



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Posible participación de Orai1 como modulador de la salida de Ca^{2+}
del Retículo Endoplásmico”**

Tesis que presenta

Ericka Martínez Martínez

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Bioquímica

Director de la Tesis:
Dr. Agustín Guerrero Hernández

México, Ciudad de México.

Agosto, 2016

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro 613981.

Contenido

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El ion calcio (Ca ²⁺) como segundo mensajero y sistemas de transporte que mantienen su homeostasis celular.....	1
1.2 La liberación de Ca ²⁺ por activación de Receptores acoplados a proteínas G (GPCR: G protein-coupled receptors, <i>por sus siglas en inglés</i>).....	2
1.3 Activación de SOCE y participación de Orai1/STIM1/TRPC1 en la corriente SOC y CRAC.....	3
1.4 Orai1.....	4
1.5 STIM.....	8
1.6 ATP e Histamina como agonistas que liberan Ca ²⁺ del RE.....	11
1.7 PKC y su participación en la movilización de Ca ²⁺	12
2. ANTECEDENTES.....	15
7.2 Transfección de células HeLa con los plásmidos MOCK, CFP-Orai1, Orai1 E106A y Orai1 S27A/S30A.....	25
7.3 Registros simultáneos de Ca ²⁺ , usando los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM.....	27
Soluciones de registro y reactivos.....	27
Indicadores fluorescentes de Ca ²⁺	27
Protocolo de incubación de los indicadores en células HeLa.....	28
Determinación de la concentración de Ca ²⁺	31
Análisis estadístico.....	34
8. RESULTADOS.....	35
8.1 La sobre-expresión de Orai1 induce un incremento en el transitorio de [Ca ²⁺] _i e inhibe el vaciamiento de [Ca ²⁺] _{RE}	36
8.2 La sobreexpresión de la dominante negativa, Orai1 E106A, inhibe el vaciamiento de [Ca ²⁺] _{RE} de una forma menos aguda que la forma nativa de Orai1.....	40
8.3 Sobre-expresar la doble mutante Orai1 S27A/S30A incrementa el transitorio de [Ca ²⁺] _i , pero no el vaciamiento del RE con ATP y TG.....	43

8.4 Gö 6976, un inhibidor específico para las PKC dependientes de Ca^{2+} , abatió la inhibición de la combinación ATP y TG, sin embargo no mostró ningún efecto para la combinación de His y TG.....	46
8.5 La combinación de His y TG inhibe el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, cuando las células se mantuvieron en un medio sin Ca^{2+}	49
8.6 La transfección de las células con una proteína Orai1 que simula estar permanentemente fosforilada (Orai1 S27E/S30E), no inhibe el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ni produce efecto en el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$	51
9. DISCUSIÓN.....	54
9. CONCLUSIÓN.....	63
10. PERSPECTIVAS.....	64
11. REFERENCIAS.....	66

RESUMEN

El ion calcio (Ca^{2+}) como un segundo mensajero, tiene un papel muy importante en la inducción de diferentes procesos celulares, los cuales son llevados a cabo mediante incrementos transitorios de la concentración de Ca^{2+} citoplásmico $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por tal motivo la célula requiere de mecanismos de liberación y remoción de Ca^{2+} , que sean finamente regulados.

En células no excitables, uno de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} es la vía denominada SOCE (Store operated-calcium entry, *por sus siglas en inglés*). Este mecanismo de influjo de Ca^{2+} es común y ubicuo en las células. Su activación requiere de la asociación de dos proteínas: STIM1 y Orai1. STIM1 es una proteína que se encuentra en la membrana del Retículo Endoplásmico (RE) y Orai1 en la membrana plasmática. Cuando los niveles de Ca^{2+} en el RE disminuyen, STIM1 se oligomeriza, permitiendo su acercamiento a la membrana plasmática, donde interacciona con los canales Orai1, activando el influjo de Ca^{2+} al citoplasma. Datos de nuestro laboratorio sugirieron que la sobre-expresión de Orai1 inhibe el vaciamiento de Ca^{2+} luminal del Retículo Endoplásmico $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, inducido por ATP y taspigargina (TG). Este mecanismo no involucró la participación de la bomba SERCA, por lo que resultó interesante dilucidar cómo se estaba llevando a cabo este nuevo papel de Orai1.

La estrategia experimental consistió en realizar registros simultáneos de Ca^{2+} citoplásmico (con fura-2) y del RE (con mag-fluo-4), sobre-expresando Orai1 e induciendo el vaciamiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ mediante dos combinaciones diferentes: ATP y TG o Histamina (His) y TG. El objetivo de utilizar dos agonistas que liberan Ca^{2+} al activar GPCR's y producir IP_3 , fue para comparar si el efecto inhibitorio depender del estímulo que se empleara. El uso de TG fue para inhibir irreversiblemente a la bomba SERCA y facilitar el vaciamiento del RE.

Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que la sobre-expresión de Orai1 nativa, inhibe el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ inducido por ATP y TG, así como por His y TG. Aunque sólo la combinación de ATP y TG puede inducir incrementos en el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y esto sugiere que los receptores purinérgicos de ATP facilitan la activación de Orai1 para incrementar la entrada de Ca^{2+} al citoplasma, un efecto que no se observa con TG. El uso de la dominante negativa de Orai1 (Orai1 E106A) demostró que la inhibición del vaciamiento del RE no depende del todo de la actividad de Orai1 como canal. Pero sí requiere de la fosforilación de los residuos S27/S30 por la PKC. La inhibición del vaciamiento del RE inducida por His y TG también requieren la fosforilación de estos residuos de serina en Orai1 pero por otra cinasa diferente a las PKC clásicas.

Todos estos datos nos permiten proponer que Orai1 limita el vaciamiento del RE por dos mecanismos diferentes, uno por permitir la entrada de Ca^{2+} vía SOCE que es capturado por la bomba SERCA y el otro por un mecanismo lento que involucra la fosforilación de los residuos de S27/S30 por diferentes tipos de cinasas y que probablemente involucra la disociación de STIM y la interacción entre el RIP_3 y el canal Orai1. Además nuestros datos sugieren que los receptores purinérgicos facilitan la activación de Orai1 por un mecanismo independiente de STIM.

ABSTRACT

Calcium (Ca^{2+}) ions function as a second messenger and they participate in the induction of different cellular processes via transient increases in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Therefore cells require mechanisms of release and removal of Ca^{2+} , both of which are tightly regulated.

In non-excitable cells, one important mechanism of Ca^{2+} entry is known as SOCE (Store operated-calcium entry). This mechanism of Ca^{2+} influx is widely present in different type of cells. Activation of SOCE involves the assembly of two proteins: STIM1 and Orai1. STIM1 is a protein which resides in the endoplasmic reticulum membrane (ER) and Orai1 in the plasma membrane. When the levels of Ca^{2+} in the ER are decreased, STIM1 is oligomerized, allowing their approach to the plasma membrane, where it interacts with Orai1 channels, activating Ca^{2+} influx to the cytoplasm. Data from our laboratory suggest that the overexpression of Orai1 inhibits the emptying of luminal Ca^{2+} from the Endoplasmic Reticulum ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$), induced by ATP and thapsigargin (TG). This mechanism does not involve the participation of SERCA pump to refill the ER store, making interesting to elucidate how Orai1 is playing this new role.

Our experimental strategy consisted of performing simultaneous recordings of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (fura-2) and the luminal ER Ca^{2+} changes (mag-fluo-4), overexpressing Orai1 and inducing the depletion of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ by two different combinations: ATP and TG or Histamine (His) and TG. The aim of using two different agonists that release Ca^{2+} by activating GPCR's and IP_3 production, was to compare whether the inhibitory effect of Orai1 is generalized effect that does not depend on the stimulus used. TG was used to irreversibly inhibit SERCA pump, which is the main mechanism for refilling the ER Ca^{2+} store by ATP hydrolysis.

Our data obtained here show that overexpression of the wild-type Orai1, inhibits the reduction of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ induced by ATP and TG, as well by His and TG. Although only ATP and TG increased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response. With the use of negative dominant of Orai1 (Orai1 E106A), we have observed that Orai1-induced inhibition of ER depletion does not totally require Orai1 to function as ion channel. But this effect depends on the phosphorylation of S27/S30 residues, which might involve PKC. Interestingly, we have observed that pre-incubation of cells with Gö 6976, which is a Ca^{2+} -dependent PKC inhibitor, did not affect the inhibition of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ depletion by the combination of His and TG. Additionally, the absence of external Ca^{2+} did not totally block the reduction of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ by His and TG. On the other hand the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ did not show any significant difference between those cells overexpressing Orai1 and cells that expressed MOCK plasmid.

Collectively these findings allow us to propose that Orai1 is limiting the depletion of the ER Ca^{2+} stores by at least two different mechanisms. The early effect involves SOCE and also a new mechanism where purinergic receptors activate Orai1 by another mechanism different to SOCE. The delayed effect of Orai1 might involve the phosphorylation of Orai1 to decrease their interaction with STIM1 and to increase association with IP_3R . Interestingly, purinergic receptors activate classical PKC to phosphorylate Orai1 while histamine receptors use another kinases different to classical PKC, whose molecular nature has not been defined y

ABREVIATURAS

SOCE	Entrada de Ca^{2+} operada por depósito
SOC	Canales de Ca^{2+} operados por depósito
CRAC	Canales activados por liberación de Ca^{2+}
I_{CRAC}	Corriente de Ca^{2+} operada por liberación de Ca^{2+}
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración de Ca^{2+} intracelular
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$	Ca^{2+} luminal del Retículo Endoplásmico
RE	Retículo Endoplásmico
NCX	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NCLX	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$
IP_3	Inositol 1,4,5-trifosfato
RIP_3	Receptor de IP_3
SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del Retículo Sarcoendoplásmico
PMCA	ATPasa de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática
TRPC	Canales de receptores de potencial transitorio
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
His	Histamina
TG	Tapsigargina
PIP_2	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
DAG	Diacilglicerol
PLC	Fosfolipasa C
PKC	Proteína cinasa C
cPKC	Proteína cinasa C clásica
nPKC	Proteína cinasa C nueva
aPKC	Proteína cinasa C atípica
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
CPA	Ácido ciclopiazónico

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El ion calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero y sistemas de transporte que mantienen su homeostasis celular.

El ion Ca^{2+} es un segundo mensajero involucrado en procesos celulares como la fertilización, secreción, contracción muscular, transcripción de genes o apoptosis, por mencionar algunos (Berridge *et al.*, 1998). Estas acciones del Ca^{2+} se deben a incrementos en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$); en condiciones de reposo el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantiene a una concentración de 100 nM aproximadamente y cuando se induce un estímulo, ésta se eleva de 500 a 1000 nM (Zayzafoon 2006), de esta manera la célula moviliza Ca^{2+} que le permite regular mecanismos de encendido y apagado de proteínas (Fig. 1.1). La razón por la cual la célula puede controlar diferentes procesos al incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debe al gran número de componentes moleculares, que sirven como herramientas de señalización por Ca^{2+} para crear perfiles de velocidad, amplitud y patrones espacio-temporales ampliamente diferentes (Berridge *et al.*, 2000).

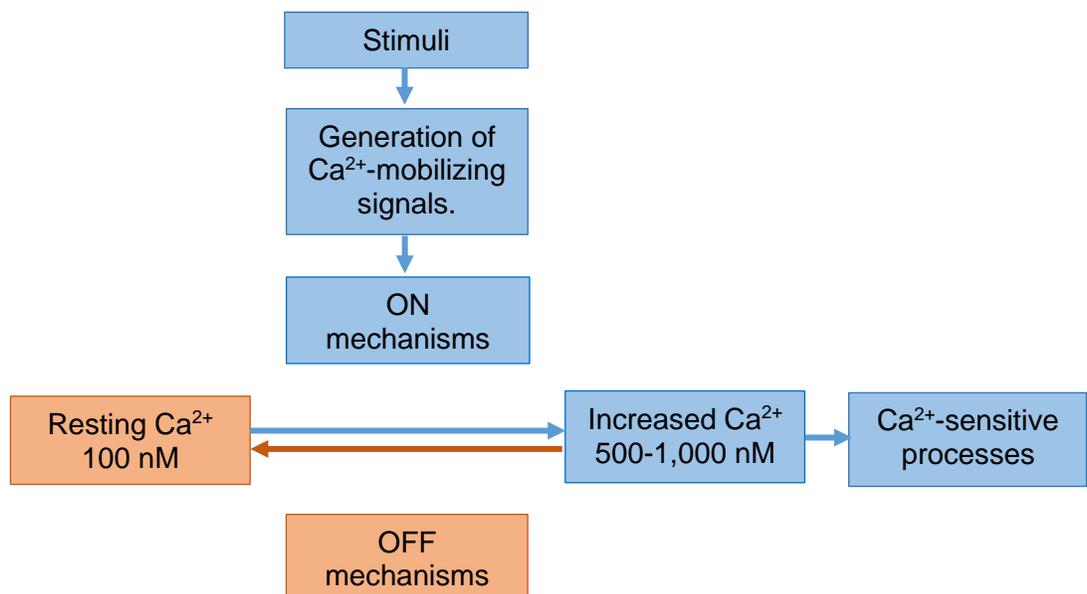


Fig. 1.1 Señalización generada por incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En condiciones de reposo la célula mantiene concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 100 nM, los estímulos generan movilización de Ca^{2+} que eleva estas concentraciones y activa diferentes vías de señalización, cuando el Ca^{2+} es removido del citoplasma estas vías son apagadas (Berridge *et al.*, 2000).

Para que la célula mantenga bajas concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones de reposo invierte mucha energía en un sistema de extrusión que saca el Ca^{2+} hacia el espacio extracelular, el cual consta de bombas como PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase, *por sus siglas en inglés*) y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX; the Na^+/Ca^{2+} exchanger, *por sus siglas en inglés*). Además el Ca^{2+} también puede ser secuestrado, en depósitos intracelulares como el retículo endoplásmico (RE) o el retículo sarcoplásmico (RS), por la bomba SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases) que reside en la membrana de este organelo (Brini & Carafoli 2011). En la Fig 1.2 se ilustran los flujos de extrusión de Ca^{2+} de la célula, nótese que el gradiente de concentración de Ca^{2+} entre el espacio extracelular (10^{-3} M) y el citoplasma (10^{-7} M) es de 10,000 veces.

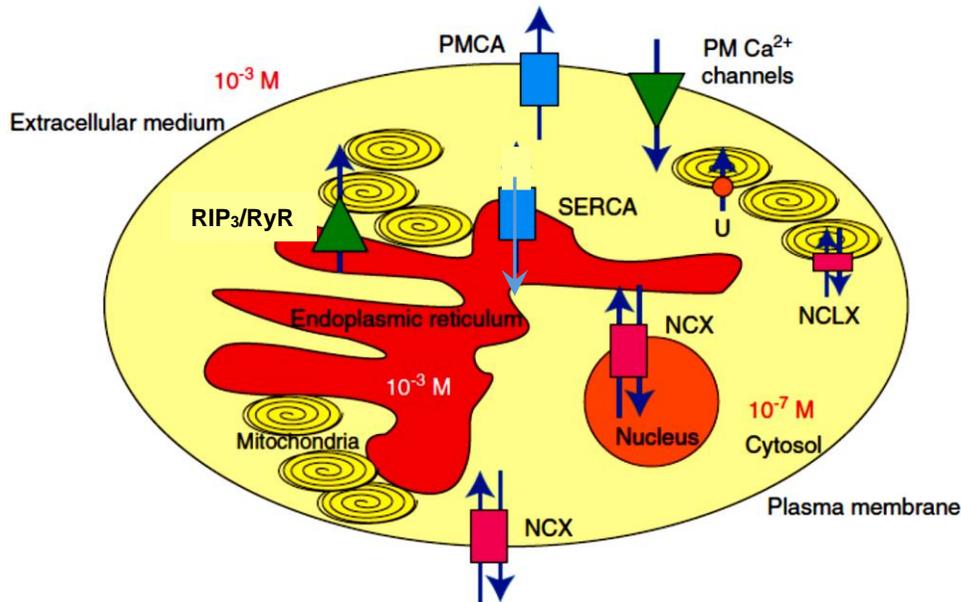


Fig. 1.2 Representación esquemática de los flujos de Ca^{2+} y los componentes celulares que mantienen la homeostasis del Ca^{2+} . El esquema ilustra los flujos de Ca^{2+} y los sistemas que participan en la homeostasis celular, tales como: las ATPasas de Ca^{2+} (PMCA y SERCA), los intercambiados Na^+/Ca^{2+} (NCX) o los intercambiadores Na^+/Ca^{2+} y Li^+/Ca^{2+} (NCLX), los receptores liberadores de Ca^{2+} (RIP₃ y RyR) y el uniportador mitocondrial (U). Tomado y modificado de Brini y Carafoli (2011).

1.2 La liberación de Ca^{2+} por activación de Receptores acoplados a proteínas G (GPCR: G protein-coupled receptors, *por sus siglas en inglés*).

En células no excitables los incrementos de Ca^{2+} provienen de dos fuentes principalmente: el espacio extracelular y el RE, la liberación de Ca^{2+} de este último ocurre al activar algunos GPCRs, en particular aquellos que se acoplan a las

proteínas del subtipo $G_{q/11}$, lo que resulta en la activación de la fosfolipasa C (PLC: phospholipase C, *por sus siglas en inglés*), que escinde el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂: phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate, *por sus siglas en inglés*) presente en la cara interna de la membrana plasmática en dos moléculas diferentes: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃: 1,4,5-inositol trisphosphate, *por sus siglas en inglés*) y el diacilglicerol (DAG: diacylglycerol, *por sus siglas en inglés*). El IP₃ activa al receptor de IP₃ (RIP₃), que se localiza principalmente en la membrana del RE (Berridge, 19393), aunque también hay evidencia de que el aparato de Golgi es sensible al IP₃ (Pinton *et al.*, 1998). La activación del RIP₃ provoca la liberación de Ca²⁺ hacia el citoplasma y el subsecuente vaciamiento del RE, esto último resulta en la activación de la entrada capacitativa o SOCE (store-operated calcium entry, *por sus siglas en inglés*).

1.3 Activación de SOCE y participación de Orai1/STIM1/TRPC1 en la corriente SOC y CRAC.

SOCE es un mecanismo común y ubicuo que regula los influjos de Ca²⁺ en diferentes tipos celulares, el primero en proponer este modelo fue Putney (1986), con base en antecedentes experimentales donde se había observado que cuando se inducía el vaciamiento de los depósitos intracelulares con agonistas, había una entrada de Ca²⁺ sostenida del medio extracelular que permitía reestablecer los niveles de Ca²⁺ dentro del retículo endoplásmico, Putney propuso que el vaciamiento del RE mediado por IP₃ producía una señal para inducir la entrada de Ca²⁺. Sin embargo la naturaleza molecular por la que podría haber comunicación entre la membrana del RE y la membrana citoplásmica se mantuvo sin dilucidar durante 20 años.

Las primeras pruebas experimentales directas del modelo de entrada capacitativa fueron realizadas por Hallam *et al.* (1989), ellos determinaron que el vaciamiento de depósitos intracelulares activó la entrada de Ca²⁺ por un mecanismo independiente de receptores o inositol fosfato. Al vaciar los depósitos intracelulares

con estímulos repetitivos de agonista en un medio sin Ca^{2+} se provocó un gran influjo cuando este ion se adicionó al medio extracelular, fenómeno que ahora caracteriza la entrada capacitativa. Bloquear la bomba SERCA con tapsigargina (TG), ácido ciclopiazónico, 2,5-di-t-butil-1,4-benzohidroquinona o por perfusiones prolongadas en solución sin Ca^{2+} , también provoca un gran influjo cuando se adiciona Ca^{2+} al medio extracelular. Estos datos en conjunto demostraron que para activar SOCE sólo se requería vaciar los depósitos intracelulares y no era necesaria la participación de segundos mensajeros generados por la activación de receptores por agonistas (Holda *et al.*, 1998).

SOCE ha sido asociado con dos tipos de canales: los canales CRAC (Calcium-release-activated Calcium, *por sus siglas en inglés*) que dependen de la interacción de las proteínas Orai1 y STIM1 (stromal interaction molecule, *por sus siglas en inglés*), así como los canales SOC (store-operated Ca^{2+} channel, *por sus siglas en inglés*) que además de Orai1 y STIM1, también involucran al canal TRPC1 (transient receptor potential channels, *por sus siglas en inglés*). Mientras que los canales TRPC1 contribuyen significativamente a la entrada de Ca^{2+} , estos canales son catiónicos no selectivos para Ca^{2+} , la ausencia de Orai1 elimina la función de SOCE y la activación de los TRPC1, sugiriendo que la activación de TRPC1 es secundaria a la activación de los canales Orai1. La corriente I_{SOC} es activada en respuesta a la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]$ de los depósitos intracelulares y está compuesta por una corriente catiónica no selectiva mediada por TRPC1/STIM1 y una corriente CRAC (I_{CRAC}) mediada por Orai1/STIM1, esta última fue detectada con shTRPC1 o con una mutante de STIM1 que no tiene el “gating” TRPC1, dominio que STIM necesita para activar estos canales (Cheng *et al.*, 2011).

1.4 Orai1.

La proteína Orai1 se localiza en la membrana plasmática y es la subunidad formadora del poro de los canales CRAC, constituye una familia de canales iónicos altamente conservados, tiene una arquitectura particular y mecanismo de unión a Ca^{2+} que le permiten ser altamente selectivos a estos iones. En condiciones fisiológicas, la concentración de Ca^{2+} es de alrededor de 1.8 mM, los canales CRAC

seleccionan el Ca^{2+} sobre los cationes monovalentes en una relación mayor de 1000:1, haciéndolo uno de los canales más altamente selectivos para Ca^{2+} . Pero en un medio sin cationes divalentes, los canales CRAC permiten el paso de cationes monovalentes, como son el K^+ y el Na^+ (Hou *et al.*, 2012) .

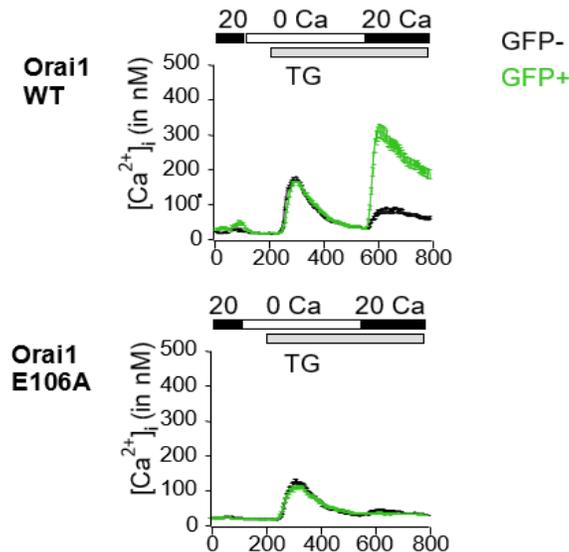
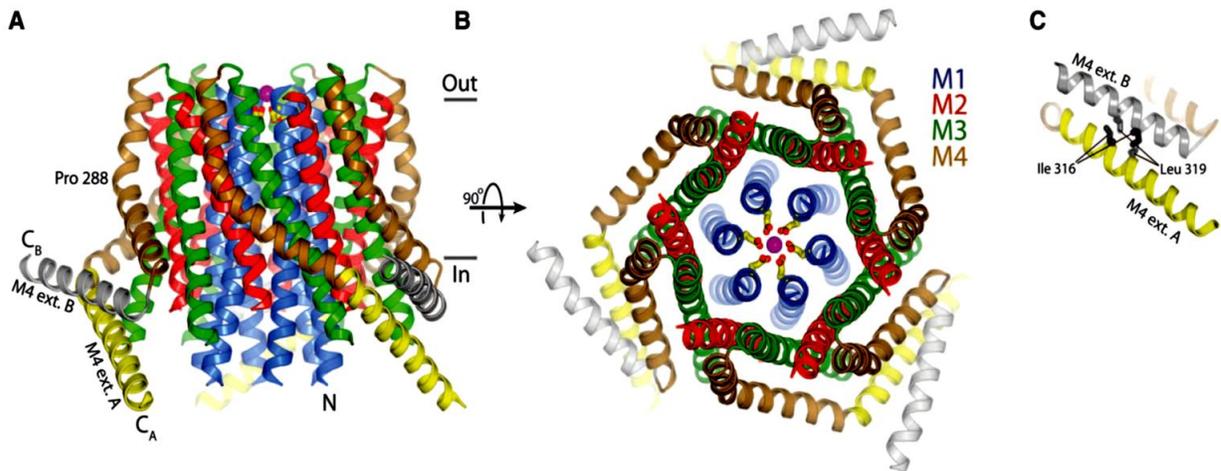


Fig. 1.3 Influxo de Ca^{2+} en células que expresan una proteína Orai1 que no funciona como canal. Las células SCID control (registro negro) no pueden permear eficientemente Ca^{2+} debido a una mutación puntual del canal Orai1, cuando este ion es incorporado al medio. Por otro lado la transfección de estas células con Orai1 (células positivas a GFP, registro verde) restauró el influxo de Ca^{2+} . La mutante Orai1 E106A no muestra ningún influxo de Ca^{2+} , debido a que este glutamato es esencial para el reconocimiento del Ca^{2+} por este canal (Prakriya *et al.*, 2006).

Los canales CRAC al igual que los canales de Ca^{2+} operados por voltaje tienen alta selectividad por Ca^{2+} debido a que este ion se une a iones glutamato del poro del canal, esta situación a su vez bloquea la entrada de cationes monovalentes porque estos no cuentan con la energía cinética suficiente para desplazar el Ca^{2+} de su sitio de unión. Se ha determinado que se necesita una concentración de 4-20 μM de Ca^{2+} para bloquear la mitad de los canales. Con experimentos de mutaciones puntuales se demostró que el glutamato en la posición 106 (E106) es el residuo responsable de la selectividad del canal, su carga negativa forma una especie de jaula electrostática que permite “atrapar” el Ca^{2+} en el centro del poro. Con registros de Patch Clamp se evaluó el efecto que tendría cambiar este residuo por aspartato, un aminoácido igualmente de carga negativa, la mutante Orai1 E106D mostró que en un medio sin iones divalentes, permeaba perfectamente los

cationes monovalentes. Cuando se adicionó el Ca^{2+} al medio, se necesitó una concentración de $220 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} para que se bloqueara la corriente debida a los cationes monovalentes, mostrando que la mutación E106D hacía que Orai1 perdiera 10 veces su selectividad por Ca^{2+} , así mismo demostraron que la mutación de este residuo por alanina (Orai1 E106A), expresaba una proteína Orai1 que no permeaba Ca^{2+} al citoplasma (Fig. 1.3), perdiendo totalmente su función como canal (Prakriya et al. 2006).

Fig. 1.4 Arquitectura de la proteína Orai1. (A) Estructura cuaternaria del canal Orai1, mostrando las subunidades que conforman el hexámero, cada una se compone de cuatro hélices M1 (azul), M2 (rojo), M3 (verde), M4 (café) y las extensiones de M4 (subunidad A y B representadas en amarillo y gris, respectivamente). (B) Vista del canal desde el lado externo, la hélice M1 es la que contiene el E106 que forma el filtro de selectividad del canal e interacciona con los iones Ca^{2+} . (C) Interacción de las extensiones de M4. (Hou et al., 2012)



La Fig. 1.4 muestra la arquitectura del canal Orai1 de *Drosophila melanogaster* que se obtuvo de estudios cristalográficos, donde se encontró que a diferencia de la mayoría de los canales que están formados por 4 subunidades, éste se compone de seis unidades organizadas alrededor de un eje central, cada subunidad contiene cuatro α hélices transmembrana (M1 a M4). La hélice M1 (residuos 144 a 157) no hace contacto con otras partes del canal en su estructura, por lo que probablemente podría interactuar con factores celulares como STIM. Se propone que la hélice M2 y M3 ayudarían a proveer integridad estructural a la región transmembranal y permitir ensanchamiento de la región intracelular del poro. La hélice M4 es la que se localiza más lejos del poro iónico y su ubicación periférica podría permitir movilidad, además tiene una extensión que cuenta con una región

de bisagra altamente conservada, la cual está compuesta de las subunidades A y B con un arreglo serpentín-serpentín (coiled-coil) antiparalelo. La interacción de la hélice M4 y las extensiones M4 involucra la interacción con los residuos Ile³¹⁶ y Leu³¹⁹ que forman un parche hidrofóbico (Hou *et al.*, 2012).

En las células de vertebrados se expresan tres diferentes canales Orai (González-Cobos *et al.* 2013), el canal Orai1 está claramente involucrado en establecer la entrada de Ca²⁺ a nivel de la membrana plasmática en respuesta al vaciamiento del retículo endoplásmico, por intermediación de la proteína STIM (como se verá más adelante). Por otro lado se desconoce las funciones de los canales Orai2 y Orai3. Se ha observado que la sobreexpresión de estos dos canales también puede producir I_{CRAC}, aunque de forma mucho menos eficiente que Orai1 (Hoth & Niemeyer, 2013; DeHaven *et al.*, 2007) se piensa entonces, que estos canales son “respaldos” de Orai1. Sin embargo esto parece poco probable. La gran mayoría de Orai2 se localiza en compartimentos intracelulares y se encontró que este canal es capaz de regular la concentración luminal de Ca²⁺ en el RE (Mercer *et al.* 2006). En el caso de Orai3 se ha encontrado que se distribuye principalmente en el RE (Amcheslavsky *et al.*, 2013) y que puede estar involucrado en la liberación de calcio inducida por el factor de crecimiento VEGF (Li *et al.* 2015) y que se sobre-expresa en células tumorales. Esto sugiere que Orai3 tiene una función en el RE, pero no está claro cuál sería esta misma. También se ha reportado que heteromultímeros de Orai1 y Orai3 forman canales que responden al ácido araquidónico, por un mecanismo independiente de STIM (Mignen *et al.*, 2008), pero de nuevo no está claro que esta sea la función primordial de Orai3 y además se ha propuesto que Orai3 requiere de Orai1 para llegar a la membrana plasmática y por lo mismo no sabemos si estos heteromultímeros son fisiológicos o debidos a la sobreexpresión de dichos canales. El canal Orai1, y también el canal Orai2, presentan una inactivación por Ca²⁺ citoplásmico muy importante, lo cual no es tan evidente en el canal Orai3 (DeHaven *et al.* 2007). Esto impide que la corriente I_{CRAC} inunde con Ca²⁺ al citoplasma, al parecer esta inactivación depende de su interacción con STIM (Derler *et al.*, 2016). Estos datos sugieren que Orai1 y en

cierto grado Orai2, están involucrados en la entrada capacitativa y que Orai3 tendría una función diferente a los otros canales.

1.5 STIM.

STIM es una proteína de un solo pase transmembranal, el extremo amino terminal se encuentra en la luz del RE, y el extremo carboxilo terminal en el citoplasma y cumple funciones como regulador de la entrada de Ca^{2+} . En el lumen del RE, STIM cuenta con un dominio mano EF que funciona como sensor del Ca^{2+} luminal del RE y un dominio SAM (sterile α -motif). La porción citoplásmica tiene tres dominios conservados coiled-coil (CC) y un dominio de polilisinas que le permiten interactuar con los fosfolípidos PIP_2 que tienen carga negativa. Además contiene el dominio SOAR o CAD que activa SOCE (Lee *et al.*, 2010). En vertebrados se expresan dos homólogos; STIM1 y STIM2, en la Fig. 1.5 se muestra los diferentes dominios que componen los dos homólogos de STIM en *Homo sapiens*, variaciones de “splicing” muestran una proteína larga de STIM1 (STIM1 long; STIM 1 L) y una proteína STIM1 más corta que tiene carácter de dominante. STIM1 se expresa de forma ubicua en los seres humanos, y STIM1 L se encuentra únicamente en músculo esquelético. Por otra parte, STIM2 codifica para 87 residuos adicionales, y se ha sugerido que esta región constituye un péptido señal necesario para la localización apropiada en el RE de las proteínas STIM2 (Stathopoulos & Ikura 2013). STIM2 tiene la característica de que su mano EF tiene una menor afinidad por Ca^{2+} (~ 500 μM) que STIM1 (~ 200 μM), lo cual sugiere que STIM2 está involucrado en mantener el retículo lleno de Ca^{2+} y STIM1 en el relleno después del vaciamiento por agonistas (Prakriya & Lewis, 2015).

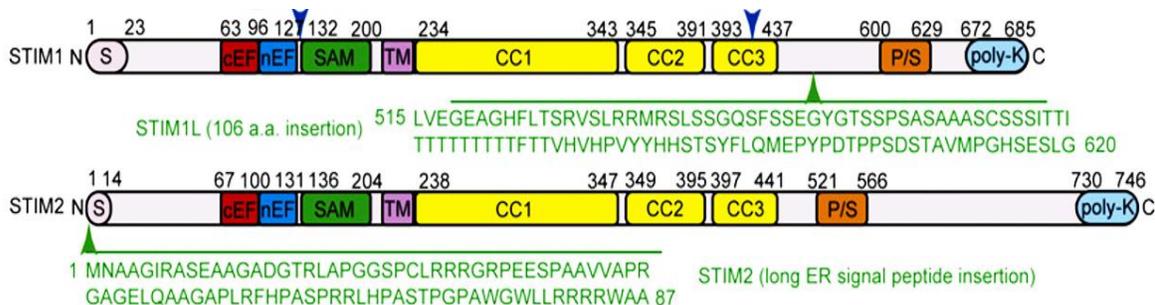


Fig. 1.5 Dominios de los dos homólogos de STIM en *Homo sapiens*. El dominio cEF representa el dominio mano-EF canónico; nEF, dominio mano-EF no canónico; SAM, motivo α estéril; TM, región transmembranal; CC1, dominio Coiled-coil putativo; CC2 y CC3, dominio Coiled-coil CC2 y CC3; P/S, región rica en Pro/Ser; poly-K, región rica en Lys; N, amino terminal y C, carboxilo terminal (Stathopoulos & Ikura, 2013).

Para demostrar que STIM1 y STIM2 son requeridas para llevar a cabo la entrada de Ca^{2+} a través de la vía SOC, se realizaron experimento en células HeLa transfectadas con los siRNAs de STIM1 y STIM2 y se indujo el vaciamiento del depósito con Histamina (His) y TG en un medio sin Ca^{2+} (Fig. 1.6), lo que provocó que hubiera una supresión significativa del influjo de Ca^{2+} respecto a las células control. Estos datos sugirieron que la proteína STIM1 tiene un papel clave en el influjo de Ca^{2+} mediado por la corriente SOC (Liou *et al.*, 2005).

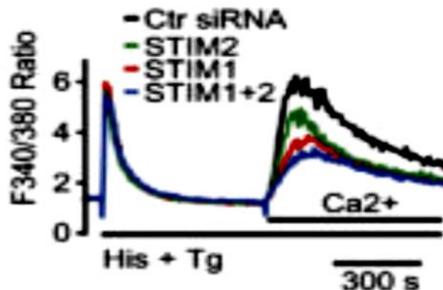


Fig. 1.6 Los siRNAs de STIM1 y STIM2 suprimen el influjo SOC. El registro muestra que cuando se transfecta a las células HeLa con los siRNAs de STIM1 y STIM2 y se induce el vaciamiento de los depósitos con His más TG, en un medio sin Ca^{2+} , se suprime el influjo de Ca^{2+} por medio de la vía SOC, cuando éste es incorporado al medio extracelular (Liou *et al.*, 2005).

De forma paralela la sobre-expresión de la proteína STIM1 provocó un incremento en el influjo basal de Ca^{2+} y éste pudo ser bloqueado con SKF 96365, un inhibidor del influjo SOC. La forma en la que STIM1 regula el influjo SOC es a través de su dominio mano-EF, que se encuentra hacia el lado luminal del RE.

Cuando detecta disminución en los niveles basales de Ca^{2+} empieza a formar agregados que le permiten acercarse a la proteína Orai1 y reclutarla para formar los canales SOCE. Mutaciones en este dominio mostraron que STIM1 incrementaba el influjo de Ca^{2+} , incluso en depósitos llenos y su ineficiencia para llevar a cabo influjos de Ca^{2+} en células que se había inducido el vaciamientos de los depósitos (Liou *et al.*, 2005).

En la Fig. 1.7 se representa la forma en la que STIM1 interacciona con Orai1, cuando la célula se encuentra en reposo STIM1 se distribuye uniformemente en la membrana del RE. Al inducir el vaciamiento de Ca^{2+} del RE, STIM1 lo detecta mediante su dominio mano-EF que se localiza del lado luminal del RE y empieza a oligomerizarse con otras proteínas STIM1, los oligómeros de STIM1 migran de una forma yuxtapuesta entre la membrana del RE y la membrana citoplásmica, reclutando a Orai1 al interaccionar con el carboxilo del lado citoplásmico de esta proteína. Se ha sugerido que STIM1 interacciona con las α hélices M1 de Orai1, permitiéndole abrir el poro donde se encuentra el Ca^{2+} adosado, y se encuentran en una relación estequiométrica Orai1: STIM1 (1:2) (Hogan *et al.*, 2010).

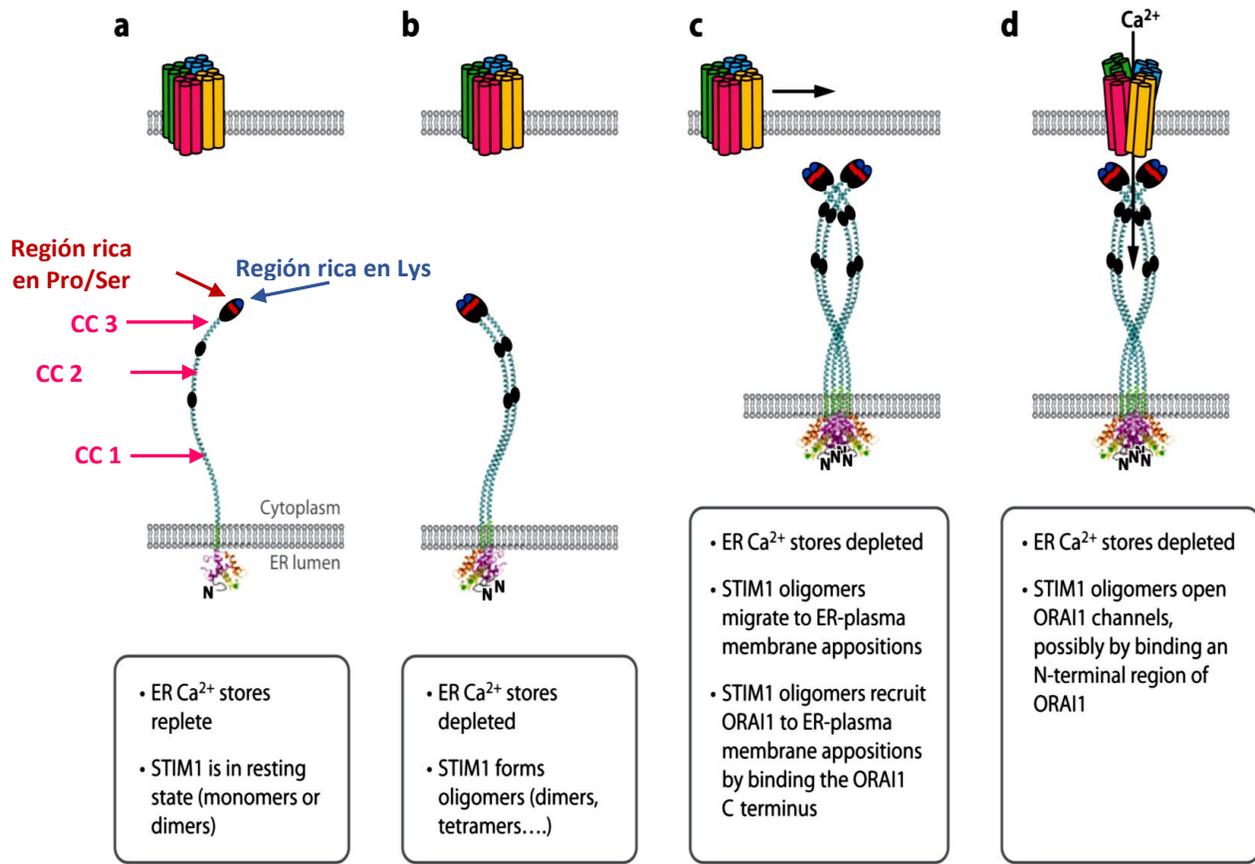


Fig. 1.7 Diagrama esquemático que representa los eventos que llevan a cabo SOCE. (A) Representación de Orai1 y STIM1 en reposo, estudios de electrofisiología han evidenciado que los canales Orai1 se pueden ensamblar como tetrámeros, la proteína STIM1 muestra sus dominios. (B) La disminución de los niveles basales de Ca²⁺ del RE promueven la oligomerización de STIM1. (C) STIM1 forma puntas que permiten su acercamiento a la membrana citoplásmica. (D) La interacción STIM1/Orai1 forma los canales SOCE que permiten la entrada de Ca²⁺ del lado extracelular al citoplasma. (Hogan *et al.*, 2010).

1.6 ATP e Histamina como agonistas que liberan Ca²⁺ del RE.

Cuando se comparó la liberación de Ca²⁺ inducida por His y ATP en línea celular de hámster, los registros mostraron diferentes perfiles en el incremento de [Ca²⁺]_i, por lo que se sugirió que podría estar siendo liberado de diferentes depósitos intracelulares, (Den *et al.*, 1992), sin embargo cuando se realizaron registros en células epiteliales de cristalino humano, se observó que la adición de TG provocaba un pequeño incremento adicional de [Ca²⁺]_i tanto para las células estimuladas con ATP como con His. La diferencia se justificó por las condiciones experimentales, los registros en línea celular de hámster se realizaron en población de células mientras que los registros en células de cristalino humano fueron realizados en

células individuales, por lo que las diferencias observadas en los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$, podrían ser por la distribución heterogénea de los receptores de cada célula, en lugar de que se tratara de diferentes depósitos (Riach *et al.*, 1995).

Se ha reportado que las vías de señalización por Ca^{2+} mediadas por ATP e His tienen un papel importante en la regulación de las funciones celulares, al producir incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$, que favorecen procesos biológicos. La liberación de Ca^{2+} por ATP es llevada a cabo mediante los receptores purinérgicos que se encuentran localizados en la superficie de la membrana citoplásmica y pertenecen al grupo de receptores purinérgicos P2, tales como P2Y₁ y P2Y₂ (Yamamoto *et al.* 2000). Esta clasificación está basada en su estructura molecular y el mecanismo de transducción de señales. Los receptores P2Y están acoplados a proteínas G, y cuando el ATP se une a éstos, les provoca cambios conformacionales que activan a la proteína efectora α_{q11} que a su vez activa a la PLC β , la cual termina escindiendo PIP₂ en DAG e IP₃. El DAG permanece en la membrana plasmática y puede activar a las cinasa C de proteínas (PKC). El IP₃ activa al RIP₃, que se encuentra en la membrana del RE y lo cual resulta en la liberación de Ca^{2+} del retículo al citoplasma (Roberts *et al.* 2006).

Por otra parte el receptor de histamina H1 (H1HR) es un receptor que también pertenece a la súper familia de GPCRs, y regula numerosas funciones celulares, llevando a cabo un mecanismo de liberación de Ca^{2+} del RE muy parecido al de ATP, sin embargo se ha demostrado que la His induce un vaciamiento menor de este depósito, además se demostró que efectivamente ambos agonistas liberaban Ca^{2+} del RE cuando al inducir el vaciamiento con ATP o His, seguido de TG u otro agonista, en un medio sin Ca^{2+} , ya no mostró un vaciamiento adicional (Riach *et al.* 1995).

1.7 PKC y su participación en la movilización de Ca^{2+} .

La familia de las PKC's son un conjunto de proteínas que transduce diferentes vías de señalización, su estructura es de un polipéptido, conformado de una región N-terminal regulatoria (de 20-40 kDa, aproximadamente) y una región C-terminal catalítica (de 45 kDa, aproximadamente). La Fig. 1.8 muestra la estructura de las diferentes isoformas de PKC, tienen cuatro dominios conservados (C1-C4); el dominio C1 contiene un motivo rico en Cys, que está de forma duplicada en la mayoría de las isoenzimas y que forman el sitio de unión a DAG, el dominio C2 contiene el sitio de reconocimiento de lípidos ácidos y en algunas isoenzimas, los sitios de unión a Ca^{2+} . Los dominios C3 y C4 forman los lóbulos de unión a sustrato y a ATP localizados en el centro de la cinasa (Nishizuka 1995).

La familia de PKC está formada por tres grupos diferentes, clasificación que está basada en la estructura y regulación funcional de las diferentes cinasas. Las primeras que se descubrieron son las PKCs clásicas (cPKC), éstas se distinguen porque su función está regulada por DAG (unido en dominio C1) y por Ca^{2+} , que se une al dominio C2, el cual se ha constituido en el paradigma de todas aquellas proteínas cuya unión a membranas depende de un incremento de Ca^{2+} . El segundo grupo se compone de las PKCs nuevas (nPKC), éstas son estructuralmente similares a las cPKC, con la diferencia que el dominio C2 no es funcional y por lo mismo sólo se activa en respuesta al DAG que se une al dominio C1. El último grupo comprende a las PKCs llamadas atípicas (aPKC), éstas difieren significativamente en su estructura de los dos grupos anteriores; las aPKC sólo tienen un motivo rico en Cys, no dos como las cPKC y nPKC (ver Fig. 1.8), además los residuos que mantienen el dominio C2 parecen no estar presentes y se piensa que se activan por interacción con otras proteínas. La actividad de cinasa de las PKCs está regulada por dos mecanismos diferentes: el primero, al igual que otras cinasas, involucra una serie de fosforilaciones que permiten que la enzima sea catalíticamente competente, así como su correcta alineación de residuos para poder ser localizada en el citoplasma y el segundo sistema de regulación se debe a la unión de sus ligandos según sea el caso, ya sea Ca^{2+} y DAG o sólo DAG (Newton 1995).

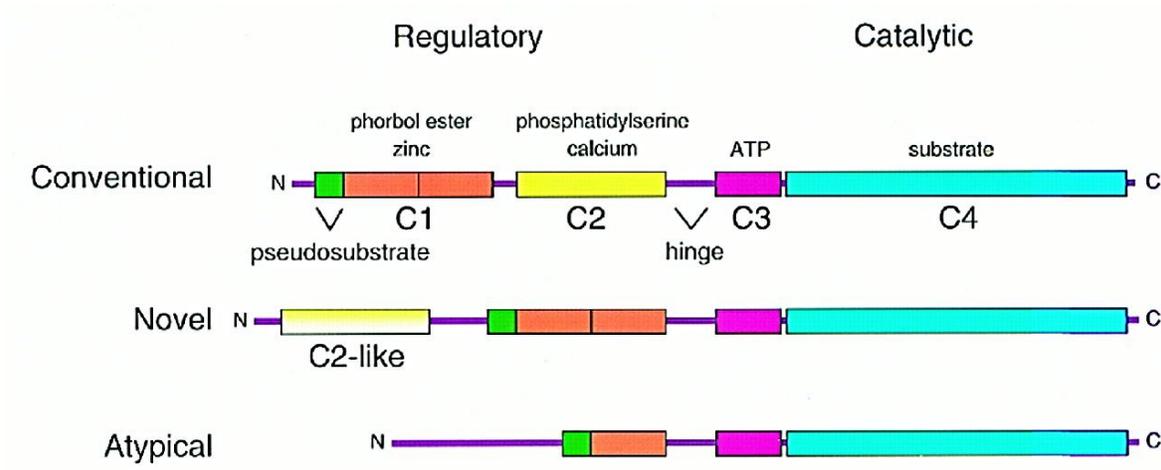


Fig. 1.8 Representación de la estructura primaria, que muestra la actividad regulatoria y catalítica de una cPKC, nPKC y aPKC. cPKC cuentan con un dominio de regulación para DAG y Ca^{2+} ; nPKC no cuentan con los residuos involucrados en la unión de Ca^{2+} , por lo que sólo se activan con DAG; aPKC no cuentan con los dominios para ser regulada por Ca^{2+} , y no responde a DAG (Newton, 1995).

2. ANTECEDENTES

En estudios utilizando células de leucemia basofílica de rata (RBL-2H3) se observó en registros de Patch-clamp, una inactivación de la I_{CRAC} en presencia de ATP, lo que llevó a pensar que podría ser el reflejo de una fosforilación mediada por cinasas (Fig. 1a), para demostrar esta hipótesis sustituyeron el ATP por ATP[γ S], un análogo que puede ser usado por cinasas, pero que resulta en una fosforilación relativamente resistente a la hidrólisis, lo que resultaría en una fosforilación irreversible y por lo tanto una inactivación mayor de la I_{CRAC} . Las células se dializaron con 2 mM de ATP[γ S], los resultados de este experimento confirmaron la inactivación casi completa de la corriente de Ca^{2+} . Con la finalidad de determinar qué tipo de cinasa estaría participando, usaron diferentes inhibidores convencionales y determinaron que la PKC podría estar modulando esta inactivación, debido a la recuperación que presentaba la I_{CRAC} en presencia de estaurosporina, un inhibidor inespecífico de la PKC, además este efecto era favorecido por el uso de bisindolylmaleimide, el cual es un inhibidor más selectivo para las PKC, de forma paralela el uso de PMA (Phorbol myristate acetate, *por sus siglas en inglés*), un activador de las PKC, favorecía la inactivación de la I_{CRAC} (Fig. 1b) (Parekh & Penner 1995).

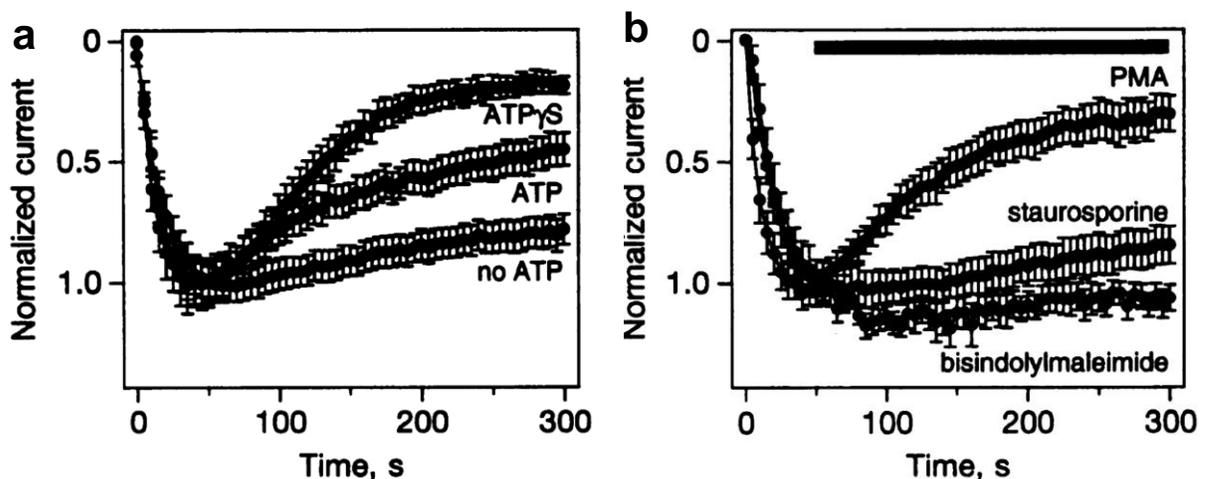


Fig. 2.1 Inactivación de la I_{CRAC} por la PKC. (A) El ATP (2 mM) inactiva la corriente I_{CRAC} , cuando éste es sustituido por su análogo relativamente no defosforilable, ATP[γ S] (2 mM) se inactiva permanentemente la I_{CRAC} . (B) Incubar a las células por 50 s con PMA (100 nM), estaurosporina (2 μ M) y bisindolylmaleimide (500 nM), mostró que la cinasa responsable de la inactivación podría ser PKC (Parekh & Penner, 1995).

Más tarde Curtis *et al.* (2003) evaluó en arteriolas de retina de rata con diabetes ya desarrollada, la influencia que podría tener esta alteración metabólica en el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje o los canales SOCE, demostrando que la entrada de Ca^{2+} a través de la vía SOCE fue la única afectada y PKC era la cinasa responsable. Con el uso de fura-2/AM realizaron registros de Ca^{2+} donde observaron que el influjo de este ion disminuía respecto a las arteriolas de retina de ratas no diabéticas. Además observaron que al inducir el vaciamiento de los depósitos en microvasos de retina, con un medio sin Ca^{2+} y en presencia de CPA (CPA; cyclopiazonic acid, *por sus siglas en inglés*), el influjo de Ca^{2+} citoplásmico se inhibía significativamente cuando los microvasos eran pre-incubados con PMA durante 10 min (Fig. 2.1).

Estos datos sugirieron que PKC modulaba negativamente el influjo de Ca^{2+} llevado a cabo a través de la vía SOCE, sin embargo la identidad molecular de las proteínas blanco de la PKC se desconocían en ese momento.

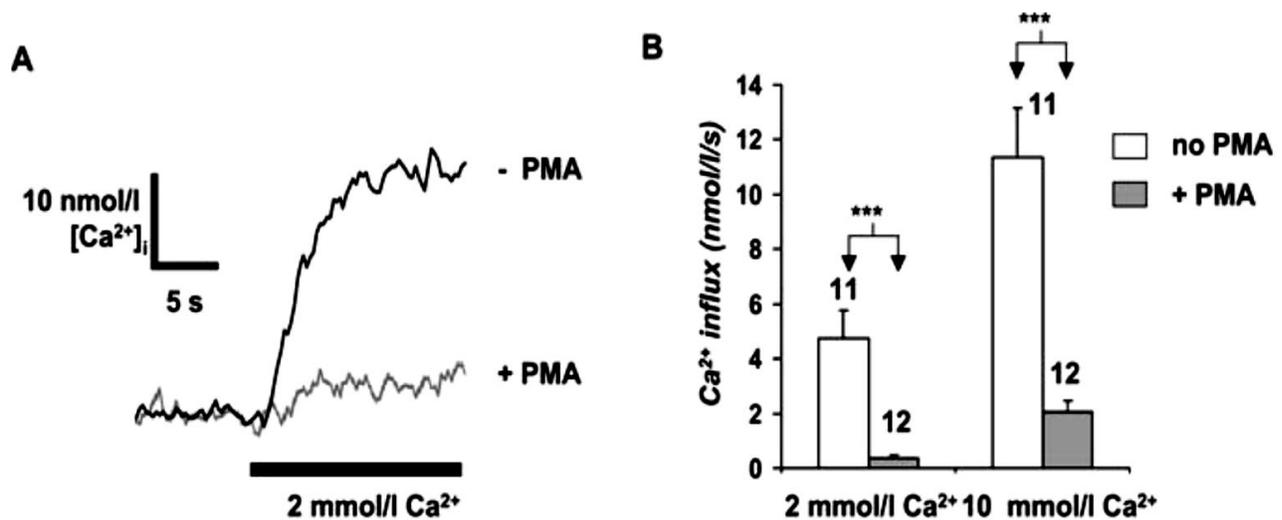


Fig. 2.2 Pre-incubar con PMA los microvasos disminuye el influjo de Ca^{2+} . (A) En microvasos de retina se indujo el vaciamiento de los depósitos con CPA (una micotoxina que vacía los depósitos de Ca^{2+}) y un medio sin Ca^{2+} . Los microvasos que fueron pre-incubados durante 10 min con PMA (100 nM), mostraron una menor entrada de Ca^{2+} vía SOCE, cuando este ion es incorporado al medio. (B) El gráfico muestra la inhibición en la entrada de Ca^{2+} , cuando los microvasos son pre-incubados con PMA, a diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular, lo que sugiere la participación de PKC como modulador negativo de SOCE. *** $p < 0.001$ (Curtis *et al.*, 2003).

Con la finalidad de determinar el blanco de PKC Kawasaki *et al.* (2010) observó en células HEK 293 que al inducir el vaciamiento del RE con TG, las PKC β se translocaban a la periferia celular, sugiriendo a esta isoforma podría estar participando en SOCE. El mecanismo molecular fue identificado mediante experimentos de fosforilación *in vitro* de Orai1, Orai2 y Orai3. Este grupo demostró que Orai1 fue significativamente más fosforilado que Orai2 y Orai3, así como una dependencia de Ca²⁺ y DAG. Con el servidor NetPhos2.0 predijeron los sitios de fosforilación de Orai1, en los cuales realizaron mutaciones puntuales por alanina, que no puede ser fosforilada, y evaluaron el impacto en SOCE.

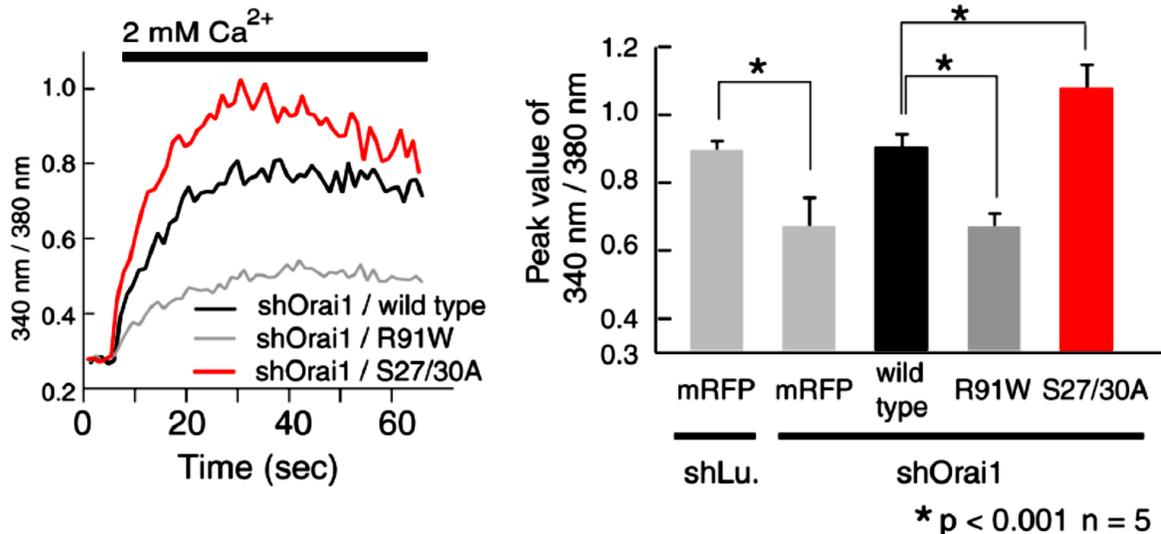
Los experimentos con la doble mutación S27A/S30A abatieron la fosforilación de Orai1, lo que sugería que PKC preferentemente fosforila estos residuos. Para corroborar que S27/S30 son el blanco de PKC *in vivo*, transfectaron Orai1 silvestre y la doble mutante Orai1 S27A/S30A en células HEK 293, cuando realizaron registros de Ca²⁺ observaron un incremento en la [Ca²⁺]_i en las células que expresan una proteína Orai1 que no puede ser fosforilada (Fig. 2.3). Además con registros de Patch Clamp demostraron que Orai1 S27A/S30A no cambió la I_{CRAC}, ellos sugirieron que PKC β probablemente estaría regulando la compuerta de los canales SOC y no la selectividad por Ca²⁺.

En conjunto todos estos datos demostraron la participación de PKC como regulador negativo de SOCE en diferentes líneas celulares sin determinar el efecto celular de fosforilar a Orai1 en los residuos S27/S30.

Existe evidencia de que al estimular a las células con agonistas, se promueven cambios dinámicos en algunas proteínas que participan en la señalización por Ca²⁺, haciendo estos mecanismos de regulación altamente complejos. Por ejemplo el DAG tiene efectos en los canales TRPC3 a través de PKC, así como PKC es un poderoso inhibidor de muchos canales TRPC. De esta forma el DAG tiene un papel regulador dual sobre los canales TRPC3 (Flockerzi & Nilius 2007). En otro estudio se observó que los TRPC3 regulan la función del RIP₃, al mediar su interacción con la proteína de andamiaje RACK1 (Bandyopadhyay *et al.* 2008), haciendo

interesante conocer el papel funcional de estas interacciones. La participación secundaria de los TRPC en SOCE y la aparente regulación de Orai1 en estos canales para que sean activados, han sugerido que podría haber un mecanismo regulatorio que involucre una interacción directa entre Orai1 y el RIP_3 .

Fig. 2.3 Orai1 S27A/S30A incrementa la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. Las células fueron transfectadas con



Orai1 S27A/S30A, Orai1 R91W y Orai1 silvestre. Cuando el Ca^{2+} fue reincorporado al medio extracelular, las células Orai1 S27A/S30A mostraron una mayor entrada de Ca^{2+} vía SOCE respecto a las que expresaban Orai1 silvestre. La mutante Orai1 R91W expresa un canal Orai1 que no tiene corriente, por lo que no hay entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular al citoplasma (Kawasaki et al. 2010).

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación Woodard *et al.* (2010) demostró que en células HeLa y HEK 293 hay interacción entre Orai1 y el RIP_3 sin necesidad de ningún estímulo, además ésta se ve favorecida cuando se estimulaba a las células con ATP. En este trabajo sugirieron que los TRPC3 median la interacción entre Orai1 y el RIP_3 , debido a que el silenciamiento de estos receptores disminuyó la entrada de Ca^{2+} en células estimuladas con ATP, interesantemente este efecto no se observa cuando las células son estimuladas con TG, por lo que es un mecanismo dependiente de agonista, no afecta la entrada de Ca^{2+} vía SOCE y es dependiente de la isoforma del RIP_3 . El efecto celular de la interacción entre Orai1 y el RIP_3 I no está claro, sin embargo con el uso de BAPTA, un quelante de Ca^{2+} intracelular, mostró que es dependiente de Ca^{2+} citoplásmico, sugiriendo que podría estar participando una cinasa dependiente de Ca^{2+} (Fig. 2.4).

En nuestro modelo celular resulta interesante saber si la asociación entre el RIP_3 y $Orai1$ podría tener un efecto regulador en el vaciamiento de Ca^{2+} por inhibir directamente el vaciamiento luminal del RE y no por otro mecanismo, así como la posible participación de las PKC dependientes de Ca^{2+} y el efecto de estimular a las células con agonistas.

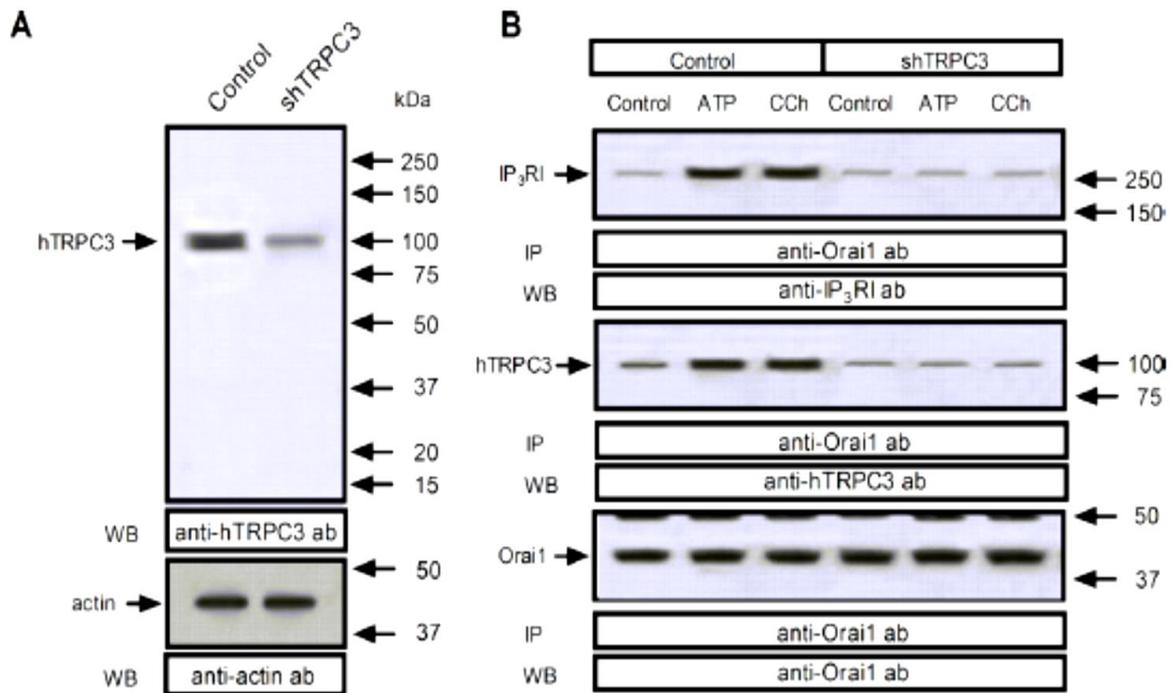


Fig. 2.4 Los TRPC3 podrían mediar el aumento de la interacción basal entre $Orai1$ y el RIP_3 en células HEK 293. Las células transfectadas con el shTRPC3, muestran que esta proteína podría mediar la interacción entre $Orai1$ y el RIP_3 ; en el panel control, se observa que incrementa la interacción basal entre $Orai1$ y el RIP_3 , después de estimular a las células con ATP (10 μ M) o CCh (100 μ M) así como la inhibición de este efecto, al realizar el knockdown de los TRPC3 (Woodard et al. 2010).

De forma interesante se ha visto que la presencia de $Orai1$ aumenta en la membrana plasmática cuando se induce el vaciamiento del RE con TG. El incremento de la externalización de $Orai1$, requiere elevar las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$; ya sea por entrada del espacio extracelular o por liberación de depósitos intracelulares. Estos datos sugirieron que la externalización de $Orai1$ no está involucrada en la primera etapa de la activación de entrada de Ca^{2+} (también conocida como I_{CRAC} , pero podría ser un evento que mantenga el influjo de Ca^{2+} (Woodard et al., 2008). La presencia de $Orai1$ en el citoplasma en vesículas y la colocalización reportada entre $Orai1$ y el RIP_3 (Woodard et al. 2010) muestran que

podría haber una regulación muy interesante en la entrada de Ca^{2+} vía SOCE por Orai1 y además esta proteína podría tener otra función como regulador negativo del vaciamiento de Ca^{2+} luminal.

El papel de las PKC en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no es claro, pero tiene una participación muy compleja, presentando diferentes blancos como Orai1, el RIP_3 , los canales TRPC y de forma indirecta influir en la bomba SERCA y la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA; plasma membrane Ca^{2+} ATPases, *por sus siglas en inglés*) (Woodard et al. 2010).

La fosforilación del RIP_3 por la PKC no ha sido esclarecido, pero sí se ha podido observar que cuando esta cinasa fosforila al RIP_3 provoca cambios en su localización subcelular, en varios tipos celulares, lo que podría tener efectos en su función pero se desconoce si el RIP_3 se fosforila así mismo durante este proceso. Además, está claro que la regulación por PKC del RIP_3 depende de la isoforma; la fosforilación *in vivo* del RIP_3 tipo I mejoró la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 , sugiriendo que esta cinasa incrementa la liberación de Ca^{2+} del RE, mientras que la fosforilación del RIP_3 tipo II y el RIP_3 tipo III parece disminuir la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 , siendo en este caso un regulador negativo de la liberación de Ca^{2+} intracelular (Vanderheyden et al. 2009).

La movilización de PKC impacta incluso en la participación de la bomba SERCA, la cual depende de la concentración de Ca^{2+} . Cuando los niveles de Ca^{2+} disminuyen en el RE se incrementa la tasa de recaptura por la bomba SERCA, mientras que el incremento de Ca^{2+} causa su inhibición. En condiciones fisiológicas, al inducir el vaciamiento del RE con agonistas, la tasa de recaptura de Ca^{2+} por la bomba SERCA se incrementa y ésta va disminuyendo paulatinamente hasta que se alcanza la tasa de fuga en reposo; lo cual termina produciendo un nivel estable del calcio en el RE. También cuando los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementan, se aumenta la tasa de recaptura (Martin et al. 2002).

El papel de la PMCA pareciera estar estrechamente relacionado con la bomba SERCA, exhibiendo un incremento de su actividad cuando la bomba SERCA está bloqueada por TG. Así mismo los niveles del mRNA se elevaron cuando se inhibe la bomba del RE (Roy et al. 2014).

Antecedentes directos

Con base en las evidencias experimentales que demuestran el papel que juega Orai1 en SOCE, así como la participación de SERCA en el relleno del RE, el M. en C. Daniel León Aparicio realizó registros simultáneos de Ca^{2+} en el citoplasma y el RE, cuando se sobre-expresa la proteína Orai1 con la finalidad de estudiar la participación de este canal en el relleno del RE. Él observó que al realizar el estímulo de las células con la combinación de ATP y TG en un medio sin Ca^{2+} , no se afectaba la fuga que se produce en el RE por TG ni la liberación de Ca^{2+} vía el RIP_3 (datos no mostrados), pero interesantemente cuando sobre-expresó la proteína Orai1 en un medio con Ca^{2+} , el vaciamiento de Ca^{2+} luminal del Retículo Endoplásmico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) se vio fuertemente inhibido, respecto a las células control que expresaban el plásmido vacío, MOCK.

Aunque el mecanismo molecular de la inhibición en el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ se desconoce, la Fig. 2.5 muestra que la respuesta en el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) no fue afectado por sobre-expresar a el canal Orai1, lo que indica que la inhibición en el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ no compromete la funcionalidad del RIP_3 o la entrada capacitativa y debe ser mediado por una vía que no involucre a la bomba SERCA, debido a que ésta se encuentra inhibida irreversiblemente por la TG. De forma preliminar este registro sugiere que la inhibición del vaciamiento luminal podría estar llevándose a cabo por un mecanismo tardío, es decir que se activa una vez que el RIP_3 ha liberado Ca^{2+} al citoplasma, activando la entrada capacitativa y permitiendo inducir el influjo de Ca^{2+} al citoplasma. Los datos permiten proponer que la sobre-expresión de Orai1 podría estar induciendo una entrada de Ca^{2+} directa del espacio extracelular al RE, o que la interacción proteína-proteína entre Orai1 y el RIP_3 podría estar modulando la inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, sin embargo la naturaleza de esta inhibición es desconocida, es decir se desconoce si este nuevo papel de Orai1 como

modulador negativo del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ se puede presentar de forma fisiológica o sólo es efecto de la sobreexpresión de Orai1. Así también se requiere dilucidar porqué esta inhibición sólo se ve en presencia de Ca^{2+} y que la falta de este ion impide ver el efecto inhibitorio de Orai1.

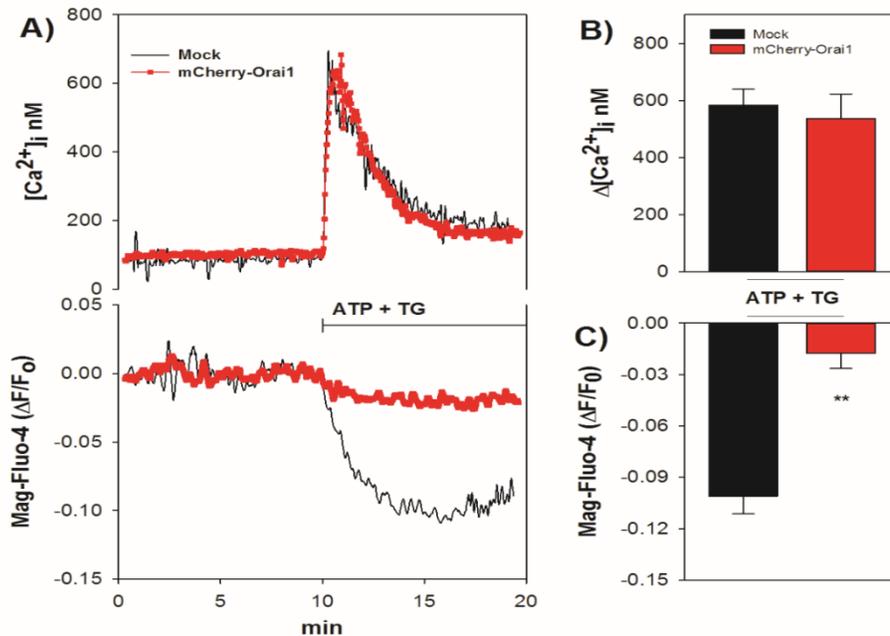


Fig. 2.5 La sobreexpresión de Orai1 inhibe fuertemente el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ cuando las células son estimuladas con ATP más TG. Las células fueron transfectadas con los plásmidos MOCK y mCherry-Orai1. Después de 24 h de transfección, fueron incubadas a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2, AM y mag-fluo-4, AM y se estimularon con ATP más TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Cuando se sobre-expresa Orai1, las células presentan una fuerte inhibición en el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$.

Cada mecanismo es característico del tipo celular, las isoforma del RIP_3 , el tipo de PKC que participa, así como los complejos proteicos que se pueden formar con diferentes enzimas o proteínas que movilizan Ca^{2+} . En este trabajo como una primera aproximación a los datos obtenidos al sobre-expresar Orai1, exploramos la participación de esta proteína como modulador negativo del vaciamiento de Ca^{2+} .

3. JUSTIFICACIÓN

En células HeLa se ha observado que la sobre-expresión del canal Orai1 inhibe el vaciamiento de Ca^{2+} del RE, por una vía que no compromete la funcionalidad del RIP_3 ni a la bomba SERCA, debido al papel que juega Orai1 en la entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE), es importante dilucidar esta nueva

función de Orai1 como posible modulador negativo del vaciamiento de Ca^{2+} en el RE, así como determinar si el mecanismo por el que sucede este fenómeno, es una entrada directa de Ca^{2+} del espacio extracelular al RE o por una interacción proteína-proteína entre Orai1 y el RIP3.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de Orai1 disminuye el vaciamiento del RE inducido por agonistas por un mecanismo que no requiere su actividad como canal iónico pero que requiere la participación de la PKC.

5. OBJETIVO GENERAL

Demostrar, mediante registros simultáneos de Ca^{2+} citoplásmico y Ca^{2+} luminal, que la sobre-expresión de Orai1 disminuye el vaciamiento del RE inducido por agonistas, por un mecanismo que no requiere su actividad como canal iónico.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 6.1 Determinar el efecto en el vaciamiento del RE, al sobre-expresar la proteína Orai1, cuando éste es inducido por agonistas (ATP e His).
- 6.2 Determinar si este efecto depende de agonistas (ATP e His) o se puede observar al llevar a cabo el vaciamiento de RE por medio de TG.
- 6.3 Determinar si este efecto requiere de una proteína que tenga la función de canal (mediante el uso de la dominante negativa de Orai1, E106A).
- 6.4 Estudiar la posible participación de PKC, con el uso de la doble mutante de Orai1 S27A/S30A, cuyos sitios no pueden ser fosforilados por esta cinasa.
- 6.5 Evaluar la respuesta luminal y citoplásmica cuando se induce el vaciamiento del RE en células preincubadas con un inhibidor de cPKC, Gö 6976.

- 6.6 Evaluar el efecto de inhibición del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ al sobre-expresar Orai1 en un medio sin Ca^{2+} .
- 6.7 Determinar el efecto que tendría en el vaciamiento del RE, el sobre-expresar una proteína Orai1 que mimetiza el efecto de una proteína permanentemente fosforilada (Orai1 S27E/S30E).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivo celular

Para la realización de este proyecto se utilizó la línea celular HeLa, las cuales son células inmortalizadas de cáncer cervicouterino que han sido ampliamente utilizadas para estudiar la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$, así también es una ventaja que se pueden transfectar de forma relativamente sencilla y eficiente de tal forma que se pueden hacer mediciones en poblaciones celulares. Las células se cultivaron en

cajas Corning de 60 mm x 15 mm en medio DMEM, suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (FBS) y 0.5 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Se mantuvieron a una temperatura de 37 °C y una atmósfera 95 % aire/ 5% CO₂, en una incubadora Nuair.

Para realizar el pase del cultivo celular se utilizó el siguiente protocolo:

- Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 90 %, se retiró el medio de cultivo y se procedió a realizar un lavado con 1 mL de PBS para retirar el remanente del medio del cultivo que haya quedado en la caja.
- Se añadió en la caja de cultivo 1 mL de tripsina al 0.05 %, y con movimientos suaves se distribuyó en toda la superficie, posteriormente se incubó por 2 min a 37 °C y en una atmósfera 95 % aire/ 5% CO₂, una vez transcurrido este tiempo se retiró la tripsina.
- Se añadió 1 mL de medio DMEM suplementado y con reflujos suaves se desprendieron las células adheridas en la superficie de la caja de cultivo.
- Las células HeLa se duplican cada 24 h aproximadamente y ya que el procedimiento de transfección utilizado requiere un periodo de 48 h, el inóculo deberá ser de 180 µL de células (4.5×10^5 cél/mL) recién despegadas para tener una confluencia aproximada del 80 % al final de la transfección. A la caja con dicho inóculo se le adicionó 4 mL del medio DMEM suplementado, para brindarle los factores de crecimiento y se mantienen en incubación con las condiciones mencionadas para el inóculo.

7.2 Transfección de células HeLa con los plásmidos MOCK, CFP-Orai1, Orai1 E106A y Orai1 S27A/S30A.

Para llevar a cabo la transfección de los plásmidos MOCK, CFP-Orai1, Orai1 E106A y Orai1 S27A/S30A en células HeLa, se utilizó Lipofectamine® 2000 de Thermo Fisher Scientific, un reactivo de transfección que está diseñado a base de lípidos

catiónicos, lo que le facilita la internalización del DNA (Fein et al. 2010). Consisten de una cabeza polar cargada positivamente y una o dos cadenas hidrocarbonadas, la carga positiva conferida por la cabeza polar permite la interacción entre el lípido y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. La lipofectamina es un reactivo compatible con Opti-MEM®, el cual permite optimizar la transfección.

El protocolo de transfección que se utilizó en este trabajo es el siguiente:

- En dos tubos (A y B) de microcentrífuga se colocó 100 μ L de Opti-MEM en cada uno de ellos.
- En el tubo A se adicionó 10 μ L de lipofectamina y se le aplicó por 3 seg una ligera homogeneización en vórtex, esta operación se repitió 3 veces.
- En el tubo B se le adicionó 2 μ g del plásmido que se desea transfectar y se homogenizó con ligeros reflujos realizados con la pipeta.
- La mezcla del tubo B se adicionó en la mezcla del tubo A y se homogenizó con ligeros reflujos realizados con la pipeta. Se dejó incubar a temperatura ambiente, durante 5 min.
- Una vez que se ha alcanzado el 80 % de confluencia, se retiró 2 mL del medio de cultivo, para mantener un volumen final de 2 mL de medio en las cajas. Transcurridos los 5 min de incubación, se adicionó la mezcla de Lipofectamina/Opti-MEM/plásmido en la caja de cultivo y se homogenizó con ligeros movimientos circulares.
- La caja se incubó a 37 °C en una atmósfera 95 % aire/ 5% CO₂, durante 24 h.
- Una vez que transcurrieron las 24 h se retiró el medio de las cajas y las células que permanecen adheridas fueron despegadas como se mencionó en el protocolo de pase celular.

7.3 Registros simultáneos de Ca^{2+} , usando los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM.

Soluciones de registro y reactivos.

La concentración de los componentes utilizados en la solución de registro son las siguientes (en mM): 121 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 MgCl_2 , 6 NaHCO_3 , 25 HEPES, 5.5 Glucosa, 1.8 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 EGTA. Ajustado a un pH = 7.3 con NaOH.

Nota. En solución de registro sin Ca^{2+} , además de que no se adicionó este catión divalente, se adicionó EGTA (0.1 mM) para tener una solución libre de Ca^{2+} .

Los reactivos utilizados en los registros de fluorescencia, son los siguientes: ATP (10 μM), Histamina (100 μM), Tapsigargina (1 μM), Gö 6976 (200 nM), Digitonina (1 %), EGTA (400 mM) y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.5 M). Los últimos tres para llevar a cabo la conversión de la señal de Fura-2 en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Indicadores fluorescentes de Ca^{2+} .

Los registros simultáneos de Ca^{2+} se llevaron a cabo en células que fueron incubadas previamente con los indicadores de Ca^{2+} libre citoplásmico y Ca^{2+} libre luminal del RE: el fura-2/AM y mag-fluo-4/AM, respectivamente.

El fura-2/AM es un indicador fluorescente altamente selectivo a Ca^{2+} ($K_d = 200$ nM), una vez que atraviesa la membrana plasmática, esterasas citoplásmicas hidrolizan sus cinco grupos acetoximetilos para obtener un colorante fura-2 sensible al Ca^{2+} . El fura-2 es un indicador de Ca^{2+} de cociente puesto que su espectro de excitación tiene un corrimiento en respuesta a la unión exclusivamente de Ca^{2+} . La elevación de Ca^{2+} citoplásmico, incrementa la fracción de fura-2 unido al Ca^{2+} , éste cambia su longitud de onda máxima de excitación de 360 nm a 340 nm, y además aumenta la amplitud de la emisión de fluorescencia. Esto quiere decir que el fura-2 con Ca^{2+} unido necesita más energía para ser excitado. Ante un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ los registros muestran un incremento en la señal de fluorescencia excitada a 340 nm y una disminución de la señal excitada a 380 nm. La señal de

fluorescencia de este indicador a la longitud de onda de excitación de 360 nm no muestra cambios en respuesta a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, a esta longitud de onda de excitación se ha llamado punto isobéptico. En los registros esta longitud de onda es usada como control, puesto que debe mantenerse constante durante todo el registro y así descartar cambios en la fluorescencia que no se deban a cambios en la concentración de Ca^{2+} (Bootman *et al*, 2014; Grynkiewicz *et al*, 1985).

Para medir la reducción del Ca^{2+} luminal se utilizó el mag-fluo-4/AM, la ventaja de este indicador es que su longitud de onda de emisión está en 510 nm, similar a la del fura-2, por lo que se pueden utilizar ambos indicadores sin necesidad de alternar la longitud de onda de emisión y así lograr una resolución temporal adecuada. El mag-fluo-4/AM tiene tres grupos acetoximetil éster que son hidrolizados por esterasas del citoplasma, y se requiere de un tiempo de incubación que permite el ingreso del mag-fluo-4 al retículo endoplásmico. Ya que este indicador de Ca^{2+} es un tricarboxilato tiene una baja afinidad, en solución salina se ha observado una $K_d = 22 \mu M$, pero lo más seguro es que la viscosidad del retículo endoplásmico incremente dicha K_d , lo cual le permite medir cambios en los niveles de Ca^{2+} en el rango de $10 \mu M$ a $1 mM$. Sin embargo este indicador de Ca^{2+} no tiene forma de ser retenido en el RE, no muestra corrimientos en sus longitudes de onda de excitación ante la unión de Ca^{2+} y se desconoce su K_d dentro del RE, por lo tanto los datos obtenidos con mag-fluo/4 muestran valores cualitativos, que reflejan cambios en la $[Ca^{2+}]$ luminal del RE o donde se encuentre dicho colorante (Paredes *et al.*, 2008).

Protocolo de incubación de los indicadores en células HeLa.

Las células HeLa fueron incubadas con los indicadores de Ca^{2+} , de acuerdo al siguiente protocolo:

- Transcurridas las 24 h de transfección, las células fueron lavadas con 1 mL de PBS para quitar el remanente de medio.

- Se adicionó 1 mL de tripsina (0.05%) diluida en PBS y se incubaron durante 2 min a 37 ° C, en una atmósfera 95 % aire/ 5 % CO₂.
- Se retiró la tripsina y se adicionó 1 mL de medio suplementado, con el que se realizó un leve reflujo con la pipeta para despegar las células adheridas en la superficie de la caja.
- Las células se colocaron en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 400 rpm durante 3.5 min. Transcurrida la centrifugación se retiró el medio y se adicionó 1 mL de solución de registro con Ca²⁺, haciendo reflujo con la pipeta para resuspender la pastilla de células que se formó en la superficie del tubo.
- Se mezcló 10 µL de la suspensión celular, con 70 µL de solución de registro con Ca²⁺ y 20 µL de azul de tripano al 0.4 %. Se tomó una alícuota de 10 µL y se colocó en una cámara de Neubauer. Se procedió a contar las células que no hayan permeado el azul de tripano, el cual es un colorante que es utilizado para cuantificar viabilidad. El fundamento es basado en el hecho de que el cromóforo está cargado negativamente y no interactúa con las células, a menos que éstas hayan sufrido daño en la membrana citoplásmica. Por tal motivo todas las células que no incorporaron el colorante, son consideradas como viables (Anleitung 1987).
- El número de células viables se determinó mediante el promedio de dos conteos celulares, divididos entre los 4 campos de la cámara, este valor es multiplicado por 1x10⁵. Debido a que se debe considerar que cargar indicador de forma excesiva en las células, puede causar una reducción severa o incluso abatir las señales de Ca²⁺ que se están observando (Bootman et al. 2014), se hace una relación para adicionar 1 µL de fura-2/AM (1 mM) y 1 µL de mag-fluo-4/AM (1 mM) por cada 1x10⁶ células. Se homogeneizaron los indicadores y se cubrió el tubo de microcentrífuga con papel aluminio, dejándolos incubar por 2 h a 27 °C.

- Transcurrido este tiempo se homogenizó la suspensión celular y se determinó la cantidad de microlitros para tener 5×10^5 células y se colocan en un tubo nuevo, donde se adiciona solución de registro hasta un volumen final de 1 mL. Se centrifuga a 400 rpm durante 3.5 min. El lavado se repite dos veces.
- La pastilla celular fue resuspendida en 1 mL de solución de registro y se llevó a un volumen final de 2.5 mL, en tubos de vidrio cónicos que son transparentes a la luz UV. Los registros simultáneos de Ca^{2+} se realizaron en un espectrofluorómetro de la compañía PTI (Photon Technology International).

El procedimiento de calibración involucra realizar medidas de la intensidad de fluorescencia del fura-2 en condiciones de saturación con Ca^{2+} o sin Ca^{2+} , para ello se adicionó 200 μM de digitonina, el cual es un detergente que forma dominios ricos en colesterol-digitonina en la membrana, reduciendo el colesterol libre y por lo tanto su capacidad de interactuar con otros constituyentes de la membrana (Paila *et al.*, 2005). La digitonina nos permitió permear la membrana plasmática y en presencia de Ca^{2+} externo, se produjo la saturación del fura-2 o $F_{\text{máx}}$, posteriormente se adicionó 5 mM de EGTA para quelar el Ca^{2+} y obtener la fluorescencia de fura-2 sin Ca^{2+} o $F_{\text{mín}}$. De esta forma podemos obtener un cociente a 340 nm/380 nm, donde el fura-2 está saturado con y sin Ca^{2+} . Finalmente la fluorescencia fue apagada al adicionar 12 mM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fig. 7.1). En el caso de los registros sin Ca^{2+} , se adicionó 2 mM de solución con Ca^{2+} antes de comenzar a calibrar.

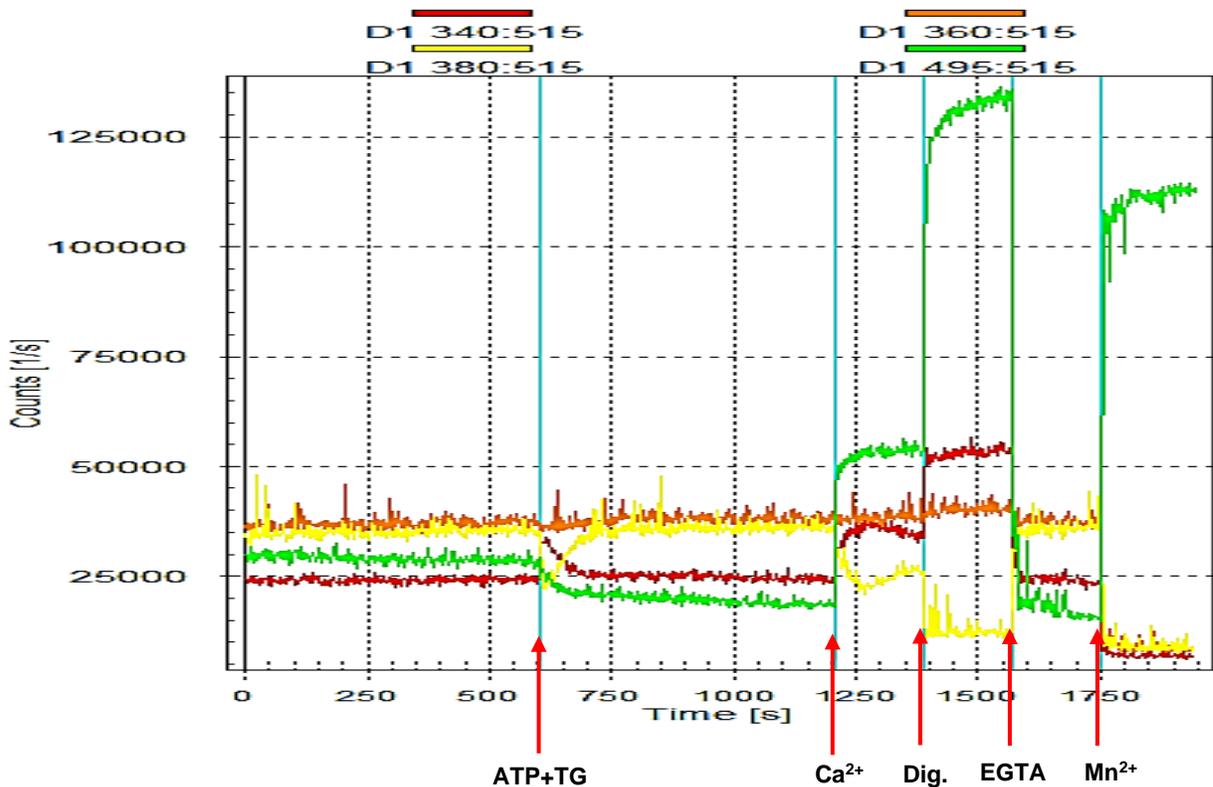


Fig. 7.1 Registro sin Ca^{2+} donde se muestra la calibración del fura-2. Los registros simultáneos de Ca^{2+} fueron realizados a una λ_{exc} : 340, 360 y 380 nm para el fura-2 y λ_{exc} : 495 nm para el mag-fluo-4. Ambos indicadores tienen una λ_{em} : 510 nm. Una vez que se terminó de realizar el registro de Ca^{2+} se adicionó 5 μL de Ca^{2+} (1 M) para saturar el fura-2 y se permeó la membrana citoplásmica con 62 μL de digitonina (1 %), para quelar el Ca^{2+} se adicionó 32 μL de EGTA (400 mM) y para apagar la fluorescencia se adicionó 20 μL de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.5 M).

Determinación de la concentración de Ca^{2+} .

Para determinar la concentración de Ca^{2+} libre, a las señales de fluorescencia se les resta el fondo y después se calculan los cocientes de fluorescencia, es decir la señal de fluorescencia en presencia de Mn^{2+} se considera el “fondo” y se utilizó la ecuación de Grynkiewicz:

$$\text{Calcio (nM)} = \frac{K_d \beta (R - R_{\text{mín}})}{R_{\text{máx}} - R}$$

Donde:

$R_{\text{mín}}$ = Cociente de la fluorescencia del indicador sin Ca^{2+} (F340/F380).

$R_{m\acute{a}x}$ = Cociente de la fluorescencia del indicador saturado con Ca^{2+} (F340/F380).

β = Es el cociente $\frac{F_{m\acute{a}x}}{F_{m\acute{i}n}}$ a la longitud de onda de 380 nm, para el fura-2.

R = Cociente de la fluorescencia corregida que se registró de las células a lo largo del experimento.

K_d = Afinidad del indicador por el Ca^{2+} (para el fura-2, la $K_d = 200$ nM).

En experimentos iniciales se pudo observar un aumento en la fluorescencia citoplásmica del fura-2, ya que cuando las células fueron lisadas con digitonina, disminuyó la intensidad de fluorescencia en ambas longitudes de onda (340 y 380 nm), sugiriéndose que este incremento es debido a la alta viscosidad del citoplasma celular. Para corregir el aumento en la fluorescencia citoplásmica, los valores de $R_{m\acute{a}x}$ y $R_{m\acute{i}n}$ fueron multiplicados por un factor de 0.75, éste fue determinado al medir el ΔF_{340} y ΔF_{380} dentro y fuera de la célula (Poenie 1990).

Los registros obtenidos con mag-fluo-4 fueron suavizados usando una ventana deslizante de 7 puntos con el programa FeliX32. Como se puede observar en la imagen 7.2 la fluorescencia del mag-fluo-4 tiende a aumentar en ausencia de estímulo y esta variación puede cambiar de un registro a otro.

Para determinar el curso temporal de la fluorescencia basal, es decir la señal de fluorescencia cuando no se han estimulado a las células, se hace un ajuste no lineal, a las lecturas de fluorescencia obtenidas durante los primeros 10 min del registro, tiempo en el que las células no han sido estimuladas. Este ajuste se realizó con el programa GraphPad Prism 5, utilizando la siguiente ecuación:

$$Y = Y_{m\acute{a}x} \left[\frac{X - C}{K + (X - C)} \right]$$

Donde:

Y = fluorescencia del mag-fluo-4 con respecto al tiempo X

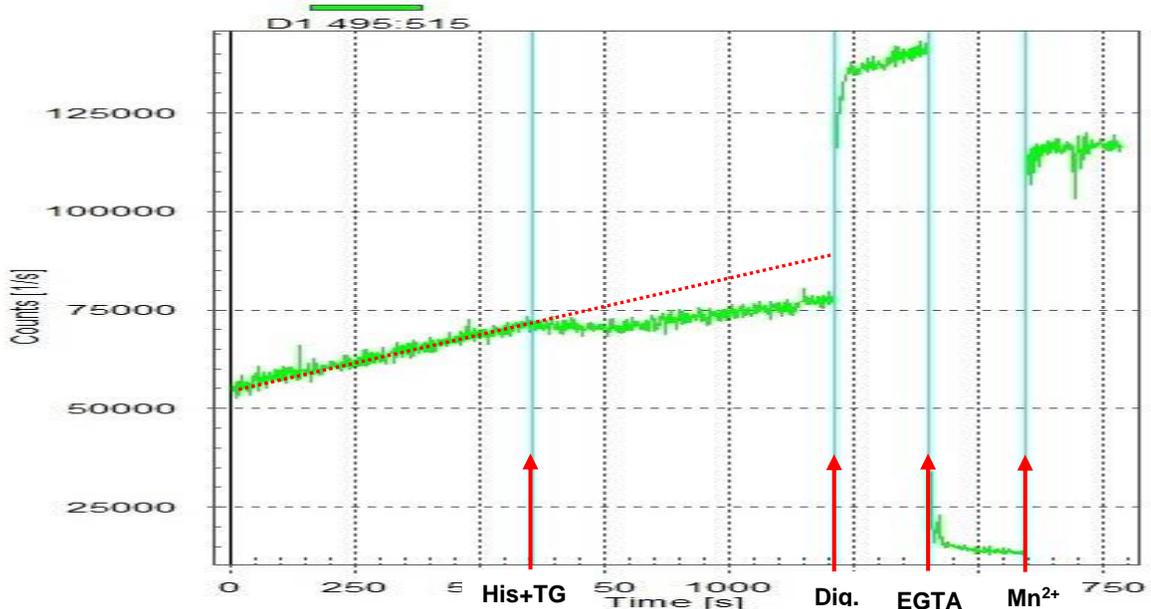
$Y_{\text{máx}}$ = fluorescencia basal máxima del mag-fluo-4

X = tiempo (min)

K = tiempo al cual se lleva a cabo la mitad del cambio máximo de fluorescencia.

C = constante de tiempo que nos permite hacer coincidir el tiempo cero para el mag-fluo-4 con el comienzo del registro.

Se puede observar en la Fig. 7.2, durante los primeros 10 min la fluorescencia de



emisión del mag-fluo-4 muestra una tendencia lineal, sin embargo el ajuste que realizamos para extrapolar estas lecturas es no lineal, debido a que un comportamiento lineal estaría suponiendo que el fluoróforo se sintetiza dentro del RE y por lo tanto no sería saturable. Nuestro ajuste mono-exponencial extrapola el comportamiento del mag-fluo-4 en ausencia de estímulo, y se le resta la caída de la fluorescencia al estimular a las células. El programa determina los parámetros $Y_{\text{máx}}$, K y C , con los se puede calcular la diferencia entre la fluorescencia teórica respecto a la experimental.

Fig. 7.2 Registro con Ca^{2+} que muestra el comportamiento del mag-fluo-4. Durante los primeros 10 min el mag-fluo-4 muestra un comportamiento en ausencia de estímulo, el cual puede ser modelado con un ajuste no lineal, lo que nos permite extrapolar la tendencia que mostraría si no fueran estimuladas las células. Cuando a estos valores de fluorescencia se les resta la fluorescencia experimental (trazo verde), se obtiene de forma cualitativa (en valores porcentuales) el vaciamiento del RE.

Por último se llevó a cabo la normalización de los datos para obtener el cambio porcentual de la fluorescencia en los registros como un indicador de Ca^{2+} en compartimentos intracelulares $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Fig. 7.3), aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0} = \left(\frac{F}{F_0}\right) - 1$$

Donde:

ΔF = diferencia de la fluorescencia de mag-fluo-4.

F_0 = fluorescencia basal (obtenida de la ecuación anterior).

F = fluorescencia experimental.

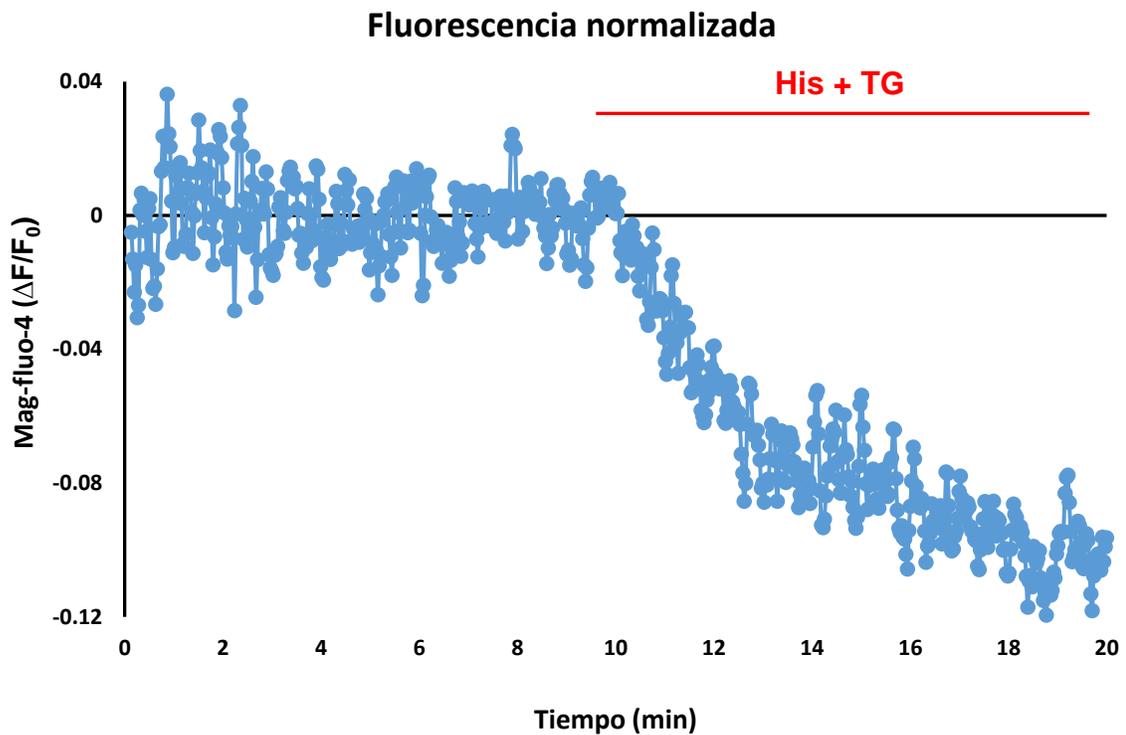


Fig. 7.3 Decaimiento de la fluorescencia de mag-fluo-4 (%) en presencia de estímulo. El decaimiento de la fluorescencia en presencia de estímulo representa cualitativamente el vaciamiento de Ca^{2+} libre en el RE al activar al RIP_3 con Histamina ($100 \mu\text{M}$) e inhibir la bomba SERCA con Tapsigargina ($1 \mu\text{M}$).

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de los diferentes experimentos son presentados como media \pm error estándar, n representa el número de experimentos

independientes que fueron realizados. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el evento presentaba un $p < 0.05$, se utilizó la prueba estadística t de Student o ANOVA con la prueba estadística Bonferroni, el cual es un test de comparación múltiple o en grupos. En este trabajo fue usada para determinar si las diferencias que presentaban las células respecto al MOCK fueron estadísticamente significativas.

8. RESULTADOS

Para estudiar el efecto de la sobre-expresión del canal Orai1 se transfectaron las células con el plásmido de Orai1 (registro azul) y también con un plásmido vacío (control, registro rojo) y se indujo la salida de Ca^{2+} del RE con la combinación, ya sea ATP (para activar los receptores purinérgicos (P2Y) que se expresan en células

HeLa y que incrementan la producción de IP₃) o histamina, junto con tapsigargina (TG), para inhibir la actividad de la bomba SERCA y evitar la recuperación del Ca²⁺ luminal del RE. En esta situación se midió simultáneamente el incremento de la concentración intracelular de calcio en el citoplasma ([Ca²⁺]_i) con fura-2/AM y la reducción del calcio luminal del retículo endoplásmico (Ca²⁺]_{ER}) con el mag-fluo/4. El primero se calibró utilizando el procedimiento descrito en la sección de Métodos y el segundo se normalizó con respecto a la señal inicial (F₀) como se indica también en la sección de Métodos.

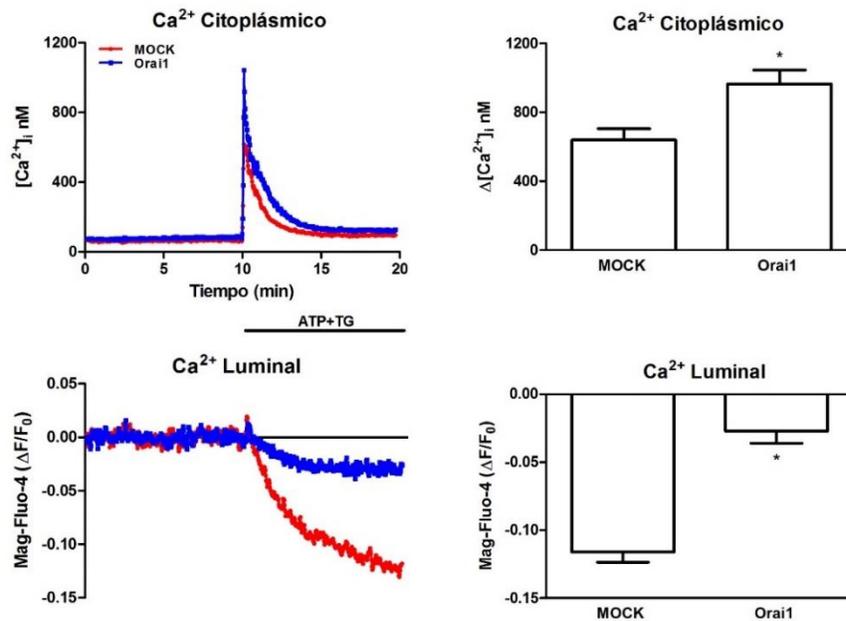


Fig. 8.1 La sobre-expresión de Orai1 aumenta el transitorio de [Ca²⁺]_i e inhibe el vaciamiento de [Ca²⁺]_{RE} en respuesta a ATP y TG. Las células fueron transfectadas con los plásmidos MOCK y CFP-Orai1. Después de 24 h de transfección, fueron incubadas a 27 °C (2 h) con los precursores de los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con ATP y TG, en un medio con Ca²⁺ (1.8 mM). Cuando se sobre-expresa Orai1, el transitorio de [Ca²⁺]_i incrementa respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío (MOCK) (965.6 ± 79.94 nM y 640.0 ± 65.09 nM, respectivamente) y hay una fuerte inhibición en el vaciamiento de [Ca²⁺]_{RE} (-0.120 ± 0.008 ΔF/F₀ en las células MOCK y -0.027 ± 0.009 ΔF/F₀ en las células que sobre-expresan Orai1). n=5 ± SE, *p < 0.05.

8.1 La sobre-expresión de Orai1 induce un incremento en el transitorio de [Ca²⁺]_i e inhibe el vaciamiento de [Ca²⁺]_{RE}.

Los registros simultáneos de Ca²⁺ mostrados en la Fig. 8.1 permiten observar las respuestas de células HeLa cuando se induce el vaciamiento de [Ca²⁺]_{RE} con ATP y TG, donde el ATP ha mostrado liberar Ca²⁺ de RE vía el RIP₃, y la TG inhibe

irreversiblemente la bomba SERCA. Las células que sobreexpresan el canal de Ca^{2+} Orai1 presentaron un aumento en el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ respecto a las células MOCK (965.6 ± 79.94 nM y 640.0 ± 65.09 nM, respectivamente). Mientras que el vaciamiento del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ se vio inhibido, como un efecto posterior a la liberación de Ca^{2+} ($-0.120 \pm 0.008 \Delta F/F_0$ en las células MOCK y $-0.027 \pm 0.009 \Delta F/F_0$ en las células que sobreexpresan Orai1). Esta inhibición del vaciamiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ involucra un mecanismo independiente de la bomba SERCA y ocurre como un efecto tardío que no compromete la actividad inicial del RIP_3 , debido a que la respuesta en el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico no fue inhibida.

Como ya se ha mencionado anteriormente el ATP es un agonista purinérgico que induce el vaciamiento de Ca^{2+} del RE al activar a receptores purinérgicos acoplados a la proteína G, donde la subunidad $\alpha_{(q/11)}$ activa a la $\text{PLC}\beta$ que escinde PIP_2 y se generan dos segundos mensajeros, el IP_3 y el DAG. Este último permanece en la membrana plasmática, mientras que el IP_3 al ser una molécula soluble, viaja en el citoplasma y activa al RIP_3 que se encuentra en la membrana del RE, liberando Ca^{2+} del espacio luminal del RE hacia el citoplasma (Clapham, 2007).

Utilizando indicadores de la actividad de la fosfolipasa Cb junto con indicadores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se pudo observar que diferentes agonistas producen una respuesta heterogénea en la activación de PLC y sin embargo se produjo un mismo transitorio de Ca^{2+} citoplásmico (van der Wal *et al.*, 2001), estos experimentos demuestran que no existe una relación lineal entre la producción de IP_3 y la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$; es más la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obedece a un incremento de IP_3 que rebasa un cierto umbral, y por lo mismo el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no lleva ninguna información del grado de producción de IP_3 .

Se considera que la histamina (His) es un agonista de los receptores H_1 que induce el vaciamiento del RE por la activación del RIP_3 , de igual forma que el ATP, sin embargo la cinética de activación de PLC sugiere que la His produce una menor cantidad de IP_3 y DAG, al menos inicialmente (van der Wal *et al.*, 2001), por lo que

evaluamos el efecto que tendría estimular a las células con la combinación de His y TG. De esta forma podríamos comparar si la inhibición del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ por Orai1 era un efecto exclusivo del ATP o podría ser inducido con His y si sería igualmente agudo para ambos agonistas.

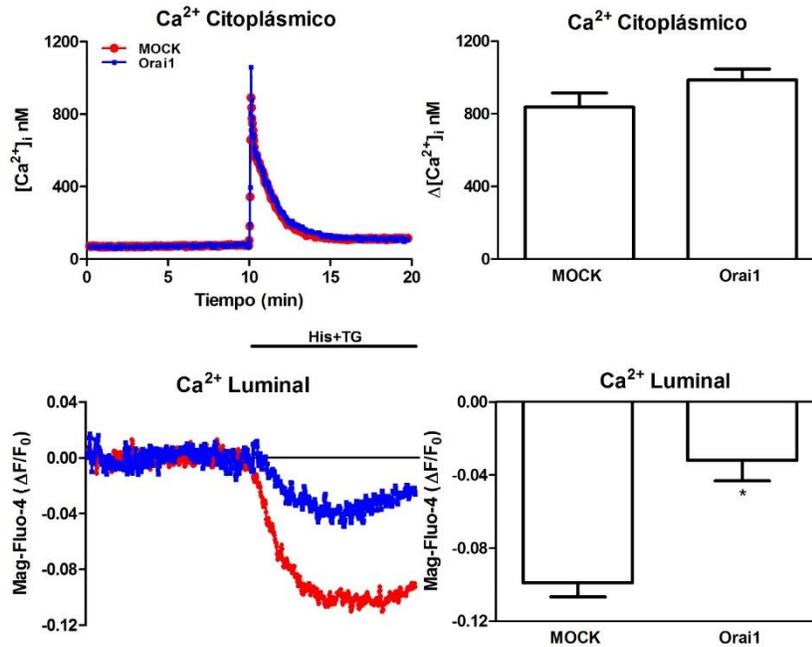


Fig. 8.2 La sobre-expresión de Orai1 inhibe el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en respuesta a His y TG. Las células fueron transfectadas con los plásmidos MOCK y CFP-Orai1. Después de 24 h de transfección, fueron incubadas a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con His y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Cuando se sobre-expresa Orai1 la respuesta al vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ se inhibe ($-0.032 \pm 0.011 \Delta F/F_0$) respecto a las células MOCK ($-0.099 \pm 0.008 \Delta F/F_0$) sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$. $n=5 \pm SE$, $*p < 0.05$.

En la Fig. 8.2 se puede observar el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ con la combinación de His y TG, e interesantemente la sobre-expresión de Orai1 resultó en una menor reducción de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ ($-0.099 \pm 0.008 \Delta F/F_0$ y $-0.032 \pm 0.011 \Delta F/F_0$ en células MOCK y Orai1, respectivamente). Sin embargo a diferencia de la combinación de ATP y TG, el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ no fue estadísticamente significativo con respecto a las células MOCK. De acuerdo a los cursos temporales, en ambos casos la inhibición en la reducción de la $[Ca^{2+}]_{ER}$ se observó casi inmediatamente después del estímulo, sin afectar el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y sólo en el caso de ATP y TG hay un transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ mayor.

Los datos sugieren que Orai1 está modulando negativamente el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$, por un mecanismo que se activa después que el RIP_3 ha liberado Ca^{2+} al citoplasma, por lo que esta inhibición ocurre como un efecto tardío que no involucra a la bomba SERCA y no afecta la funcionalidad inicial del RIP_3 .

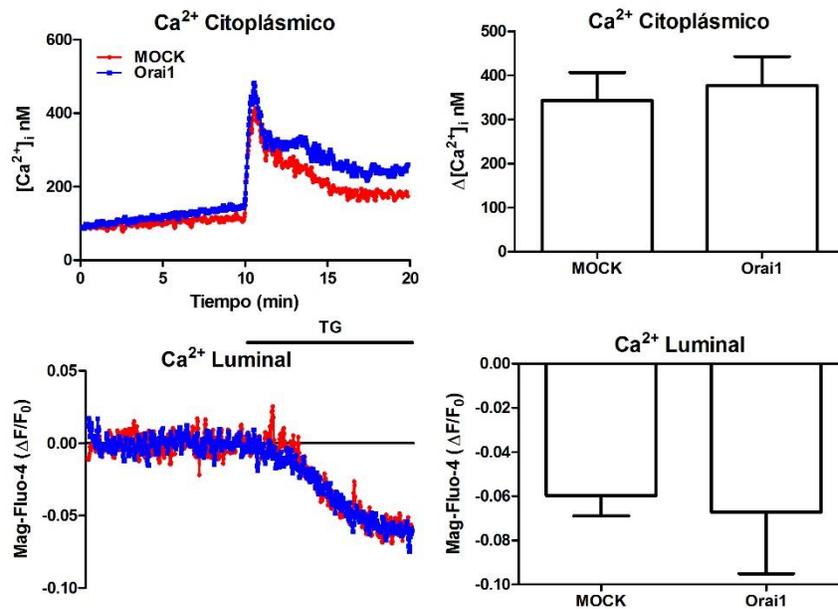


Fig. 8.3 Bloquear la bomba SERCA con TG, no inhibe el vaciamiento $[Ca^{2+}]_{RE}$ en las células que sobreexpresan Orai1. Las células fueron transfectadas con los plásmidos MOCK y CFP-Orai1. Después de 24 h de transfección, fueron incubadas a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). La respuesta citoplásmica y luminal del RE no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las células Orai1 y MOCK. $n=4$.

Para determinar si esta inhibición dependía de agonista o podría ser inducida únicamente al vaciar el RE, se estimuló a las células con TG. Como se puede ver en la Fig. 8.3, el transitorio de Ca^{2+} y el vaciamiento del RE no presentan diferencias estadísticamente significativas, de hecho la cinética de vaciamiento del RE es muy similar en las células MOCK y las células que sobreexpresan Orai1. Estos datos sugieren que la inhibición del vaciamiento luminal requiere de agonistas, probablemente porque existen otros elementos involucrados en el vaciamiento del RE además de la activación del RIP_3 .

8.2 La sobreexpresión de la dominante negativa, Orai1 E106A, inhibe el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ de una forma menos aguda que la forma nativa de Orai1.

Con la finalidad de determinar si era importante que el canal Orai1 fuera funcional, se llevaron a cabo experimentos utilizando mutaciones puntuales de la proteína Orai1, que es la subunidad formadora de los canales SOCE (Prakriya *et al.*, 2006). El reemplazo del glutamato 106 por alanina (E106A) produce la pérdida de la función de la proteína Orai1 como canal, ya que no es capaz de unir de forma selectiva al ion Ca^{2+} y esto inhibe el influjo de Ca^{2+} del espacio extracelular al citoplasma.

El uso de esta mutante nos permitiría dilucidar cuál de estos dos escenarios explica la inhibición de la reducción del $[Ca^{2+}]_{ER}$ por Orai1, donde uno sería que Orai1 se constituye como una entrada directa de Ca^{2+} del espacio extracelular al lumen del RE, y que por lo mismo no requiere la participación de la bomba SERCA o donde Orai1, por una interacción proteína-proteína con el RIP_3 resultaría en la inhibición de la actividad de este último y por lo tanto en la reducción del vaciamiento de Ca^{2+} del RE. Pensamos que si la inhibición se siguiera llevando a cabo en presencia de la mutante de Orai1 E106A, entonces no sería necesario que la proteína Orai1 tuviese la función de canal y podría tratarse de una interacción proteína-proteína entre el RIP_3 y el canal Orai1. Por el contrario, si se abatiera la inhibición, entonces podría tratarse de una entrada directa de Ca^{2+} al retículo y se requiere que Orai1 funcione como canal.

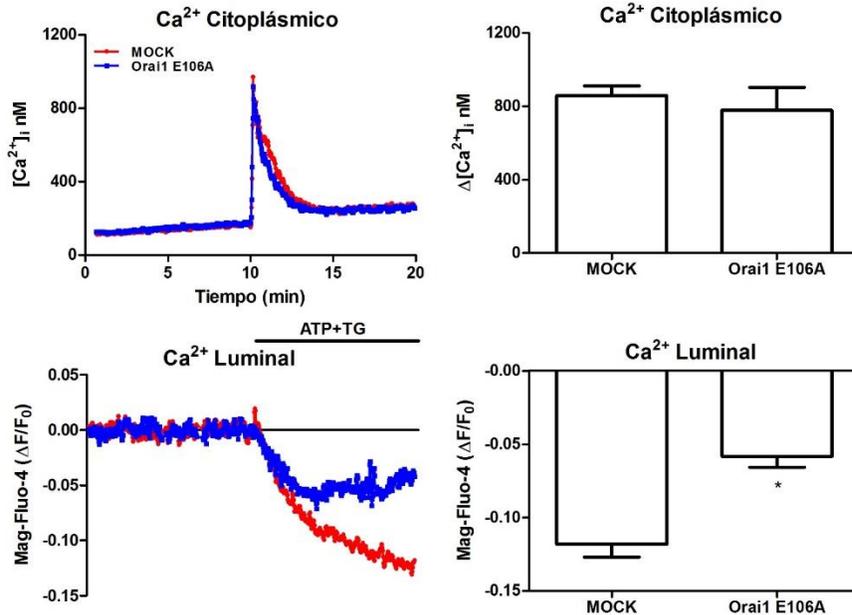


Fig. 8.4 La sobre-expresión de la dominante negativa de Orai1 (Orai1 E106A) inhibe el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ sin incrementar el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$, en células estimuladas con ATP y TG. Las células fueron transfectadas con los plásmidos MOCK y la mutante Orai1 E106A. Después de 24 h de transfección, fueron incubadas a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con ATP y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Las células que sobre-expresan la proteína Orai1 E106A muestran una inhibición en el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ respecto a las células MOCK ($-0.058 \pm 0.007 \Delta F/F_0$ y $-0.120 \pm 0.009 \Delta F/F_0$, respectivamente), sin que haya diferencias estadísticamente significativas en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$. Nótese la inhibición con Orai1 E106A es menos aguda respecto a las células que sobre-expresan Orai1 (de $-0.058 \pm 0.007 \Delta F/F_0$ y $-0.027 \pm 0.009 \Delta F/F_0$, respectivamente). $n=5 \pm SE$, * $p < 0.05$.

Cuando se sobre-expresó la proteína Orai1 E106A (Fig. 8.4) y se estimularon las células con ATP y TG, la inhibición en el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ sigue siendo estadísticamente significativa respecto a las células MOCK ($-0.058 \pm 0.007 \Delta F/F_0$ y $-0.120 \pm 0.009 \Delta F/F_0$, respectivamente), sin embargo ésta es menor que en las células que sobreexpresan la proteína Orai1 nativa ($-0.027 \pm 0.009 \Delta F/F_0$) y lo más interesante es que hubo un retardo en la instalación del efecto inhibitorio puesto que se presentó 2 min después de la adición del estímulo. En este experimento no se encontraron diferencias significativas en el transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$, como sí lo muestran las células que sobreexpresan Orai1 (Fig. 8.1), lo cual sugiere que se requiere una proteína funcional de Orai1 para permitir la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular y que Orai1 se activa durante el vaciamiento con la combinación de ATP y TG.

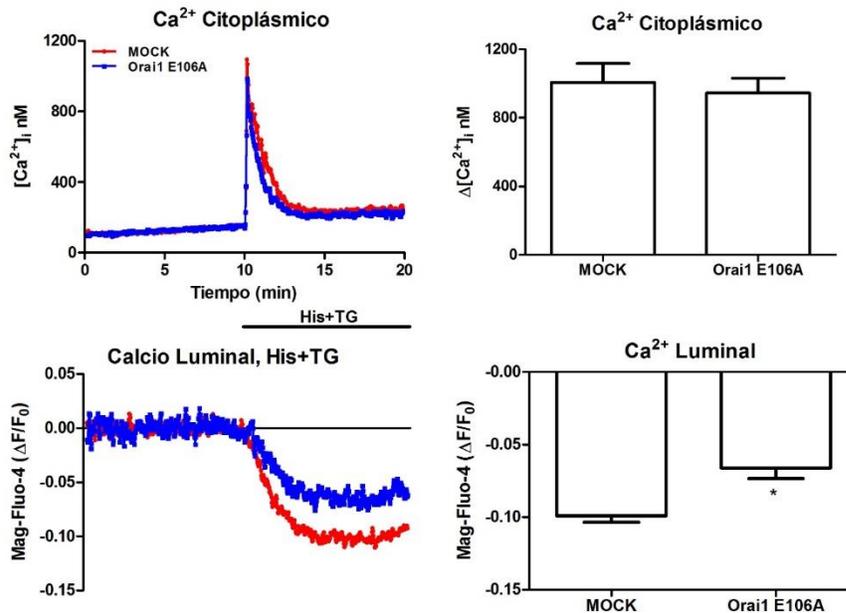


Fig. 8.5 La sobre-expresión de la dominante negativa de Orai1 (Orai1 E106A) inhibe el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ sin incrementar el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$, en células estimuladas con His y TG. Las células fueron transfectadas con los plásmidos MOCK y la mutante Orai1 E106A. Después de 24 h de transfección, fueron incubadas a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con His y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Las células que sobre-expresan Orai1 E106A mostraron una inhibición del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$, respecto a las células MOCK ($-0.066 \pm 0.007 \Delta F/F_0$ y $-0.099 \pm 0.004 \Delta F/F_0$, respectivamente), sin diferencias estadísticamente significativas en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$. La inhibición con Orai1 E106A es menos aguda respecto a las células que sobre-expresan Orai1 ($-0.032 \pm 0.011 \Delta F/F_0$). $n=5 \pm SE$, * $p < 0.05$.

Cuando se llevó a cabo este mismo experimento pero a las células se estimularon con la combinación de His y TG, la inhibición del vaciamiento de Ca^{2+} se presentó 30 seg después de haberse aplicado el estímulo ($-0.099 \pm 0.004 \Delta F/F_0$ y $-0.066 \pm 0.007 \Delta F/F_0$ para las células MOCK y las células Orai1E106A, respectivamente), sin embargo esta inhibición fue menor respecto a las células que sobre-expresaron Orai1 nativo ($-0.032 \pm 0.011 \Delta F/F_0$). El transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ no mostró una diferencia estadísticamente significativa como era de esperarse para el caso de His y TG.

Estos datos, en conjunto, sugieren que la inhibición del vaciamiento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ por la sobre-expresión de Orai1 no requiere que dicha proteína sea un canal funcional, sino que más bien depende de su presencia como proteína. Nosotros proponemos que la proteína Orai1 estaría interaccionando directamente

con el RIP_3 , inhibiéndolo de una forma tardía y que sólo la combinación de ATP y TG resulta en un incremento del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (véase Fig. 8.1), este efecto podría deberse a que los receptores purinérgicos son capaces de activar a los canales Orai1, respecto a los histaminérgicos, promoviendo una entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular al citoplasma ligeramente mayor.

8.3 Sobre-expresar la doble mutante Orai1 S27A/S30A incrementa el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pero no el vaciamiento del RE con ATP y TG.

El influjo de Ca^{2+} a través de la entrada capacitativa o SOCE está regulado negativamente por PKC (Kawasaki *et al.*, 2010). Este grupo demostró que la mutación de los residuos de Orai1 S27 y S30 por alaninas (aminoácidos no fosforilables) resultó en que la entrada capacitativa se aumentaba con respecto a las células control, lo que sugiere que estos residuos estarían involucrados en la modulación negativa del influjo de Ca^{2+} por los canales Orai1, probablemente por promover el desacople entre la proteína STIM1 y el canal Orai1.

Con la finalidad de conocer si los residuos fosforilados por la PKC estarían participando en la inhibición del vaciamiento $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, se realizaron experimentos simultáneos de Ca^{2+} , transfectando a las células con la doble mutante de Orai1 (Orai1 S27A/S30A). La Fig. 8.6 muestra las respuestas de las células que sobre-expresaron a Orai1 S27A/S30A al ser estimuladas con ATP y TG. Cuando Orai1 no puede ser fosforilado por la PKC, la inhibición se abolió totalmente, lo que sugiere que esta cinasa podría ser un elemento muy importante en la regulación negativa del vaciamiento de Ca^{2+} luminal del RE por el RIP_3 . Sin embargo el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incrementó en las células Orai1 S27A/S30A respecto a las células MOCK (945.7 ± 89.98 nM y 700.4 ± 40.75 nM respectivamente), lo cual indica que las proteínas mutantes de Orai1 son canales funcionales a pesar de no contar con los sitios de fosforilación por PKC y por lo mismo se comportan igual que el canal Orai1 nativo. Estos datos a su vez nos permiten concluir que la doble mutante de Orai1, que no puede ser fosforilada por PKC, se comporta como un canal funcional que permite una mayor entrada de Ca^{2+} de tipo capacitativa.

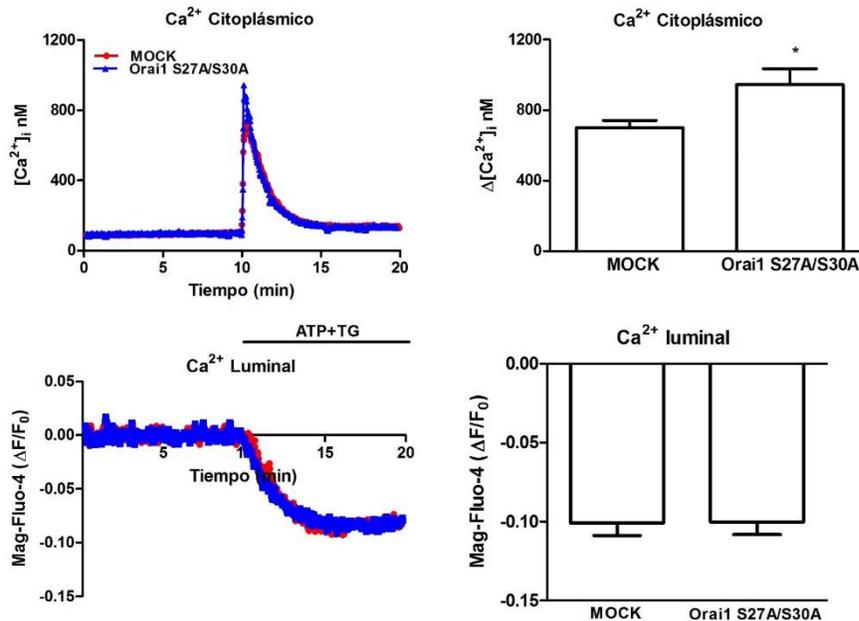


Fig. 8.6 La sobre-expresión de la doble mutante Orai1 S27A/S30A, incrementa el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$, pero no inhibe el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células que fueron estimuladas con ATP y TG. Las células fueron transfectadas con los plásmidos MOCK y la doble mutante Orai1 S27A/S30A. Después de 24 h de transfección, fueron incubadas a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con ATP y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Las células que sobre-expresaron Orai1 S27A/S30A mostraron un incremento del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ respecto a las células MOCK (945.7 ± 89.98 nM y 700.4 ± 40.75 nM, respectivamente) sin que la respuesta en el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ fuese inhibida. $n=5 \pm SE$, * $p < 0.05$.

En la Fig. 8.7 se puede observar el efecto de la mutante Orai1 S27/30A en las respuestas de Ca^{2+} inducida por la combinación de His y TG. El registro muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ ni en el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$. Considerando que esta mutante es completamente funcional como canal y además promueve una mayor entrada de Ca^{2+} debido a las mutaciones que tiene en los residuos de fosforilación por PKC, es de esperarse que haya un transitorio de Ca^{2+} mayor. Contrario a esto, el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ de las células transfectadas con la doble mutante S27A/S30A sólo mostró una tendencia a aumentar, aunque ésta no fue estadísticamente significativa.

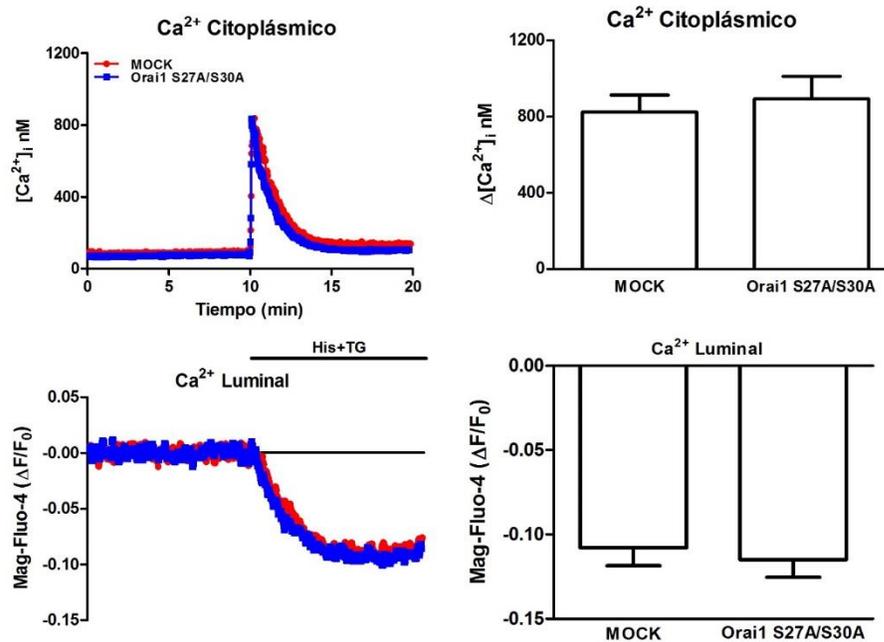


Fig. 8.7 La sobre-expresión de la doble mutante de Orai1 (Orai1 S27A/S30A) no muestra un efecto en la respuesta luminal y citoplásmica de células estimulas con His y TG. Las células se transfectaron con los plásmidos MOCK y la doble mutante Orai1 S27A/S30A. Después de 24 h de transfección, se incubaron a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con His y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Las células que sobre-expresaron Orai1 S27A/S30A no mostraron respuestas con diferencias estadísticamente significativas, respecto a las células MOCK. $n=5 \pm SE$.

Con la finalidad de corroborar que el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ mayor se debía a un efecto particular de la activación de los receptores purinérgicos con ATP (Ver Fig. 8.1 y 8.7), realizamos registros simultáneos de Ca^{2+} en los que las células se transfectaron con la doble mutante de Orai1 (S27A/S30A) y se estimularon únicamente con TG (Fig. 8.8). Este experimento mostró que la respuesta en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ así como el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ no presentó diferencias estadísticamente significativas y por lo mismo podemos concluir que se requiere la participación de los receptores purinérgicos a ATP para observar los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$.

En conjunto estos datos sugieren que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en células que sobre-expresan Orai1 u Orai1S27A/S30A, es un efecto que sólo se muestra cuando Orai1 es funcional y cuando las células fueron estimuladas con ATP y TG y no se puede inducir por la combinación de His y TG o al bloquear únicamente a

la bomba SERCA con TG, probablemente porque el canal Orai1 podría estar involucrado en estimular la entrada de Ca^{2+} en la membrana plasmática y en la inhibición del vaciamiento del RE, llevado a cabo por dos mecanismos moleculares diferentes que pudieran ser regulados por la fosforilación de PKC .

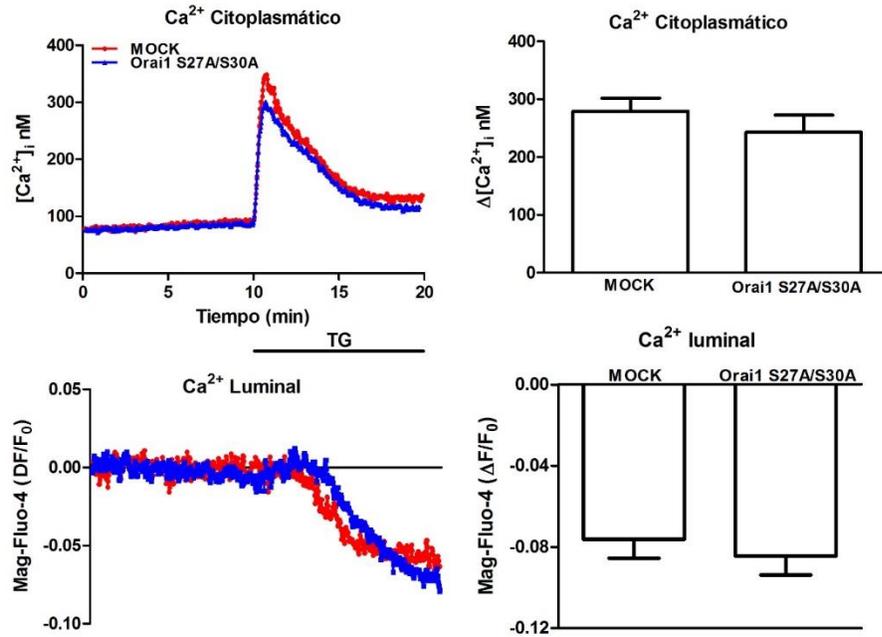


Fig. 8.8 Las células que sobre-expresan la doble mutante de Orai1 (Orai1 S27A/S30A) no mostraron un transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mayor cuando fueron estimuladas únicamente con TG. Las células se transfectaron con los plásmidos MOCK y la doble mutante Orai1 S27A/S30A. Después de 24 h de transfección, se incubaron 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Las células Orai1 S27A/S30A no muestran diferente respuesta luminal o citoplásmico que sea estadísticamente significativa, respecto a las células MOCK. $n = 4 \pm \text{SE}$.

8.4 Gö 6976, un inhibidor específico para las PKC dependientes de Ca^{2+} , abatió la inhibición de la combinación ATP y TG, sin embargo no mostró ningún efecto para la combinación de His y TG.

Con la finalidad de obtener mayor evidencia de la participación de la PKC en la modulación de la inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ se utilizó el inhibidor Gö 6976, ya que se considera que éste discrimina entre las PKC dependientes de Ca^{2+} , es decir las clásicas, y aquellas que no requieren un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para su activación (Martiny-Baron *et al.*, 1993). Las células que sobre-expresaron Orai1 y las células MOCK fueron preincubadas por 10 min con Gö 6976 y se aplicó el

estímulo. En la Fig. 8.9 se muestra que la respuesta en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ no presentó diferencias entre las células MOCK y las células que sobre-expresaban Orai1, así mismo la inhibición del vaciamiento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ ya no resultó en una diferencia estadísticamente significativa debido a dos efectos principales: Gö6976 tiene un impacto en las células MOCK, disminuyendo el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$, y en las células que sobre-expresaban Orai1, abatiendo casi completamente la inhibición, este experimento nos permite ver que la inhibición de las PKC dependientes de Ca^{2+} , produce respuestas muy similares en el vaciamiento del RE para las células que sobre-expresan Orai1 y las células MOCK, sugiriendo que la inhibición producida por la combinación ATP y TG requiere de la actividad de las PKC clásicas para que se lleve a cabo.

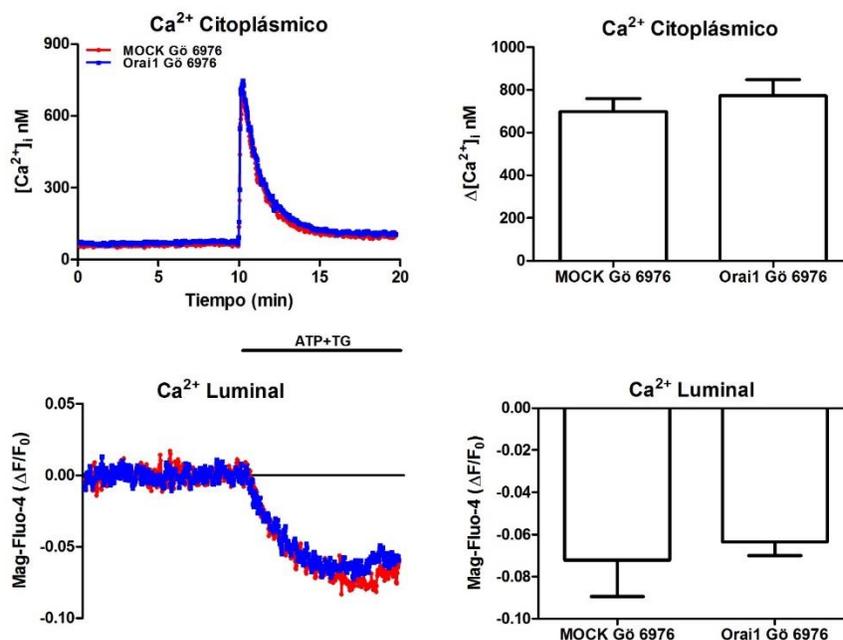


Fig. 8.9 Pre-incubar a las células con Gö 6976, disminuye el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en las células MOCK y abate por completo la inhibición de las células que sobre-expresan Orai1. Las células se transfectaron con los plásmidos MOCK y CFP-Orai1. Después de 24 h de transfección, se incubaron a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM. Las células se pre-incubaron por 10 min con Gö 6976 (200 nM) y se estimularon con ATP y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). Las células MOCK así como las células Orai1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ o el vaciamiento $[Ca^{2+}]_{RE}$. Interesantemente Gö 6976 mostró un efecto dual: indujo una menor inhibición en las células Orai1 (de $-0.027 \pm 0.009 \Delta F/F_0$ a $-0.056 \pm 0.006 \Delta F/F_0$) y disminuyó el vaciamiento en las células MOCK (de $-0.120 \pm 0.008 \Delta F/F_0$ a $-0.073 \pm 0.018 \Delta F/F_0$), $n = 5 \pm SE$.

En la Fig. 8.10 se muestra el efecto de pre-incubar a las células con Gö 6976 y estimularlas con His y TG; el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico no presentó

diferencias estadísticamente significativas, sin embargo sí se observó la inhibición del vaciamiento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, sugiriendo que la His involucra la activación de una cinasa diferentes a las cPKC. Los registros mostraron que la inhibición para His y TG fue menos aguda (véase la Fig. 8.2 y 8.4) comparada con la combinación de ATP y TG (véase Fig. 8.1 y 8.3), esto podría deberse a que la His produce menos IP_3 cuando se compara con otros agonistas (van der Wal *et al.*, 2001). Ya que el IP_3 y el DAG son los dos productos de la $PLC\beta$ al escindir el fosfolípido PIP_2 . Nosotros proponemos que en el caso de la His, la cinasa que regula la inhibición podría ser una PKC nueva y su efecto no sería tan prominente debido a la reducida producción de DAG como resultado de la pobre activación de la $PLC\beta$ por la His, y por lo mismo este efecto no se puede abatir con un inhibidor de cPKC.

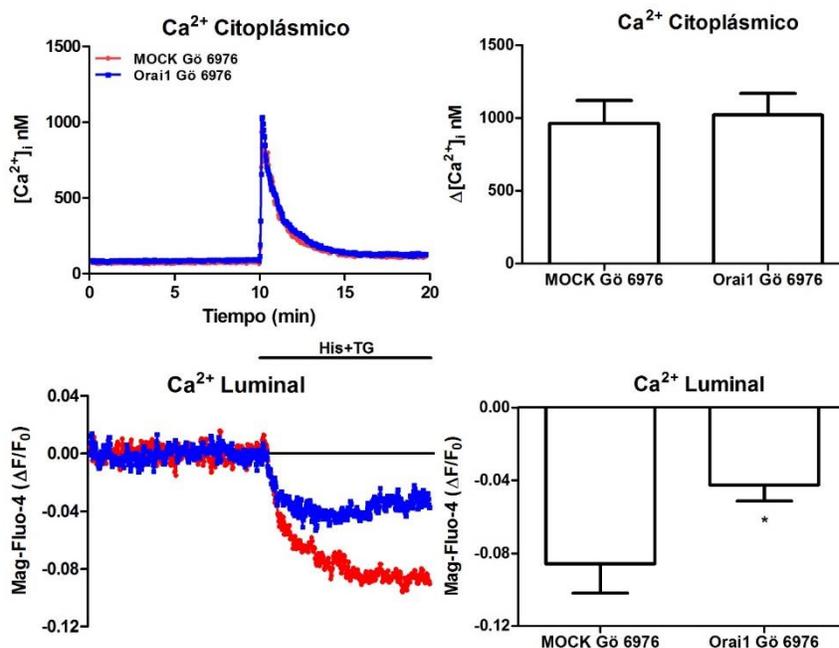


Fig. 8.10 Pre-incubar a las células con Gö 6976 y estimularlas con His y TG, no altera la inhibición del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$. Las células se transfectoron con los plásmidos MOCK y CFP-Orai1. Después de 24 h de transfección, se incubaron a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM. Se pre-incubaron 10 min con Gö 6976 (200 nM) y se estimularon con His y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). La inhibición del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ no se afectó por Gö 6976 ($-0.087 \pm 0.020 \Delta F/F_0$ y $-0.035 \pm 0.009 \Delta F/F_0$ para las células MOCK y Orai1, respectivamente), el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ no mostró diferencias estadísticamente significativas, $n = 5 \pm SE$, * $p < 0.05$.

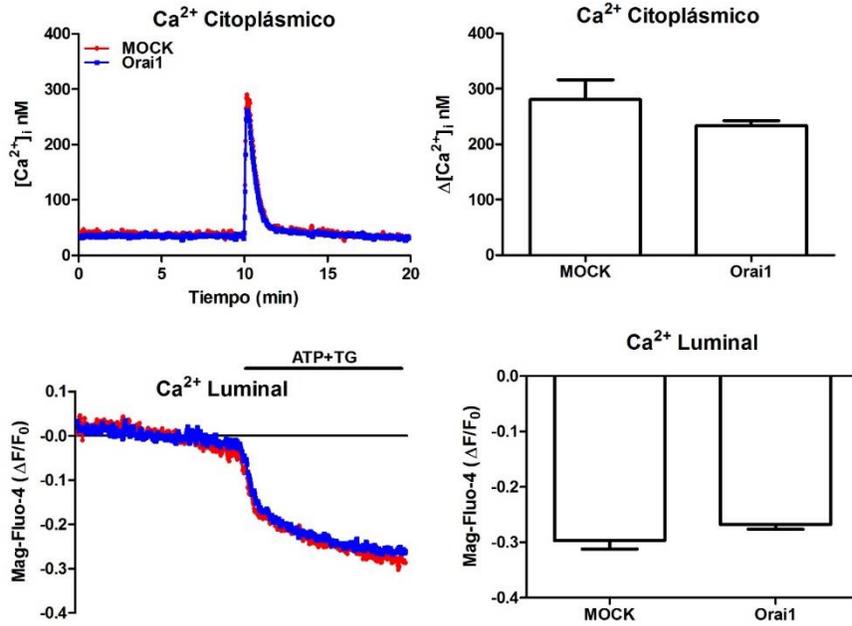


Fig. 8.11 La sobre-expresión de Orai1 en un medio sin Ca^{2+} , no inhibe el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$. Las células se transfectoron con los plásmidos MOCK y CFP-Orai1. Después de 24 h de transfección, se incubaron a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM. Se estimularon con His y TG, en un medio sin Ca^{2+} . La respuesta luminal muestra que no hubo inhibición por Orai1 cuando las células se encuentran en un medio sin Ca^{2+} , así como una tendencia, a disminuir el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células que sobre-expresan Orai1, $n = 5 \pm \text{SE}$.

8.5 La combinación de His y TG inhibe el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, cuando las células se mantuvieron en un medio sin Ca^{2+} .

Con la finalidad de corroborar que la inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, está siendo modulada por diferentes cinasas para cada agonista y que una de ellas es dependiente de Ca^{2+} , así como determinar la fuente de donde proviene un mayor transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se realizó un experimento sobre-expresando Orai1 en solución de registro sin Ca^{2+} . Las células que sobre-expresan Orai1 y son estimuladas con ATP y TG mostraron un transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ligeramente menor respecto a las células MOCK (Fig. 8.11), sugiriendo que Orai1 promueve también un vaciamiento parcial del retículo endoplásmico en ausencia de Ca^{2+} externo. Además la inhibición del vaciamiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ se abate totalmente, apoyando nuestra hipótesis, la cual menciona que la activación de una PKC dependiente de Ca^{2+} promueve la inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ al fosforilar los residuos S27/S30 de Orai1, lo cual probablemente promueve su interacción con el RIP_3 , debido a que se

seguimos observado la inhibición del vaciamiento del RE al sobre-expresar a una proteína Orai1 que no funciona como canal.

Cuando las células que sobre-expresan Orai1 fueron estimuladas con His y TG en un medio sin Ca^{2+} (Fig. 8.12), las células MOCK mostraron una respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con una tendencia a ser mayor, éste es un comportamiento parecido al que se observó con el ATP y la TG en un medio sin Ca^{2+} (ver Fig. 8.11), pero interesantemente en las células que sobreexpresan Orai1 la inhibición del vaciamiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ fue estadísticamente significativo respecto a las células MOCK ($-0.203 \pm 0.007 \Delta F/F_0$ y $-0.290 \pm 0.021 \Delta F/F_0$, respectivamente), sin embargo a diferencia de la inhibición que se observó cuando las células están en un medio con Ca^{2+} (Fig. 8.2), ésta requirió de aproximadamente 40 seg para que fuera evidente. En conjunto estos datos apoyan la hipótesis de que al inducir el vaciamiento del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ con His y TG, se activa una cinasa que no depende de Ca^{2+} , la cual limita el vaciamiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$.

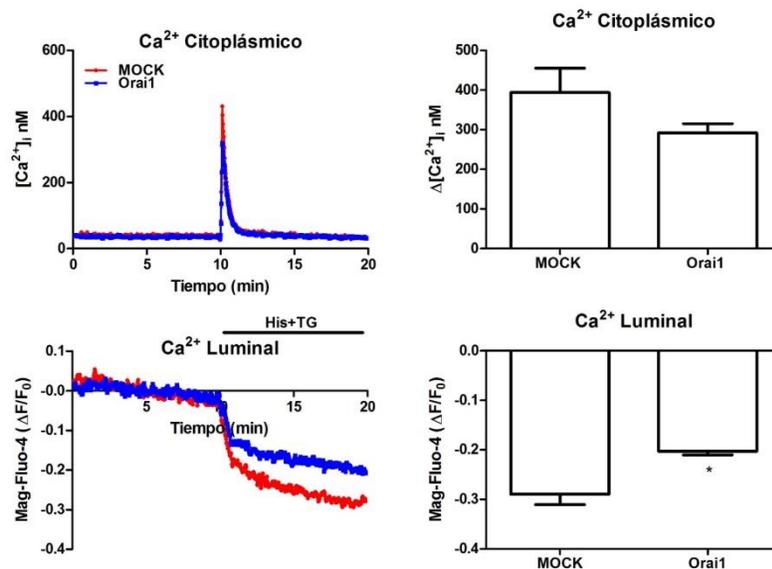


Fig. 8.12 Sobre-expresar Orai1 en un medio sin Ca^{2+} mostró inhibición en el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$. Las células se transfectaron con los plásmidos MOCK y CFP-Orai1. Después de 24 h de transfección, se incubaron a 27°C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con His y TG, en un medio sin Ca^{2+} . El transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no mostró diferencias estadísticamente significativas y el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ fue inhibido en las células que sobre-expresan Orai1, respecto a las células MOCK ($-0.203 \pm 0.007 \Delta F/F_0$ y $-0.290 \pm 0.021 \Delta F/F_0$, respectivamente), $n=5 \pm \text{SE}$.

8.6 La transfección de las células con una proteína Orai1 que simula estar permanentemente fosforilada (Orai1 S27E/S30E), no inhibe el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ ni produce efecto en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$.

Con base en los datos obtenidos, nosotros hemos propuesto que Orai1 necesita los residuos S27/S30 para ser fosforilado por una PKC dependiente de Ca^{2+} y de esta forma inhibir el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ cuando se induce con la combinación ATP y TG. Dicha inhibición también se puede ver cuando se induce el vaciamiento luminal con la combinación de His y TG pero estaría siendo regulada por una cinasa diferente a la PKC clásicas. Con la finalidad de demostrar nuestra hipótesis se utilizó una mutante de Orai1, que mimetiza el efecto de una proteína permanentemente fosforilada, al sustituir los residuos S27/S30 por glutamato (Orai1 S27E/S30E).

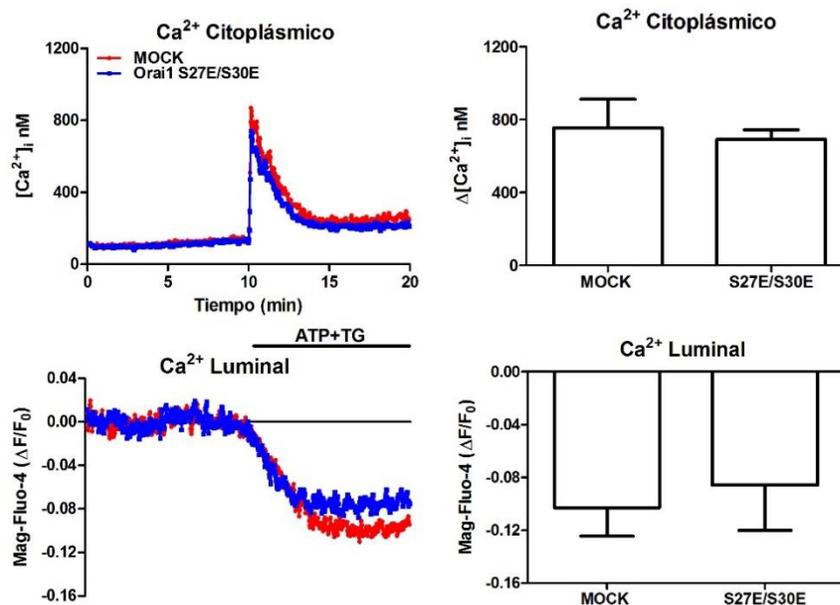


Fig. 8.13 Sobre-expresar la proteína mutante Orai1 S27E/S30E y estimular a las células con ATP y TG no mostró diferencias estadísticamente significativas en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ ni en el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$. Las células se transfectaron con los plásmidos MOCK y Orai1 S27E/S30E. Después de 24 h de transfección, se incubaron a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con His y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). El transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ no mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se transfeció a las células con una mutante que mimetiza un efecto de fosforilación permanente, $n = 3 \pm SE$.

Nuestra expectativa era ver una inhibición mucho mayor de la liberación de Ca^{2+} vía el RIP_3 que sería evidente desde el mismo momento en que se aplicara el estímulo y probablemente sería mayor que la que se produce con Orai1 tipo silvestre, debido a que esta última es un efecto tardío producido después de la activación del RIP_3 y que requiere la entrada de Ca^{2+} vía Orai1 para promover su fosforilación por PKC.

La Fig. 8.13 muestra que la sobre-expresión de Orai1 S27E/S30E tiene un efecto contrario al que esperábamos, ya que la respuesta del vaciamiento luminal tiene un comportamiento parecido al de las células MOCK, además aunque se supone que esta proteína es funcional como canal, tampoco mostró un incremento del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ característico de la combinación de ATP y TG (755.3 ± 156 nM y 692.1 ± 52.03 nM para células MOCK y células que sobreexpresan Orai1 S27E/S30E, respectivamente) aunque habría que verificar si la entrada capacitativa no está siendo afectada por estas mutaciones. La ausencia de efecto no parece deberse al agonista debido a que es muy parecido al observado con la combinación de His y TG (Fig. 8.14). Nuestros datos de PCR muestran que los plásmidos de Orai1 S27E/S30E sí se están expresando en las células HeLa en nuestras condiciones de transfección, pero no sabemos si la proteína producida es funcional o se encuentra en la posición correcta. Nosotros pensamos que estas mutaciones podrían estar alterando la estabilidad de la proteína y consecuentemente promoviendo su rápida degradación, esto pudiera explicar la ausencia de efecto entre la mutante y las células MOCK, aunque esta hipótesis requiere evidencia experimental que la apoye.

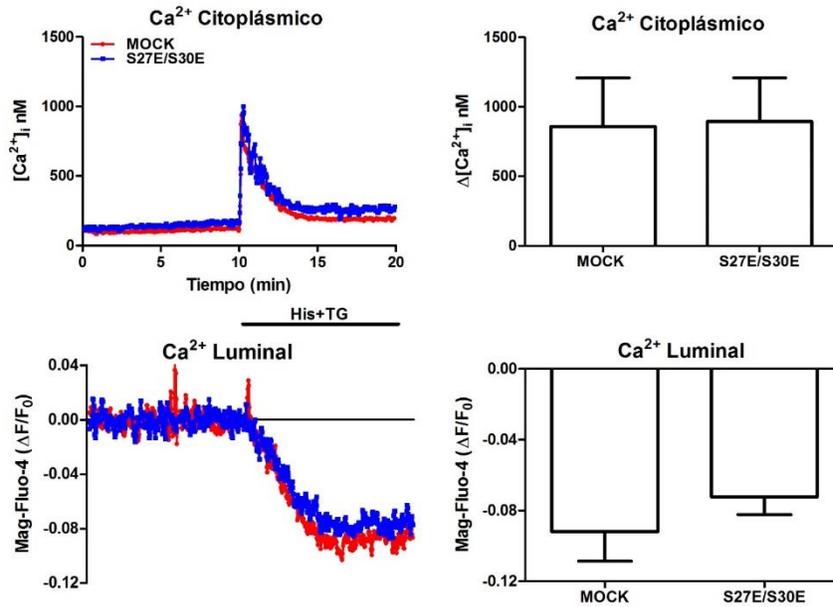


Fig. 8.14 Sobre-expresión de la proteína mutante Orai1 S27E/S30E y estimulación de las células con His y TG, muestra una respuesta muy parecida en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$, respecto a las células MOCK. Las células se transfectaron con los plásmidos MOCK y Orai1 S27E/S30E. Después de 24 h de transfección, se incubaron a 27 °C (2 h) con los fluoróforos fura-2/AM y mag-fluo-4/AM y se estimularon con His y TG, en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM). La respuesta del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ no presentó diferencias estadísticamente significativas cuando se transfectó a las células con una mutante que mimetiza una fosforilación permanente, $n = 3 \pm SE$.

En conclusión podemos sugerir el siguiente escenario donde la activación del RIP_3 por los agonistas induce un vaciamiento parcial del calcio luminal del RE que conlleva a la activación de Orai1 vía $STIM1$, esto aumenta la entrada de Ca^{2+} a nivel de la membrana plasmática; posteriormente la fosforilación de Orai1 por PKC clásicas o por otras cinasas, resulta en la disociación de Orai1 de la proteína $STIM1$ y la subsecuente interacción con el RIP_3 con un efecto inhibitorio que limita de forma significativa el vaciamiento del RE, aun cuando la bomba SERCA haya sido inhibida con la TG. La discusión presentará elementos de la literatura que apoyan dicho modelo de trabajo y a la vez propondremos enfoques experimentales que nos permitan probar la veracidad de este modelo.

9. DISCUSIÓN

La importancia de los canales Orai1 en la entrada de Ca^{2+} a través de la vía conocida como “SOCE” se ha reportado por diferentes laboratorios (Prakriya *et al.*, 2006; Hou *et al.* 2012; Luik *et al.*, 2006). El M. en C. Daniel León Aparicio mientras estudiaba el efecto de los canales Orai en el vaciamiento del RE, sobre-expresó Orai1 y descubrió una fuerte inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ inducido por agonistas de los receptores acoplados a proteínas G, lo que sugería un nuevo mecanismo por el cual esta proteína promovía la recuperación del RE en células HeLa. Como se indicó antes, está claro que Orai1, vía SOCE, promueve la recuperación del Ca^{2+} luminal del RE y esto requiere de la actividad de la bomba SERCA. Sin embargo, Orai1 limita el vaciamiento del RE a pesar de que la bomba SERCA está completamente inhibida por tapsigargina.

Por lo anterior la presente tesis tiene como objetivo contestar si Orai1 promueve la recuperación del RE por otro mecanismo que no requiere su actividad como canal iónico de Ca^{2+} . Este efecto de Orai1 no se observa cuando se utiliza únicamente tapsigargina para vaciar el RE (Fig. 8.3), entonces está claro que se requiere la activación de los receptores acoplados a las proteínas G. Los receptores acoplados a las proteínas G liberan Ca^{2+} del RE debido a la activación de la PLC y cada receptor muestra un perfil cinético característico en la producción de IP_3 . Ya que el reclutamiento y activación del RIP_3 es un proceso de “todo o nada” esto explica la ausencia de una relación lineal entre la producción de IP_3 y los transitorios de Ca^{2+} citoplásmico (van der Wal *et al.*, 2001). Con estos antecedentes decidimos explorar el mecanismo por el cual la proteína Orai1 limita el vaciamiento del RE en células HeLa, en las cuales se sobre-expresó esta proteína y fueron estimuladas con dos combinaciones diferentes de agonistas; ATP junto con TG e His y TG.

La sobre-expresión de la proteína Orai1 en células HeLa inhibió el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ independientemente del estímulo utilizado, es decir fuese ATP y TG o His y TG. Sin embargo los efectos no fueron idénticos, notamos que la combinación de ATP y TG produjo una inhibición más aguda y presentó un mayor transitorio de

[Ca²⁺]_i (Fig. 8.1 y 8.2), lo que sugiere que la homeostasis de Ca²⁺ es regulada de forma diferente entre estos dos agonistas, aunque compartan una misma vía de liberación de Ca²⁺, vía el RIP₃. Esto es congruente con la idea de que el receptor histaminérgico H1 tiene menor producción de IP₃ y un menor vaciamiento luminal del RE que se ha reportado anteriormente (Riach *et al.*, 1995; van der Wal *et al.*, 2001). Ya que SOCE no puede ser la explicación para este efecto de Orai1, nosotros proponemos que podría ser un efecto tardío de Orai1, que requiere la activación de Orai1 y su subsecuente inactivación por fosforilación. Decidimos estudiar la importancia de que Orai1 fuera funcional pues cabía la posibilidad de que el canal estuviera metiendo Ca²⁺ del espacio extracelular directamente al RE, sin la participación de la bomba SERCA o por un mecanismo que no requiere a una proteína Orai1 que funcione como canal.

Nuestros experimentos con la dominante negativa de Orai1 (Orai1 E106A), que es un canal no funcional, mostraron que esta mutante aún promovió la reducción en el vaciamiento del RE, aunque no de la misma magnitud que la proteína nativa (Fig. 8.4 y Fig. 8.5), y de forma particularmente interesante, el registro muestra una inhibición menor con respecto a Orai1 nativo, al estimular a las células con His y TG, en conjunto estos datos sugieren que esta regulación negativa del vaciamiento del RE pareciese involucrar una interacción proteína-proteína (pudiera ser Orai1-RIP₃), que depende del tipo de agonista que se emplee y está favorecida por la actividad de canal de Orai1.

Como ya se ha reportado, la PKC participa modulando negativamente la entrada de Ca²⁺ vía SOCE en diferentes líneas celulares (Parekh & Penner, 1995; Curtis *et al.*, 2003; Tojyo *et al.*, 2013; Hooper *et al.*, 2015), al fosforilar a Orai1 en los residuos S27 y S30 (Kawasaki *et al.*, 2010). Por lo tanto decidimos estudiar si estos sitios de fosforilación tuvieran algún papel en el efecto de Orai1 de evitar el vaciamiento del RE. Por lo mismo llevamos a cabo la transfección de la doble mutante de Orai1 (Orai1 S27A/S30A), cuyos residuos de serina son reemplazados con alanina y por lo mismo no pueden ser fosforilados. Esta mutante fue incapaz de inhibir el vaciamiento del retículo puesto que observamos que la respuesta

luminal tanto en las células que sobre-expresaban Orai1 S27A/S30A como en las que expresan el vector vacío no mostraron diferencias (Fig. 8.6 y Fig. 8.7). Notamos sin embargo que se presentaba nuevamente un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, que parecía ser particular para la combinación de ATP y TG. Un transitorio mayor del $[Ca^{2+}]_i$ es característico de una proteína Orai1 funcional como canal, lo cual es independiente de que no pueda ser fosforilada por la PKC (Kawasaki et al. 2010).

Para corroborar que el incremento en el transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ es favorecido por el uso de ATP, transfectamos a las células con Orai1 S27A/S30A y se estimularon únicamente con TG. Las respuestas del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ fueron similares, favoreciendo la idea de que es necesario estimular a las células con un agonista para poder ver un incremento en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y la inhibición del vaciamiento del RE. Estos datos sugieren que Orai1 está jugando un papel dual; al favorecer el influjo de Ca^{2+} al citoplasma, que ya ha sido reportado anteriormente (Woodard *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2016), e inhibir el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$, este último efecto podría estar siendo mediado por PKC.

Para comenzar a discriminar qué tipo de PKC estaría regulando el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ pre-incubamos a las células durante 10 min con Gö 6976, un inhibidor relativamente selectivo de las PKC clásicas (Martiny-Baron et al. 1993), y evaluamos el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y el vaciamiento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$. Este experimento nos permitió observar que la inhibición luminal del RE requiere la actividad de PKC clásicas al utilizar la combinación de ATP y TG (Fig. 8.4); sin embargo el efecto en el vaciamiento del RE inducido por la combinación de His y TG no se vio modificado por la inhibición de la PKC clásica. Nosotros proponemos que estas diferencias sugieren la participación de diferentes cinasas para cada agonista; en el caso de los receptores purinérgicos activados por el ATP estarían participando las cPKC y en el caso de los receptores histaminérgicos H1 activados por Histamina involucraría otro tipo de cinasas diferentes a las cPKC. Esta propuesta la hacemos con base en la cinética de vaciamiento mostrada por la adición de His y TG (Fig. 8.5), la cual exhibe un mecanismo más complejo (una

inhibición inicial que depende de Ca^{2+} , seguida de inhibición que no depende de Ca^{2+} y que involucra una cinasa diferente a PKC). Siendo evidente al comparar las respuestas donde se sobre-expresó Orai1 (Fig. 8.1) y Orai1 pre-incubado con Gö 6976 (Fig. 8.10), la inhibición es menos aguda al inhibir a las cPKC. Para poder determinar en el futuro el tipo de cinasa que podría estar regulando el vaciamiento luminal del RE, inducido por His y TG, se podría utilizar el Gö 6983, el cual es un inhibidor de PKC de amplio espectro (Young *et al.*, 2005).

Los registros simultáneos en un medio sin Ca^{2+} demuestran que el incremento del transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debe a un incremento de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular (Fig. 8.11) e interesantemente observamos que solamente las células que fueron estimuladas con la combinación de His y TG mantenían la inhibición del vaciamiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Fig 8.12), aunque ésta fue menor que en presencia de Ca^{2+} (Fig. 8.2). Esto concuerda con la idea de que la histamina involucra la participación inicial de una cinasa dependiente de Ca^{2+} y como un mecanismo posterior una cinasa independiente de Ca^{2+} . Un comportamiento bifásico en la cinética de vaciamiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ inducida por His, ya se había observado con anterioridad y usando estaurosporina se elimina dicho comportamiento bifásico, sugiriéndose la participación de cinasas en el proceso de inactivación del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ inducido por la Histamina (Montero *et al.*, 2003).

Nosotros evaluamos la participación de PKC en la inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, mediante una mutante que mimetiza el efecto de una proteína Orai1 permanentemente fosforilada (Orai1 S27E/S30E). En este experimento esperábamos ver una inhibición temprana, incluso mayor que la observada con Orai1 nativo. Sin embargo los registros no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 8.13 y 8.14) en la respuesta luminal y citoplásmica, con ninguno de los agonistas.

Con el objetivo de descartar una baja eficiencia de transfección, realizamos experimentos exploratorios de PCR y de forma preliminar podemos decir que el plásmido estaba sobre-expresando el mRNA del canal completo (datos no

mostrados). Por otra parte descartamos la posibilidad de que el plásmido contenga una proteína Orai1 nativa, debido a que los registros no mostraron inhibición del vaciamiento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ ni un incremento en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$, en las células estimuladas con ATP y TG.

La ausencia de efecto con Orai1 S27E/S30E, no excluye la posibilidad de evaluar, en un futuro, su expresión como proteína. Pensamos que esta mutación podría conferirle inestabilidad al canal, haciéndolo no funcional o promoviendo su pronta degradación. Otra posibilidad es que no se necesite fosforilar los dos sitios de Orai1 para inhibir la entrada capacitativa, ya que en los experimentos de Kawasaki *et al.* (2010) no se evaluó la entrada capacitativa al fosforilar únicamente un residuo de serina, por lo que sería interesante repetir este experimento con una mutante que exprese sólo un residuo fosforilado (ya sea S27E/S30 o S27/S30E).

En diferentes laboratorios se ha reportado la participación de PKC en SOCE (Hooper *et al.*, 2015; Petersen & Berridge, 1994; Wilson *et al.*, 2015) como regulador negativo de la entrada de Ca^{2+} vía SOCE. Sin embargo en un estudio realizado por Tojyo *et al.* (2013), observaron una mayor entrada de Ca^{2+} al citoplasma cuando pre-incubaron a las células con estaurosporina, el cual es uno de los más potentes inhibidores de PKC, pero además inhibe otras cinasas como a la cinasa dependiente de cAMP, la cinasa de tirosina, y la cinasa de la cadena ligera de miosina. Este grupo sugirió que una mayor entrada de Ca^{2+} , causada por estaurosporina, fue debida a la inhibición de la fosforilación de proteínas. Estos datos podrían explicar por qué al inhibir a las cPKC, no se ve un abatimiento total de la inhibición en el vaciamiento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ cuando las células son estimuladas con His (Fig. 8.10), sugiriendo un mecanismo que involucra la participación de diferentes cinasas.

Las diferencias en los perfiles de inhibición del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$, para las células estimuladas con ATP o His, han mostrado que son dependientes del agonista. Como ya se ha evaluado anteriormente con mediciones indirectas, cada agonista produce IP_3 con un perfil característico. Aunque no hay una relación lineal

entre la producción de IP_3 y el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (van der Wal et al. 2001), haciendo que el vaciamiento luminal tenga diferentes mecanismos de regulación, dependientes del agonista con el que se estimule la producción de IP_3 .

Nuestros datos nos permiten proponer que la inhibición en la entrada de Ca^{2+} , al fosforilar Orai1 en las S27/S30 (Kawasaki et al. 2010), podría ser debida a que Orai1 fosforilado pierda afinidad por STIM1 y podría tener más afinidad por el RIP_3 . Esta competencia entre STIM1 y el RIP_3 por interaccionar con Orai1, podrían mantener de forma discreta este mecanismo de inhibición y por tal motivo es predominante cuando sobre-expresamos Orai1. No tenemos evidencias de que este mecanismo se esté llevando a cabo de manera fisiológica, pero sería interesante evaluar si el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ se acelera con el siRNA de Orai1. El grado de vaciamiento luminal del RE es mayor cuando se realizan los experimentos en ausencia de Ca^{2+} (datos no mostrados). Nosotros esperaríamos que si se tratara de un mecanismo fisiológico, el vaciamiento del $[Ca^{2+}]_{RE}$ tendría un comportamiento parecido a las condiciones en ausencia de Ca^{2+} externo y la falta de Orai1 para interaccionar con el RIP_3 , haría que el vaciamiento luminal incrementara aún en presencia de Ca^{2+} externo.

Nuestra propuesta de que Orai1 pierde afinidad por STIM1, cuando es fosforilado por cPKC en el caso de ATP o por un conjunto de cinasas en el caso de His, coincide con lo observado al incubar a las células con estaurosporina. En estos experimentos la formación de puntas por STIM1 no se afectó, sin embargo el desensamble de STIM1 y Orai1 no se llevó a cabo de forma eficiente, aun cuando los depósitos ya habían sido rellenos completamente. Proponiendo que una cinasa inhibida por la estaurosporina reduce la estabilidad de la interacción Orai1/STIM1 (Tojyo et al. 2013). En otro estudio se observó que en células de melanoma maligno, la entrada de Ca^{2+} vía SOCE sólo se reestablecía cuando se transfectaba a las células con Orai1 S27A/S30A, y en menor medida con el uso de Gö 6983 (Hooper et al. 2015). En estos experimentos se muestra que al evitar la fosforilación de Orai1 se mantiene su función como canal, por un tiempo mayor, aun cuando los depósitos intracelulares ya estén llenos de Ca^{2+} . En estos trabajos

no se midió el Ca^{2+} luminal del RE que nos permite inferir un cambio de afinidad de Orai1, cuando éste es fosforilado.

Nuestros registros de Ca^{2+} luminal del RE sugieren que Orai1 fosforilado reduce el vaciamiento del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ por un mecanismo que no necesita a una proteína Orai1 con la función de canal (Fig. 8.4 y Fig. 8.5) y aunque al inhibir a las cPKC no se abatió totalmente la inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ inducido por His y TG (Fig. 8.10), sí mostró un mayor vaciamiento cuando fueron pre-incubadas con Gö 6976. Así mismo los registros con His y TG sugieren un mecanismo más complejo que no podría restringirse a que sólo Orai1 controlara la inhibición del vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, pudiendo ser un conjunto de cinasas las que participan. Es importante mencionar que Orai1 pareciera tener más sitios de fosforilación, y la participación de diferentes cinasas, podría explicar por qué con His no se abate toda la inhibición, así como las diferentes cinéticas de vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ que se observan con cada agonista empleado en este trabajo.

Está claro que la interacción, en condiciones basales, de Orai1 con el RIP_3 debe de tener importancia biológica, por otra parte que ésta misma sea favorecida por el uso de agonistas, apoya esta suposición (Woodard *et al.*, 2010). Vaciar el RE con TG son condiciones muy artificiales, en condiciones fisiológicas el vaciamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ es mediado por GPCR's y cada vaciamiento es característico del tipo de receptor que se está activando. Debido a la importancia fisiológica que tiene Orai1 en SOCE y la regulación de los TRPC, mediar su interacción con el RIP_3 podría ser un mecanismo de regulación discreta que en condiciones fisiológicas podría estar ocurriendo, pero sólo se puede ver cuando sobre-expresamos Orai1.

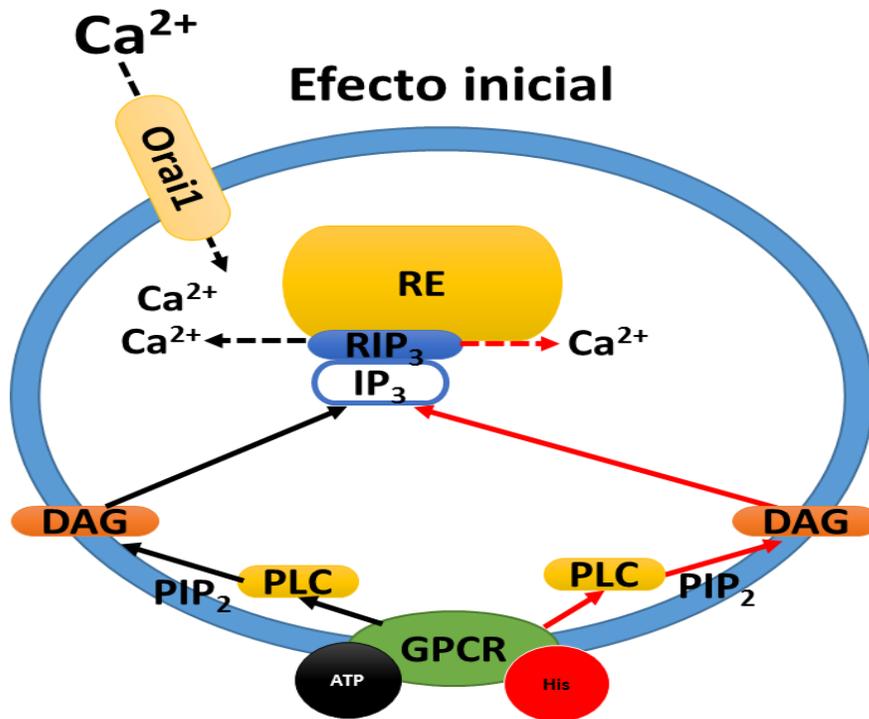


Fig. 9.1 Modelo de liberación de Ca^{2+} inducido por ATP y TG o His y TG. Cuando se sobre-expresa la proteína Orai1 y se estimula a las células con ATP y TG (flechas negras), se activa una mayor entrada de Ca^{2+} a través de los canales Orai1, que son activados cuando se disminuyen los niveles de Ca^{2+} en el RE, debido a la inhibición de la bomba SERCA con TG y liberar Ca^{2+} del RE, vía el RIP_3 . Este efecto no se ve con His y TG (flechas rojas).

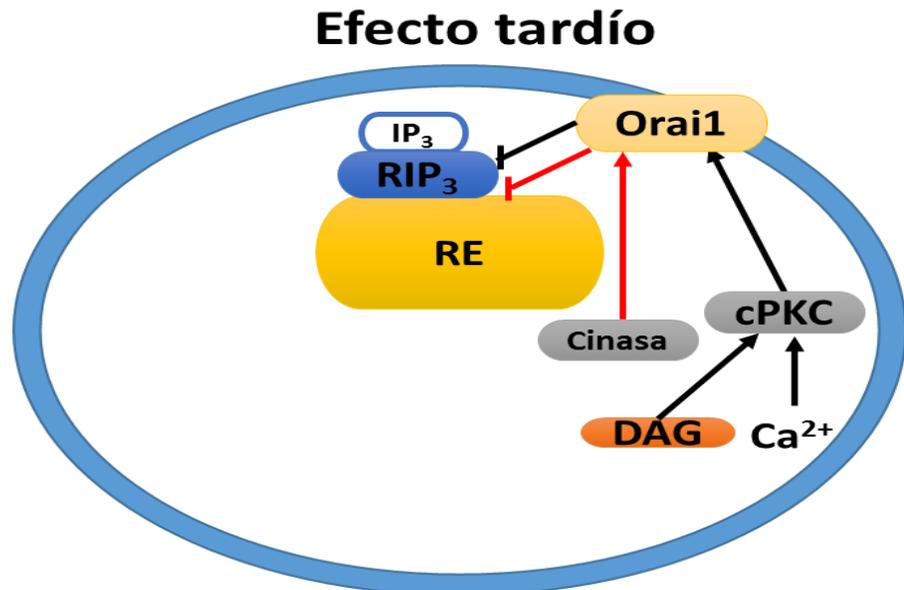


Fig. 9.2 Modelo de inhibición del vaciamiento de Ca^{2+} en el RE, mediado por diferentes cinasas. En el caso de ATP y TG, la activación de las $cPKC$ con Ca^{2+} y DAG, permiten la fosforilación de Orai1 y su posible interacción con el RIP_3 , dando lugar a la inhibición del vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$ (flechas negras). En el caso de His y TG, se estaría activando un conjunto de cinasas, dependientes e independientes de Ca^{2+} (flechas rojas).

Aunque anteriormente la sobre-expresión de Orai1 haya mostrado reducir SOCE, posiblemente por una relación estequiométrica deficiente (Soboloff *et al.*, 2006; Smyth & Putney, 2012), nosotros observamos que al sobre-expresar Orai1 hay un incremento en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ cuando las células son estimuladas por agonistas y no por la TG, esto aparentemente pudiera ser contradictorio con lo reportado en la literatura. Nosotros proponemos que estas diferencias son debidas al protocolo con el que realizamos los registros; en ese trabajo ellos evaluaron estrictamente la entrada capacitativa en un medio sin Ca^{2+} , mientras que nosotros realizamos los registros en un medio con Ca^{2+} , además de inducir el vaciamiento del RE con agonistas y TG. Si a esto se le suma que no se observó un efecto inhibitorio con solo TG (Fig. 8.3), podemos proponer que la entrada SOCE no estaría siendo afectada. Estos datos apoyan nuestra hipótesis de la señal de Mag-fluo-4, indicando un menor vaciamiento del RE, provocado posiblemente por una interacción proteína-proteína entre el RIP_3 y Orai1, que ya se ha reportado anteriormente (Woodard *et al.*, 2010).

Nuestros datos nos permitieron proponer una inhibición del vaciamiento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, que es modulada por la proteína Orai1. Ésta se compone de dos fases. Como primer efecto; Orai1 promovió un incremento en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$, únicamente en células estimuladas con ATP, en el caso de His el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ no muestra diferencias respecto a las células que expresan el plásmido MOCK. Como un efecto tardío; Orai1 inhibió el vaciamiento del RE, por una posible interacción con el RIP_3 , misma que es mediada, en el caso de ATP, por cPKC y en el caso de His, pareciese participar un sistema más complejo, que comprende más de una cinasa (Fig. 9.1 y Fig. 9.2).

El efecto luminal de la fosforilación de PKC en el canal Orai1 no quedó claro en los trabajos anteriores, es decir que no se esclareció cuál es el efecto de dicha fosforilación en el vaciamiento de $[Ca^{2+}]_{RE}$. Nosotros proponemos un sistema donde STIM1 y el RIP_3 se unen a Orai1 de una forma competitiva; cuando se induce un vaciamiento de Ca^{2+} luminal, la proteína Orai1 tiene más afinidad por STIM1 permitiendo el influjo de Ca^{2+} al citoplasma y cuando Orai1 está fosforilado tiene una mayor afinidad por el RIP_3 permitiendo su inactivación.

9. CONCLUSIÓN

Nuestros datos experimentales mostraron que la sobre-expresión de la proteína Orai1 afectó de diferente manera las respuestas inducidas por agonistas de receptores acoplados a proteínas G en sus transitorios de Ca^{2+} citoplásmico y en el nivel de vaciamiento del Ca^{2+} luminal del RE. Además estas diferencias dependieron también del agonista que se empleó y la sobre-expresión de Orai1 no afectó las respuestas de Ca^{2+} debidas a la inhibición de la bomba SERCA con tapsigargina. Esto refleja que los flujos de Ca^{2+} inducidos por agonistas tienen perfiles diferentes, aunque sus vías de señalización sean muy parecidas. Los datos obtenidos en este trabajo, nos permiten concluir lo siguiente:

- La sobre-expresión de la proteína Orai1 nativa promovió una mayor entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular, pero sólo en respuesta al ATP. Este efecto requiere que Orai1 sea un canal funcional y no parece estar involucrado SOCE puesto que el vaciamiento del RE con His o con TG no mostró este efecto. Pensamos que sólo los receptores purinérgicos facilitan la activación de los canales Orai1 por un mecanismo que no ha sido descrito.
- La inhibición debida a Orai1 del vaciamiento de Ca^{2+} luminal del RE que ha sido inducido con ATP y TG o con His y TG ocurre aun cuando el canal Orai1 expresado no era funcional, aunque la inhibición no fue tan grande como con el canal funcional. Estos datos sugieren que el efecto de Orai1 es bifásico, parte requiere la entrada de Ca^{2+} y parte pudiera deberse a una interacción proteína-proteína entre el RIP_3 y Orai1.
- La fosforilación de Orai1 (S27 y S30) es necesario para que esta proteína inhiba el vaciamiento de Ca^{2+} luminal del RE tanto por la activación de los receptores purinérgicos como de los receptores a histamina H1. La mayor entrada de Ca^{2+} citoplásmico vía Orai1 y promovida por ATP no requiere de la fosforilación de Orai1 en los aminoácidos S27 y S30.

- La inhibición de las PKC clásicas con Gö 6976 sugiere que el efecto inhibitorio de Orai1 en el vaciamiento del RE se debe a la activación de PKC clásicas por los receptores purinérgicos.
- La inhibición por Orai1 del vaciamiento del RE inducido por la activación de receptores H1 a histamina involucra dos diferentes tipos de cinasas, unas dependientes de Ca^{2+} , pero que no son las PKC clásicas y las otras serían independientes de Ca^{2+} . Estos datos sugirieron que los sitios de fosforilación de Orai1 (S27/S30) sean blancos de diferentes cinasas.
- Los experimentos con el mutante fosfomimético (S27E/S30E) del canal Orai1 no provocó la inhibición permanente de la liberación de Ca^{2+} inducida por el agonista. Aunque tenemos datos de que el mRNA del canal está presente, pareciese que el canal no es funcional, ya sea por inestabilidad o por localización incorrecta. Posibilidades que se requieren explorar.

10. PERSPECTIVAS

Debido a que estos datos son claramente novedosos, las preguntas que se abrieron consecuencia de este trabajo son más de las que se han respondido hasta el momento. Entre estos cuestionamientos podemos desglosar los siguientes:

1. Para determinar la relevancia de la fosforilación de Orai1 en su interacción con el RIP_3 , proponemos realizar experimentos de co-inmunoprecipitación con la doble mutante de Orai1 S27A/S30A, esperando ver que una proteína que no se puede fosforilar por las cPKC, no interaccione con el RIP_3 . Así como realizar co-inmunoprecipitación con Orai1 S27A u Orai1 S30A. También sería interesante evaluar la co-inmunoprecipitación entre Orai1 y el RIP_3 al estimular a las células con His y TG, en un medio sin Ca^{2+} . Nosotros esperaríamos ver que la co-inmunoprecipitación se viera favorecida al estimular a las células con agonista, aunque debería ser menor respecto a células estimulas en un medio con Ca^{2+} .
2. Se requiere identificar la naturaleza molecular de las cinasas que participan en la inhibición con His y TG.
3. También sería relevante estudiar la importancia de Ora1 endógeno en reducir el vaciamiento del RE utilizando siRNAs que nos permitan disminuir la expresión del canal y determinar si esto aumenta el vaciamiento del RE. Determinar también si el efecto de activar la PKC, con PMA, en la inhibición de la liberación de Ca^{2+} del RE requiere o no la presencia de Orai1.
4. Esclarecer las razones por las cuales la mutante fosfomimética de Orai1 S27E/S30E no muestra ningún efecto en el vaciamiento del RE. Determinar si la fosforilación sólo de S27 o S30 es suficiente para inhibir el vaciamiento del RE o si se requiere la fosforilación de ambos aminoácidos.
5. La ausencia de Ca^{2+} externo promueve un mayor vaciamiento y se ha pensado que esto se debe a que la bomba SERCA no tiene sustrato, sin embargo es factible que esta condición experimental también promueve un

mayor vaciamiento del RE al no activar las cPKC, esto requiere utilizar PMA para activar a las PKCs y observar si la ausencia de Ca^{2+} sigue facilitando el vaciamiento.

11. REFERENCIAS

Amcheslavsky, A., Safrina, O. & Cahalan, M.D., 2013. Orai3 TM3 point mutation G158C alters kinetics of 2-APB-induced gating by disulfide bridge formation with TM2 C101. *The Journal of general physiology*, 142(4), pp.405–412.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3787773&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

- Anleitung, 1987. Viable Cell Counts Using Trypan Blue. 実験, pp.1987–1987.
- Bandyopadhyay, B.C. et al., 2008. TRPC3 controls agonist-stimulated intracellular Ca²⁺ release by mediating the interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and RACK. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), pp.32821–32830.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Lipp, P., 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature*, 395(6703), pp.645–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/27094>.
- 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. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413485>.
- Bootman, M.D. et al., 2014. Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging. *Cold Spring Harbor Protocols*, 8(2), pp.25–49.
- Brini, M. & Carafoli, E., 2011. The plasma membrane Ca²⁺-ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), pp.1–17.
- Cheng, K.T. et al., 2011. Local Ca²⁺ entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca²⁺ signals required for specific cell functions. *PLoS Biology*, 9(3), pp.26–34.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), pp.1047–1058.
- Curtis, T.M. et al., 2003. Diabetes-induced activation of protein kinase C inhibits store-operated Ca²⁺ uptake in rat retinal microvascular smooth muscle. *Diabetologia*, 46(9), pp.1252–1259.
- DeHaven, W.I. et al., 2007. Calcium Inhibition and Calcium Potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 Calcium Release-activated Calcium Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), pp.17548–17556.
- Den, A., Hoiting, B., Molleman, A., Den, J., Duin, M., & Nelemans, A., 1992. Calcium release from separate Receptor-specific intracellular stores induced by Histamine and ATP in a hamster cell line. *Journal of Physiology*, 454,

pp.591–607.

- Derler, I., Jardin, I. & Romanin, C., 2016. The molecular mechanisms of STIM/Orai communications. A Review in the Theme: STIM and Orai Proteins in Calcium Signaling. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 310, pp.C643–C662. Available at:
<http://ajpcell.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpcell.00007.2016>.
- Fein, D.E. et al., 2010. Novel Cationic Lipids with Enhanced Gene Delivery and Antimicrobial Activity. *Molecular Pharmacology*, 78(3), pp.402–410.
- Flockerzi, V. & Nilius, B., 2007. *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*.
- González-Cobos, J.C. et al., 2013. Store-Independent Orai1/3 Channels Activated by Intracrine LeukotrieneC4: Role in Neointimal Hyperplasia. *Circulation Research*, 112(7), pp.1013–1025.
- Grynkiewicz, Grzegorz, Poenie, Martin, Tsien, R.Y., 1985. A New Generation Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties*. *The Journal of Biological Chemistry*, pp.3440–3450.
- Hallam, T.J., Jacob, R. & Merritt, J.E., 1989. Influx of bivalent cations. *Biochemical Journal*, 259, pp.125–129.
- Hogan, Patrick G., Richard S. Lewis, and A.R., 2010. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology*, 28(10), pp.491–533.
- Hooper, R. et al., 2015. Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma. *Molecular and Cellular Biology*, 35(16), pp.2790–2798. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/content/long/35/16/2790>.
- Hoth, M. & Niemeyer, B.A., 2013. The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Current Topics in Membranes*, 71, pp.237–271.
- Hou, X. et al., 2012. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6112), pp.1308–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3695727&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Jaclyn R. Holda, Andrey Klishin, Marina Sedova, J.H.& L.A.B., 1998. Capacitative calcium entry. *News in physiological sciences*, 13, pp.157–163.
- Jen Liou, Man Lyang Kim, Won Do Heo, Joshua T. Jones, Jason W. Myers,

- J.E.F.J. & T.M., 2005. STIM1 is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺ -Store-Depletion- Triggered Ca²⁺ Influx. *Current Biology*, 15(13), pp.1235–1241.
- Kawasaki, T. et al., 2010. Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), pp.25720–25730.
- Lee, K. et al., 2010. An Endoplasmic Reticulum/Plasma Membrane Junction: STIM1/ Orai1/TRPCs. *National Institutes of Health*, 584(10), pp.2022–2027.
- Lee, S.H. et al., 2016. Orai1 promotes tumor progression by enhancing cancer stemness via NFAT signaling in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(28), pp.43239–43255.
- Li, J. et al., 2015. Orai3 Surface Accumulation and Calcium Entry Evoked by Vascular Endothelial Growth Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(9), pp.1987–1994.
- Luik, R.M. et al., 2006. The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *Journal of Cell Biology*, 174(6), pp.815–825.
- Martin, V. et al., 2002. Three Novel Sarco/endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), pp.24442–24452.
- Martiny-Baron, G. et al., 1993. Selective Inhibition of Protein Kinase C Isozymes by the Indolocarbazole Gö 6976*. *The Journal of biological chemistry*, 268(13), pp.9194–9197.
- Mercer, J.C. et al., 2006. Large Store-Operated Calcium Selective Currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, STIM1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), pp.24979–24990.
- Mignen, O., Thompson, J.L. & Shuttleworth, T.J., 2008. Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels. *The Journal of physiology*, 586(1), pp.185–195.
- Montero, M. et al., 2003. Modulation of Histamine-induced Ca²⁺ Release by Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), pp.49972–49979.
- Newton, A.C., 1995. Protein Kinase C : Structure , Function , and Regulation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(48), pp.28495–28498.

- Nishizuka, Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB Journal*, 9(7), pp.484–496.
- Paila, Y.D., Pucadyil, T.J. & Chattopadhyay, A., 2005. The cholesterol-complexing agent digitonin modulates ligand binding of the bovine hippocampal serotonin 1A receptor. *Molecular membrane biology*, 22(3), pp.241–249. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096266>.
- Paredes, R.M. et al., 2008. Chemical Calcium Indicators. *National Institutes of Health*, 46(3), pp.143–151.
- Parekh, a B. & Penner, R., 1995. Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), pp.7907–7911.
- Petersen, C.C.H. & Berridge, M.J., 1994. The Regulation of Capacitative Calcium Entry by Calcium and Protein Kinase C in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51), pp.32246–32253.
- Pinton, P., Pozzan, T. & Rizzuto, R., 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*, 17(18), pp.5298–5308.
- Poenie, M., 1990. Alteration of intracellular Fura-2 fluorescence by viscosity: A simple correction. *Cell Calcium*, 11(2-3), pp.85–91.
- Prakriya, M. et al., 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108), pp.230–233.
- Putney, J.W., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), pp.1–12.
- Riach, R.A. et al., 1995. Histamine and ATP mobilize calcium by activation of H1 and P2U receptors in human lens epithelial cells. *Journal of Physiology*, 486(2), pp.273–282.
- Roberts, V.H.J. et al., 2006. Purinergic receptors in human placenta: evidence for functionally active P2X4, P2X7, P2Y2, and P2Y6. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 290(5), pp.R1374–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373435>.
- Roy, N. et al., 2014. Regulation of PKC Mediated Signaling by Calcium during

- Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE*, 9(10), p.e110843.
- Smyth, J.T. & Putney, J.W., 2012. Regulation of Store-operated Calcium Entry during Cell Division. *Biochem Soc Trans.*, 40(1), pp.119–123.
- Soboloff, J. et al., 2006. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), pp.20661–20665.
- Stathopoulos, P.B. & Ikura, M., 2013. *Structure and Function of Endoplasmic Reticulum STIM Calcium Sensors* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00003-2>.
- Tojyo, Y. et al., 2013. Staurosporine maintains the activation of store-operated Ca²⁺ entry even after the refilling of Ca²⁺ stores. *Cell Calcium*, 53, pp.349–356. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2013.03.002>.
- Vanderheyden, V. et al., 2009. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(6), pp.959–970.
- van der Wal, J. et al., 2001. Monitoring Agonist-induced Phospholipase C Activation in Live Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), pp.15337–15344. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152673>.
- Wilson, C.H. et al., 2015. Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca²⁺ entry and reduces ER Ca²⁺ through a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochemical Journal*, 466, pp.379–390.
- Woodard, G.E. et al., 2010. TRPC3 regulates agonist-stimulated Ca²⁺ mobilization by mediating the interaction between type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, RACK1, and Orai1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), pp.8045–8053.
- Woodard, G.E., Salido, M. & Rosado, J.A., 2008. Enhanced exocytotic-like insertion of Orai1 into the plasma membrane upon intracellular Ca²⁺ store depletion. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 294, pp.C1323–C1331.
- Yamamoto, K. et al., 2000. P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 279(1), pp.H285–92. Available at:

<http://ajpheart.physiology.org/content/279/1/H285.abstract>.

Young, L.H., Balin, B.J. & Weis, M.T., 2005. Gö 6983: A Fast Acting Protein Kinase C Inhibitor that Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Cardiovascular drug reviews*, 23(3), pp.255–272.

Zayzafoon, M., 2006. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(1), pp.56–70.