



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“La fosforilación del canal Orai1 reduce la liberación de Ca^{2+} del
retículo endoplásmico mediada por el receptor de IP_3 ”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. ERICKA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

Director de la Tesis:
Dr. Agustín Guerrero Hernández

Ciudad de México

Julio, 2022

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 338030 y la Beca Mixta 291250 para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Extremadura, España.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al CINVESTAV por darme la oportunidad de pertenecer a esta reconocida institución mexicana. Por el apoyo otorgado para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Extremadura y por el apoyo extraordinario.
- Al departamento de BIOQUÍMICA por haberme aceptado como parte de su comunidad estudiantil.
- Agradezco al Dr. Agustín Guerrero Hernández por aceptarme como su estudiante, por compartir conmigo sus conocimientos del maravilloso mundo del Ca^{2+} y por transmitirme su entusiasmo y pasión que tiene por la ciencia. También le agradezco por ser una persona muy empática con los demás y por solidarizarse con las circunstancias difíciles de otros.
- Le agradezco a mi Comité de Asesores, conformado por; Dr. Guillermo Ávila Flores, Dr. Edgar Morales Ríos, Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña y Dr. Manuel Arias Montaña. Les agradezco todos sus comentarios, sugerencias y observaciones que ayudaron a mejorar este trabajo de tesis, además de su disposición y amabilidad.
- Agradezco al Dr. Juan Antonio Rosado Dionisio y a los miembros de su laboratorio por permitirme realizar una estancia de investigación en la Universidad de Extremadura, especialmente a José J. López y José Sánchez.
- Mi agradecimiento a El Colegio de Profesores de Bioquímica por todo lo aprendido en los cursos de maestría.
- A la Lic. Angélica González Ceja, Lic. Priscila González Ceja y Lic. Leticia Gómez Sandoval por todo el apoyo en el área administrativa y por siempre brindar una cordial atención.
- A la Lic. Norma Cirnes Verduzco por la realización del resumen gráfico.
- Al Ing. Oscar Torales Vega por su apoyo en el área computacional y técnica.
- A mis compañeros y amigos del Lab-10; Jorge Fragosó, Rodrigo Contreras, Jesús Chávez y Daniel León. Gracias por haber compartido conmigo sus conocimientos en ciencia y por cada uno de los buenos momentos que tuvimos.
- A Cristina López, a Leonardo Gallegos y a Alejandro Palacios por haberme dado una sincera y comprensiva amistad. Gracias por todo chicos.
- A la Bióloga Lucía García Romero y al Ing. Roberto Arellano por el apoyo brindado en el laboratorio para la realización de los experimentos y por su sincera amistad.
- A mis amigos de generación; Diego Camargo y Rogelio Salazar, porque quizá sin darse cuenta han sido un gran apoyo para mí a lo largo de estos años.
- A mi mejor amiga Karina Rangel por siempre estar conmigo en los buenos y malos momentos, por brindarme su sincera amistad desde que nos conocimos en el 2008 en los pasillos de la UAM Iztapalapa. También le agradezco a Christian Huerta y a Angélica Ochoa porque a pesar del tiempo y la distancia seguimos siendo amigas.
- A mi amiga Damaris, por haber seguido siendo parte de mi vida y por todos su apoyo y confianza en todo momento.
- A mis abuelitas Lore Aguayo y Eva Gómez, cada una de ellas ha sido una inspiración en mi vida. Gracias por todo. A mi abuelo Miguel que siempre vivirá en nuestros corazones.
- A todos mis tíos, primos y sobrinos porque de ellos he aprendido que la familia siempre estará cuando la necesites, especialmente a mi tío Chilo, Beto, a mi tía Delfi, Silvia Clemen, Sara y Rufis, así como mis primitas Mela y Mere por alegrarnos el corazón a todos.
- A mi nueva familia: mis suegros, el Sr. Bonifacio y la Sra. Rosalía; mi cuñado, Sergio y a Jazmín, así como a mi sobrino Emmanuel, por recibirme de una forma tan cálida en su familia.

DEDICATORIA

A mis padres; Alejandra Martínez Gómez y Héctor Martínez Aguayo, porque su amor, apoyo y confianza han estado conmigo cada día de mi vida... Los amo.

A mi esposo Víctor Hugo Sánchez Vázquez, por ser un pilar muy importante y llenar mi vida de amor, comprensión, apapachos y cariño... Te amo.

A Vania Martínez Martínez y Edgar Ismael Martínez Martínez, porque los hermanos son esas personas con las que siempre podrás contar, sin importar el tiempo o la distancia... Los amo.

A Dios por ser el motor de mi vida.

ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Entrada de Ca ²⁺ operada por depósito (SOCE)	1
1.2 STIM1 (Molécula de Interacción del Estroma 1)	3
1.3 STIM2 (Molécula de Interacción del Estroma 2)	5
1.4 Orai1.	6
1.5 Orai2 y Orai3.....	9
1.6 Receptor de IP ₃	11
1.7 PKC y su participación en la movilización de Ca ²⁺	13
1.8 Enfermedades asociadas a alteraciones en la homeostasis de Ca ²⁺	15
2. ANTECEDENTES	17
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO GENERAL.....	21
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Transfección.....	23
7.2 Reactivos y soluciones de registros de Ca ²⁺ citoplásmico y Ca ²⁺ luminal.	25
7.3 Indicadores fluorescentes de Ca ²⁺	25
7.4 Registros simultáneos de Ca ²⁺	26
7.5 Calibración de la señal de fluorescencia del fura-2.	27
7.6 Determinación de la [Ca ²⁺] _i	28
7.7 Normalización de la señal de fluorescencia del mag-fluo-4.....	28
7.8 Construcción de las mutante Orai1-S27D/S30D, mChery-Orai1-S27D/S30D y mChery-Orai1-S27A/S30A.....	31
7.9 Ensayos de sensibilidad al IP ₃	32
7.10 Ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia de Föster (FRET).....	33
7.11 Ensayos de Inmunoprecipitación y Western Blot.	34

7.12 Imágenes confocales de células HeLa.	36
7.13 Fijación y permeabilización de célula HeLa.....	36
7.14 Oscilaciones de Ca ²⁺ en solución salina con Ca ²⁺	37
7.15 Ensayos de ligación por proximidad (PLA).	37
7.16 Análisis estadístico.....	39
8. RESULTADOS.....	40
8.1 La mutante fosfomimética de Orai1 inhibió la liberación de Ca ²⁺ del ER sin la participación de la PKC.	41
8.2 La inhibición de la actividad de PKC facilitó el vaciamiento de Ca ²⁺ del ER en células HeLa.	42
8.3 La activación de la PKC redujo la liberación de Ca ²⁺ del ER e incrementó la entrada de Ca ²⁺ operada por depósito.....	43
8.4 La proteína fosfomimética redujo la liberación de Ca ²⁺ estimulada por ATP y TG en ausencia de Ca ²⁺	46
8.5 La mutante fosfomimética (Orai1 S27D/S30D) no modificó la sensibilidad del IP ₃ R por el IP ₃	47
8.6 El ATP y la TG en un medio con Ca ²⁺ favorecieron la señal de FRET entre YFP-IP ₃ R y mCherry-O1-wt en células HEK-293T.	48
8.7 La colocalización del canal Orai1 y el IP ₃ R1 incrementó en células expresando la mutante que mimetiza un canal permanentemente fosforilado.....	50
8.8 La mutante O1-DD inhibió la liberación de Ca ²⁺ del ER inducida por ATP.....	51
8.9 La interacción entre el canal Orai1 y los IP ₃ Rs tipo 1 y tipo 2 fueron modificadas por el ATP y la TG.....	53
8.10 Las S27/S30 del canal Orai1 modularon la interacción de este canal con el IP ₃ R tipo 1 y 2.	55
8.11 La fosforilación de S27/S30 modificó la localización de Orai1.....	60
8.12 Los residuos de aminoácidos S27 y S30 no modificaron la colocalización entre el ER-Tracker y los canales Orai1.	61
8.13 La mutante mCherry-O1-DD incrementó su señal de fluorescencia después de la estimulación con ATP y TG.....	62
8.14 El canal fosfomimético O1-DD y la proteína STIM1 reconstituyen SOCE.....	63
8.15 Cambios postraduccionales de los residuos de los aminoácidos S27 y S30 modifican las oscilaciones de Ca ²⁺ inducidas por ATP.	66

8.16 La reducción en la liberación de Ca^{2+} del ER mediada por el canal Orai1 es insensible a los inhibidores de la PKC cuando las células son estimuladas con histamina y TG.....	70
8.17 El inhibidor Gö 6983 favoreció la liberación de Ca^{2+} del ER.....	71
8.18 El activador de PKC, PDBu, suprime la liberación de Ca^{2+} inducida tanto por histamina como por la combinación de histamina y TG.....	73
8.19 La inhibición de PKC favorece la liberación de Ca^{2+} del ER.	75
8.20 La interacción entre el IP_3R y Orai1 incrementa cuando las células se estimulan con histamina y TG.	78
8.21 Representación esquemática del modelo de trabajo.....	80
9. DISCUSIÓN	82
10. CONCLUSIONES	92
11. PERSPECTIVAS	93
12. MATERIAL SUPLEMENTARIO	94
13. REFERENCIAS.....	99

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
CPA	Ácido ciclopiazónico
CRAC	Canales activados por liberación de Ca ²⁺
DAG	Diacilglicerol
ER	Retículo Endoplásmico
erGAP3	Sensor de Ca ²⁺ dirigido al retículo endoplásmico basado en la proteína acuorina GFP
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia de Förster
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
I_{CRAC}	Corriente de Ca ²⁺ activada por liberación de Ca ²⁺
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP₃R	Receptor de IP ₃
NCLX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ o Li ⁺ /Ca ²⁺
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
O1-wt	Orai1 nativo
O1-AA	Orai1-S27A/S30A
O1-DD	Orai1-S27D/S30D
PDBu	Forbol 12,13-dibutirato
PIP₂	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PKC	Proteína cinasa C
aPKC	Proteína cinasa C atípica
cPKC	Proteína cinasa C clásica
nPKC	Proteína cinasa C nueva
PLA	Ensayos de ligación por proximidad

PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMCA	ATPasa de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática
SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del Retículo Sarcoendoplásmico
SOC	Canales de Ca^{2+} operados por depósito
SOCE	Entrada de Ca^{2+} operada por depósito
TG	Tapsigargina
TRPC	Canales de receptores de potencial transitorio

RESUMEN

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero muy versátil que participa en diferentes procesos celulares a través de incrementos transitorios de su concentración intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Sin embargo, mantener elevada la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por tiempos prolongados ocasiona daños irreversibles e incluso la muerte celular o apoptosis. Para mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en niveles basales, la célula invierte una gran cantidad de energía para extruir el Ca^{2+} mediante sofisticados mecanismos de remoción. En diferentes tipos celulares se ha observado que al estimular la liberación de Ca^{2+} del ER, se induce la entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE, por sus siglas en inglés), la cual tiene dos consecuencias principales: rellenar el ER de forma rápida y mantener el incremento del Ca^{2+} citoplásmico.

Los componentes moleculares involucrados en la expresión de SOCE son los canales Orai y las proteínas STIM; se han descrito tres isoformas del canal Orai, dos isoformas de la proteína STIM y algunas variantes de *splicing* en ambas. La complejidad de estas proteínas se vislumbra porque solo en los mamíferos Orai1 posee dos diferentes sitios de inicio de la traducción, generando una proteína larga (α , 63 aminoácidos adicionales en el extremo N terminal) y una corta (β). Ambas transportan Ca^{2+} de forma similar, aunque se ha sugerido que Orai1 α es más sensible a la inactivación por Ca^{2+} . Estos datos sugieren que Orai1 α pudiera tener mecanismos de regulación adicionales a los de Orai1 β .

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar si la fosforilación de Orai1 α -S27/S30 pudiese regular la dinámica de Ca^{2+} a través de una interacción entre Orai1 y el receptor de IP_3 (IP_3R , por sus siglas en inglés). En este trabajo reportamos que la sobreexpresión de Orai1 en células HeLa inhibió fuertemente la liberación de Ca^{2+} e incrementó el transitorio de Ca^{2+} intracelular en células que fueron estimuladas con agonista y taspigargina (TG) en un medio con Ca^{2+} . Además, la inhibición de la liberación de Ca^{2+} del ER fue dependiente de la participación del agonista y de la actividad de las PKCs dependientes de Ca^{2+} , por lo que cual se comenzó a estudiar tanto la mutante de Orai1 que no puede ser fosforilada por PKC β , Orai1 S27A/S30A, como la mutante que mimetiza un canal permanentemente fosforilado, Orai1 S27D/S30D.

Mediante ensayos de ligación por proximidad, coinmunoprecipitación y FRET, se ha mostrado que el canal Orai1 interacciona con el IP_3R , además este complejo incrementa cuando las células fueron estimuladas con agonista y con TG en un medio suplementado con Ca^{2+} . Por lo que, en este trabajo presentamos un nuevo papel de Orai1 como inhibidor de la actividad del IP_3R . Debido a que este efecto inhibitorio requiere de un medio con Ca^{2+} y que además el transitorio de Ca^{2+} intracelular incrementó al sobreexpresar Orai1, es probable que este canal estabilice al IP_3R una vez que se encuentre en el estado inactivo por Ca^{2+} .

Adicionalmente, en este trabajo se muestra que la fosforilación de las S27/S30 podrían estar modulando la localización intracelular de Orai1; esto podría favorecer que Orai1 S27D/S30D permanezca en vesículas intracelulares por más tiempo. Debido a que tanto el extremo N como el C participan en el reciclamiento vesicular de Orai1, la propuesta es que la fosforilación de las S27/S30 contribuyen a la internalización de Orai1. Con base en todos los datos presentados en este trabajo de tesis, se propone que Orai1 además de favorecer el rellenado del ER por transportar Ca^{2+} del espacio extracelular al citoplasma, también suprime la liberación de Ca^{2+} del ER al inhibir la actividad del IP_3R , evitando una excesiva fuga de Ca^{2+} luminal. Considerando que la desregulación de la actividad de Orai1 ha sido asociada a diferentes canalopatías, estos hallazgos contribuyen a entender mejor el papel que Orai1 está llevando a cabo.

ABSTRACT

Ca^{2+} ion (Ca^{2+}) is a second messenger that participates in a plethora of cellular processes by increasing cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). However, a sustained raise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ leads to cell damage and worse cell death or apoptosis. To maintain $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at low resting level, cells have developed a sophisticated Ca^{2+} toolkit to remove Ca^{2+} from the cytoplasm. In different cells lines have observed that Ca^{2+} release from the ER induces the so-called Store-Operated Calcium Entry (SOCE). SOCE has two main functions; rapidly refills the ER and keeps elevated the $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

The molecular components behind SOCE are the Orai channels and the STIM proteins. Three Orai isoforms and two STIM isoforms have been described and some splicing variants. The complexity of these proteins is evident since in mammals was reported an Orai1 alternative translation initiation variant with 63 additional amino acids at N-terminus domain and although it has been shown that both long (α) and short (β) Orai1 isoforms have the same Ca^{2+} channel activity, Orai1 α displays a stronger Ca^{2+} dependent inactivation. All these data suggest that Orai1 α could have different regulatory mechanisms.

The main goal in this work was to study whether phosphorylation on Orai1 α -S27/S30 could regulate Ca^{2+} dynamics due to the interaction between Orai1 and the IP_3 receptor (IP_3R). We have found in HeLa cells that Orai1 overexpression strongly inhibited Ca^{2+} release while at the same time stimulated Ca^{2+} entry in response to agonist and thapsigargin (TG) in saline solution with Ca^{2+} . Additionally, reduced Ca^{2+} release from the ER required the agonist and Ca^{2+} dependent PKC activity, for this reason we decided to study both Orai1 S27A/S30A and S27D/S30D mutants, the former cannot be phosphorylated by PKC β while the latter is a phosphomimetic mutant which simulates an irreversibly phosphorylated channel.

The proximity ligation assay, coimmunoprecipitation and FRET, all three showed that Orai1 channel interacts with the IP_3R , additionally this complex increased in cells stimulated with agonist and TG in a medium supplemented with Ca^{2+} . In this work, we present a new role for phosphorylated Orai1 as inhibitor of IP_3R activity. Since this inhibition requires an external Ca^{2+} medium besides we observed an increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient with Orai1 overexpression, it is likely that Orai1 can stabilize the IP_3R in the Ca^{2+} -inactivated state.

In addition, this work shows that S27 and S30 phosphorylation state modulates Orai1 intracellular location, accordingly Orai1 stays longer in intracellular vesicles. Since both N and C-termini participate in Orai1 vesicle recycling, we therefore propose that S27/S30 phosphorylation enhances Orai1 internalization. Based on all the data presented in this Ph. D. thesis, we propose that Orai1 facilitates ER refiling by two different mechanisms: by allowing Ca^{2+} entry, and by suppressing IP_3R -mediated Ca^{2+} release from the ER. Since Orai1 dysregulation is associated with several channelopathies, these findings can contribute to better understand the role of Orai1 in calcium signaling.

1. INTRODUCCIÓN

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que está implicado en la regulación de muchos procesos celulares, debido a que su unión con diferentes proteínas puede inducir cambios conformacionales que permiten la activación o inhibición de enzimas, canales iónicos, bombas, transportadores, intercambiadores o amortiguadores de Ca^{2+} (Newton, Bootman, and Scott 2016). El Ca^{2+} regula una plétora de procesos celulares que abarcan desde el crecimiento y la proliferación, hasta procesos de muerte celular programada o apoptosis (Berridge, Bootman, and Lipp 1998), por lo que la célula mantiene un estado estacionario de Ca^{2+} finamente regulado (Guerrero-Hernandez, Dagnino-Acosta, and Verkhatsky 2010).

En condiciones de reposo, la concentración de Ca^{2+} citoplásmico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se mantiene cercana a 100 nM y alcanza picos de 500 a 1000 nM en respuesta a estímulos físicos o químicos (Guerrero-Hernández et al. 2020). Las dos principales fuentes de Ca^{2+} son el retículo endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés) y el espacio extracelular. Indicadores de Ca^{2+} que se expresan en el lumen del ER revelan una concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) libre que se encuentra alrededor de 500 μM (Rossi and Taylor 2020), mientras que en el espacio extracelular la $[\text{Ca}^{2+}]$ se mantiene constante en valores de ~ 1.2 mM por diversos mecanismos homeostáticos (Bronner 2001). Los incrementos transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ modulan diversos procesos celulares, pero a su vez los sistemas de extrusión de la célula regulan que los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma se mantengan en el orden de nM (Guerrero-Hernandez et al. 2010; Perez-Rosas et al. 2015).

1.1 Entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE).

En células no excitables se reportó que al inducir la liberación de Ca^{2+} del ER a través del receptor de IP_3R (IP_3R , por sus siglas en inglés) o al bloquear la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés) con taspigargina (TG) se producía una fuerte entrada de Ca^{2+} , la cual se denominó entrada capacitativa (Putney 1986; Putney Jr. and Ribeiro 2000; Smyth et al. 2010). Esta entrada de Ca^{2+} requería un depósito de Ca^{2+} vacío, por lo que se denominó entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE, por sus siglas en inglés). Hoy en día

se sabe que también en células excitables existe una participación de SOCE y es muy relevante para mantener el estado estacionario de Ca^{2+} del ER de forma aguda (Bollimuntha, Pani, and Singh 2017; Majewski and Kuznicki 2015; Wegierski and Kuznicki 2018; Zhang and Hu 2020). Los canales Orai y las proteínas STIM forman un complejo que permite la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular al citoplasma en respuesta a una reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]$ del ER. En la Fig. 1.1 se muestra un esquema representativo de cómo se lleva a cabo la activación de Orai1 por STIM1.

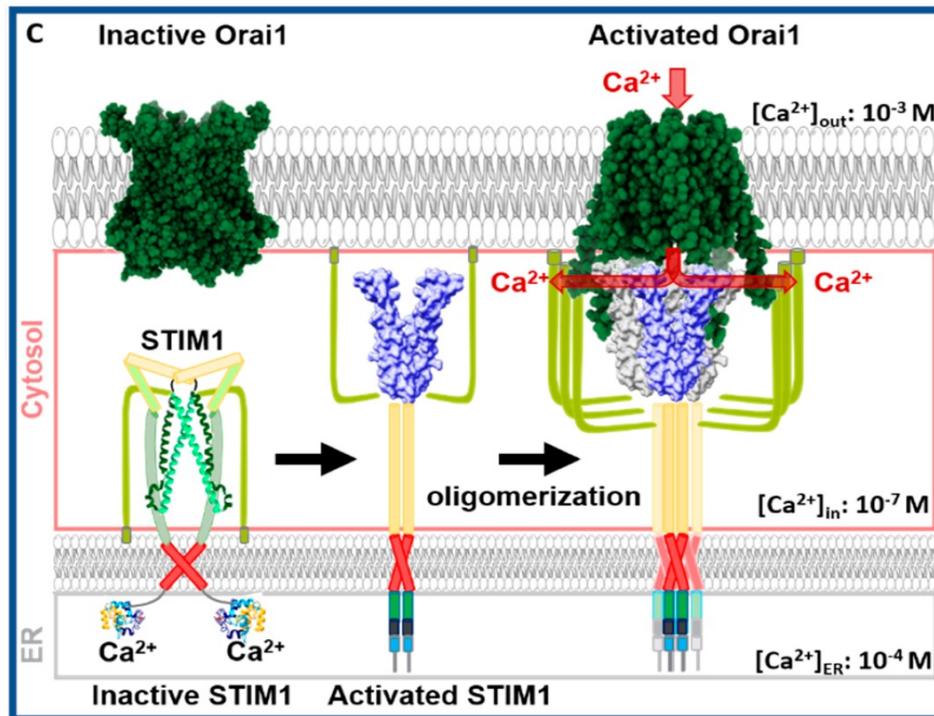


Fig. 1.1. Representación esquemática de la interacción Orai1-STIM1. En condiciones de reposo STIM1 está unido a Ca^{2+} ; cuando se reduce la $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro del ER, STIM1 se oligomeriza, exponiendo su dominio citoplásmico con el que puede unirse a la membrana plasmática y reclutar a Orai1. La interacción Orai1-STIM1 permite una fuerte entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular al citoplasma (Tiffner, Maltan, et al. 2021).

Cada vez hay más información acerca de la importancia de SOCE y las proteínas que modifican significativamente la actividad de STIM y Orai (Ahmad et al. 2022; Emrich et al. 2021; Kawasaki et al. 2010; Sampieri et al. 2018; Woodard et al. 2010), por lo que se abre un amplio campo de investigación sobre la importancia de mantener la homeostasis del Ca^{2+} en el lumen del ER y en el citoplasma. En las siguientes secciones se describen los componentes moleculares de las proteínas que llevan a cabo SOCE.

1.2 STIM1 (Molécula de Interacción del Estroma 1).

STIM1 es una proteína larga de un único pase transmembranal que reside en la membrana del ER y cuenta con un dominio mano EF orientado hacia el lado luminal del ER, el cual en condiciones de reposo está unido a Ca^{2+} (Fahrner and Romanin 2021; Yuan et al. 2009). STIM1 cuenta con un motivo α estéril (SAM, por sus siglas en inglés) que se oligomeriza, formando dímeros cuando su dominio mano EF se disocia del Ca^{2+} (van Dorp et al. 2021). STIM1 tiene un dominio citosólico largo que cuenta con una región C terminal rica en lisinas; se ha propuesto que esta región polibásica interacciona con el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2 , por sus siglas en inglés) y el fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP_3 , por sus siglas en inglés) de la membrana plasmática (Hogan 2015; Yuan et al. 2009).

Los agregados de STIM1 terminan interaccionando con proteínas de la membrana plasmática en regiones que se conocen como “sitios de contacto membranal” (MCS, por sus siglas en inglés) ya que están a una distancia de 10 a 30 nm. En células HeLa se ha reportado que los MCS tienen una extensión promedio de 100–200 nm y ocupan <1 % de la membrana plasmática (Hogan 2015). En estas regiones, STIM1 recluta a Orai1 y lo activa, permitiendo un flujo de Ca^{2+} de alta selectividad. Hay evidencia de que la activación eficiente de Orai1 requiere dos subunidades de la proteína STIM1 por cada subunidad de este canal (Fahrner, Schindl, and Romanin 2018; Hoover and Lewis 2011; Tiffner, Schober, et al. 2021; Yeung, Yamashita, and Prakriya 2020); esta estequiometría es importante puesto que explica que la sobreexpresión de Orai1, sin STIM1, resulta en una inhibición de SOCE por un efecto de “dilución” del STIM1 endógeno con los nuevos canales Orai1 (Soboloff et al. 2006) de tal forma que se reduce el número de canales donde todas sus subunidades tienen STIM1.

Se ha identificado la región mínima necesaria de STIM1 para activar a los canales Orai1, la cual ha recibido diferentes nombres según el grupo que ha identificado dicha región, como OASF (Muik et al. 2009), Ccb9 (Kawasaki, Lange, and Feske 2009), SOAR (Yuan et al. 2009) o CAD (Park et al. 2009). Este dominio de STIM1 es suficiente para inducir las corrientes de Ca^{2+} activadas por liberación de Ca^{2+} (I_{CRAC} , por sus siglas en inglés). El dominio CC1 (coiled-coil) de los tres

presentes en STIM1 interactúa con el dominio CAD para suprimir SOCE (van Dorp et al. 2021), mientras que los otros dos dominios, CC2 y CC3, son los que constituyen la región de activación de Orai1 (Tiffner, Maltan, et al. 2021).

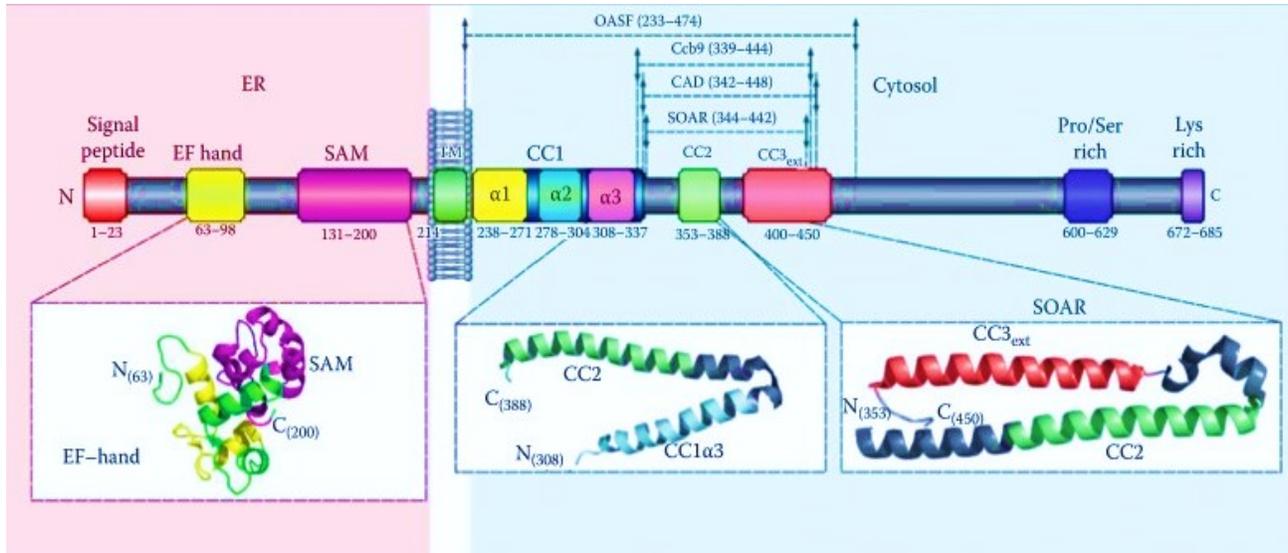


Fig. 1.2. Representación esquemática de los dominios de STIM1. La imagen muestra los dominios de la proteína STIM1 de humano; la región sombreada de rosa muestra los dominios que se encuentran en el lado luminal del ER y la región sombreada de azul muestra los dominios que se encuentran en el lado citosólico. Los recuadros presentan una ampliación del dominio mano EF, el dominio CC1α3-CC2 y el dominio SOAR que es la región mínima para la activación de los canales Orai1 (Fahrner et al. 2018).

La formación de los agregados de STIM1 requiere una reducción sustancial de Ca^{2+} del ER debido a que su dominio mano EF presenta una alta afinidad por Ca^{2+} comparada con STIM2, mostrando una constante de disociación (K_d) de $\sim 0.2-0.6$ mM, el cual es un valor muy similar a la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en el lumen del ER (Novello et al. 2020; Soboloff et al. 2012; Stathopoulos et al. 2006), por lo que para observar una fuerte entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE) se han diseñado protocolos en los que se debe inducir un fuerte vaciamiento de Ca^{2+} del ER. El protocolo clásico de SOCE consiste en bloquear a la bomba SERCA con TG en un medio sin Ca^{2+} , lo que permite la formación de los agregados STIM1-Orai1, lo que a su vez induce una fuerte entrada de Ca^{2+} cuando este ion es adicionado al medio extracelular (Abdullaev et al. 2008; Ahmad et al. 2022).

1.3 STIM2 (Molécula de Interacción del Estroma 2).

La isoforma STIM2 es una proteína que cuenta con un dominio mano EF con menor afinidad por Ca^{2+} que STIM1, con una K_d de $\sim 0.4\text{--}0.8$ mM. En condiciones de reposo la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre del ER se encuentra entre 0.4 y 0.7 mM (Novello et al. 2020), por lo que se propone que STIM2 recluta y activa a los canales Orai1 en condiciones de reposo (Ahmad et al. 2022; Ong et al. 2015), mientras que STIM1 requiere que haya un vaciamiento sustancial de Ca^{2+} del ER para la formación de los agregados STIM1-Orai1 (Ahmad et al. 2022). Adicionalmente, STIM2 tiene una secuencia de retención del ER que no presenta STIM1, por lo que esta proteína se encuentra exclusivamente en la membrana del ER, mientras que 5–10 % de STIM1 se encuentra en la membrana plasmática (Soboloff et al. 2012).

STIM2 es un activador débil de los canales Orai1, por lo que se ha sugerido que la importancia de esta proteína, además de su función como una proteína constitutivamente activa, es la de facilitar la formación de los agregados de STIM1 y Orai1 (Ong et al. 2015). Además, se ha propuesto que STIM2 forma agregados en condiciones basales debido a que esta proteína detecta la disminución local de Ca^{2+} que se produce cuando el IP_3R es activado de forma espontánea (Ahmad et al. 2022). Esto concuerda con observaciones donde hay una correlación entre la actividad del IP_3R y la formación de agregados de STIM2 en condiciones basales, aunque no se pudo observar que STIM1 o STIM2 coinmunoprecipitaran con el IP_3R (Ahmad et al. 2022). Esto sugiere que la comunicación estrecha entre STIM2 y el IP_3R podría requerir la participación de otras proteínas, por ejemplo, el canal Orai1.

De manera fisiológica se ha reportado una variante de *splicing* de STIM2, denominada STIM2 β o STIM2.1, la cual tiene un efecto antagónico en SOCE ya que su sobreexpresión resulta en la supresión de la entrada de Ca^{2+} y la reducción de su expresión produce un incremento de la entrada de Ca^{2+} (Miederer et al. 2015; Rana et al. 2015). Adicionalmente se ha identificado otra variante de *splicing*, la proteína STIM2.3, pero se desconoce su función (Grabmayr, Romanin, and Fahrner 2021). Estos hallazgos sugieren que SOCE tiene varios puntos de regulación en STIM1 y Orai1 por diversos componentes moleculares.

1.4 Orai1.

Orai1 es la subunidad formadora de los canales CRAC; cada monómero de esta proteína consta de cuatro pasos transmembranales con los extremos N y C terminal orientados hacia el espacio citoplásmico (Prakriya et al. 2006; Soboloff et al. 2006). Los canales Orai1 residen en la membrana plasmática, con alta selectividad por Ca^{2+} debido a la presencia de un anillo formado por ácidos glutámicos que se ubican en la posición 106 (E106) de cada subunidad de Orai1 de humano (Hou et al. 2012). La mutante conservada de aspartato por glutamato, aunque también tiene carga negativa (Orai1-E106D) reduce 10 veces su selectividad por Ca^{2+} y cuando este aminoácido se reemplaza con alanina (Orai1-E106A), resulta en la pérdida total de su actividad de canal. Debido a que una subunidad de Orai1-E106A destruye el anillo de glutamatos, se considera que esta mutante es una dominante negativa de los canales CRAC (Prakriya et al. 2006).

La estructura cristalina de Orai de *Drosophila melanogaster* (Hou et al. 2012) ha mostrado que los canales Orai están formados por hexámeros, cada subunidad consta de cuatro hélices α transmembranales (M1-M4). M1 forma el anillo interno y recubre el poro iónico que se encuentra en el centro del canal, mientras que M2 y M3 forman un anillo intermedio que separa a M1 de M4. M4 se encuentra más alejada del poro, por lo que se ha propuesto que este dominio le pudiese conferir movilidad a Orai (Fig. 1.3 A). Adicionalmente, M2 y M3 podrían permitir que la región citoplásmica del poro pueda ensancharse debido a que forman un anillo que solo rodea la región transmembranal de las hélices M1, dejando libre la región intracelular de M1 (Fig. 1.3 B).

En la Fig. 1.3 C, D, se muestra el poro del canal Orai de *Drosophila melanogaster* y entre paréntesis se indica el aminoácido correspondiente para el canal Orai1 de humanos. Como se puede observar, el poro tiene una longitud de $\sim 55 \text{ \AA}$ y está compuesto de cuatro secciones (Fig. 1.3 C, D): el anillo de glutamatos en el extremo extracelular contiene seis residuos de E178, una región hidrofóbica recubierta por las cadenas laterales de los residuos V174, P171 y L167; esta sección pareciera ser relativamente rígida, lo que probablemente ayuda a mantener la integridad del canal. Una región básica debido a los residuos K163, K159 y R155,

y una sección más ancha que se extiende hacia el citosol, compuesta por residuos de Q152 y W148 (Hou et al. 2012). Se han identificado mutaciones del canal Orai que provocan diferentes canalopatías, las cuales pueden activar o inhibir al canal Orai1 y resultar en un amplio espectro de padecimientos (Feske 2019; Feske et al. 2006; Lacruz and Feske 2015; Yeh et al. 2020).

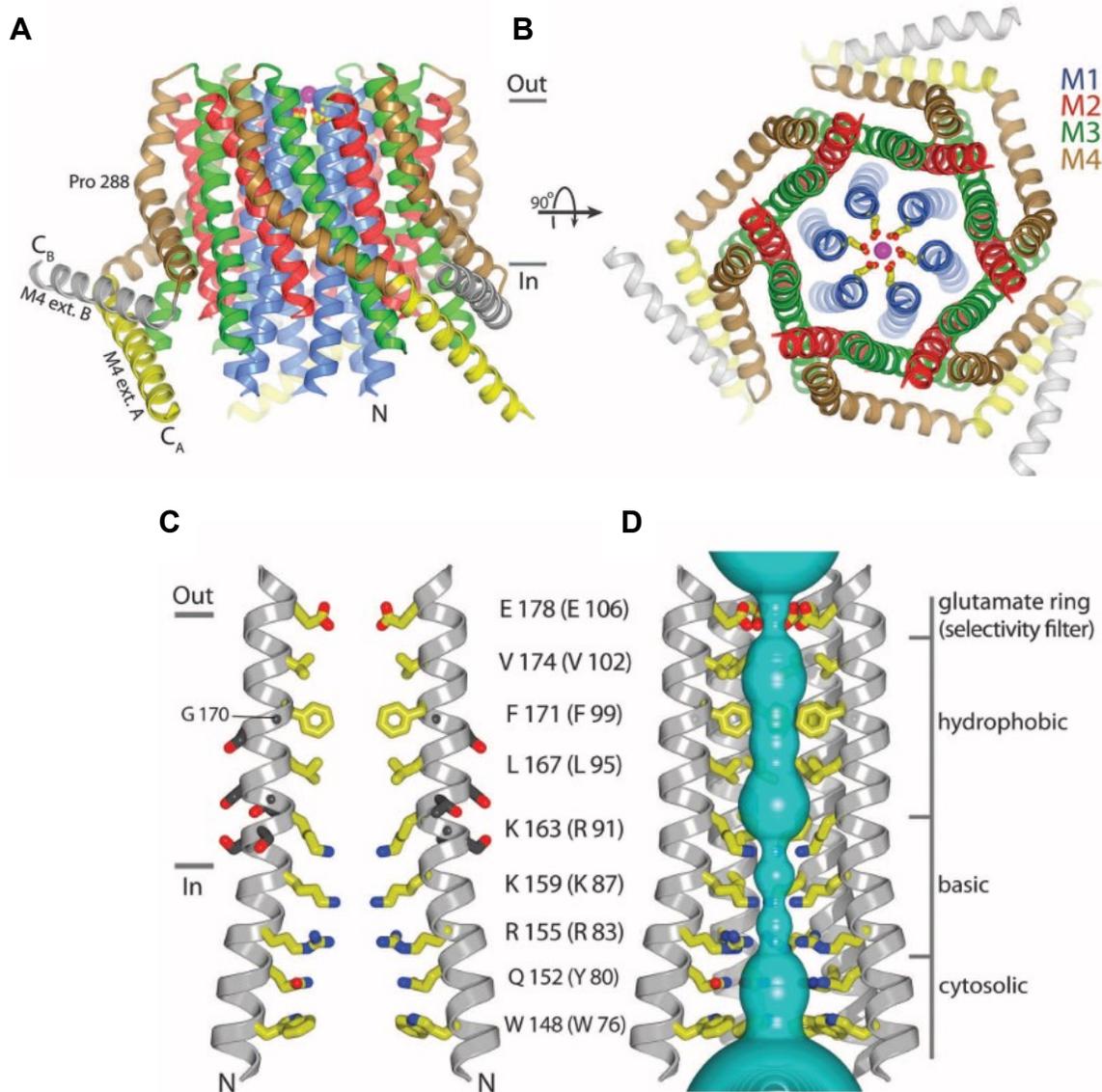


Fig. 1.3. Representación esquemática de la arquitectura del canal Orai. (A) Representación lateral de la estructura terciaria del canal. Las cuatro hélices transmembranales se identifican con diferentes colores, azul (M1), rojo (M2), verde (M3), marrón (M4) y las extensiones de M4 están representadas en color amarillo para la subunidad A y en color gris para la subunidad B. El círculo color magenta representa un ion Ca^{2+} . (B) Vista ortogonal del canal desde el lado extracelular. (C) Representación de dos hélices M1; en amarillo se representan los aminoácidos que recubren el poro, las líneas horizontales de color gris representan los límites aproximados de la membrana plasmática. (D) Representación de cuatro hélices α , M1 en color gris; en color verde azulado se representa la distancia radial del poro del canal, así como las secciones mencionadas en el texto (Hou et al. 2012).

Solo los mamíferos expresan una variante con 63 aminoácidos adicionales en el extremo N terminal denominada Orai1 α , la isoforma corta denominada Orai1 β , se comienza a traducir en las metioninas 64 o 71. Por lo general la traducción de Orai1 β inicia a partir de la M64 y solo cuando existen mutaciones, la proteína comienza a traducirse en la M71 (Fukushima et al. 2012). La proporción Orai1 α /Orai1 β es similar en diferentes líneas celulares, incluyendo células HeLa, sin embargo, se ha reportado que la movilidad de Orai1 α en la membrana plasmática es menor que la movilidad de Orai1 β (Fukushima et al. 2012). Esto podría sugerir que Orai1 α requiere de reguladores moleculares adicionales, probablemente no descritos, para poder movilizarse a lo largo de la membrana plasmática.

Además, se ha reportado que la actividad del canal Orai1 β es mayor en comparación con Orai1 α , lo que sugiere que Orai1 α presenta una mayor inactivación dependiente de Ca²⁺ (Zhang et al. 2019). Esto podría explicar la presencia de estos dominios exclusivos de Orai1 α , lo que permitiría llevar a cabo una fina regulación de los flujos de Ca²⁺ y así evitar que haya una excesiva entrada de Ca²⁺ al citoplasma. En la Fig. 1.4 se muestran los dominios que presenta únicamente Orai1 α . El dominio de unión a PIP₂ y caveolina están relacionados a su permanencia en la membrana plasmática, así como al tráfico vesicular, mientras que los sitios de fosforilación serina 27 y 30 (S27/S30) están asociados a la regulación de SOCE y el dominio putativo de unión a calmodulina y a la ciclase de adenilato 8, AC8 han sido asociados a la regulación positiva de SOCE (Kawasaki et al. 2010; Yu, Sun, and Machaca 2010; Zhang et al. 2019).

Hay reportes de que el canal Orai1 puede interactuar con otras proteínas, como el macrocomplejo formado por Orai1-STIM1-TRPC3-RACK1-IP₃R1 (Woodard et al. 2010). Ensayos de coimmunoprecipitación llevados a cabo en este trabajo de tesis, mostraron que la interacción entre Orai1 y el IP₃R1 o entre Orai1 y el IP₃R2 incrementó por acción del agonista y la TG. Hay que resaltar que en este macrocomplejo también participan los receptores para cinasa C activada (RACK, por sus siglas en inglés), los cuales participan en la regulación de los flujos de Ca²⁺ mediados por el IP₃R.

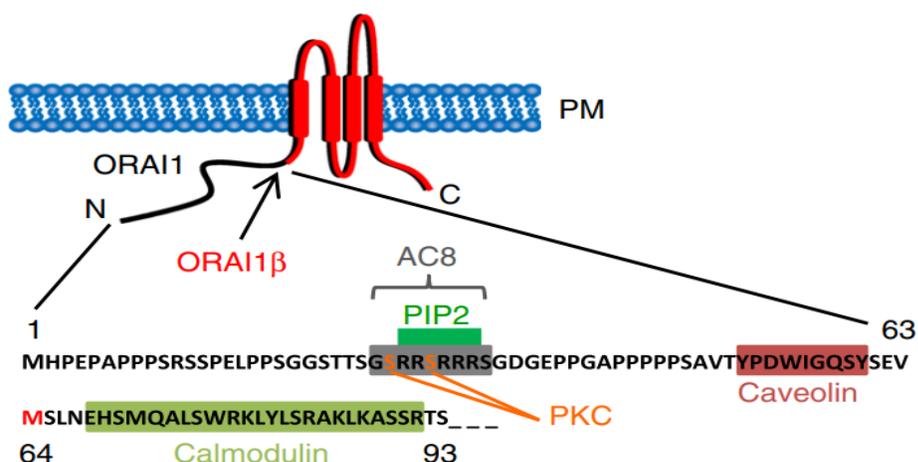


Fig. 1.4. Sitios de unión en el N terminal de Orai1 α . En la imagen se indican los sitios putativos de unión a calmodulina y a la ciclasa de adenilato 8 (AC8), los sitios de fosforilación de PKC, el sitio de unión a PIP₂ y a caveolina (Zhang et al. 2019).

1.5 Orai2 y Orai3.

Los canales CRAC están compuestos por tres ortólogos; Orai1, Orai2 y Orai3. Los invertebrados expresan un solo canal Orai, en vertebrados no mamíferos se expresan dos isoformas, el Orai1 y el Orai2, mientras que los mamíferos son los únicos animales que expresan las tres isoformas (Shuttleworth 2012). Los canales Orai2 y Orai3 no pueden generar las I_{CRAC} que genera Orai1, sin embargo, varios estudios sugieren que estos canales pueden participar en SOCE (Shuttleworth 2012; Vaeth et al. 2017). Un trabajo reciente ha propuesto que cada subunidad de Orai y STIM tiene un papel particular para orquestar finamente los flujos de Ca²⁺ a través de la membrana plasmática, sugiriendo que las isoformas de Orai y STIM no son redundantes, sino que cada una regula SOCE y la liberación de Ca²⁺ del ER de forma específica (Emrich et al. 2021a).

La relevancia de Orai2 se ha observado en cultivos neuronales; en este modelo celular se ha reportado que reducir la expresión de Orai2 disminuye la entrada de Ca²⁺ operada por depósito, lo que sugiere que Orai2 es el principal canal que lleva a cabo SOCE (Stegner et al. 2019). En este trabajo se ha propuesto que en neuronas se ha sustituido la participación principal del canal Orai1 por Orai2 debido a que no se requiere una entrada de Ca²⁺ sustancial a través de los canales CRAC como sería el caso para las células no excitables, permitiendo que la eficiente entrada de Ca²⁺ por Orai1 sea sustituida por una entrada de Ca²⁺ más modesta, mediada por la combinación de Orai2 y STIM2 (Stegner et al. 2019).

En linfocitos T que no han sido expuestos a antígenos se ha reportado una mayor expresión del canal Orai2, sin embargo, una vez que se diferencian en células efectoras, la expresión de este canal disminuye e incrementa la expresión de Orai1. Lo más interesante es que la eliminación de la expresión de Orai2 en linfocitos T vírgenes resultó en un incremento de SOCE, sugiriendo que Orai2 participa como un modulador negativo de la entrada de Ca^{2+} en este modelo celular (Vaeth et al. 2017). La formación de heteromultímeros entre Orai1 y Orai2 podría regular las propiedades biofísicas de los canales CRAC, permitiendo regular finamente la entrada de Ca^{2+} (Vaeth et al. 2017). No obstante, en neutrófilos murinos se ha reportado que disminuir la expresión de Orai2 reduce SOCE y que es necesario reducir tanto la expresión de Orai1 como la de Orai2 para suprimir completamente la entrada capacitativa (Grimes et al. 2020). Estos hallazgos en conjunto muestran que Orai2 tiene diferentes funciones dependiendo del modelo celular; su mecanismo de activación y regulación sigue siendo un tema que requiere más investigación.

El canal Orai3 ha mostrado una importante participación en mediar SOCE en células de cáncer de mama, pulmón y próstata, promoviendo su crecimiento y favoreciendo su capacidad de metástasis (Vaeth et al. 2017). Además, también mostró que funciona como un canal de fuga del ER (Leon Aparicio et al. 2017), lo que podría explicar por qué a Orai3 se le conoce como oncogén, al permitir la supervivencia de las células cancerígenas al evitar una sobrecarga con Ca^{2+} del ER cuando Orai3 funciona como una válvula de escape, reduciendo procesos apoptóticos debidos a un exceso de Ca^{2+} liberado desde el ER a la mitocondria. También se han descrito heteropentámeros entre Orai1 y Orai3, en una relación estequiométrica 3:2, los cuales forman canales de Ca^{2+} sensible a ácido araquidónico. Estos canales difieren en algunas propiedades biofísicas a los canales CRAC clásicos (Motiani et al. 2013), lo que sugiere que la regulación de los canales Orai tiene diversos mecanismos de activación e inhibición que pudiesen no estar aún descritos y esta regulación depende de las isoformas que se están ensamblando.

1.6 Receptor de IP₃.

En células no excitables, los incrementos transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ dependen sustancialmente tanto de la entrada de Ca^{2+} por la membrana plasmática, así como de la liberación de Ca^{2+} del ER a través del IP₃R; este canal involucra a tres isoformas (Mikoshiba 2015). Cada subunidad está compuesta de ~2,700 aminoácidos, los cuales forman canales tetraméricos con un poro grande permeable al Ca^{2+} pero no selectivo, que es coactivado por Ca^{2+} e IP₃ (Fig. 1.5) (Taylor and Tovey 2010). El IP₃R tiene un sitio de unión a IP₃ y dos sitios de unión a Ca^{2+} , el Ca^{2+} activa al IP₃R en presencia de IP₃, de lo contrario el Ca^{2+} induce un estado inactivado (Lock and Parker 2020). Las células HeLa expresan las tres isoformas del IP₃R en una proporción ~53:1:46 para el IP₃R1, IP₃R2 y el IP₃R3, respectivamente (Hattori et al. 2004; Lock and Parker 2020), por lo que se mencionarán algunas de las características más relevantes para cada isoforma.

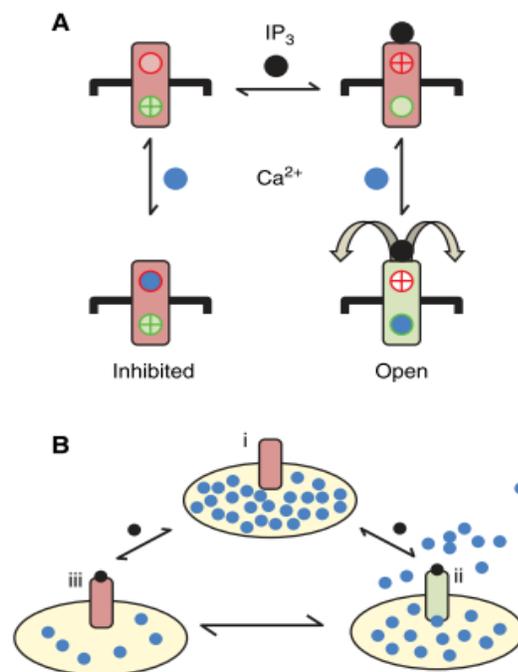


Fig. 1.5. Regulación de la probabilidad de apertura del IP₃R por Ca^{2+} . (A) La unión del IP₃ favorece que el Ca^{2+} se pueda unir a un sitio estimulador o inhibitorio. (B) Un modelo propone que la $[Ca^{2+}]$ luminal permite cambiar la sensibilidad del IP₃R por el IP₃ citosólico, favoreciendo la liberación del Ca^{2+} luminal (Taylor and Tovey 2010).

En las células HEK, mediante manipulación genética, se han expresado cada una de las tres isoformas del IP₃R de forma independiente para estudiar los patrones de liberación de Ca²⁺ de cada isoforma en comparación con células nativas (Lock and Parker 2020). La expresión del IP₃R1 generó señales de Ca²⁺ globales con amplitudes mucho menores y más lentas que las células nativas o las células que expresaban solamente el IP₃R2 o el IP₃R3. Por otra parte, las células que únicamente expresaron el IP₃R2 mostraron una rápida y amplia liberación de Ca²⁺, mientras que las células expresando el IP₃R3 fueron similares en amplitud a las células nativas y a las células expresando solo la isoforma del IP₃R2, pero con una velocidad lenta de subida de [Ca²⁺]_i (Lock and Parker 2020). En resumen, cada isoforma tiene un papel importante en los patrones de liberación de Ca²⁺, por lo que resulta interesante conocer si la velocidad en la liberación de Ca²⁺ depende de las proteínas que puedan estar asociadas a estos canales.

Se ha propuesto que el IP₃R tiene una estrecha comunicación con STIM2, debido a que la reducción local de la [Ca²⁺] del ER a través de la apertura espontánea del IP₃R permite la oligomerización de STIM2 en condiciones basales y así inicia la ya ampliamente descrita “actividad constitutiva de STIM2” (Ahmad et al. 2022). Adicionalmente, se ha reportado la participación de STIM1 para llevar a cabo una correcta señalización de Ca²⁺ inducida por agonista (Decuypere et al. 2010). Sin embargo, con ensayos de inmunoprecipitación no se ha observado interacción directa entre el IP₃R y STIM (Ahmad et al. 2022; Emrich et al. 2021), lo que sugiere que podría haber otra proteína que facilite este complejo. De acuerdo al trabajo reportado por Woodard et al. (2010), se ha propuesto un macrocomplejo compuesto por STIM1, Orai1, TRPC3, RACK y el IP₃R1, lo que permite inferir que otras proteínas podrían estar participando como proteínas de andamiaje para regular los flujos de Ca²⁺ citoplásmico y luminal del ER.

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

La familia de las cinasas de proteínas activadas por calcio y diacilglicerol (PKC) son un conjunto de proteínas que transducen 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) (Newton 1995). La Fig. 1.6 muestra la estructura de las diferentes isoformas de las PKC. Estas cinasas tienen cuatro dominios conservados (C1-C4); el dominio C1 contiene un motivo rico en cisteínas, que está duplicado en la mayoría de las isoenzimas y que forman el sitio de unión al diacilglicerol (DAG); el dominio C2 contiene el sitio de reconocimiento de lípidos ácidos y en algunas isoenzimas, los sitios de unión al Ca^{2+} . Los dominios C3 y C4 forman los lóbulos de unión al sustrato y al ATP localizados en el centro de la cinasa (Nishizuka 1995).

La familia de la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) está formada por tres grupos diferentes, clasificación que se basa en la estructura y regulación funcional de las diferentes cinasas. Las primeras que se descubrieron son las proteínas cinasas C clásicas (cPKC, por sus siglas en inglés), cuya función está regulada por DAG que se une al dominio C1 y por Ca^{2+} , que se une al dominio C2. El segundo grupo se compone de las proteínas cinasas C nuevas (nPKC, por sus siglas en inglés), las cuales son estructuralmente similares a las cPKC, con la diferencia que el dominio C2 no es funcional y por lo mismo solamente se activa en respuesta al DAG que se une al dominio C1. El último grupo comprende a las proteínas cinasas C atípicas (aPKC, por sus siglas en inglés), estas cinasas difieren significativamente en su estructura de los dos grupos anteriores (Kawano et al. 2021; Newton 1995, 2018).

Las aPKC solo tienen un motivo rico en cisteínas, no dos como las cPKC y nPKC (ver Fig. 1.6), y los residuos que hacen funcional al dominio C2 no están presentes, por lo que se piensa que se activan por interacción con otras proteínas. La actividad de las proteínas cinasas C (PKCs, por sus siglas en inglés) 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; el segundo sistema de regulación se debe a la unión de sus ligandos según sea el caso, ya sea Ca^{2+} y DAG o solo DAG (Kawano et al. 2021; Newton 1995).

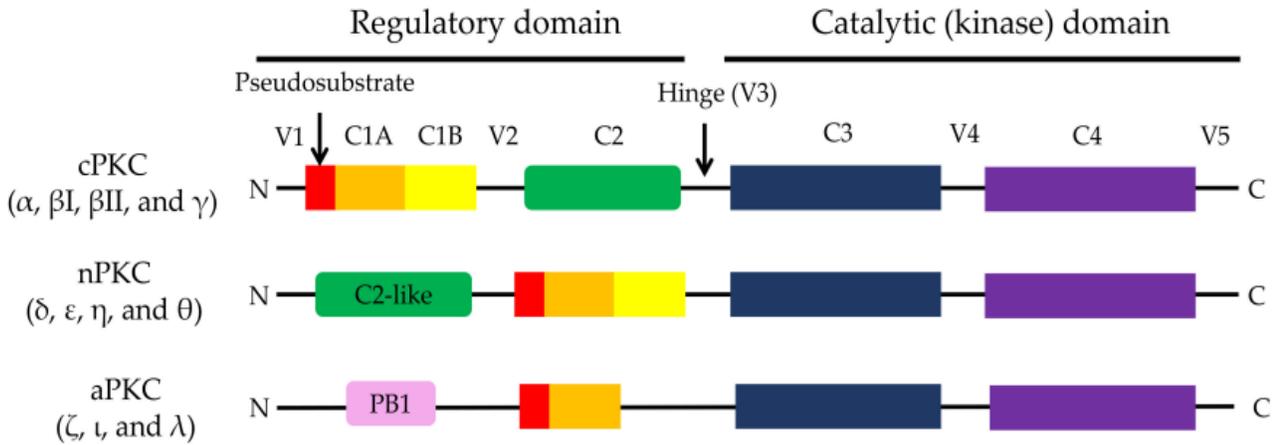


Fig. 1.6 Representación de la estructura primaria, que muestra la actividad regulatoria y catalítica de las cPKC, nPKC y aPKC. cPKC cuentan con un dominio de regulación para DAG y Ca^{2+} ; nPKC no cuentan con los residuos involucrados en la unión de Ca^{2+} , por lo que se activan con DAG; aPKC no cuentan con los dominios para ser regulada por Ca^{2+} , y no responde al DAG (Kawano et al. 2021).

La PKC β ha mostrado regular la entrada de Ca^{2+} operada por depósito a través de la fosforilación de las S27/S30 de Orai1 (Kawasaki et al. 2010). En este trabajo se emplearon mutaciones puntuales y se sustituyó a las S27/S30 por alaninas que no pueden ser fosforiladas, lo que provocó que SOCE incrementara significativamente, sin embargo, no se presentaron datos de un canal Orai1 que mimetizara una proteína permanentemente fosforilada en las S27/S30. En el presente trabajo se estudió la participación de la PKC y de las S27/S30 de Orai1 en los flujos de Ca^{2+} . Para este propósito se empleó el PDBu, un éster de forbol que activa a la PKC, así como el inhibidor de las PKCs dependientes de Ca^{2+} (Gö 6976) o un inhibidor más generalizado, Gö 6983 (ver tabla suplementaria 1).

1.8 Enfermedades asociadas a alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} .

La función anómala de los canales Orai1 y la proteína STIM1 está asociada a diferentes enfermedades, causadas tanto por una excesiva actividad de Orai1, como por inhibición de la misma (Hogan and Rao 2015). De hecho, se ha observado que Orai1 y STIM1 son proteínas clave para mantener la homeostasis de Ca^{2+} en músculo esquelético (Lacruz and Feske 2015). Mutaciones puntuales en los residuos ácidos de STIM (D76, D84 o E87), ubicados en el dominio canónico mano EF de STIM1, permiten que esta proteína se mantenga constitutivamente activa, al mimetizar la conformación que STIM1 adopta cuando se ha inducido un vaciamiento de Ca^{2+} del ER (Lacruz and Feske 2015).

Personas deficientes de la actividad de STIM1 y Orai1 sufren infecciones virales, bacterianas y fúngicas recurrentes (Lacruz and Feske 2015; Tiffner, Maltan, et al. 2021). Se ha reportado que en pacientes con deficiencia de STIM1, SOCE está fuertemente suprimida, ocasionando el desarrollo de sarcoma de Kaposi clásico fatal (Byun et al. 2010). Además, la pérdida de función de Orai1 y STIM1 se asocia con alteraciones en la función de células inmunes, así como con hipotonía muscular, es decir, una fuerza muscular reducida (Lacruz and Feske 2015).

El reciclamiento de Orai1 también juega un papel importante en la regulación de los flujos de Ca^{2+} , ya que se ha observado que el polimorfismo de nucleótido individual está asociado a mutaciones que favorecen que Orai1 escape de la vía de degradación y en su lugar entre al reciclamiento endosomal, que es positivo a la proteína Rab-11, provocando un incremento en la cantidad de Orai1 en la membrana plasmática, lo que ocasiona reducción de SOCE por alterar la estequiometría entre STIM1 y Orai1 (Yeh et al. 2020).

Por otra parte, el IP_3R también juega un papel importante, debido a que son tres isoformas y ya que cada una de ellas exhibe un patrón particular de liberación de Ca^{2+} , la regulación deficiente de cualquier isoforma puede derivar en diversos tipos de enfermedades humanas (Ando et al. 2018; Hisatsune and Mikoshiba 2017; Mikoshiba 2015; Terry et al. 2020). Estos ejemplos muestran la relevancia de mantener la homeostasis de Ca^{2+} celular, por lo que resulta relevante estudiar las

vastas y diversas interacciones moleculares que permiten llevar a cabo patrones espaciotemporales particulares para mantener la regulación de los diferentes procesos celulares.

En esta tesis se plantea estudiar si la entrada de Ca^{2+} y la liberación de Ca^{2+} del ER podrían estar siendo modificadas por Orai1 y determinar cuál es el papel que juegan las S27/S30. Esto resulta relevante ya que las patologías que están asociadas a alteraciones en los flujos de Ca^{2+} abarcan un amplio espectro de gravedad, por lo que comprender si de manera fisiológica Orai1 tiene un papel dual en la regulación de los flujos de Ca^{2+} podría ayudar a comprender mejor el papel que juega en este canal y las alteraciones ocasionadas por su desregulación.

2. ANTECEDENTES

Derivado de mi trabajo de tesis de maestría, hemos reportado que en células HeLa, la sobreexpresión de Orai1 produjo una fuerte inhibición en el vaciamiento de Ca^{2+} del ER cuando las células fueron estimuladas tanto con ATP y TG como por histamina y TG (Fig. 2.1). Por otro lado, el ATP y TG, pero no la histamina y TG, incrementaron el pico del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Debido a que Orai1 es un canal de Ca^{2+} , se comenzó a estudiar si la modificación de los flujos de Ca^{2+} por Orai1 requerían la participación tanto del agonista como de la TG. Nuestros datos mostraron que no fue suficiente con vaciar el ER utilizando TG, ya que se requiere el agonista para poder observar la inhibición en el vaciamiento de Ca^{2+} del ER al sobreexpresar a Orai1 (Martínez-Martínez 2016).

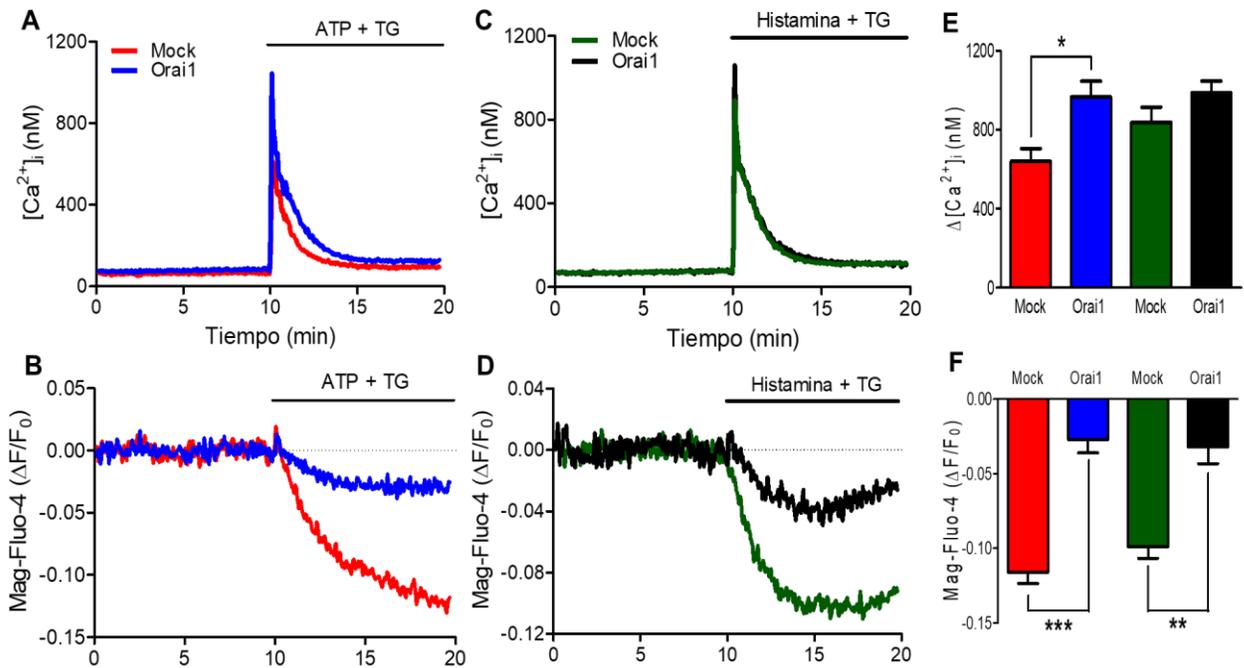


Fig. 2.1 La sobreexpresión de Orai1 modificó las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tanto luminal como citoplásmica. (A-B) La sobreexpresión de Orai1 incrementó el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e inhibió la liberación de Ca^{2+} del ER en células estimuladas con ATP y TG. **(C-D)** La sobreexpresión de Orai1 no modificó el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mientras que inhibió fuertemente el vaciamiento de Ca^{2+} del ER al estimular a las células con histamina y TG. **(E)** El transitorio de Ca^{2+} citoplásmico incrementó significativamente únicamente en células estimuladas con ATP y TG. **(F)** La fuerte inhibición en la liberación de Ca^{2+} del ER fue estadísticamente significativa tanto para las células estimuladas con la combinación de ATP y TG, así como para las células estimuladas con la combinación de histamina y TG. Se realizaron 5 experimentos independientes para cada condición y se realizó la prueba estadística *t* de Student en la que se comparó la respuesta al sobreexpresar Orai1 respecto a las células transfectadas con el plásmido *mock*. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Aunque se desconoce el mecanismo molecular utilizado por los canales Orai1 para inhibir el vaciamiento de Ca^{2+} del ER, el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico no muestra supresión, incluso incrementó cuando las células fueron estimuladas con ATP y TG, lo que sugiere que Orai1 no perturba la actividad del IP_3R , al menos inicialmente. Ya que se requiere TG para inhibir el vaciamiento del ER, esto sugiere que una mayor actividad de la bomba SERCA no sería la explicación para dicha inhibición. El efecto al sobreexpresar Orai1 requiere tanto bloquear a la bomba SERCA con TG como la participación del agonista, este último produce DAG que activa a las PKCs nuevas y junto con el Ca^{2+} activa a las PKCs clásicas, por lo que se ha propuesto que la actividad de Orai1 es regulada negativamente por la fosforilación de PKC en las S27/S30. Por lo tanto, se estudió a la mutante Orai1-S27A/S30A (O1-AA) que no puede ser fosforilada por $\text{PKC}\beta$ (Kawasaki et al. 2010) y se indujo el vaciamiento del ER tanto con ATP y TG como con histamina y TG en presencia de Ca^{2+} .

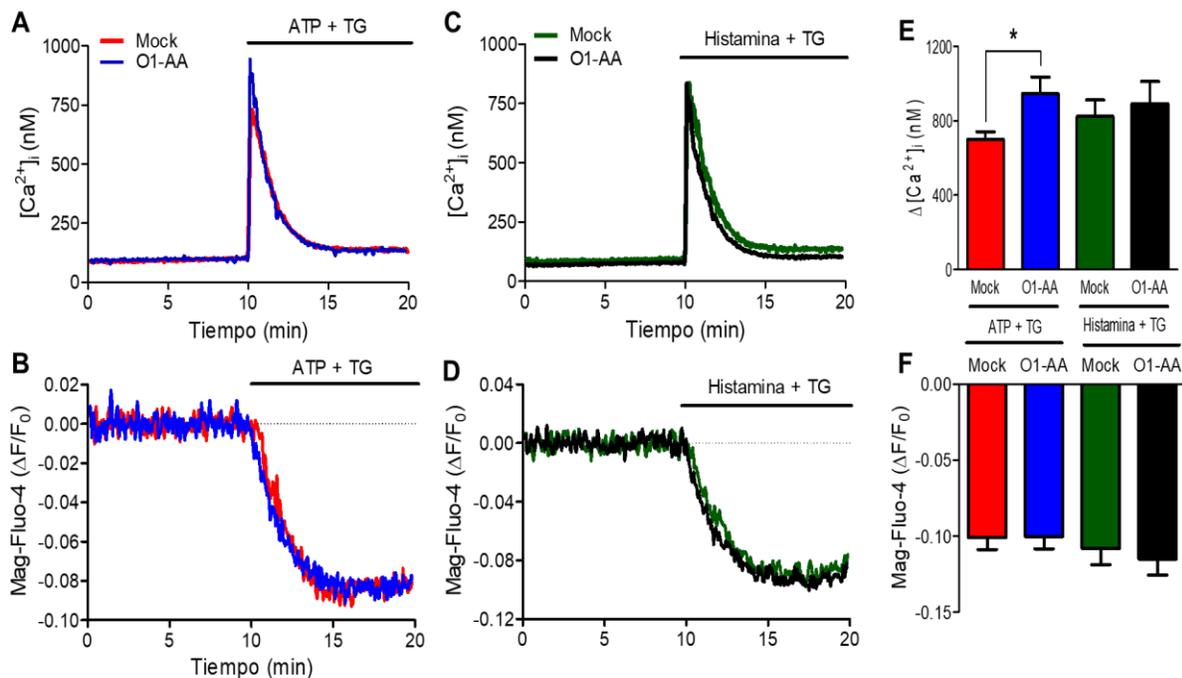


Fig. 2.2 La mutante Orai1-S27A/S30A (O1-AA) suprimió la inhibición en la liberación de Ca^{2+} del ER. (A-B) La expresión de O1-AA incrementó el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células estimuladas con ATP y TG, sin que modificara la liberación de Ca^{2+} del ER. **(C-D)** En las células transfectadas con O1-AA no se modificó el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico ni la liberación de Ca^{2+} del ER. **(E)** El transitorio de Ca^{2+} citoplásmico incrementó únicamente en células estimuladas con ATP y TG que expresaban O1-AA. **(F)** La liberación de Ca^{2+} del ER no fue modificada por la mutante O1-AA. Se realizaron 5 experimentos independientes para cada condición y se llevó a cabo la prueba estadística *t de Student* en la que se comparó la respuesta al sobreexpresar O1-AA respecto a las células transfectadas con el plásmido *mock* *, $p < 0.05$.

La Fig. 2.2 muestra que la fosforilación por PKC es necesaria para inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER para las células estimuladas con ATP y TG, así como para las células estimuladas con histamina y TG. Sin embargo, la respuesta de Ca^{2+} en el citoplasma no mostró dependencia de la fosforilación de las S27/S30, siendo reproducible el incremento en el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando se empleó el ATP y la TG. Con estos datos se planteó la posibilidad de que Orai1 estaría inhibiendo el vaciamiento de Ca^{2+} del ER al interactuar con el IP_3R , más que por su actividad intrínseca de canal de Ca^{2+} . Esta propuesta concuerda con la formación del complejo entre Orai1, STIM1, RACK, TRPC3 y el $\text{IP}_3\text{R1}$ en respuesta a agonistas productores de IP_3 (Woodard et al. 2010). Otro escenario sería que Orai1 modificará la actividad del IP_3R de forma indirecta por alterar la interacción del IP_3R y STIM1, así como la regulación de la actividad de STIM1 por el IP_3R que se ha reportado por varios laboratorios independientes (Ahmad et al. 2022; Decuyper et al. 2010; Emrich et al. 2021; Sampieri et al. 2018).

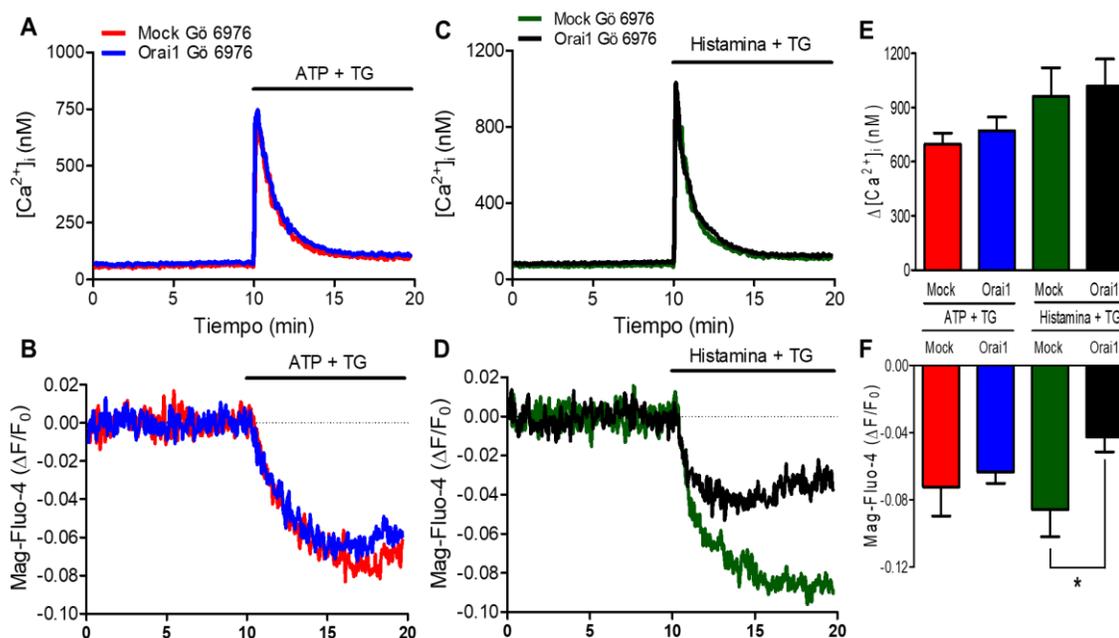


Fig. 2.3 El inhibidor de PKC Gö 6976 modificó los flujos de Ca^{2+} . (A-B) La sobreexpresión de Orai1 no modificó el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico ni la liberación de Ca^{2+} del ER en células que fueron incubadas por 10 min con 200 nM de Gö 6976. (C-D) El transitorio de Ca^{2+} citoplásmico no fue modificado al sobreexpresar Orai1 e incubar a las células con Gö 6976 (200 nM) por 10 min, mientras que la liberación de Ca^{2+} del ER sí se redujo por Orai1 únicamente al estimular a las células con histamina y TG. (E) El transitorio de Ca^{2+} citoplásmico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones. (F) La liberación de Ca^{2+} del ER fue significativamente reducida solo en células estimuladas con histamina y TG. Se realizaron 5 experimentos independientes para cada condición y se analizaron mediante la prueba estadística *t de Student* en la que se comparó la respuesta de células que sobreexpresaron Orai1 respecto a las células transfectadas con el plásmido *mock* e incubadas con Gö 6976. *, $p < 0.05$.

Para demostrar la participación de las PKC en este mecanismo de inhibición, se realizaron experimentos incubando a las células por 10 min con Gö 6976, este inhibidor es selectivo para las PCKs dependientes de Ca^{2+} (Martiny-Baron et al. 1993). Como se puede ver en la Fig. 2.3, el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico en presencia de este inhibidor fue similar al de las células control, mientras que la inhibición del vaciamiento del RE se abatió completamente en células estimuladas con ATP y TG. Inesperadamente, las células estimuladas con histamina y TG, mostraron una reducción solo en la liberación de Ca^{2+} del ER, sugiriendo que el mecanismo de inactivación que es activado por histamina y TG son diferentes. Se ha reportado que no hay una respuesta lineal entre la producción de IP_3 inducida por agonistas y la respuesta en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que la histamina produce menos IP_3 y DAG que otros agonistas (van der Wal et al. 2001). No obstante, la histamina puede producir DAG por otras vías de señalización que podrían explicar las diferencias entre este agonista y el ATP (Oprins et al. 2002).

Todos estos datos en conjunto sugieren que la actividad de la PKC, así como los residuos de las serinas 27 y 30 del canal Orai1 son importantes para llevar a cabo la inhibición del vaciamiento de Ca^{2+} del ER, por lo que en el presente trabajo se plantea estudiar si la inhibición mediada por Orai1 podría ser un mecanismo de regulación de Ca^{2+} fisiológica y si esta regulación es activada de forma diferencial para cada agonista, así como determinar si Orai1 está interaccionando de forma directa o indirecta con el IP_3R para inhibir su actividad. Además, establecer la relevancia tanto de las PKC como de un medio suplementado con Ca^{2+} .

3. JUSTIFICACIÓN

La sobreexpresión del canal Orai1 inhibe el vaciamiento del ER inducido por la combinación de ATP y TG o histamina y TG en células HeLa. Por otro lado, hay varios reportes de que Orai1 interacciona con el IP₃R, pero se desconoce si esta interacción modifica los flujos de Ca²⁺ a través del IP₃R. Ya que Orai1 es la subunidad formadora de los canales CRAC que participan en SOCE, resulta relevante investigar si hubiese otros papeles de Orai1 en relación con la actividad del IP₃R.

4. HIPÓTESIS

La fosforilación del canal Orai1 por la PKC en los residuos S27/S30 facilita la internalización del canal Orai1 y su interacción con el IP₃R, provocando una reducción en la liberación de Ca²⁺ del ER.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel que tiene la fosforilación del canal Orai1 en los residuos S27/S30 y si estas modificaciones postraduccionales promueven la interacción entre Orai1 y el IP₃R, ocasionando la inactivación de la liberación de Ca²⁺ a través de este receptor.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto del canal Orai1 “permanentemente fosforilado” en S27/S30:
 - Mediante el uso de un inhibidor generalizado de PKC (Gö 6983), determinar si además de las cPKC, las nPKC podrían estar participando en la inhibición del vaciamiento de Ca^{2+} del ER inducido por la combinación de histamina y TG.
 - Generar el ADN codificante para la mutante fosfomimética de Orai1 (Orai1 S27D/S30D) en el vector p3xFLAG-CMV10 y estudiar si su expresión tiene un efecto en la inhibición del vaciamiento del ER.
 - Determinar el efecto de expresar Orai1 S27D/S30D en células incubadas de forma aguda con Gö 6983.
 - Determinar el efecto en el vaciamiento de Ca^{2+} del ER en células que expresan Orai1 S27D/S30D al ser incubadas con Gö 6983 por 10 min.

2. Establecer si el canal Orai1 endógeno es capaz de inhibir la actividad del IP_3R :
 - Determinar si al inhibir la actividad de PKC con Gö 6983 se incrementa el vaciamiento inducido únicamente por agonistas.
 - Determinar si la activación de PKC con PDBu en un medio sin Ca^{2+} externo inhibe el vaciamiento de Ca^{2+} del ER.
 - Estudiar si Orai1 endógeno puede inhibir el vaciamiento de Ca^{2+} del RE mediante el uso del activador de PKC PDBu.

3. Investigar cuál es el papel de las S27/S30 en la interacción de Orai1 y el IP_3R :
 - Estudiar la interacción proteína-proteína entre el IP_3R y Orai1 inducida por ATP, TG, o por la combinación de agonistas y TG, mediante ensayos de FRET, coimmunoprecipitación y PLA en células transfectadas con los canales Orai1-wt, Orai1-AA y Orai1-DD.
 - Estudiar si los canales Orai1-wt, Orai1-AA y Orai1-DD modifican los patrones de oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por el agonista ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este proyecto se utilizó la línea celular inmortalizada HeLa, la cual ha mostrado ser un buen modelo celular para estudiar la dinámica de Ca^{2+} (Montero et al. 1997; Shen et al. 2016; Vay et al. 2007). En ensayos donde se requirió expresar proteínas de elevado peso molecular como el $\text{IP}_3\text{R1}$, se empleó la línea celular HEK-293T debido a su alta eficiencia de transfección (Ooi et al. 2016).

Las líneas celulares HeLa y HEK-293T se cultivaron en cajas Corning de 60 mm \times 15 mm en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y una relación de antibiótico de 100 mg/mL penicilina y 100 U/mL estreptomycin. Las células se mantuvieron en una incubadora Nuair a una temperatura de 37 °C y una atmósfera de 5 % CO_2 .

7.1 Transfección.

En este trabajo se realizaron transfecciones transitorias de 24 h y los plásmidos utilizados se presentan en la tabla 6.1. El plásmido p3XFLAG-CMV10-Orai1 S27A/S30A fue donado por el Dr. Stefan Feske (New York University School of Medicine). Los plásmidos pEX-CFP-STIM1-deltaK, Orai1-CFP, Orai1-E106A, p3XFLAG-CMV-7.1-mCherry-Orai1 fueron un generoso obsequio del Dr. Luis Vaca (Instituto de Fisiología Celular – UNAM). El plásmido eYFP-C1-hOrai1 y el pcDNA3_erGAP3 fueron obsequiados por Dr. Juan Antonio Rosado Dionisio (Universidad de Extremadura) y la Dra. María Teresa Alonso (Universidad de Valladolid), respectivamente. Las construcciones p3XFLAG-CMV-7.1-mCherry-Orai1 S27A/S30A, p3XFLAG-CMV-7.1-mCherry-Orai1 S27D/S30D, p3XFLAG-CMV10-Orai1 S27D/S30D y p3XFLAG-CMV10-Orai1 S27A/S30A-E106A se generaron en este trabajo con la asesoría del Dr. Juan Manuel Arias Montaña (Facultad de Estudios Superiores Iztacala – UNAM).

Tabla 7.1. Plásmidos empleados para la realización de transfecciones transitorias en células HeLa y HEK-293T.

Plásmido	Resistencia
pEX-CFP-STIM1-deltaK	Kanamicina
Orai1-CFP	Ampicilina
Orai1-E106A	Ampicilina
eYFP-C1-hOrai1	Kanamicina
p3XFLAG-CMV-7.1-mCherry-Orai1	Ampicilina
p3XFLAG-CMV-7.1-mCherry-Orai1 S27A/S30A	Ampicilina
p3XFLAG-CMV-7.1-mCherry-Orai1 S27D/S30D	Ampicilina
p3XFLAG-CMV10-Orai1 S27A/S30A	Ampicilina
p3XFLAG-CMV10-Orai1 S27D/S30D	Ampicilina
p3XFLAG-CMV10-Orai1 S27A/S30A-E106A	Ampicilina
pcDNA3_erGAP3	Ampicilina

Las células HeLa o HEK-293T fueron transfectados con los plásmidos mencionados en la tabla 6.1 y 24 h después se efectuaron los ensayos, según se indique en cada caso. Como agente de transfección se empleó la lipofectamina 2000 de Thermo Fisher Scientific que está basada en lípidos catiónicos para agregar y facilitar la internalización del ADN (Chong, Yeap, and Ho 2021; Fein et al. 2010). Este reactivo consiste de moléculas con una cabeza polar cargada positivamente y una, dos o tres cadenas hidrocarbonadas. La carga positiva conferida por la cabeza polar permite la interacción entre el lípido y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Se propone que este complejo de ADN plasmídico-lipofectamina se internaliza en la célula por endocitosis (Kumar, Nagarajan, and Uchil 2019).

Las células se transfectaron a una confluencia del 70–80 % con el complejo de ADN plasmídico y lipofectamina 2000 preparado en Opti-MEM. Para realizar los experimentos de espectrofluorometría, las células se cultivaron en cajas Corning de 60 mm × 15 mm (P60) y fueron transfectadas con una relación de ADN plasmídico, lipofectamina 2000 y Opti-MEM de 2 µg; 10 µL; 200 µL. Las células para los experimentos de microscopía confocal se cultivaron sobre cubreobjetos de 22 mm × 22 mm, colocados en Placas Corning de 6 pozos, los cuales fueron transfectados de acuerdo a la siguiente relación ADN plasmídico, lipofectamina 2000 y Opti-MEM de 2 µg; 4 µL; 300 µL.

7.2 Reactivos y soluciones de registros de Ca^{2+} citoplásmico y Ca^{2+} luminal.

- Componentes utilizados en la **solución salina suplementada con Ca^{2+}** (en mM): 121 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 MgCl_2 , 6 NaHCO_3 , 1.8 CaCl_2 , 5.5 glucosa, 25 HEPES. Ajustado con NaOH a pH 7.3.
- Componentes utilizados en la **solución salina sin Ca^{2+}** (en mM): 121 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 MgCl_2 , 6 NaHCO_3 , 5.5 glucosa, 25 HEPES y 100 μM EGTA. Ajustado con NaOH a pH 7.3.
- Componentes utilizados en la **solución salina de alto K^+ isotónica suplementada con Ca^{2+}** (en mM): 126.4 KCl, 0.8 MgCl_2 , 6 NaHCO_3 , 1.8 CaCl_2 , 5.5 glucosa, 25 HEPES. Ajustado a con NaOH a pH 7.3.
- Componentes utilizados en la **solución salina a base de HEPES** (HBS, en mM): 10 HEPES, 145 NaCl, 5 KCl, 9.9 glucosa y 1 MgSO_4 . Ajustado a pH 7.4.

Los reactivos utilizados en los registros de fluorimetría, son los siguientes: ATP (10 μM), histamina (100 μM), TG (1 μM), CaCl_2 (2 mM), Gö 6976 y Gö 6983 (200 nM) y PDBu (1 μM). Digitonina (1 %), EGTA (400 mM) y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.5 M).

7.3 Indicadores fluorescentes de Ca^{2+} .

Los registros de espectrofluorimetría fueron realizados en células incubadas con los indicadores **fura-2/AM** y **mag-fluo-4/AM**, que reportan cambios de Ca^{2+} libre citoplásmico y Ca^{2+} libre luminal del ER, respectivamente. El **fura-2/AM** es un indicador de Ca^{2+} que atraviesa la membrana plasmática. En el citoplasma, sus cinco grupos funcionales acetoximetilos son hidrolizados por acción de las esterasas citoplásmicas, obteniendo así el indicador fluorescente fura-2, cuya K_d por Ca^{2+} es ~ 200 nM en el citoplasma (Grynkiewicz, Poenie, and Tsien 1985). El fura-2 es un indicador de Ca^{2+} de cociente debido a que su espectro de excitación tiene un corrimiento en respuesta a la unión exclusivamente de Ca^{2+} (Grynkiewicz et al. 1985).

La elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incrementa la fracción de fura-2 unido al Ca^{2+} , cambiando su longitud de onda máxima de excitación de 360 nm a 340 nm, y además aumenta la amplitud de emisión de su fluorescencia. Esto quiere decir que

el fura-2 con Ca^{2+} unido necesita más energía para ser excitado. Ante un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, los registros muestran un incremento de la señal de fluorescencia de excitación a 340 nm y una disminución de la señal de fluorescencia de excitación a 380 nm, mientras que a 360 nm el fura-2 no reporta cambios en su señal de emisión ante variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bootman et al. 2013; Grynkiewicz et al. 1985; Hess et al. 2021; Kwakye et al. 2011).

El mag-fluo-4/AM tiene tres grupos acetoximetil éster que son hidrolizados por esterasas del citoplasma; en este trabajo se incubó durante 2 h a las células con este indicador para permitir su internalización al ER. El mag-fluo-4/AM es un indicador que tiene baja afinidad por Ca^{2+} , por lo que se puede emplear para medir cambios en los niveles de Ca^{2+} en el rango de 10 μM a 1 mM. En solución salina se ha reportado para el mag-fluo-4/AM una $K_d = 22 \mu\text{M}$, pero es probable que la viscosidad del ER incremente este valor. Este indicador de Ca^{2+} no tiene forma de ser retenido en el RE 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 concentración de Ca^{2+} luminal del RE o donde se encuentre dicho indicador (Paredes et al., 2008). El mag-fluo-4 es excitado a una longitud de onda de 495 nm, en el laboratorio se realizan registros simultáneos de Ca^{2+} empleando el mag-fluo-4 y el fura-2 debido a que ambos indicadores presentan un pico de emisión a una longitud de onda de 510 nm (Grynkiewicz et al. 1985; Paredes et al. 2008).

7.4 Registros simultáneos de Ca^{2+} .

Se incubó 1 μM de **fura-2/AM** y 1 μM de **mag-fluo-4/AM** por cada 1×10^6 células en un medio suplementado con 1.8 mM de Ca^{2+} durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. La cuantificación de células se realizó empleando una cámara de Neubauer con una solución de azul de tripano al 0.4 %. El fundamento de este ensayo consiste en que el cromóforo está cargado negativamente y no entra a las células a menos que su membrana plasmática estuviese dañada. Todas aquellas células que no incorporaron el colorante se consideraron viables (Tennant 1964). Los registros simultáneos de Ca^{2+} se realizaron en un espectrofluorómetro de la compañía PTI (Photon Technology International).

7.5 Calibración de la señal de fluorescencia del fura-2.

La calibración del fura-2 consiste en realizar medidas de la intensidad de fluorescencia de este indicador en condiciones de saturación y de ausencia de Ca^{2+} . Para calcular el valor de fluorescencia máxima ($F_{\text{máx}}$), la membrana plasmática fue permeabilizada con 200 μM de digitonina (Paila et al., 2005) para saturar el fura-2 con el Ca^{2+} extracelular. Una vez que la señal se estabilizó, se determinó la fluorescencia mínima ($F_{\text{mín}}$) al adicionar 5 mM de EGTA para quelar el Ca^{2+} y así determinar la fluorescencia de fura-2 sin Ca^{2+} . Finalmente, la fluorescencia del fura-2 fue apagada con 12 mM de MnSO_4 . Cuando se realizaron registros en ausencia de Ca^{2+} , se adicionó 2 mM de CaCl_2 antes de comenzar a calibrar. En la Fig. 7.1 se presenta un registro de Ca^{2+} , donde se puede observar la secuencia de adición de los reactivos empleados para calibrar la señal del fura-2.

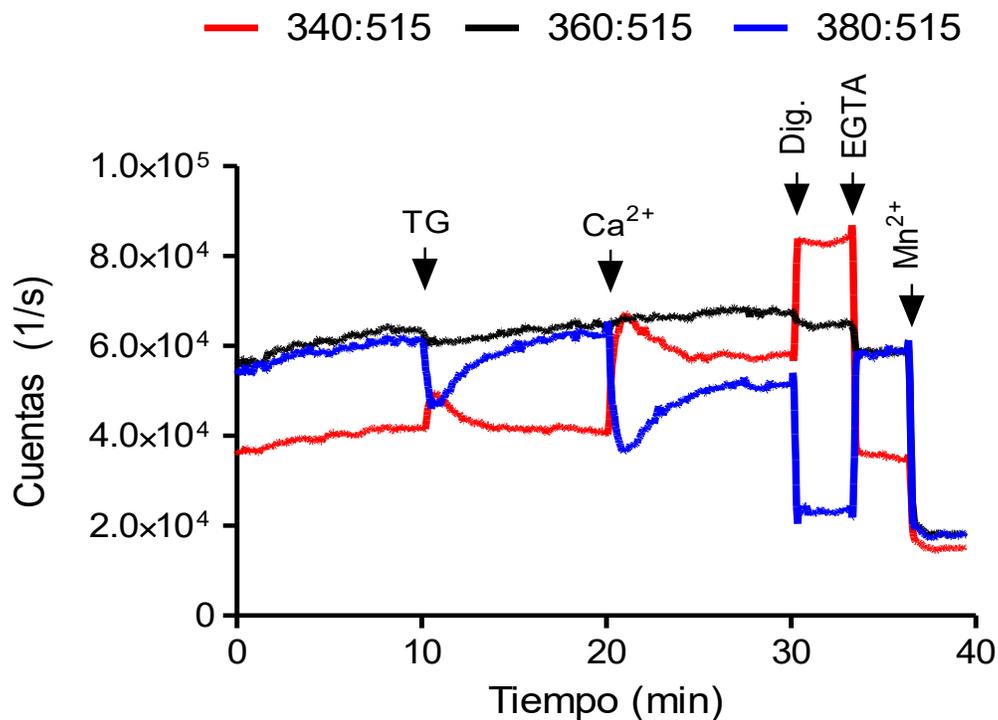


Fig. 7.1. Calibración del fura-2. El fura-2 fue excitado a longitudes de onda de 340, 360 y 380 nm y la fluorescencia de emisión fue registrada a 515 nm. La calibración se realizó empleando 2 mM de CaCl_2 para saturar el fura-2 en los registros donde la solución extracelular no fue suplementada con Ca^{2+} . La membrana plasmática se permeabilizó con 200 μM de digitonina, el Ca^{2+} fue quelado con 5 mM de EGTA y la fluorescencia de fondo fue apagada con 12 mM de MnSO_4 .

7.6 Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$.

La calibración del fura-2 fue utilizada para determinar la $[Ca^{2+}]_i$; la transformación de cuentas de fluorescencia a $[Ca^{2+}]$ (nM) se realizó mediante la ecuación de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al. 1985). $R_{m\acute{a}x}$, $R_{m\acute{i}n}$ y el factor β fueron calculados después de haber restado la fluorescencia del fura-2 en presencia de $MnSO_4$.

$$[Calcio] \text{ (nM)} = \frac{K_d \beta (R - R_{m\acute{i}n})}{R_{m\acute{a}x} - R}$$

Donde:

$R_{m\acute{i}n}$ = cociente de la fluorescencia del indicador sin Ca^{2+} ; $F_{EGTA} \frac{340 \text{ nm}}{380 \text{ nm}}$.

$R_{m\acute{a}x}$ = cociente de la fluorescencia del indicador saturado con Ca^{2+} ; $F_{Digitonina} \frac{340 \text{ nm}}{380 \text{ nm}}$.

β = es el cociente $\frac{F_{Digitonina}}{F_{EGTA}}$ a la longitud de onda de 380 nm.

R = cociente de la fluorescencia corregida que se registró experimentalmente.

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

En experimentos iniciales, se observó un aumento en la fluorescencia citoplásmica del fura-2 ya que cuando las células fueron lisadas con digitonina disminuyó la intensidad de fluorescencia a 340 nm y 380 nm, lo que sugería 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, el cual fue determinado al medir el ΔF_{340} y ΔF_{380} dentro y fuera de la célula (Poenie 1990).

7.7 Normalización de la señal de fluorescencia del mag-fluo-4.

La señal de fluorescencia obtenida con mag-fluo-4 se filtró usando una ventana deslizante de 7 puntos con el programa Savitzky Golay instalado en FeliX32. Como se puede observar en la Fig. 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 en condiciones de reposo se realizó un ajuste no lineal a la señal de fluorescencia antes de estimular a las células. El ajuste se realizó con el programa GraphPad Prism 5, utilizando la siguiente ecuación:

$$Y = Y_{\text{máx}} \left[\frac{x - C}{K + (x - C)} \right]$$

Donde:

Y = fluorescencia del mag-fluo-4 con respecto al tiempo en *x*.

Y_{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.

En la Fig. 7.2 A se puede observar el ajuste hiperbólico que se utilizó para calcular la fracción de disminución de la fluorescencia del mag-fluo-4. Este ajuste extrapola el comportamiento saturable del mag-fluo-4 en ausencia de estímulo y determina los parámetros *Y_{máx}*, *K* y *C*, con los que se puede calcular la diferencia entre la fluorescencia teórica respecto a la experimental.

La siguiente ecuación fue utilizada para normalizar los cambios de fluorescencia del mag-fluo-4, como un indicador sensible a Ca²⁺ que está agregado en depósitos intracelulares (Fig. 7.2 B):

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

Donde:

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

F₀ = fluorescencia basal (obtenida con la ecuación anterior).

F = fluorescencia experimental.

En este trabajo se realizaron mediciones simultáneas de Ca²⁺ incubando a las células con fura-2 y mag-fluo-4 para medir cambios de Ca²⁺ en el citoplasma y el ER, respectivamente. Para inducir el vaciamiento de Ca²⁺ del ER, se realizaron estímulos ya sea solo con agonista (ATP o histamina), TG o con la combinación de uno de los dos agonistas más TG. En la Fig. 7.3 se empleó un indicador de Ca²⁺

que cuenta con una secuencia de retención que le permite permanecer en el ER (erGAP3), el cual nos permitió mostrar que la combinación del agonista ATP y TG acelera la velocidad de vaciamiento comparado con células estimuladas solo con ATP o solo con TG.

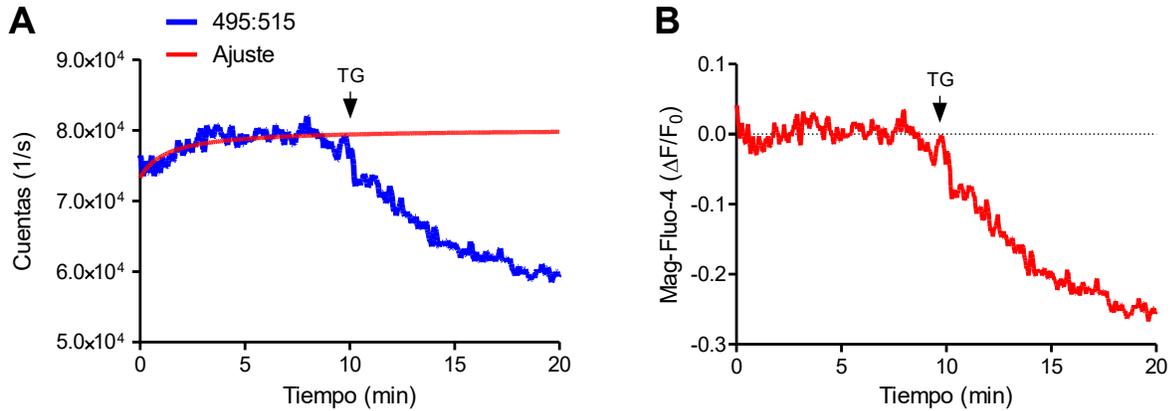


Fig. 7.2. Señal de fluorescencia del mag-fluo-4 en un medio en ausencia de Ca²⁺. (A) El mag-fluo-4 muestra un comportamiento que puede ser modelado con un ajuste no lineal (trazo rojo), el cual presenta el comportamiento que tendría el fluoróforo si no se indujera el vaciamiento de Ca²⁺ del ER con TG (1 μM). El trazo azul muestra la señal de fluorescencia experimental del mag-fluo-4 registrada a una longitud de onda de excitación de 495 nm; la señal de emisión fue colectada a una longitud de onda de 515 nm. (B) Empleando la fluorescencia experimental y los valores de fluorescencia del ajuste no lineal se calculó la fracción de disminución de fluorescencia $\Delta F/F_0$ estimulada por la liberación de Ca²⁺ del ER sensible a TG.

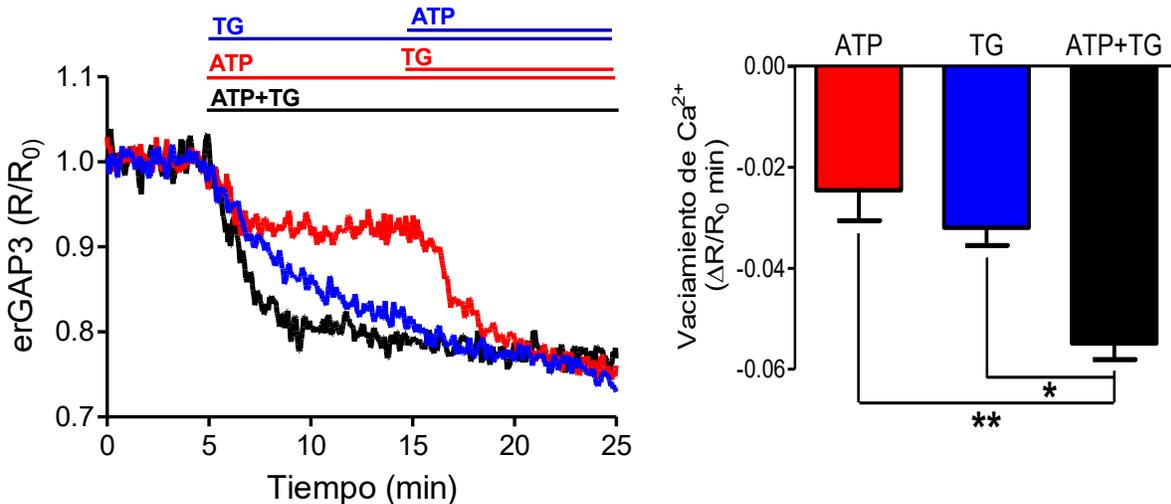


Fig. 7.3. Vaciamiento de Ca²⁺ del ER en células transfectadas con el indicador erGAP3. (A) Las células HeLa fueron transfectadas por 24 h con un indicador que cuenta con una secuencia de retención del ER (erGAP3) y se realizaron registros donde el vaciamiento de Ca²⁺ del ER fue inducido ya sea solamente por ATP (10 μM), TG (1 μM) o por la combinación de ATP y TG. El erGAP3 es un fluoróforo de cociente por lo que fue excitado a 405 y 470 nm, mostrando un pico de emisión a 515 nm. Los experimentos se normalizaron con un ajuste lineal y el cociente de fluorescencia 470/405. (B) La velocidad de vaciamiento se aceleró significativamente cuando las células fueron estimuladas con la combinación de ATP y TG respecto a las células que fueron estimuladas únicamente con ATP o con TG.

7.8 Construcción de las mutante **Orai1-S27D/S30D**, **mCherry-Orai1-S27D/S30D** y **mCherry-Orai1-S27A/S30A**.

Para generar el ADN codificante (ADNc) para una proteína **Orai1 fosfomimética (Orai1-S27D/S30D)** se introdujeron dos mutaciones puntuales en el plásmido p3XFLAG-CMV10-Orai1-S27A/S30A (O1-AA) mediante la técnica de extensión por empalme de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Heckman and Pease 2007), con los oligonucleótidos sentido GCGGCGACCGCCGGGACCGCCG y antisentido CGGCGGTCCCGGCGGTCCGCGC. El fragmento con las mutaciones fue amplificado por la PCR y purificado con el Kit GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento de interés (273 pb) fue digerido con la enzima de restricción HindIII, purificado y ligado al ADNc complementario. Las mutaciones fueron verificadas por secuenciación y el alineamiento se presenta en el material suplementario MS1.

Orai1-S27A/S30A-E106A. La mutación E106A fue realizada con los oligonucleótidos sentido GGTGGCAATGGTGGCCGTGCAGCTGGACGC y antisentido GCGTCCAGCTGCACGGCCACCATTGCCACC. El fragmento con la mutación fue amplificado por la PCR y purificado con el Kit GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher). El fragmento de 931 pb fue digerido con la enzima de restricción SacI y ligado al ADNc de la mutante p3XFLAG-CMV10 Orai1-S27A/S30A para obtener el cDNA p3XFLAG-CMV10 Orai1-S27A/S30A- E106A. La mutación E106A fue verificada por secuenciación y la alineación es mostrada en el material suplementario MS2.

Los ADNc para las proteínas de fusión **mCherry-Orai1-S27A/S30A** y **mCherry-Orai1-S27D/S30D** fueron generadas reemplazando en el plásmido p3XFLAG-CMV-7.1-mCherry-Orai1 el ADNc del Orai1-wt con los ADNc de las mutantes Orai1 S27A/S30A u Orai1 S27D/S30D. Las mutantes fueron ligadas empleando los sitios únicos para las endonucleasas BspEI y BamHI, el primero al inicio de la región codificante de Orai1 y el segundo en el sitio de clonación múltiple (polilinker) enseguida del final del extremo 5' del ADNc.

7.9 Ensayos de sensibilidad al IP₃.

Los ensayos de sensibilidad al IP₃ se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Una vez que las células fueron transfectadas transitoriamente por 24 h, se incubaron con 1 μM de mag-fluo-4/AM por cada 1×10^6 células durante 2 h. Se realizó un primer lavado para retirar la solución salina con Ca^{2+} , cuyos componentes se describieron en la sección 7.2, y se reemplazó por una solución tipo medio citosólico (CLM, por sus siglas en inglés) sin Ca^{2+} (Laude et al. 2005). La **solución CLM** tiene la siguiente composición (en mM): 140 KCl, 20 NaCl, 1 EGTA, 2 MgCl_2 y 20 PIPES (pH 7.0).
- Las células fueron permeabilizadas con digitonina (16.3 μM) y se comprobó la permeabilización con azul de tripano (Tennant 1964) en la cámara de Neubauer.
- Se realizó un lavado para retirar la solución CLM sin Ca^{2+} y se adicionó solución CLM suplementada con 200 nM de Ca^{2+} . En intervalos de 3 min se adicionaron los siguientes estímulos: 500 μM de Na_2ATP para activar a la bomba SERCA, 1 μM de IP₃ para activar al IP₃R, un segundo estímulo de 10 μM de IP₃ y finalmente para permeabilizar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se adicionó 1 μM de ionomicina (Fasolato et al. 1991).

Los datos se analizaron dándole el valor mínimo a la señal obtenida al adicionar Na_2ATP y el valor máximo a la señal obtenida al adicionar la ionomicina.

7.10 Ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET).

Se realizaron ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés) en la variante de fotoblanqueo del aceptor (Piston and Kremers 2007) de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Se crecieron células HEK293T en un medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera 5 % CO_2 y 95 % aire. Para optimizar la expresión del IP_3R se realizaron transfecciones de YFP- IP_3R y mCherry-O1 en una relación 3:2 μg plásmido por cada transfección.
- El YFP- IP_3R y mCherry-O1-wt fueron transfectadas en células HEK293T con lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) durante 48 h como ya se describió anteriormente. Se realizó un protocolo FRET por fotoblanqueo del aceptor ya descrito (Bohórquez-Hernández et al. 2017), en el cual se utilizó a la proteína YFP- IP_3R como donador y la proteína mCherry-O1-wt como aceptor y se realizaron las mediciones FRET con un microscopio invertido IX81 Olympus.
- El fotoblanqueo del aceptor fue realizado por exponer la región de interés (ROI, por sus siglas en inglés) directamente al láser al 50 % de su intensidad máxima durante 13 s, a una longitud de onda de 580 nm a la cual la proteína mCherry tiene su pico de excitación.
- Una vez que el aceptor fue fotoblanqueado, la longitud de onda de emisión del donador (YFP- IP_3R , $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$) comenzó a elevarse en aquellas condiciones donde Orai1 y el IP_3R se encontraron a una distancia de 1–10 nm (Kay et al. 2021; Piston and Kremers 2007; Wu et al. 2020)

7.11 Ensayos de Inmunoprecipitación y Western Blot.

Los experimentos de inmunoprecipitación y western blot se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo (Albarran et al. 2016; Woodard et al. 2010):

- Las células HeLa fueron transfectadas durante 24 h empleando como agente de transfección Turbo Fect (#R0532, Thermo Fisher Scientific).
- Las células fueron cosechadas a una confluencia del 80–100 % y empaquetadas en un tubo para centrifuga cónico de 15 mL a 900 $\times g$ durante 5 min y resuspendidas en 1 mL de solución HBS 1 \times , homogenizando suavemente.
- Se realizaron alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL, adicionando en cada uno de ellos 500 μL de muestra y se colocaron en un termobloque a 37 °C durante 10 min y en seguida se adicionaron los estímulos; en este trabajo se empleó ATP (10 μM) o las combinaciones de ATP (10 μM) y TG (1 μM) o histamina (100 μM) y TG (1 μM) durante 3 min y se homogenizó suavemente.
- Se adicionaron 500 μL de NP40 2 \times suplementado con inhibidores de proteasas y 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de ortovanadato de sodio (Na_3VO). Las muestras fueron colocadas en hielo de 1–3 minutos y sonicadas antes de ser colocadas nuevamente en hielo durante 30 min.
- Centrifugar a 4 °C durante 30 min a 16,000 $\times g$. Se retiró el sobrenadante y la muestra se colocó en un tubo de microcentrifuga nuevo.
- Se midió la concentración de proteína a través del método de BCA (ácido bicinconínico) cuyo principio se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} debido a la presencia de proteínas en una solución alcalina. La formación de color púrpura ocurre por la reacción entre los iones Cu^{1+} y el BCA. La absorbancia de este complejo (562 nm) aumenta linealmente respecto a la cantidad de proteína en la muestra a estudiar (Smith et al. 1985).
- Las muestras se ajustaron a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con NP40 y se mezclaron con 30 μL de perlas de agarosa y 1 μg de anticuerpo. Las muestras fueron incubadas toda la noche a 4 °C con agitación moderada.
- Las muestras fueron centrifugadas a 4 °C, durante 1 min a 16,000 $\times g$, el sobrenadante fue retirando mediante el uso de una bomba de vacío y se

realizaron 2 lavados con PBS a 4 °C retirando el sobrenadante cuidadosamente para conservar las perlas de agarosa.

- En las perlas de agarosa se adicionó solución amortiguadora de Laemmli 1× (suplementada con 5 % de DTT y 5 % de β-mercaptoetanol). Se indujo un choque térmico para desnaturalizar las proteínas mediante un cambio de temperatura rápido (de 70 °C a 4 °C).
- Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 ×g durante 1 min a temperatura ambiente. Todas las muestras se resolvieron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 7 %.
- Se realizó la transferencia de proteínas semiseca a una membrana de nitrocelulosa, verificando con la solución de Ponceau que hubo transferencia de proteína.
- La membrana fue bloqueada durante 1 h a temperatura ambiente con BSA al 10 %.
- Se incubó durante 2 h con el anticuerpo primario de interés en una relación 1:500 y se realizaron 6 lavado de 5 minutos cada uno con TBST para posteriormente incubar durante 1 h el anticuerpo secundario diluido en una relación 1:10,000, se realizaron 6 lavado de 5 minutos cada uno con TBST y se observó la señal mediante el empleo de un kit de bioluminiscencia SuperSignal West Dura que tiene como base el luminol. En este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anti-IP₃R1 (A302-157A), Anti-IP₃R2 (sc-39843), Anti-Orai1 (08264-200UL) y Anti-FLAG (MA1-91878).

La señal se cuantificó mediante el software ImageJ y se representó como el número de veces respecto al control.

7.12 Imágenes confocales de células HeLa.

Las células HeLa fueron cultivadas en cubreobjetos de 22 mm × 22 mm y una vez que alcanzaron una confluencia del 50 % fueron transfectadas con 2 µg de plásmido *mock*, mCherry-Orai1-wt, mCherry-Orai1-S27A/S30A y mCherry-Orai1-S27D/S30D por 24 h con lipofectamina 2000 como se describió anteriormente. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal ZEISS LSM700 usando un objetivo 63× (NA 1.4). La señal de fluorescencia de la proteína mCherry fue excitada a 555 nm a una unidad Airy (45 µm) y colectada a 580 nm. Las imágenes fueron adquiridas a una resolución de 1024 x 1024 píxeles y 12 bits, utilizando un *pinhole* de 40 nm (1 unidad de Airy). Las imágenes fueron deconvolucionadas mediante el complemento 2D de deconvolución iterativa paralela de ImageJ. En las imágenes se obtuvo el perfil de intensidades para visualizar la distribución de los canales de Orai1, las diferentes condiciones experimentales fueron analizadas con el software ImageJ y cuantificadas como unidades arbitrarias de fluorescencia.

7.13 Fijación y permeabilización de célula HeLa.

Una vez que las células fueron transfectadas con diferentes condiciones por 24 h en cubreobjetos de 22 mm × 22 mm colocados en placas de 6 pozos, se lavaron una vez con PBS y se fijaron con 2 mL/pozo de paraformaldehído al 4 % diluido en PBS frío durante 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS con rotación suave. La permeabilización se realizó con 2 mL/pozo de Tritón X-100 al 0.5 % diluido en PBS frío durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 3 veces las muestras con PBS con rotación suave y se adicionaron 40 µL de solución con DAPI (Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI, DUO82040, Sigma-Aldrich) a cada muestra; después de 15 min cada cubreobjeto fue sellado con laca sobre un portaobjeto y observado en el microscopio confocal.

7.14 Oscilaciones de Ca^{2+} en solución salina con Ca^{2+} .

Las células HeLa fueron cultivadas y transfectadas como se ha indicado anteriormente; una vez alcanzado el 80 % de confluencia fueron incubadas con 1 μM de Fluo-4/AM a temperatura ambiente en oscuridad, después de 30 min fueron lavadas con solución salina con Ca^{2+} , cuyos componentes están indicados en la sección 7.2. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal utilizando una configuración de escaneo secuencial (dos canales). El Fluo-4 fue excitado a 488 nm y la señal fue colectada a 510 nm, mientras que el mCherry fue excitado a 555 nm y las imágenes fueron capturadas a 580 nm. Las imágenes fueron adquiridas a una resolución de 512×512 píxeles con un pinhole de 200 nm y 8 bits. Se realizó un curso temporal donde se hicieron mediciones cada 5 s durante 4 min; la región del citoplasma fue utilizada para calcular $\Delta(F - F_{\text{mín}}) / (F_0 - F_{\text{mín}})$; $F_{\text{mín}}$ representa la señal de fluorescencia en la ausencia de una célula y F_0 es la fluorescencia antes de adicionar el estímulo (10 μM de ATP).

7.15 Ensayos de ligación por proximidad (PLA).

Los ensayos de PLA entre el $\text{IP}_3\text{R}2$ y los canales de Orai1 fueron realizados con el Kit Duolink Red de acuerdo a las especificaciones del fabricante, como a continuación se describe (Albarran et al. 2016; Hegazy et al. 2020):

- **Obtención de muestras:** Se cultivaron células en cubreobjetos de 22 mm \times 22 mm, las cuales fueron transfectadas por 24 h con O1-wt, O1-AA y O1-DD hasta alcanzar una confluencia del 90 % aproximadamente. Las células fueron estimuladas con 10 μM de ATP y 1 μM de TG, después de 3 min fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 10 min. Se realizaron dos lavados con PBS de 5 min cada uno y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5 % durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces con TBST (20 mM Trizma base, 137 mM NaCl, pH 7.6) al 0.5 % de Tween 20 con rotación suave durante 5 min.
- **Bloqueo de las muestras:** Se retiró el exceso de TBST al 0.5 % de Tween 20, se añadió 1 gota de la solución de bloqueo Duolink en cada uno de los pocillos y se incubó en una cámara de humedad a 37 °C durante 60 min.

Todas las reacciones se realizaron en la misma área para evitar que la muestra se seque.

- **Incubación de los Anticuerpos primarios:** Se retiró el exceso de solución de bloqueo de cada pocillo y se añadieron los anticuerpos primarios de Ori1 y el IP₃R2 a una concentración 1:100 diluidos en “Duolink antibody diluent”, las muestras se incubaron durante 60 min a 37 °C sin agitación en una cámara de humedad.
- **Incubación de las sondas “Duolink PLA probe”:** Se retiró el exceso de anticuerpo primario y se realizaron dos lavados con amortiguador de lavado (A), durante 5 min a temperatura ambiente con rotación suave y se adicionaron 40 µL de las sondas de PLA por pocillo (8 µL de Duolink anti-rabbit PLUS, 8 µL de Duolink anti-mouse MINUS y 24 µL de Duolink antibody diluent). Las muestras fueron incubadas en una cámara de humedad durante 60 min a 37 °C.
- **Ligación:** Las muestras fueron lavadas 2 veces durante 5 min con el regulador de lavado (A) a temperatura ambiente con rotación suave y se adicionó 40 µL de una relación 1:40 de ligasa y amortiguador de ligación Duolink. Las muestras fueron incubadas por 30 min a 37 °C en una cámara de humedad sin agitación.
- **Amplificación:** Las muestras fueron lavadas 2 veces con rotación suave, empleando el regulador de lavado (A) durante 5 min a temperatura ambiente y se agregaron 40 µL por reacción de una mezcla 1:80 de polimerasas y amortiguador de ligación Duolink.
- **Lavado final:** Las muestras fueron lavadas 2 veces con el buffer de lavado (B) a temperatura ambiente por 10 min con rotación suave. Al final, las muestras fueron lavadas con regulador de lavado (B) al 0.01 % con agitación por 1 min.
- **Preparación final de la muestra y captura de imágenes:** Se retiró el exceso de buffer de lavado (B) y se añadieron 40 µL de “Duolink *in situ* Mounting Medium with DAPI”. Las muestras fueron colocadas en un portaobjetos y selladas con laca para posteriormente ser analizadas en un Microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Eclipse Ti2, Ámsterdam,

Países Bajos) con adquisición de imágenes y sistema de análisis para microscopía de vídeo (NIS-Elements Imaging Software, Nikon).

7.16 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de los diferentes experimentos son presentados como media \pm error estándar; en cada figura se indica el número de experimentos independientes que fueron realizados. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el evento presentaba una $p < 0.05$; se utilizó la prueba estadística *t de Student* o ANOVA con la prueba estadística Dunnett, el cual es un procedimiento que compara todos los tratamientos experimentales respecto a la condición control.

8. RESULTADOS

Los datos presentados en la sección de antecedentes sugieren que los residuos S27/S30 de Orai1 afectan la liberación de Ca^{2+} del ER y el transitorio de Ca^{2+} citoplásmico. Con el objetivo de estudiar el mecanismo molecular por el cual estos dos residuos de serina regulan los flujos de Ca^{2+} , con la asesoría del Dr. Juan Manuel Arias Montaña (Facultad de Estudios Superiores Iztacala – UNAM), se realizaron dos mutaciones puntuales en Orai1 para mimetizar una proteína permanentemente fosforilada. Esta proteína fosfomimética 3XFLAG-Orai1 S27D/S30D (O1-DD) fue transfectada de forma transitoria por 24 h en células HeLa y se realizaron registros simultáneos de Ca^{2+} en el citoplasma y en el lumen del ER empleando los fluoróforos Fura-2, AM y Mag-Fluo-4, AM, respectivamente.

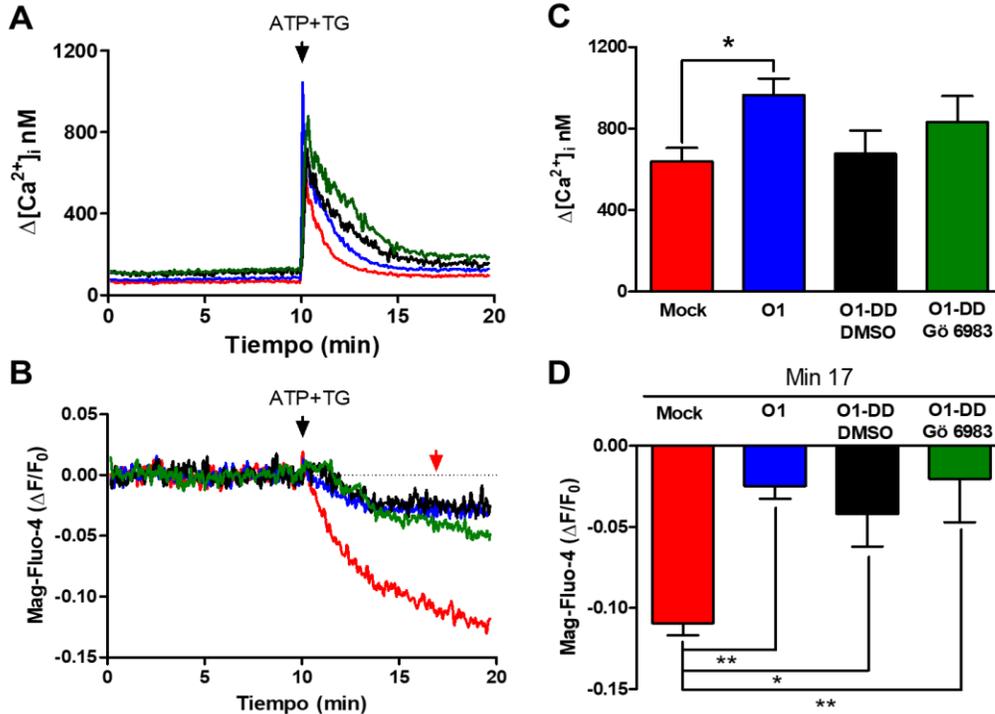


Fig. 8.1. La mutante O1-DD inhibió la liberación de Ca^{2+} del RE sin requerir la participación de PKC. Registros de Ca^{2+} simultáneos que muestran (A) el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y (B) el vaciamiento de Ca^{2+} del ER inducido por ATP (10 μM) y TG (1 μM) en un medio con Ca^{2+} (1.8 mM); la flecha roja indica el tiempo (17 min) donde se realizó el análisis estadístico. (C) El gráfico de barras muestra la respuesta promedio al pico \pm SE de células transfectadas con el plásmido vacío (*mock*), O1 y O1-DD incubadas durante 10 min con DMSO (0.1 %) o el inhibidor de PKCs, Gö 6983 (200 nM). Únicamente las células transfectadas con Orai1 silvestre mostraron un incremento en el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ respecto a las células transfectadas con el plásmido *mock*. (D) El gráfico muestra el vaciamiento promedio del ER \pm SE al tiempo indicado con la flecha roja en C. Las células que expresaron la mutante O1-DD fueron capaces de inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER, aún en presencia de Gö 6983. Se realizó un análisis estadístico ANOVA seguido de la corrección de Dunnett donde se comparó la respuesta de las células expresando el plásmido *mock* respecto a cada condición. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

8.1 La mutante fosfomimética de Orai1 inhibió la liberación de Ca^{2+} del ER sin la participación de la PKC.

La Fig. 8.1 muestra el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el vaciamiento de Ca^{2+} luminal del ER inducido por la combinación de ATP y TG (panel A y B, respectivamente). El gráfico de barras del panel C muestra que las células que sobreexpresan Orai1 nativo tienen una respuesta mayor en el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (966 ± 80 nM) que las células control (640 ± 65 nM). Sin embargo, la mutante fosfomimética O1-DD mostró un transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ similar a las células control y esta respuesta no fue significativamente modificada por preincubar a las células con Gö 6983, el cual es un inhibidor generalizado de PKC (Young, Balin, and Weis 2005) que tiene como blanco, tanto cinasas dependientes de Ca^{2+} (PKCs clásicas) como PKCs nuevas que se activan por DAG (676 ± 114 nM y 831 ± 128 nM, incremento promedio del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de células transfectadas con O1-DD u O1-DD y preincubadas con Gö 6983, respectivamente).

En concordancia con nuestras observaciones previas, la respuesta en la liberación de Ca^{2+} del ER de las células que sobreexpresan O1-wt y O1-DD fue inhibida respecto a las células control (Fig. 8.1 D) (Martínez-Martínez 2016). Con el propósito de evaluar la funcionalidad de O1-DD como una proteína que mimetiza un canal Orai1 permanentemente fosforilado, las células fueron transfectadas con O1-DD e incubadas con Gö 6983 (10 min). En el gráfico de barras se muestra que O1-DD es capaz de inhibir la liberación de Ca^{2+} sin la participación de PKC ($-0.11 \pm 0.01 \Delta F/F_0$, $-0.02 \pm 0.01 \Delta F/F_0$, $-0.04 \pm 0.02 \Delta F/F_0$ y $-0.02 \pm 0.03 \Delta F/F_0$, liberación de Ca^{2+} del ER de células transfectadas con el plásmido *mock*, O1-wt, O1-DD preincubadas con DMSO y O1-DD preincubadas con Gö 6983, respectivamente).

Estos experimentos en conjunto sugieren que las S27/S30 tienen un papel en la regulación de los flujos de Ca^{2+} , posiblemente modulando la entrada de Ca^{2+} de forma independiente de STIM1, así como inhibiendo la liberación de Ca^{2+} del ER. Con base en estos datos, continuamos estudiando si esta inhibición pudiese estar ocurriendo a través de Orai1 endógeno.

8.2 La inhibición de la actividad de PKC facilitó el vaciamiento de Ca^{2+} del ER en células HeLa.

Basándonos en el efecto inhibitorio de la liberación de Ca^{2+} del ER provocado por la mutante fosfomimética de Orai1, exploramos la posibilidad de que Orai1 endógeno también pudiera inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER mediante el uso del inhibidor generalizado de PKC, Gö 6983 (Young et al. 2005). Para este propósito, las células se incubaron durante 2 h con Gö 6983 y se evaluó si la inhibición de la PKC, y por consiguiente de la fosforilación de Orai1, pudiera inducir una mayor liberación de Ca^{2+} del ER.

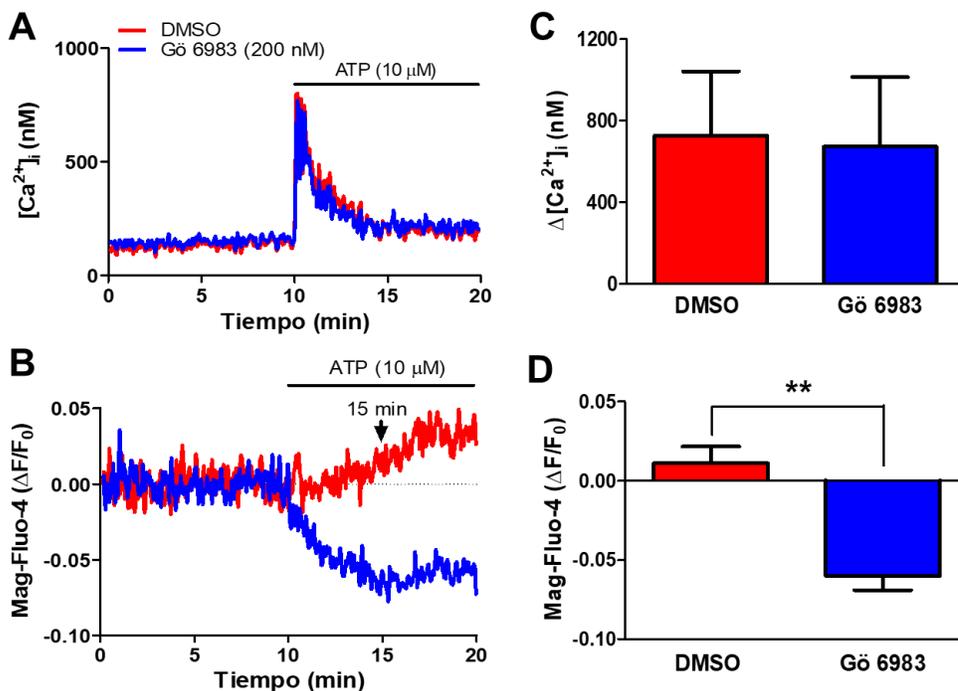


Fig. 8.2. Gö 6983 favorece la liberación de Ca^{2+} del ER inducido por el ATP. (A) Registro de la liberación de Ca^{2+} intracelular y (B) registro de la respuesta promedio de la reducción en el nivel de Ca^{2+} del ER. Las células se incubaron por 2 h con el inhibidor de PKC, Gö 6983 (200 nM) y después fueron estimuladas con ATP (10 μM). (C) El gráfico muestra el incremento promedio del transitorio de Ca^{2+} citoplásmico del panel (A). (D) La respuesta promedio mostró una mayor liberación de Ca^{2+} del ER cuando las células fueron incubadas con Gö 6983. Se realizó un análisis estadístico *t*-test donde se comparó la respuesta de las células incubadas con Gö 6983 respecto a las células incubadas con DMSO (0.1 %). Se realizaron 3 experimentos independientes. **, $p < 0.01$.

En la Fig. 8.2 B se puede observar que las células estimuladas únicamente con ATP en un medio suplementado con Ca^{2+} muestran un incremento en la señal del Mag-Fluo-4, sugiriendo que el ATP está induciendo un fuerte relleno de Ca^{2+} del ER o de algún otro compartimento, obscureciendo el vaciamiento de Ca^{2+} del ER cuando se estimula a las células únicamente con agonista. Este efecto lo hemos

explicado como un mecanismo compensatorio de la bomba SERCA. Es decir, cuando se induce el vaciamiento del ER con ATP, se activa SOCE (Abdullaev et al. 2008; Dickson et al. 2012; Zheng et al. 2018), produciendo un incremento en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y el posterior relleno con Ca^{2+} del ER, por la acción de la bomba SERCA (Guerrero-Hernandez et al. 2010; Perez-Rosas et al. 2015). La entrada de Ca^{2+} al ER acompañada de la inactivación del IP₃R por Ca^{2+} , produciría un aumento en la señal del Mag-Fluo-4 en el lumen del ER (trazo rojo).

Sin embargo, cuando las células se incubaron con Gö 6983, observamos una reducción sustancial del Ca^{2+} en el ER en comparación con las células que fueron transfectadas con el plásmido *mock* ($0.01 \pm 0.01 \Delta F/F_0$ y $-0.06 \pm 0.01 \Delta F/F_0$, reducción del Ca^{2+} del ER de células incubadas con el vehículo DMSO (0.1 %) y células incubadas con Gö 6983, respectivamente). En nuestras condiciones experimentales no observamos ninguna diferencia en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ entre las células control y las células incubadas con Gö 6983 (Fig. 8.2 C). La respuesta de la liberación de Ca^{2+} sugiere que Orai1 endógeno a través de la actividad de PKC podría estar inhibiendo la liberación de Ca^{2+} , pero habría también otros factores que podrían estar regulando el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$.

8.3 La activación de la PKC redujo la liberación de Ca^{2+} del ER e incrementó la entrada de Ca^{2+} operada por depósito

Con el objetivo de estudiar la participación de PKC en la regulación de los flujos de Ca^{2+} , se utilizó otro enfoque experimental empleando un activador de esta cinasa. El 12,13-dibutirato de forbol (PDBu, por sus siglas en inglés) es una molécula que activa a las PKCs debido a que mimetiza al DAG (Chiu et al. 1988), lo que permite que se activen tanto PKCs nuevas como PKCs dependientes de Ca^{2+} , el PDBu a diferencia del DAG no se degrada (Kolczynska et al. 2020), lo que permite que las PKCs permanezcan activas por más tiempo.

Como se puede observar en la Fig. 8.3 A, las células incubadas con PDBu, mostraron un transitorio de Ca^{2+} inducido por ATP y TG ligeramente disminuido sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa (Fig. 8.3 C). De manera inesperada, la entrada de Ca^{2+} incrementó de 503 ± 98 nM a 893 ± 173 nM cuando

las células estuvieron en presencia de PDBu (200 nM). Con respecto a la respuesta en la liberación de Ca^{2+} del ER, aunque ésta mostró una tendencia a ser más lenta no fue estadísticamente diferente, por lo que proponemos que las PKCs participan en la regulación de la entrada de Ca^{2+} de una forma independiente de los canales Orai1. Por otra parte, para inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER es importante la participación del Ca^{2+} , debido a que en un medio sin este ion la inhibición es lenta, aún con las PKCs activadas por PDBu.

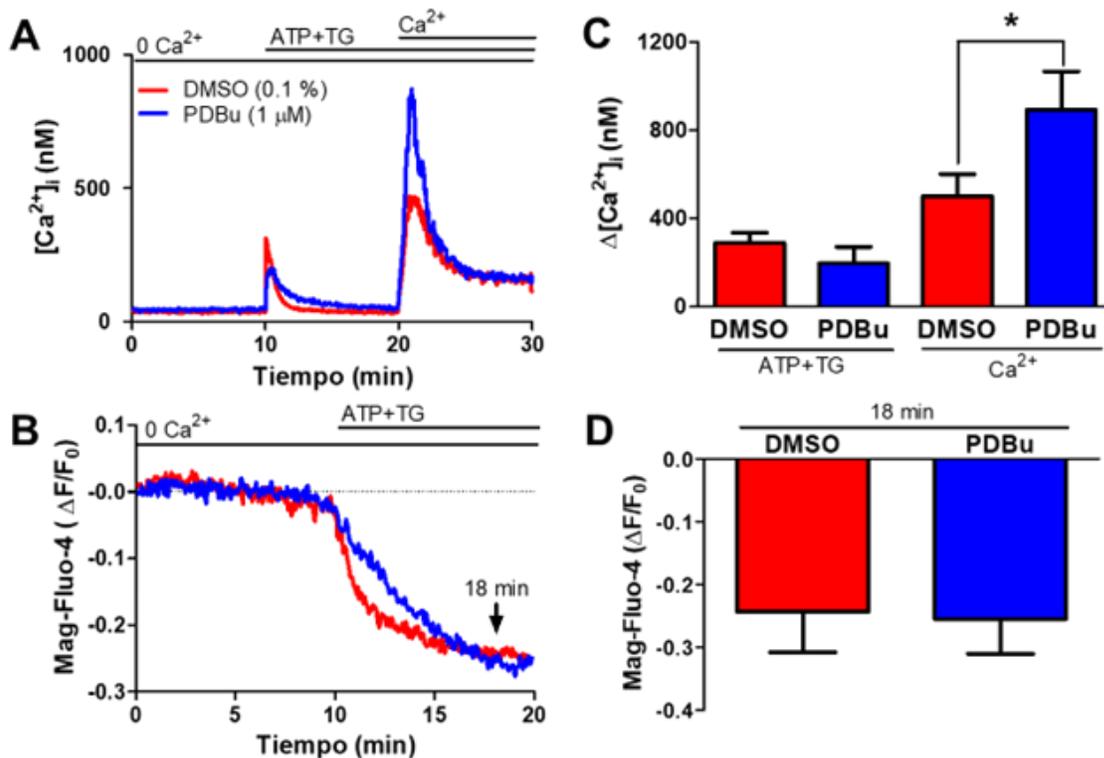


Fig. 8.3. El PDBu incrementa la entrada de Ca^{2+} inducida por ATP y TG. Las células fueron incubadas durante 10 min con PDBu (200 nM) o con DMSO y se estimularon con ATP (10 μM) y TG (1 μM). El panel (A) muestra el registro promedio del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ATP y TG y la entrada de Ca^{2+} inducida por la adición de este ion al medio. (B) Los trazos representan las respuestas promedio de la liberación de Ca^{2+} del ER estimulada por ATP y TG. (C) El gráfico representa la respuesta promedio del transitorio de Ca^{2+} citoplásmico, ya sea estimulado por ATP o por la adición de Ca^{2+} al medio extracelular. Las células que fueron incubadas con PDBu mostraron un incremento en la entrada de Ca^{2+} . (D) La respuesta promedio mostró que incubarlo con PDBu no cambió la liberación de Ca^{2+} del ER estimulada por ATP y TG. Se realizó un análisis estadístico *t*-test donde se comparó la respuesta de las células incubadas con PDBu respecto a las células control (incubadas con 0.1 % de DMSO). Se realizaron 4 experimentos independientes. *, $p < 0.05$.

La Fig. 8.4 muestra que las células incubadas durante 10 min con PDBu tuvieron una respuesta a ATP fuertemente suprimida (de 105 ± 12 nM a 20 ± 2 nM en células incubadas con DMSO y PDBu, respectivamente), sin alterar la entrada de Ca^{2+} cuando este ion fue adicionado al medio extracelular (Fig. 8.4, panel A y B), está entrada sostenida podría ser un nuevo estado estacionario de Ca^{2+} debido a que en estas condiciones la bomba SERCA no fue inhibida por TG como en la Fig. 8.3. La reducción del Ca^{2+} del ER no mostró diferencias estadísticamente significativas. Estos datos sugieren que la activación de las PKCs suprime la liberación de Ca^{2+} vía el IP_3R , probablemente por bloquear la actividad de este receptor, sin que la entrada de Ca^{2+} haya sido modificada.

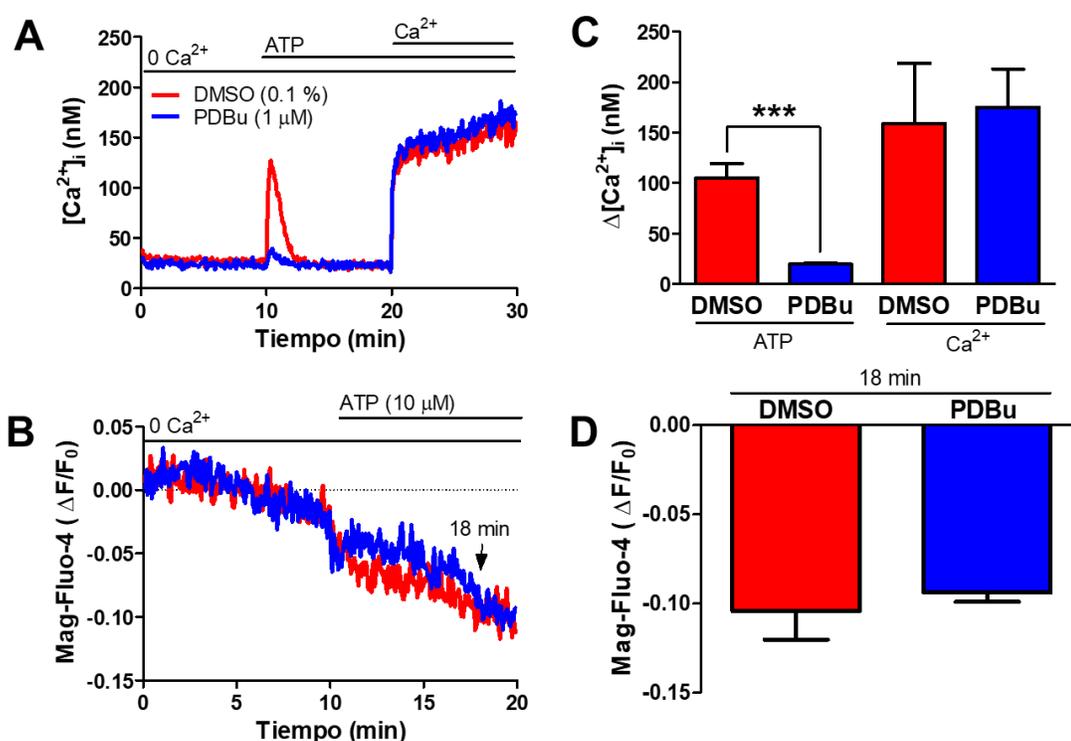


Fig. 8.4. El éster de forbol PDBu inhibe la liberación de Ca^{2+} inducida por ATP. Las células fueron incubadas durante 10 min con el activador de las PKCs, PDBu, o con DMSO y se estimularon con ATP (10 μM). El panel (A) muestra el registro promedio de la liberación de Ca^{2+} en el citoplasma y el panel (B) muestra el registro promedio de la liberación de Ca^{2+} del ER inducida por ATP. (C) El gráfico representa la respuesta promedio del transitorio de Ca^{2+} citoplásmico; ya sea estimulado por ATP o por la adición de Ca^{2+} al medio extracelular. Las células que fueron incubadas con PDBu mostraron una fuerte inhibición de la liberación de Ca^{2+} del ER estimulada por ATP. (D) La respuesta promedio mostró que incubar a las células con PDBu no cambió la liberación de Ca^{2+} del ER. Se realizó un análisis estadístico *t*-test donde se comparó la respuesta de las células incubadas con PDBu respecto a las células control (incubadas con 0.1 % de DMSO). Se realizaron 4 experimentos independientes para cada condición. ***, $p < 0.001$.

8.4 La proteína fosfomimética redujo la liberación de Ca^{2+} estimulada por ATP y TG en ausencia de Ca^{2+}

Con base en las observaciones anteriores, decidimos evaluar si la mutante fosfomimética de Orai1 podría reproducir los hallazgos obtenidos con el activador de la PKC (PDBu). En la Fig. 8.5 A se puede observar que el transitorio inducido por ATP y TG disminuyó en las células transfectadas con O1-DD, en comparación con la respuesta de las células *mock* (transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 195 ± 18 nM a 140 ± 9 nM para las células *mock* y las células sobreexpresando O1-DD, respectivamente).

La respuesta de SOCE fue reducida al sobreexpresar a Orai1 respecto a las células *mock* (transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 303 ± 33 nM a 153 ± 21 nM), ya que como se ha reportado, la relación estequiométrica que existe entre Orai1 y STIM1 es 1:2; por esta razón, se ha propuesto que al sobreexpresar únicamente Orai1, las proteínas STIM1 endógenas sufren un proceso de dilución debido a que no son suficientes para poder abrir todos los canales, provocando una reducción en SOCE (Prakriya et al. 2006; Soboloff et al. 2006). La liberación de Ca^{2+} no se vio modificada por O1-DD en experimentos sin Ca^{2+} extracelular, lo que corrobora que este ion tiene un papel central en la inhibición que hemos observado al sobreexpresar Orai1.

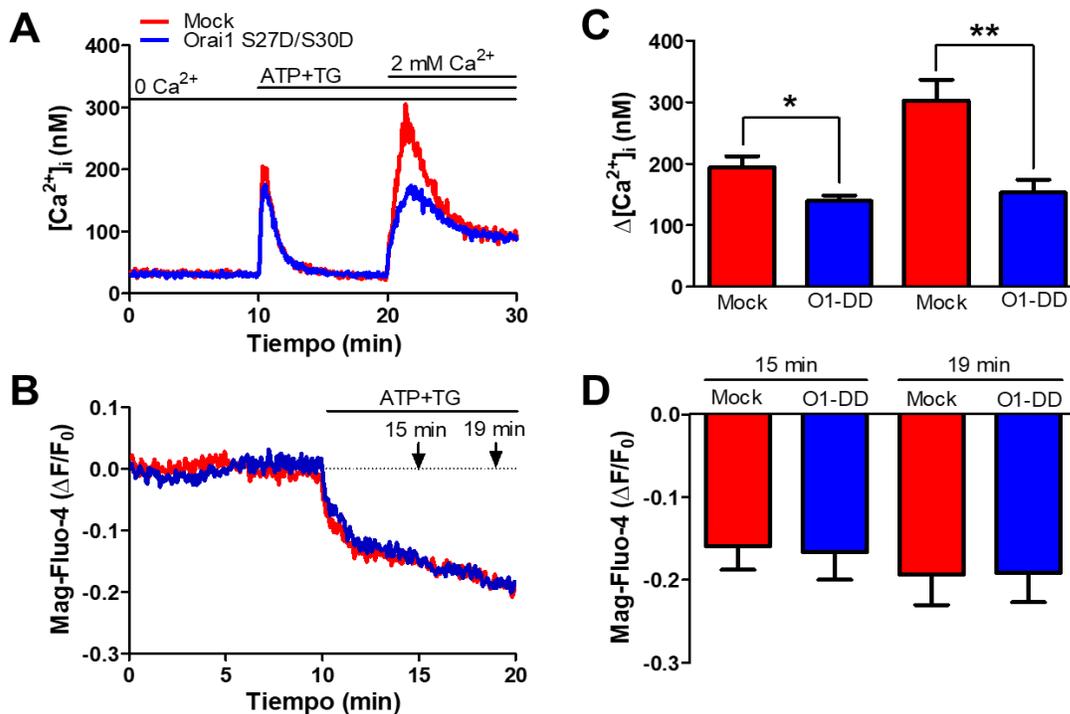


Fig. 8.5. La mutante Orai1 S27D/S30D (O1-DD) inhibió la liberación de Ca²⁺ del ER, así como en transitorio de [Ca²⁺]_i. El panel (A) muestra el registro promedio del transitorio de Ca²⁺ en el citoplasma estimulada por ATP y TG o por la adición de Ca²⁺ al medio extracelular y el panel (B) muestra el registro promedio de la liberación de Ca²⁺ del ER tanto en células transfectadas transitoriamente con O1-DD como las células transfectadas con el plásmido *mock*. (C) El gráfico representa la respuesta promedio del transitorio de [Ca²⁺]_i, ya sea estimulado por ATP y TG o por la adición de Ca²⁺ al medio extracelular. Las células que fueron transfectadas con O1-DD mostraron una menor liberación de Ca²⁺ estimulada por ATP y TG y una menor respuesta de SOCE cuando se adicionó Ca²⁺ al medio extracelular. (D) La respuesta promedio del ER no mostró diferencias estadísticamente significativas a los 15 y 19 min. Se realizó un análisis estadístico *t*-test donde se comparó la respuesta de las células transfectadas con O1-DD respecto a las células control. Se realizaron 3 experimentos independientes. *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01.

8.5 La mutante fosfomimética (Orai1 S27D/S30D) no modificó la sensibilidad del IP₃R por el IP₃.

Con la intención de estudiar el mecanismo por el cual Orai1 fosforilado inhibe la liberación de Ca²⁺ del ER, llevamos a cabo experimentos de liberación de Ca²⁺ en células permeabilizadas, de acuerdo a un protocolo ya descrito (Laude et al. 2005). Brevemente, el ensayo consiste en sustituir la solución externa por una solución tipo medio citosólico (CLM, por sus siglas en inglés) sin Ca²⁺ y permeabilizar a las células con 16.3 μM digitonina, el cual es un detergente que se asocia preferentemente al colesterol de la membrana plasmática (Paila et al. 2005). Una vez que las células han sido permeabilizadas, se procedió a colocarlas en una CLM suplementada con 200 nM de Ca²⁺ y se indujo el relleno de los depósitos de Ca²⁺ adicionando ATP, señal que se empleó para normalizar el Mag-Fluo-4.

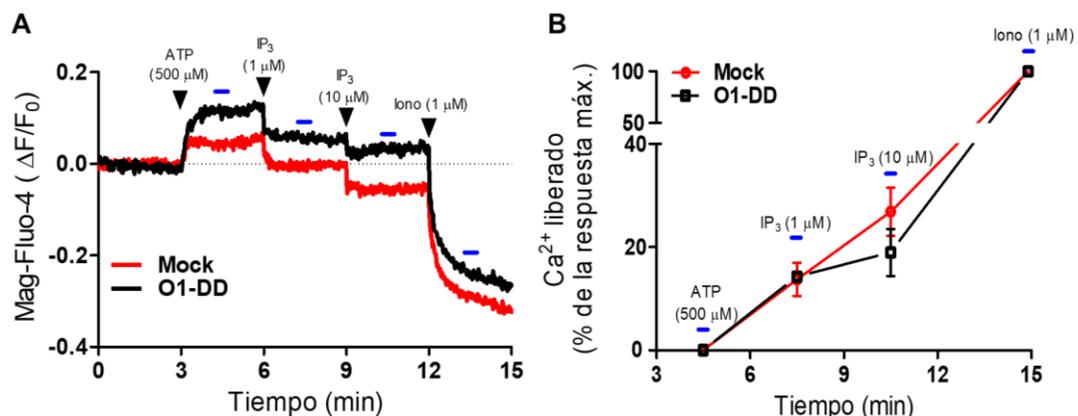


Fig. 8.6. La mutante O1-DD no cambió la sensibilidad del IP₃R por IP₃. (A) Registro promedio de la liberación de Ca²⁺ del ER en células control y células transfectadas con el plásmido de O1-DD. (B) La señal se normalizó respecto a ATP y se consideró como valor máximo la señal registrada al vaciar los depósitos de Ca²⁺ con ionomicina. Las regiones elegidas para el análisis estadístico están indicadas con una línea azul. La liberación de Ca²⁺ del ER no mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se estimuló a las células con concentraciones de IP₃ 1 μM y 10 μM, entre las células que fueron transfectadas con la mutante O1-DD y las células *mock*. Se realizó una medición, indicada por la línea azul, de cada experimento independiente, n = 4.

En este ensayo se utilizaron dos concentraciones de IP₃, 1 μM y 10 μM. La señal de fluorescencia después del ATP se consideró la señal de mínimo vaciamiento y la señal de fluorescencia después de agregar ionomicina se consideró el máximo vaciamiento de los depósitos intracelulares (Fasolato et al. 1991). La mutante O1-DD mostró una mayor captura de Ca²⁺ cuando se activó a la bomba SERCA con ATP, este efecto podría ser explicado debido a una reducción, mediada por O1-DD, de la fuga espontánea de Ca²⁺ que ocurre a través del IP₃R. Este nuevo estado estacionario provocaría que las células que expresan la mutante O1-DD muestren una tendencia a liberar menos Ca²⁺.

Estos datos sugieren que Orai1 fosforilado no cambia de forma importante la sensibilidad del IP₃R por el IP₃ y además esto podría explicar que en nuestras condiciones experimentales observamos transitorios de [Ca²⁺]_i de amplitud similar entre las células *mock* y las células expresando O1-DD (Fig. 8.5). En conjunto se plantea la posibilidad de estudiar si las modificaciones postraduccionales de los aminoácidos S27/S30 tienen alguna implicación en la interacción ya descrita entre Orai1 y el IP₃R (Hong et al. 2011; Lur et al. 2011; Woodard et al. 2010).

8.6 El ATP y la TG en un medio con Ca²⁺ favorecieron la señal de FRET entre YFP-IP₃R y mCherry-O1-wt en células HEK-293T.

De las diferentes metodologías disponibles para estudiar la interacción proteína-proteína entre el IP₃R1 y Orai1, se optó por FRET y se estableció una colaboración con el Dr. Luis Vaca (Instituto de Fisiología Celular – UNAM). Se utilizó la técnica de FRET, en la modalidad de fotoblanqueo del receptor, y se evaluó la interacción entre las construcciones YFP-IP₃R1 y mCherry-Orai1. Debido al bajo rendimiento de expresión en células HeLa, se utilizaron las células HEK-293T para realizar estos experimentos, ya que en esta línea celular se favorece la expresión de proteínas de alto peso molecular como el IP₃R1 (Chong et al. 2021; Ooi et al. 2016; Sampieri et al. 2018).

Las condiciones que se estudiaron fueron cuatro: interacción entre YFP-IP₃R1 y mCherry-O1 wt en presencia de Ca²⁺ en condiciones basales o estimuladas con ATP y TG, así como en un medio sin Ca²⁺ en reposo o estimuladas con ATP y TG. La Fig. 8.7 panel A muestra un trazo representativo de los experimentos FRET que se realizaron con cada condición. El fotoblanqueo se indujo por exponer la región de interés directamente al láser del microscopio durante 12 s a una longitud de onda de 580 nm para excitar a la proteína mCherry. El gráfico de barras (Fig. 8.7 B) muestra una mayor señal FRET únicamente cuando las células fueron estimuladas con ATP y TG en presencia de Ca²⁺, sugiriendo que Orai1 y el IP₃R1 podrían estar interaccionando directa o indirectamente a través de otra proteína. Estos datos también corroboraron la importancia del Ca²⁺, ya que en un medio sin Ca²⁺ las células no mostraron una mayor señal de FRET al ser estimuladas con el agonista ATP y la TG.

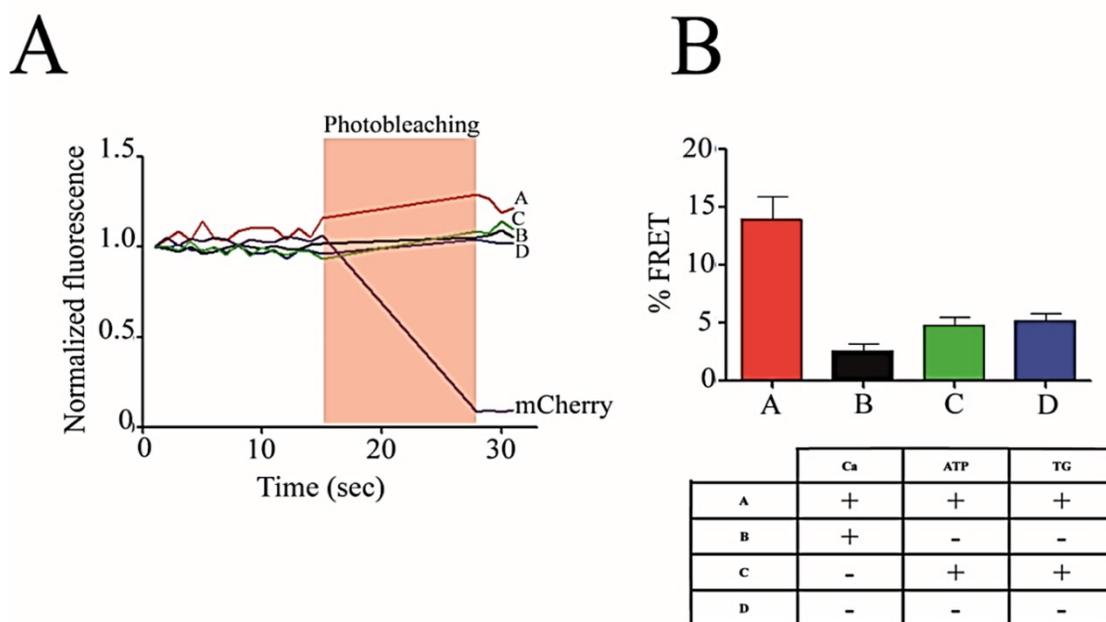


Fig. 8.7. En células HEK-293T incrementó la señal de FRET entre Orai1 y el IP₃R1 al estimular a las células con ATP y TG en un medio con Ca²⁺. **(A)** Las células fueron transfectadas con YFP-IP₃R y con mCherry-O1 wt durante 48 h y se detectó la señal de FRET entre estas dos construcciones en condiciones de reposo o estimuladas con ATP (10 μM) y TG (1 μM) en ausencia o presencia de Ca²⁺. **(B)** Las barras muestran la señal de FRET (%) que mostró cada condición del panel A. Las células estimuladas con ATP y TG en un medio suplementado con Ca²⁺ mostraron una mayor señal FRET. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

8.7 La colocalización del canal Orai1 y el IP₃R1 incrementó en células expresando la mutante que mimetiza un canal permanentemente fosforilado.

Los datos de FRET sugirieron que Orai1 y el IP₃R1 podrían estar interaccionando en células HEK-293T, por lo que, en colaboración con el M. en C. Víctor H. Sánchez Vázquez, se evaluó la colocalización entre estas dos proteínas en la misma línea celular. Las células HEK-293T transfectadas con las construcciones YFP-IP₃R1 y mCherry-O1, se visualizaron mediante microscopía confocal para determinar la colocalización mediante el coeficiente de Manders (Manders, Verbeek, and Aten 1993). La Fig. 8.8 muestra que las células que fueron transfectadas con la mutante fosfomimética mCherry-O1 DD incrementaron su colocalización con YFP-IP₃R y que esta relación se mantenía al comparar el nivel de colocalización de mCherry-O1 DD respecto a YFP-IP₃R1 o el nivel de colocalización de YFP-IP₃R1 respecto a mCherry-O1 DD.

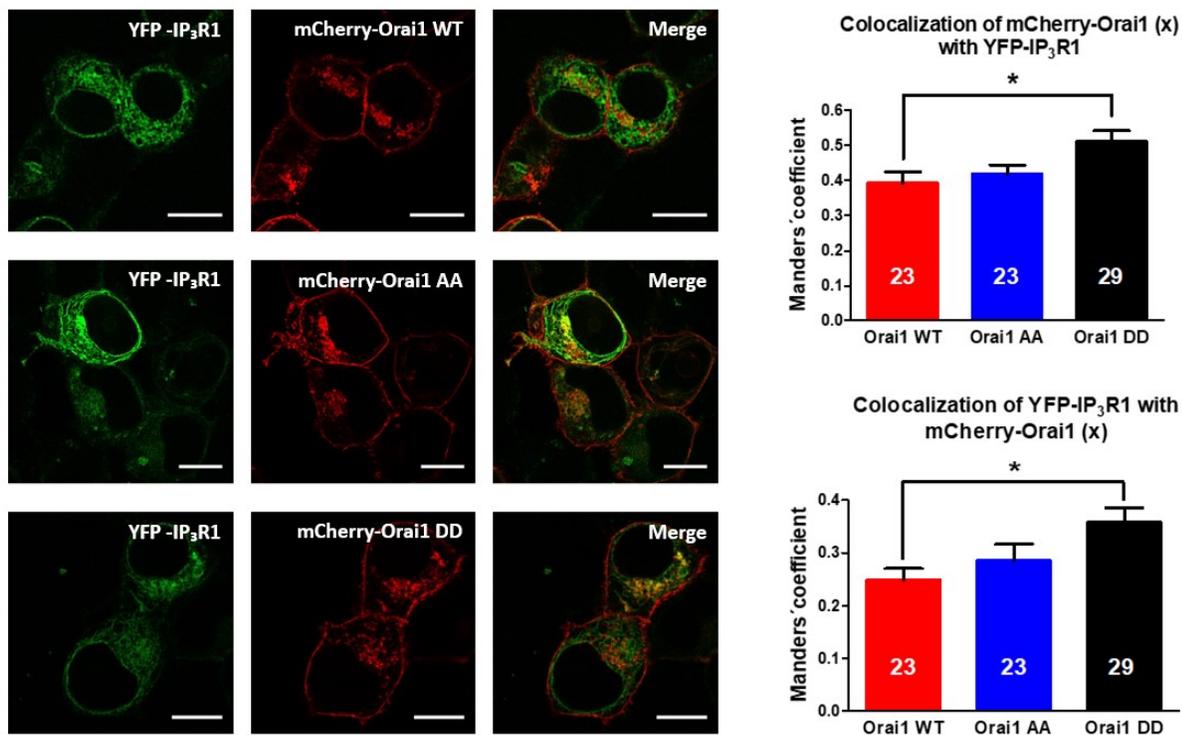


Fig. 8.8. La colocalización entre el YFP-IP₃R y mCherry-O1 incrementó en células que mimetizan un canal permanentemente fosforilado. Las células fueron cotransfectadas con YFP-IP₃R y con mCherry-O1-wt o las mutantes mCherry-O1-AA o mCherry-O1-DD durante 48 h y se determinó la colocalización de estas proteínas mediante el coeficiente de Manders. El gráfico de barras superior muestra que en las células transfectadas con la mutante mCherry-O1-DD incrementó la colocalización entre Orai1 y el IP₃R1 de $39 \pm 3 \%$ al $51 \pm 3 \%$. La colocalización de YFP-IP₃R1 respecto a mCherry-O1-DD incrementó de $25 \pm 2 \%$ a $36 \pm 3 \%$. La barra blanca representa 10 μm . Se analizaron al menos 19 células de 3 experimentos independientes. *, $p < 0.05$.

Es importante mencionar que no se esperaba que la mutante mCherry-O1 AA mostrara una mayor colocalización con el YFP-IP₃R1 que la que muestra mCherry-O1 con el YFP-IP₃R1, sin embargo, esto podría ser explicado por el constante tráfico vesicular de la proteína Orai1 (Yu, Sun, and Machaca 2009; Yu et al. 2010). Este experimento sugiere que tanto O1-wt como O1-AA se encuentran mayoritariamente en la membrana plasmática. No obstante, hay una fracción que normalmente está internalizada, que pudiera o no estar interaccionando con el IP₃R, lo que podría indicar que esta fracción del IP₃R no es suficiente para modificar la liberación de Ca²⁺ del ER y se necesitar un canal Orai1 fosforilado para observar modificaciones en los flujos de Ca²⁺.

Interesantemente, aunque la mutante mCherry-O1-DD muestra una importante fracción internalizada, este canal también muestra distribución en la membrana plasmática, sugiriendo que los residuos S27/S30 no estarían cambiando las funciones de Orai1 como un canal selectivo para Ca²⁺, pero sí podría estar modificando la localización de esta proteína y por lo tanto su posibilidad de interaccionar con el IP₃R. Modificar la localización de Orai1 facilitaría la interacción de este canal que reside en la membrana plasmática con el IP₃R que reside en la membrana del ER. Una interacción basal entre Orai1 y el IP₃R podría modificar la actividad espontánea del IP₃R e incluso ocasionar una reducción en la liberación de Ca²⁺ del ER.

8.8 La mutante O1-DD inhibió la liberación de Ca²⁺ del ER inducida por ATP.

Con el objetivo de estudiar si O1-DD estuviese interaccionando con el IP₃R en condiciones basales, se realizaron registros de Ca²⁺ en un medio suplementado con 1.8 mM de Ca²⁺ en alto K⁺, con el objetivo de reducir el gradiente electroquímico para la entrada de Ca²⁺ y así poder evaluar únicamente la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares. Las células fueron transfectadas por 24 h con el plásmido *mock*, O1-wt, O1-AA y O1-DD, y se estimularon únicamente con ATP. La Fig. 8.9 muestra los registros de Ca²⁺ obtenidos con estas condiciones empleando 3 vehículos de transfección diferentes; las células del panel A muestra la respuesta de las células transfectadas con lipofectamina 2000, el panel B muestra la respuesta de las células transfectadas con lipofectamina 3000 y el panel C se empleó el

método de transfección de fosfato de Ca^{2+} (Graham and van der Eb 1973). Con este experimento concluimos que la mutante fosfomimética puede interactuar con el IP_3R de forma basal, ocasionando una reducción en la liberación de Ca^{2+} . Las diferencias en la inhibición podrían deberse a las distintas eficiencias de transfección de cada uno de los vehículos, aunque, en este trabajo no se evaluó el nivel de expresión de la proteína O1-DD.

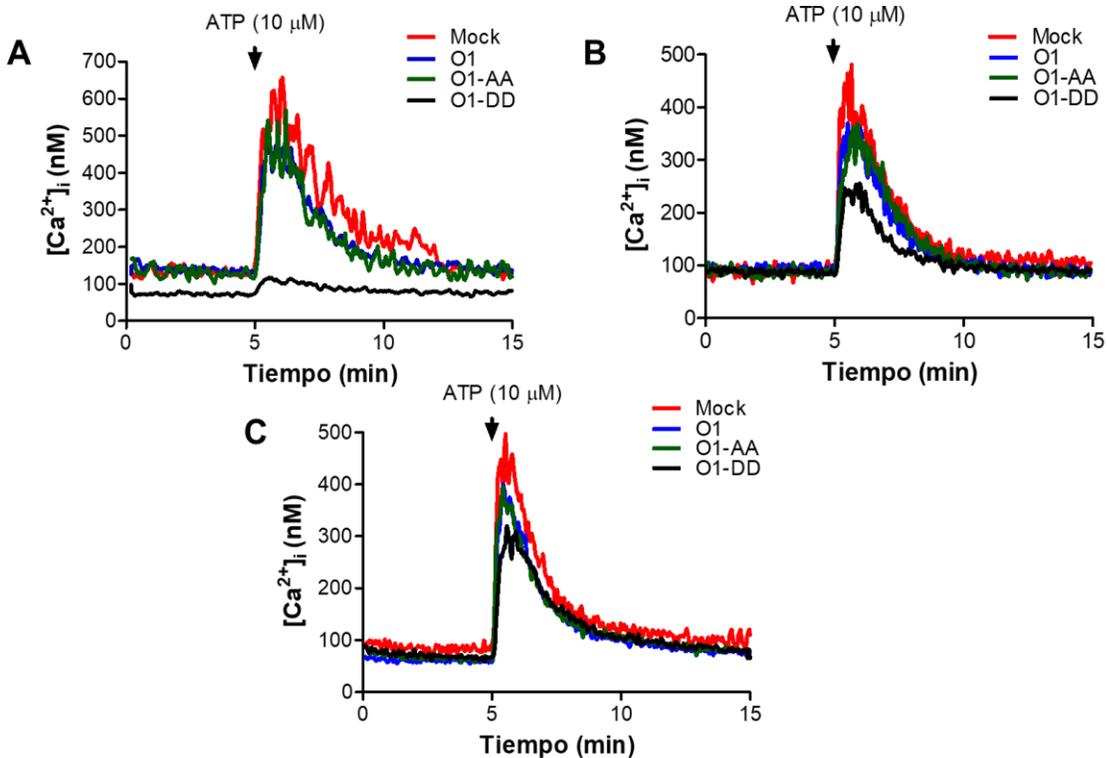


Fig. 8.9. La liberación de Ca^{2+} del ER es inhibida por O1-DD. Las células fueron transfectadas con el plásmido control, O1-wt, O1-AA y O1-DD empleando diferentes vehículos de transfección; en el panel (A) se empleó lipofectamina 2000, en el panel (B) se empleó lipofectamina 3000 y en el panel (C) se empleó el método de transfección de fosfato de Ca^{2+} . Todos los vehículos de transfección mostraron que O1-DD inhibe la liberación de Ca^{2+} del ER cuando las células fueron estimuladas únicamente con ATP (10 μM).

8.9 La interacción entre el canal Orai1 y los IP₃Rs tipo 1 y tipo 2 fueron modificadas por el ATP y la TG.

Se sabe que el canal Orai1 puede interaccionar con el IP₃R en un macrocomplejo donde participan varias proteínas que regulan los flujos de Ca²⁺, como son los canales TRPC3 y las proteínas RACK y STIM1 (Woodard et al. 2010). De forma relevante en ese trabajo, la interacción entre Orai1 y el IP₃R tipo 1 y 2 incrementó por acción de los agonistas ATP o carbacol y también por la TG sugiriendo que al vaciar el ER se inducía la formación de esta asociación. Con el propósito de estudiar las implicaciones de la interacción Orai1-IP₃R en la inhibición del vaciamiento de Ca²⁺ del ER que hemos observado al sobreexpresar Orai1, establecimos una colaboración con el Dr. Juan Antonio Rosado Dionisio (Universidad de Extremadura) para estudiar la interacción entre Orai1, O1-AA u O1-DD y el IP₃R1 o el IP₃R2.

La Fig. 8.10 panel A muestra un western blot representativo de la inmunoprecipitación contra el IP₃R1 en células HeLa. Cuando se cuantificó la señal del canal Orai1, se observó un incremento en la interacción entre estas dos proteínas después de estimular a las células con ATP o con la combinación de ATP y TG. Consistentemente, la isoforma tipo 2 mostró un incremento en la interacción IP₃R2 y Orai1 cuando las células fueron estimuladas con ATP. La combinación ATP y TG mostró una tendencia a incrementar la interacción de Orai1 y el IP₃R2 que no fue estadísticamente significativa.

Una vez que se corroboró que el agonista puede modular la interacción entre el canal Orai1 y el IP₃R, las células fueron transfectadas ya sea con el canal YFP-Orai1 (Frischauf et al. 2015) o con las mutantes O1-AA y O1-DD. El gráfico de barras (Fig. 8.10 C) mostró que YFP-Orai1 se sobreexpresó 50 % con respecto a las células control. En el panel D se muestra un blot representativo de la señal que se observa únicamente cuando las células fueron transfectadas con las mutantes O1-DD y O1-AA, donde se puede notar que se detectaron una serie de bandas de 37–50 kDa que podrían reflejar a la proteína Orai1 no glicosilada o glicosilada, respectivamente (Kawasaki et al. 2010). El panel E muestra la distribución del canal

YFP-Orai1 que como se ha reportado presenta una distribución principalmente periférica. Para contrastarlo, el núcleo de las células fue teñido con DAPI.

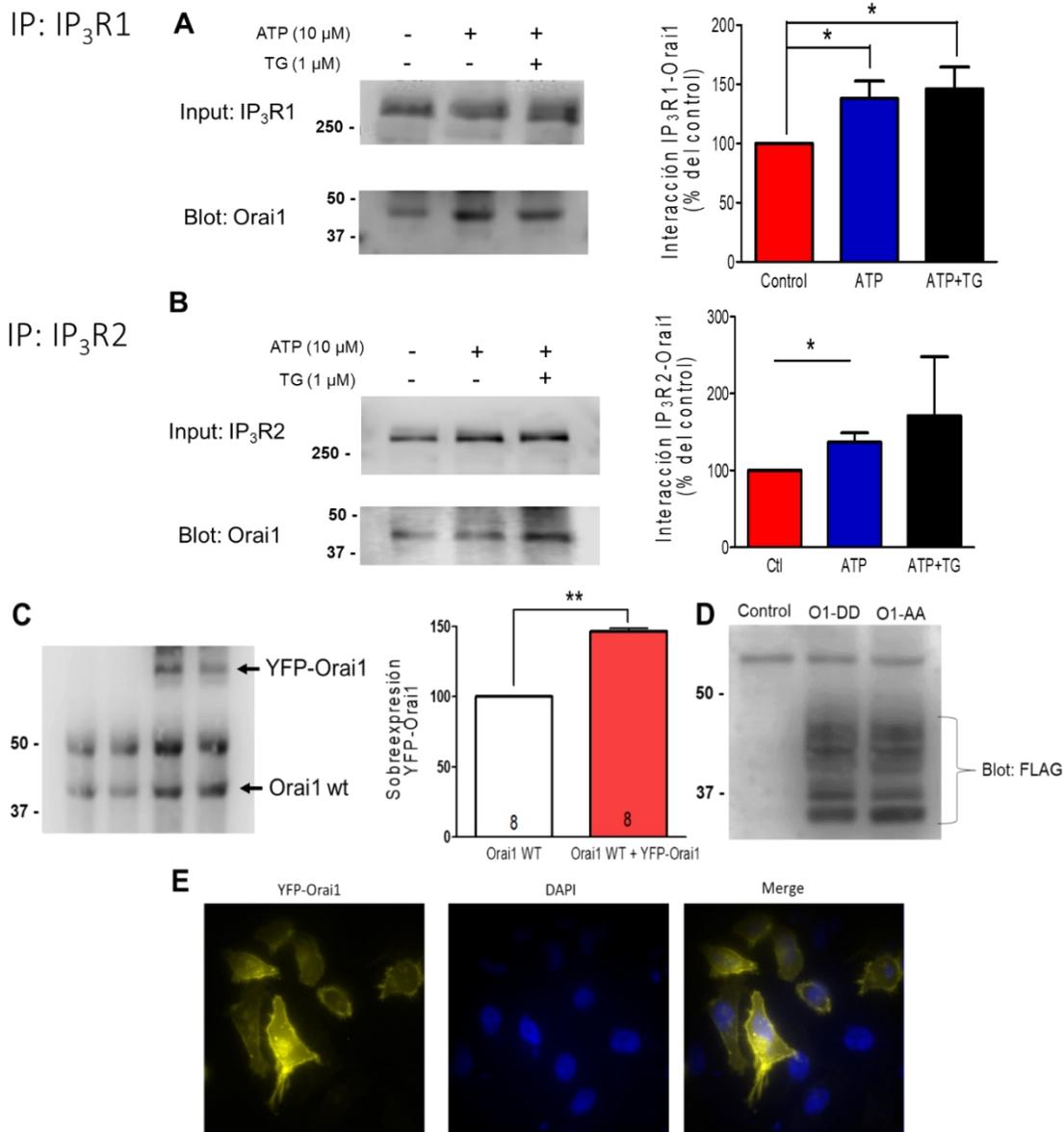


Fig. 8.10. La interacción entre el IP3R y Orai1 es regulada por el agonista ATP y la TG en un medio suplementado con Ca²⁺. (A) Blot representativo de la inmunoprecipitación del IP₃R1, el cual se utilizó como control de carga y se evaluó su interacción con el canal Orai1. El gráfico de barras muestra un incremento del 38 % en la interacción IP₃R1-Orai1 cuando las células fueron estimuladas con ATP y un incremento del 46 % cuando fueron estimuladas con la combinación ATP+TG, n = 3 experimentos independientes. (B) Blot representativo de la inmunoprecipitación del IP₃R2, el cual fue utilizado como control de carga y se estudió su interacción con el canal Orai1. El gráfico de barras mostró un incremento estadísticamente significativo cuando las células fueron estimuladas con ATP (37%), n = 3 experimentos independientes. (C) Blot representativo de la sobreexpresión del canal exógeno YFP-Orai1 y el canal Orai1 endógeno. El gráfico muestra que Orai1 se sobreexpresó 50 % respecto a las células control, n = 8 experimentos independientes. (D) Blot representativo de células que fueron transfectadas con las mutantes O1-AA y O1-DD. Únicamente las células transfectadas con las mutantes de Orai1 muestran señal con el anticuerpo anti-FLAG. (E) Imagen representativa de la expresión y distribución del canal YFP-Orai1; el núcleo fue teñido con el marcador fluorescente DAPI.

8.10 Las S27/S30 del canal Orai1 modularon la interacción de este canal con el IP₃R tipo 1 y 2.

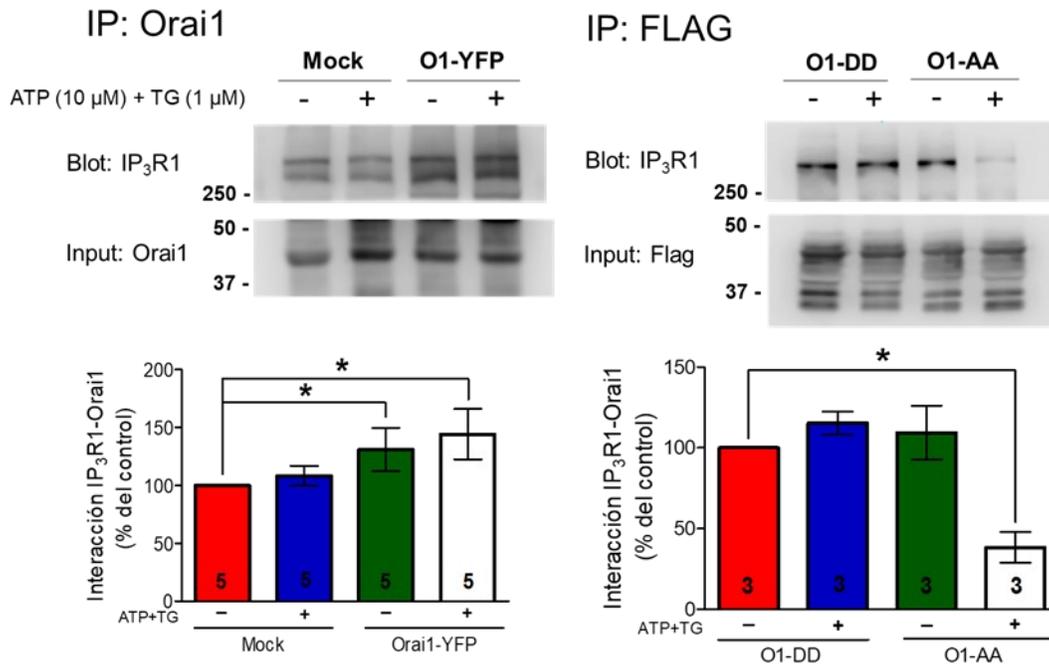


Fig. 8.11. El ATP y la TG modificaron la interacción entre O1-wt y el IP₃R1 en células HeLa. Las proteínas de células control y las células que sobreexpresaron el canal O1-wt fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-Orai1, mientras que las proteínas de las células transfectadas con las mutantes O1-AA y O1-DD fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-FLAG. En todas las condiciones se cuantificó la señal respecto al IP₃R1; los gráficos de barras muestran que la interacción IP₃R1-O1-wt incrementó cuando se sobreexpresó O1 sin que esta interacción aumentara significativamente al estimular a las células con ATP y TG. La mutante O1-AA disminuyó fuertemente su interacción con el IP₃R1 al estimular a las células con ATP y TG. El número de experimentos independientes está indicado dentro de cada barra. *, $p < 0.05$.

Woodard et al. (2010) mostraron que la interacción entre Orai1 y el IP₃R1 o entre Orai1 y el IP₃R2 se modifica en respuesta a los agonistas y también como por la TG y que este efecto es dependiente del TRPC3, sugiriendo que inducir el vaciamiento de Ca²⁺ del ER estimula la interacción entre estas dos proteínas. Además, en ese trabajo se demostró que tanto la liberación de Ca²⁺ del ER, como la entrada desde el espacio extracelular al citoplasma dependieron de la expresión del TRPC3. En este macrocomplejo participaron otras proteínas como STIM1 y RACK, lo que podría sugerir que PKC además de estar regulando negativamente la entrada de Ca²⁺ operada por depósito (Hooper et al. 2015; Kawasaki et al. 2010) también podría tener una participación relevante en este complejo proteico.

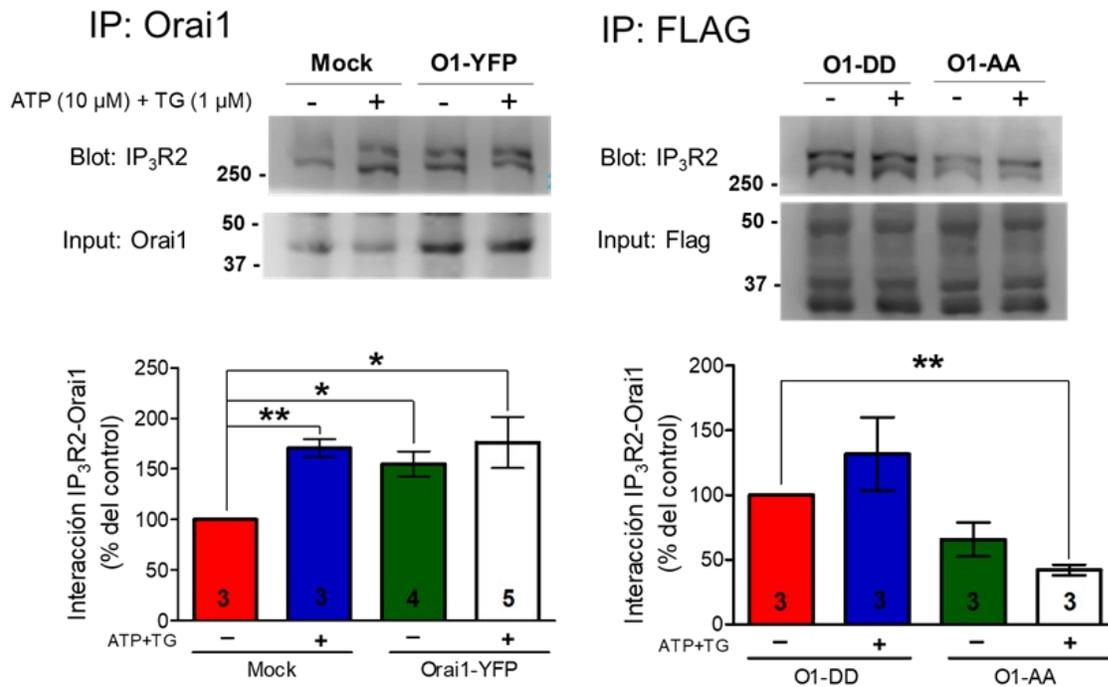


Fig. 8.12. El ATP y la TG modificaron la interacción entre el IP₃R2 y Orai1 en células HeLa. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Orai1 en células control y en las células transfectadas con O1-wt. Las células que fueron transfectadas con las mutantes O1-AA y O1-DD se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-FLAG. El anticuerpo con el que se realizó la inmunoprecipitación se utilizó como control de carga y se evaluó la señal del IP₃R2 antes y después de estimular a las células con ATP y TG. El gráfico de barras muestra que al estimular a las células con ATP y TG incrementó la interacción entre el IP₃R2-O1-wt. La sobreexpresión de O1-wt también incrementó la interacción de este canal con el IP₃R2 sin aparente modificación al estimular a las células. La mutante O1-DD no mostró diferencias estadísticamente significativas cuando las células fueron estimuladas con ATP y TG. La mutante O1-AA mostró una menor interacción con el IP₃R2, mientras que el estímulo de ATP y TG disminuyó este complejo. El número de experimentos independientes está indicado dentro de cada barra. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

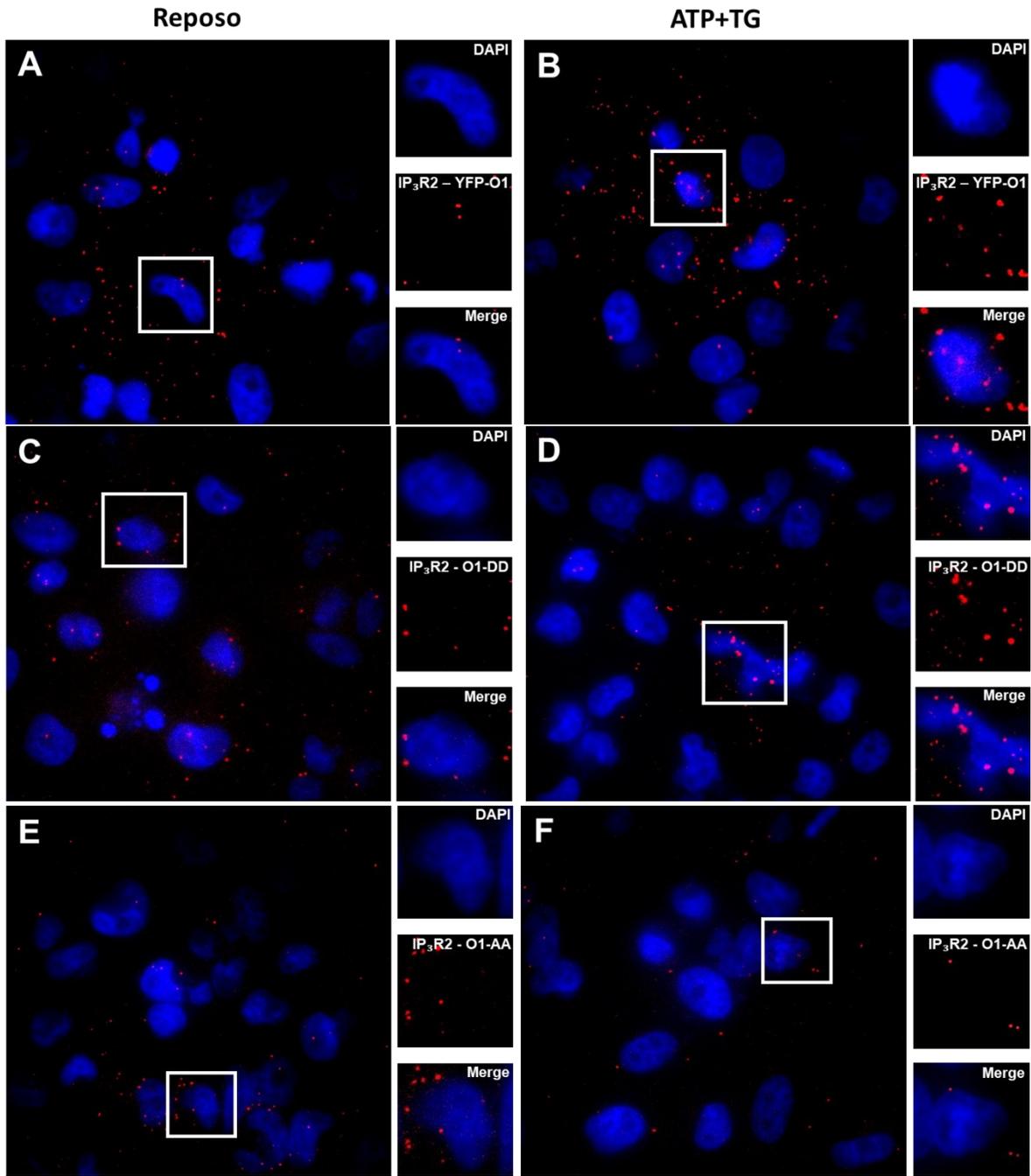
Con base en estos antecedentes se estudió la interacción del IP₃R1 y el IP₃R2 tanto con O1-wt como con las mutantes O1-AA y O1-DD. Para discernir la señal de las mutantes de Orai1, se utilizó el anticuerpo anti-FLAG que es una etiqueta de 8 aminoácidos que se repiten 3 veces, la cual se encuentra en el vector de O1-AA y O1-DD en el extremo N terminal. La Fig. 8.11 muestra un blot representativo de experimentos de inmunoprecipitación y posteriormente western blot donde se estudió si las mutaciones en los residuos de aminoácidos S27/S30 tienen implicaciones en la interacción IP₃R1 y Orai1. Como se puede observar en el gráfico de barras el IP₃R1 y O1-wt interaccionan en condiciones de reposo y aparentemente esta interacción no es modificada por el estímulo de ATP y TG; esta observación fue consistente, ya que al sobreexpresar Orai1 incrementó su interacción con el IP₃R1 más del 30 % sin que el agonista modificara esta señal, lo que sugiere que el

IP₃R1 y Orai1 son muy afines, aún en condiciones de reposo, lo que podría ocultar algún efecto adicional del estímulo.

Lo siguiente que se estudió fue el efecto de las modificaciones de los residuos de aminoácidos, S27/S30, en la interacción del IP₃R1 con O1-wt. Para esto se emplearon las mutantes O1-AA y O1-DD. Como se puede observar (Fig. 8.11), al adicionar el estímulo de ATP y TG, la mutante O1-AA disminuyó en un 60 % su interacción con el IP₃R1. Por otro lado, el incremento en la interacción que mostró la mutante O1-DD con el IP₃R1 no fue estadísticamente significativo. Estos resultados en conjunto sugirieron que la inhibición en la liberación de Ca²⁺ del ER es más compleja y podría estar involucrando a otras proteínas u otros sitios de fosforilación en Orai1.

La Fig. 8.12 muestra un blot representativo de las proteínas que fueron inmunoprecipitadas con Orai1 o con el anticuerpo anti-FLAG. En este experimento se pudo observar que al estimular a las células con ATP y TG, la interacción entre IP₃R2-O1-wt incrementó 70 %. Sin embargo, al sobreexpresar el canal Orai1, ya no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las células que se inmunoprecipitaron en estado basal y las células que fueron estimuladas con ATP y TG, aunque es importante mencionar que la sobreexpresión *per se* incrementó la interacción entre estas dos proteínas.

Las mutantes O1-DD y O1-AA mostraron un comportamiento opuesto; en el caso de la mutante O1-DD, la interacción con el IP₃R2 estaba aumentada desde las condiciones basales. De forma opuesta, la mutante O1-AA disminuyó la interacción basal con el IP₃R2 y el estímulo agudizó este efecto. Estos datos sugieren que, al igual como se observó con el IP₃R1, la inhibición que Orai1 está induciendo en la liberación de Ca²⁺ del ER podría involucrar otras proteínas u otros sitios de fosforilación en Orai1. Estas observaciones están en línea con los hallazgos reportados por Woodard et al. (2010) donde presentan un macrocomplejo, compuesto por Orai1-STIM1-TRPC3-RACK-IP₃R1, que es capaz de regular los flujos de Ca²⁺ en células HeLa y HEK-293.



G

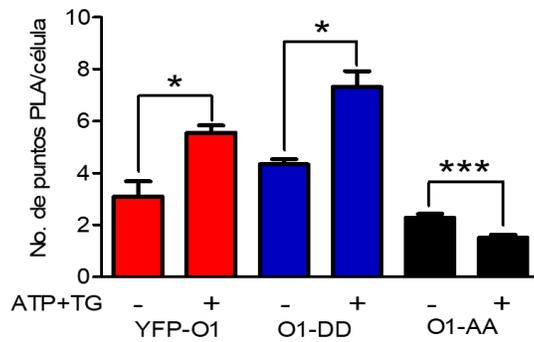


Fig. 8.13. El ATP y la TG modificaron la interacción entre el IP₃R2 y Orai1 en células HeLa. Se realizaron ensayos de PLA y se estudió la interacción entre el IP₃R2 y Orai1-wt, así como con las mutantes O1-AA y O1-DD. Las células que fueron transfectadas con YFP-O1, incrementaron su interacción con el IP₃R2 cuando fueron estimuladas con ATP (10 μM) y TG (1 μM) durante 3 min. Las células que expresaron la mutante O1-AA mostraron menor interacción con el IP₃R2 y el agonista agudizó esta disminución, mientras que las células que expresaron la mutante O1-DD mostraron una mayor interacción basal y el agonista favoreció este complejo. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes y se analizaron al menos 50 células. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

En el presente trabajo se empleó una segunda estrategia experimental para estudiar la interacción entre el IP₃R2 y Orai1 mediante la técnica de ensayos de ligación por proximidad (PLA, por sus siglas en inglés). Esta técnica permite detectar una señal fluorescente en el espectro del color rojo ($ex/em = 593\text{ nm}/622\text{ nm}$) cuando dos proteínas están a menos de 40 nm (Hegazy et al. 2020). En la Fig. 8.13 se muestran imágenes representativas de células HeLa en las que se realizaron ensayos de PLA con anticuerpos contra el IP₃R2 y contra Orai1, los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI para cuantificar el número de células en cada campo de estudio.

Como se muestra en La Fig. 8.13 A, B, la aplicación de ATP y TG, por 3 min, incrementó el número de puntos PLA del binomio IP₃R2-Orai1 en aquellas células sobreexpresando el canal Orai1 nativo. Estos datos corroboran la interacción entre el IP₃R y Orai1 y que es susceptible de ser modulada por agonistas que activan al IP₃R. En el panel C y D se muestran las señales obtenidas al sobreexpresar la mutante O1-DD. En concordancia con los experimentos de inmunoprecipitación, la mutante que mimetiza un canal Orai1 permanentemente fosforilado, O1-DD, favoreció la interacción entre el IP₃R2 y Orai1 aún en ausencia de estímulo. Por otro lado, el estímulo de ATP y la TG incrementó aún más la asociación IP₃R2-O1-DD, resultado que no era del todo esperado, puesto que implica que la fosforilación de S27/S30 no es la única condición necesaria para que se lleve a cabo esta interacción.

Las células que expresaban la mutante O1-AA (Fig. 8.13 E, F) mostraron una asociación IP₃R2-O1-AA opuesta a la mutante fosfomimética, sugiriendo que cuando estos aminoácidos no pueden ser fosforilados por PKC, la proteína Orai1 pierde afinidad por el IP₃R2. Sin embargo, el haber observado que el estímulo de

ATP y TG disminuyó aún más la interacción IP₃R2-O1-AA, se puede inferir que hay otros factores que participan en esta asociación. Todos estos datos en conjunto indican que, aunque los residuos S27/S30 de Orai1 regulan la asociación entre este canal y los IP₃R1 y P₃R2, no son suficientes para explicar todos los efectos que hemos reportado al sobreexpresar Orai1.

8.11 La fosforilación de S27/S30 modificó la localización de Orai1.

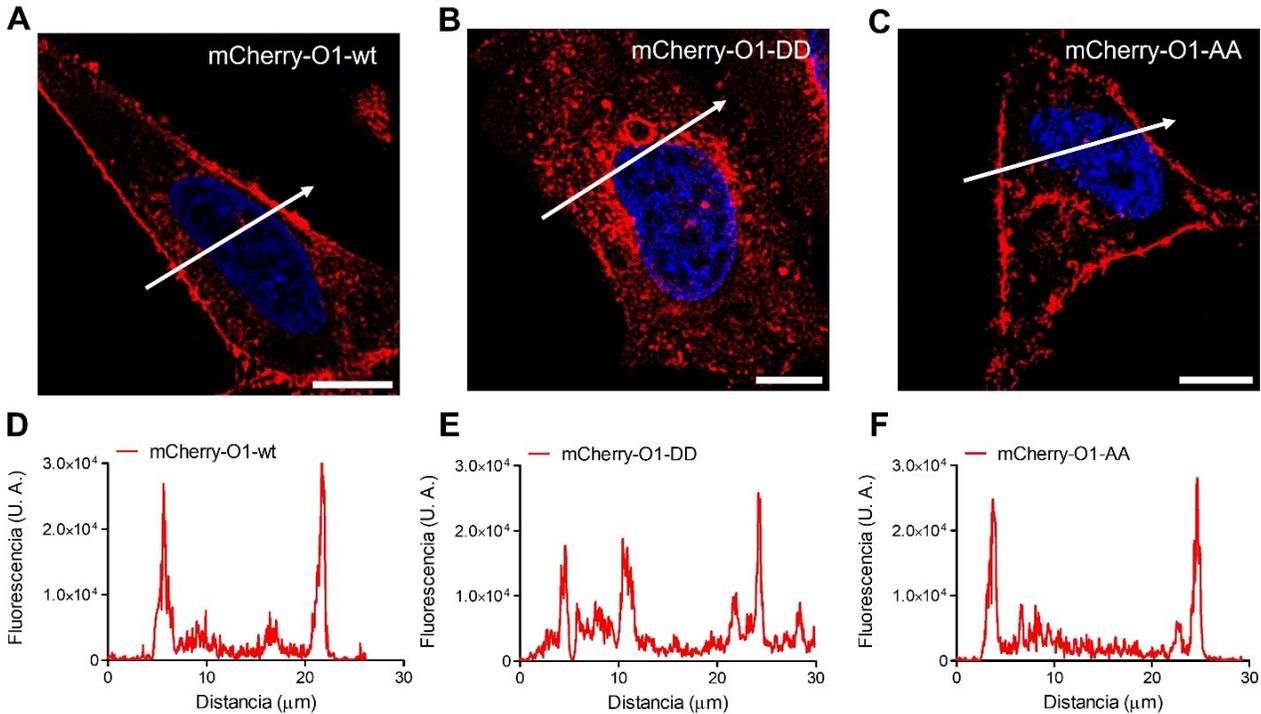


Fig. 8.14. La fosforilación de Orai1 favoreció la internalización del canal. (A-C) Imágenes de células HeLa transfectadas con los plásmidos que codifican para las proteínas mCherry-O1-wt, mCherry-O1-DD y mCherry-O1-AA, respectivamente. (D-F) Las gráficas muestran la distribución de los diferentes canales en la célula. Los perfiles de intensidad fueron obtenidos a partir de las regiones que se indican con la flecha blanca de A-C. Nótese que la mutante mCherry-O1-DD mostró una distribución más internalizada que los canales mCherry-O1-wt y mCherry-O1-AA.

Debido a que Orai1 es una proteína que preferentemente se ubica en la membrana plasmática y el IP₃R es una proteína que se ubica en la membrana del ER, se generaron ADNc para obtener proteínas fluorescentes de O1-wt y sus mutantes O1-AA y O1-DD, al fusionar en sus extremos N terminal la proteína mCherry que nos permitiera ver la localización celular de los diferentes canales de Orai1. Estas construcciones fueron transfectadas en células HeLa (Fig. 8.14), después de 24 h fueron fijadas y permeabilizadas para poder incorporar el DAPI al núcleo celular y se tomaron imágenes confocales en estado basal de los canales

(A) mCherry-O1-wt, (B) mCherry-O1-DD y (C) mCherry-O1-AA, la flecha blanca indica la región donde se realizó el perfil de intensidades que se muestra en los paneles D-F.

El perfil de intensidades de la mutante fosfomimética mCherry-O1-DD presenta un patrón de internalización mayor a los otros dos canales, sugiriendo que la fosforilación del canal Orai1 facilita la permanencia de O1-DD en el citoplasma. Contrario a este comportamiento, tanto O1-wt como O1-AA han mostrado ser canales que se encuentran mayoritariamente en la membrana plasmática. Aunque se sabe que hay una fracción de Orai1 de aproximadamente el 60 % que está participando en tráfico vesicular (Yu et al. 2010). Estos datos en conjunto sugieren que la fosforilación de los residuos S27/S30 facilitaría la internalización del canal Orai1, permitiendo así un mayor acercamiento de este canal con el IP₃R.

8.12 Los residuos de aminoácidos S27 y S30 no modificaron la colocación entre el ER-Tracker y los canales Orai1.

En colaboración con el M. en C. Víctor Hugo Sánchez Vázquez, se realizaron experimentos de colocación entre los diferentes canales Orai1 y el ER-Tracker, este último como un marcador del ER (Cole et al. 2000). En la Fig. 8.15 se muestra la distribución de los canales Orai1 en las células HeLa, del ER-Tracker y el empalme de la señal roja del canal Orai1 y la señal verde del ER-Tracker. La colocación se determinó empleando el coeficiente de Manders (Manders et al. 1993). En el gráfico de barras se puede notar que Orai1 y el ER-Tracker colocan únicamente en un 18 % y este valor no cambió significativamente entre las mutantes mCherry-O1-DD y mCherry-O1-AA.

Estos datos nos permitieron descartar que la inhibición en la liberación de Ca²⁺ del ER se deba a que el canal O1-wt o las mutantes O1-DD u O1-AA estuviesen localizadas en la membrana del ER. Con base en estos hallazgos se ha propuesto que el tráfico vesicular del canal Orai1 podría estar siendo modulado por la fosforilación de los residuos S27/S30, ya que estos aminoácidos estarían facilitando la internalización del canal Orai1, aunque esta conclusión requiere de más experimentos. Además, debido a que el agonista sigue teniendo efecto en las

mutantes O1-DD y O1-AA, las S27/S30 podrían tener un efecto negativo en la fosforilación de aminoácidos cercanos, como son las S22, S25 o S34 (ver MS3).

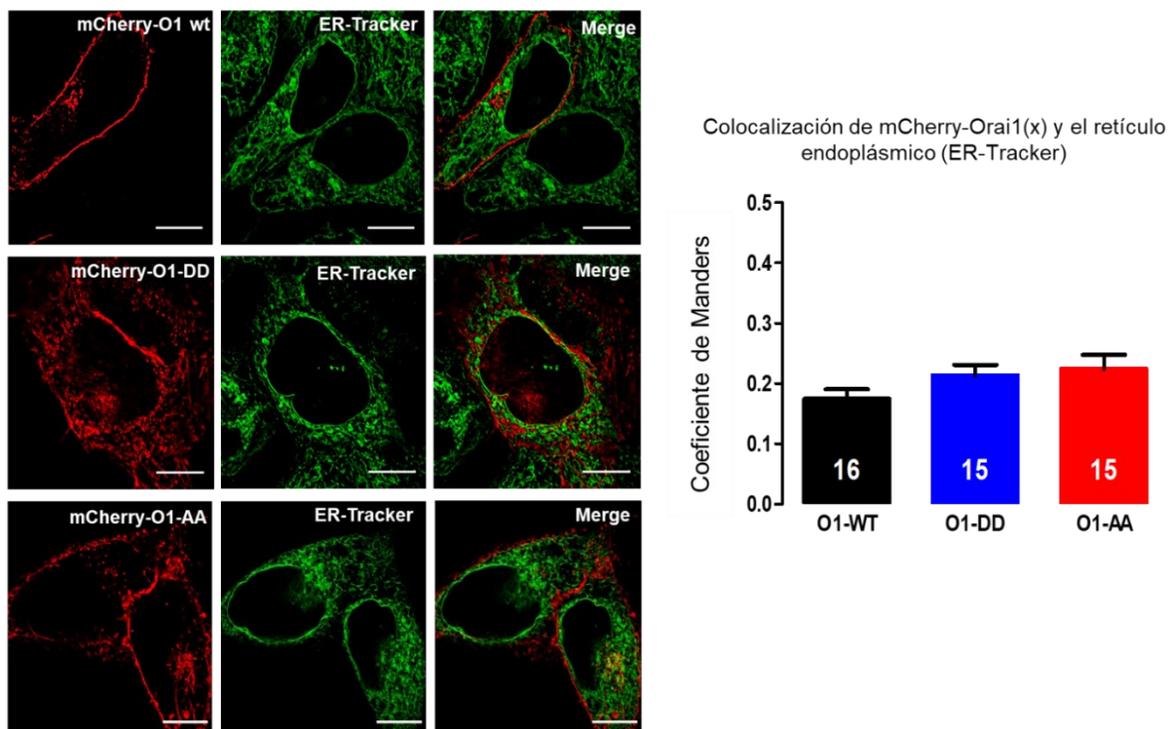


Fig. 8.15. Ensayo de colocalización entre los canales Orai1 y el marcador de retículo ER-Tracker. Las células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos codificantes para mCherry-O1-wt, mCherry-O1-DD y mCherry-O1-AA e incubadas durante 30 min con 1 μ M de ER-Tracker. La imagen muestra la señal del canal rojo, del canal verde y la superposición de ambos canales. El gráfico de barras muestra el valor del coeficiente de Manders entre los canales Orai1 y el ER-Tracker; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas construcciones. La barra blanca representa 10 μ m

8.13 La mutante mCherry-O1-DD incrementó su señal de fluorescencia después de la estimulación con ATP y TG.

Con el propósito de visualizar qué efecto tiene el ATP y la TG en las células que expresan los diferentes canales Orai1, se realizó un curso temporal de mCherry-O1-wt y las mutantes mCherry-O1-DD y mCherry-O1-AA donde se tomaron fotografías cada 3 min y se cuantificó la fluorescencia en cada una de las regiones de interés. La Fig. 8.16 muestra una imagen representativa de cada condición; en concordancia con nuestras observaciones anteriores, se puede ver que mCherry-O1-DD muestra una distribución más internalizada. Además, únicamente la fluorescencia de mCherry-O1-DD mostró un incremento del 13 ± 3 % en el min 12 respecto a su fluorescencia basal, lo que podría indicar que esta

mutante se está expresando más que mCherry-O1-wt y mCherry-O1-AA. Al inducir la liberación de Ca^{2+} con ATP y TG, también se favorecería la movilización de mCherry-O1-DD desde la membrana plasmática a vesículas intracelulares, provocando un incremento en su fluorescencia.

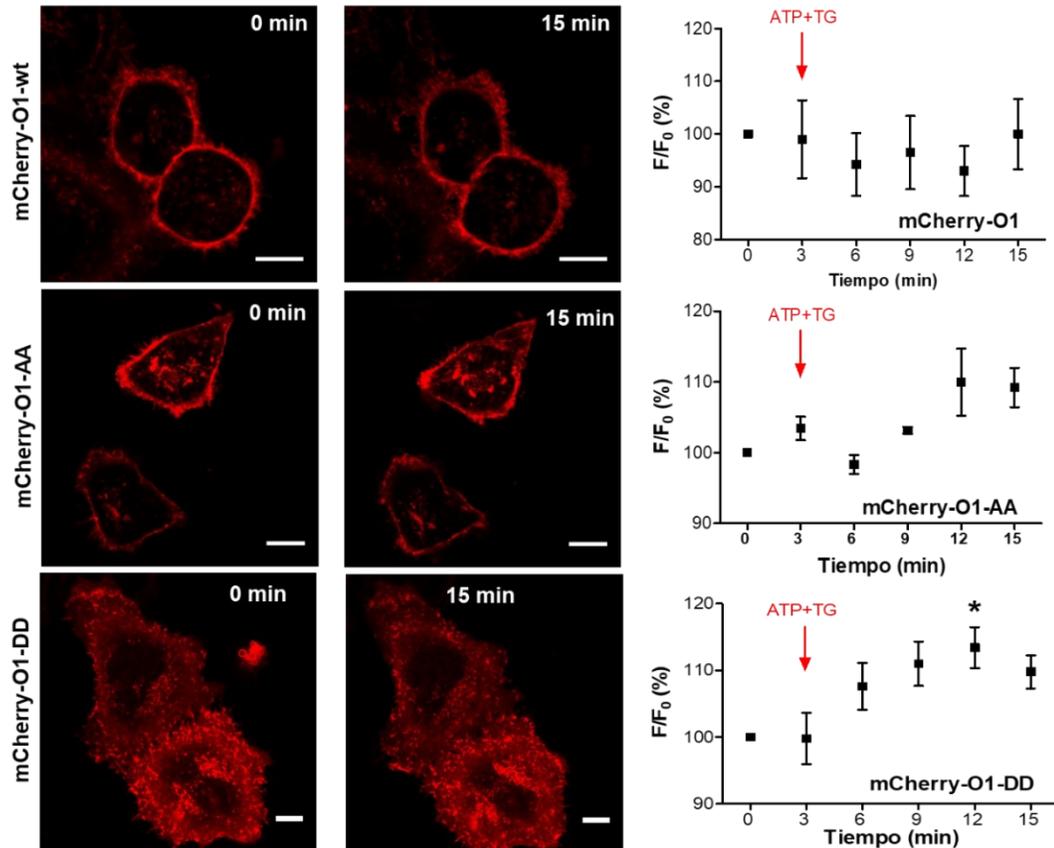


Fig. 8.16. El estímulo de ATP y TG incrementó la fluorescencia de la mutante mCherry-O1-DD. Las células HeLa fueron transfectadas con los canales Orai1 y estimuladas durante 3 min con 10 μM ATP y 1 μM TG, y se realizó un curso temporal donde se evaluaron los cambios de fluorescencia después del estímulo normalizando la señal respecto a la fluorescencia basal. Únicamente las células expresando la mutante mCherry-O1-DD mostraron fluorescencia de mayor intensidad después de ser estimuladas; esta diferencia se mantuvo por 15 min. La barra blanca representa 10 μm . Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición. *, $p < 0.05$.

8.14 El canal fosfomimético O1-DD y la proteína STIM1 reconstituyen SOCE.

Nuestros experimentos sugieren que la mutante O1-DD se expresa mejor que los canales O1-wt y O1-AA, lo que concuerda con un trabajo previo en el que también se puede observar que la proteína fosfomimética se expresa mejor que O1-AA (Sanchez-Collado et al. 2019). Es importante resaltar que ambas proteínas (O1-AA y O1-DD) se encuentran codificadas en el mismo vector (p3xFLAG-CMV10), por lo que nos preguntamos si esto podría ser un mecanismo compensatorio de las células, ya que si el canal O1-DD se internaliza eficientemente, la célula requeriría

producir más proteína O1-DD para tener el mismo nivel de canal Orai1 en la membrana plasmática. Con el objetivo de responder a esta pregunta se han realizado experimentos de SOCE sobreexpresando los canales Orai1 y la proteína STIM1; como controles se ha sobreexpresado únicamente STIM1 o el vector vacío *mock*.

En la Fig. 8.17 A se muestran los promedios de los trazos de SOCE en células HeLa transfectadas con el plásmido *mock* (rojo), con la proteína STIM1 (azul) o cotransfectadas con O1-wt y STIM1 (negro), O1-AA y STIM1 (verde) u O1-DD y STIM1 (rosa). Las células se mantuvieron en un medio extracelular sin Ca^{2+} y se adicionó TG para inducir un fuerte vaciamiento de Ca^{2+} del ER. La fuga basal de Ca^{2+} revelada por TG no fue diferente en ninguna de las condiciones. SOCE fue inducida al adicionar 2 mM de Ca^{2+} al medio extracelular, revelando que las modificaciones de los residuos S27/S30 no alteraron de forma importante la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1.

En la Fig. 8.17 B se presentan los valores promedios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal. La cotransfección con Orai1 y STIM1 incrementó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de forma significativa. Este efecto fue mayor para las células que expresaban el canal fosfomimético. Ya que no hay Ca^{2+} en el medio extracelular pensamos que un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría ser debido a que O1-DD se encuentre internalizado en vesículas o en gránulos de secreción (Dickson et al. 2012), ocasionando que STIM1 active a Orai1 y libere Ca^{2+} de estos depósitos intracelulares; esta posible explicación requiere de investigación adicional.

La Fig. 8.17 C muestra que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la TG fue la misma independientemente del canal que se sobreexpresó, lo que sugiere que la fuga de Ca^{2+} del ER no fue alterada. En el panel D se muestra una amplificación del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la adición de 2 mM de Ca^{2+} al medio extracelular, los valores promedio se presentan en el gráfico del panel E, únicamente vimos una pequeña reducción de SOCE al cotransfectar O1-DD y STIM1, probablemente porque la expresión de Orai1-DD está aumentada (datos no mostrados) para compensar la mayor internalización de este canal.

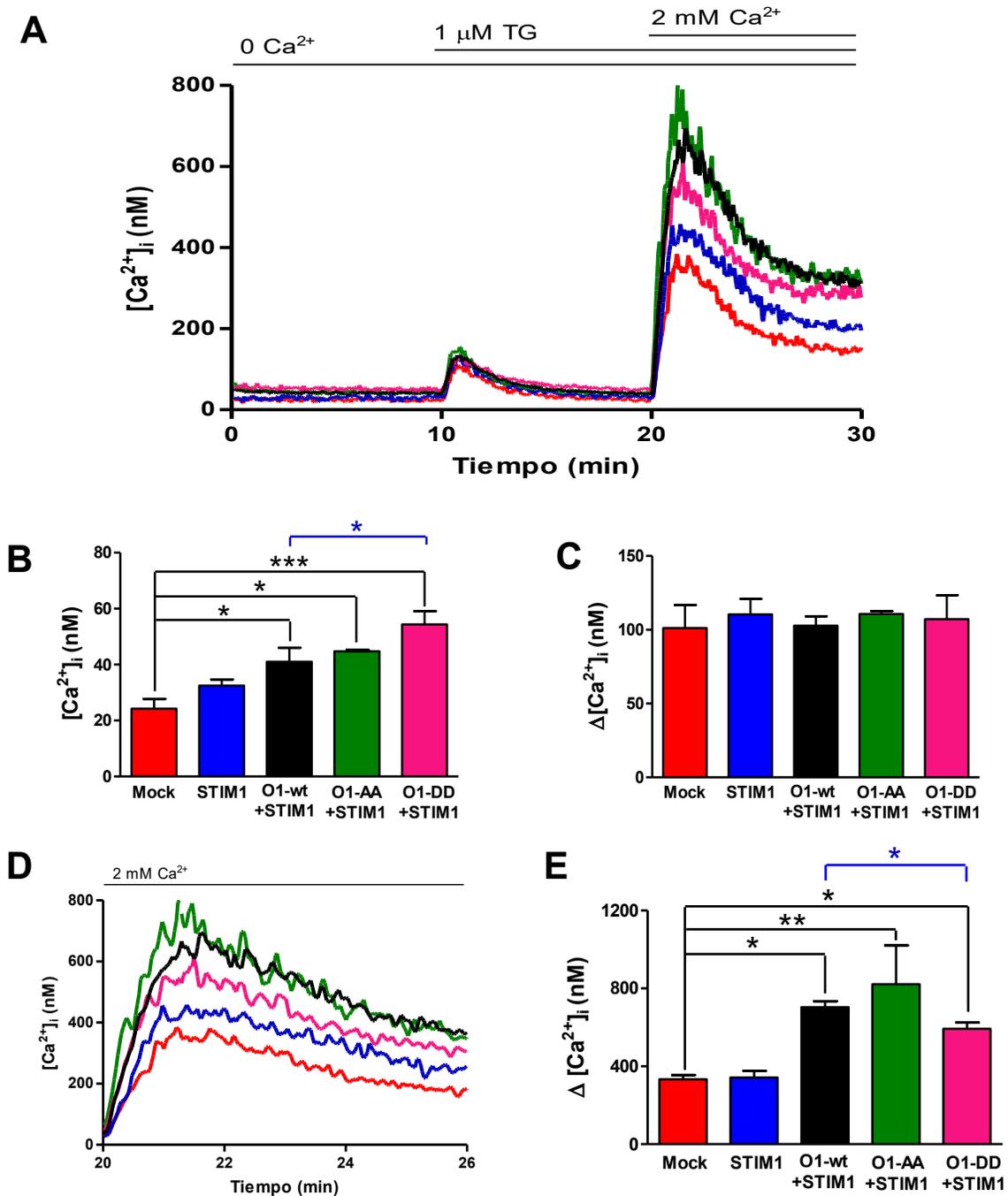


Fig. 8.17. Las mutaciones en los residuos S27/S30 del canal Orai1 no modificaron la respuesta de SOCE. (A) La entrada de Ca²⁺ operada por depósito fue evaluada en células transfectadas únicamente con el plásmido *mock* (rojo), STIM1 (azul) o células cotransfectadas con los plásmidos de O1-wt y STIM1 (negro), O1-AA y STIM1 (verde) u O1-DD y STIM1 (rosa). (B) El gráfico de barras muestra la [Ca²⁺]_i basal a los 6 min de haber comenzado el registro. Las células que coexpresaron la mutante O1-DD y STIM1 mostraron una mayor [Ca²⁺]_i basal. (C) El gráfico de barras muestra que el incremento de la [Ca²⁺]_i respecto al valor basal inducido por TG no fue modificado por ninguno de los canales Orai1. (D) Amplificación de la respuesta celular al adicionar 2 mM Ca²⁺ al medio extracelular. (E) El incremento promedio del transitorio de [Ca²⁺]_i mostrado en (D) fue ligeramente menor al cotransfectar O1-DD y STIM1. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Con el objetivo de determinar si los residuos S27 y S30 pudiesen modificar la velocidad de SOCE, se realizó un ajuste no lineal (Fig. 8.18 A-E) del curso temporal mostrado en la Fig. 8.17 D. Como se puede notar en la Fig. 8.18 F, el $t_{1/2}$ para SOCE no mostró ninguna diferencia, lo que sugiere que estos residuos de aminoácidos (S27/S30) no modificaron significativamente la velocidad de la entrada de Ca^{2+} .

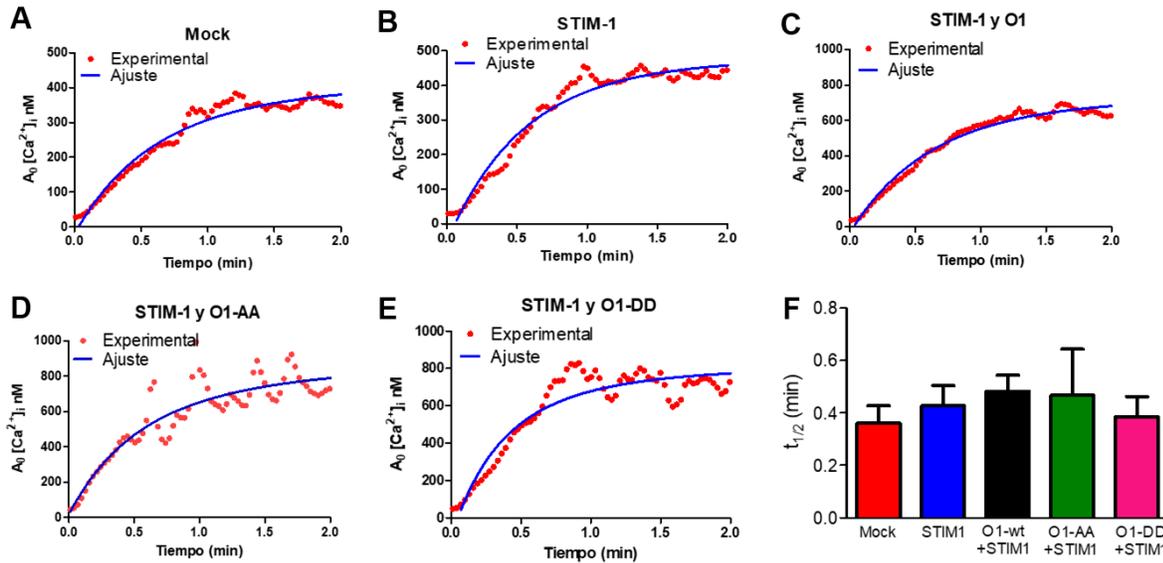


Fig. 8.18. La velocidad de SOCE no fue modificada por los canales Orai1. El transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la adición de Ca^{2+} al medio extracelular (trazo rojo) fue modelado con un ajuste no lineal (trazo azul). (A) Trazo representativo de células que fueron transfectadas con el plásmido vacío *mock*, (B) el plásmido que codifica la proteína STIM1 o las células cotransfectadas con las (C) proteínas STIM1 y O1-wt, (D) STIM1 y O1-AA o (E) STIM1 y O1-DD. (F) El gráfico muestra el $t_{1/2}$ que se requiere para alcanzar la velocidad máxima, los canales Orai1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de SOCE. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición.

8.15 Cambios postraduccionales de los residuos de los aminoácidos S27 y S30 modifican las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por ATP.

Con el propósito de determinar si las modificaciones de los residuos de S27 y S30 afectan las oscilaciones de Ca^{2+} citoplásmico, se realizaron experimentos en el microscopio confocal con células que habían incorporado el fluoróforo Fluo-4 (Gee et al. 2000) para registrar cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Las células fueron transfectadas con las construcciones que permiten expresar la proteína mCherry fusionada en el extremo amino terminal de cada uno de los canales Orai1. El Fluo-4 permite detectar cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a una longitud de onda de excitación de 488 nm, que se encuentra en el rango de la luz visible, lo que lo hace compatible con el microscopio confocal. Se realizó un curso temporal alternando las mediciones entre la longitud de onda de excitación del Fluo-4 y la proteína mCherry.

La Fig. 8.19 muestra en el recuadro superior la señal del Fluo-4 y en el recuadro inferior la señal de la proteína mCherry que representa la presencia del canal Orai1. En cada panel (A-D) se muestran trazos representativos del tipo de respuesta estimulada por ATP; los trazos rojos exhiben los incrementos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que los trazos azules exhiben las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular. Las cuatro condiciones estudiadas fueron células transfectadas con el plásmido vacío (A) *mock*, mCherry-O1-wt (B), mCherry-O1-AA (C), y mCherry-O1-DD (D). Las células se incubaron en solución salina suplementada con 1.8 mM de Ca^{2+} y se estimularon con 10 μ M ATP.

El número de oscilaciones fue cuantificado durante 3 min a partir de que se adicionó ATP, cuando las respuestas fueron incrementos transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$, se determinó la amplitud máxima. Tomando las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ observadas en presencia del *mock* como la referencia, se observa que la sobreexpresión de los canales Orai1 cambió los patrones de las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Fig. 8.19 E, F). La moda de la frecuencia de oscilaciones fue 5, 7, 2 y 1 para células *mock* y sobreexpresando mCherry-O1-AA, mCherry-O1-wt o mCherry-O1-DD, respectivamente. Estos datos sugieren que el canal que no puede ser fosforilado, mCherry-O1-AA, aumentó la frecuencia de las oscilaciones, mientras que el canal nativo y el fosfomimético redujeron la frecuencia de las oscilaciones.

Adicionalmente, mCherry-O1-wt y mCherry-O1-DD modificaron el perfil de las oscilaciones, pasaron de ser híbridas (oscilaciones montadas en una respuesta transitoria) a ser únicamente oscilaciones. La sobreexpresión de los canales Orai1 aumentó la fracción de las respuestas transitorias excepto para mCherry-O1-DD. Estos datos sugieren que los canales Orai1 que se mantienen en la membrana plasmática aumentan la frecuencia de la respuesta transitoria, y además revelan que la fosforilación de Orai1 en los residuos S27 y S30 modulan de forma negativa la liberación de Ca^{2+} del ER, lo cual se pudiese deber a que Orai1 fosforilado estabiliza el estado inactivado del IP_3R .

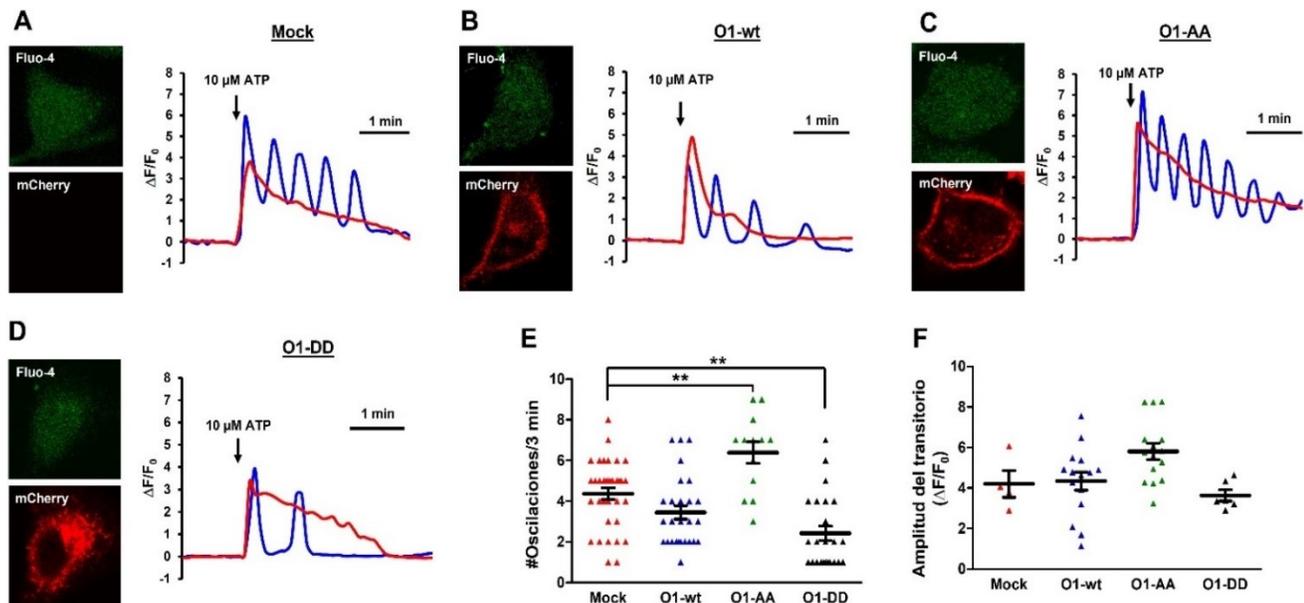


Fig. 8.19. Los canales O1-wt, O1-AA y O1-DD modificaron las señales de Ca^{2+} estimuladas por ATP. El ATP indujo la movilización de Ca^{2+} con dos patrones diferentes: oscilaciones de Ca^{2+} citoplásmico (trazo azul) o incrementos transitorios (trazo rojo) en células HeLa transfectadas con (A) el plásmido vacío (*mock*), (B) mCherry-O1-wt, (C) mCherry-O1-AA y (D) mCherry-O1-DD. (E) Se utilizó un tiempo fijo de 3 min a partir de la adición de ATP para determinar el número de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cada uno de los símbolos representa la respuesta de una célula. El *mock* mostró una gran variabilidad en el número de oscilaciones, mostrando de 1 hasta 8 oscilaciones en ese periodo de tiempo, siendo la moda 5 oscilaciones. El canal mCherry-O1-wt disminuyó la moda a 2 oscilaciones, mientras que el canal mCherry-O1-AA incrementó la moda a 7 y el canal mCherry-O1-DD disminuyó la moda a 1 oscilación. La frecuencia promedio aumentó al expresar O1-AA y disminuyó al expresar O1-DD, O1-wt no modificó la frecuencia significativamente. (F) El pico del incremento transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no cambió significativamente por la expresión de los canales Orai1. Sin embargo, los canales O1-wt y O1-AA aumentaron la frecuencia de respuestas, no así el canal O1-DD. Se analizaron al menos 28 células de 4 experimentos independientes. **, $p < 0.01$.

Con el propósito de conocer si hay una mayor entrada de Ca^{2+} inducida por ATP y TG en células que sobreexpresaron O1-wt u O1-AA, se estudió la participación de la entrada de Ca^{2+} a través de la mutante Orai1-S27A/S30A-E106A (O1-AA-E106A) que tiene suprimida su función como canal y a su vez poca afinidad por el IP_3R . Si el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocasionado por la sobreexpresión de O1-wt o la mutante O1-AA se debiese a una mejor liberación de Ca^{2+} , esto se tendría reproducir sin requerir la participación Orai1 como un canal de Ca^{2+} . Como se puede notar en la Fig. 20 A y B cuando se expresó esta mutante, las células no mostraron diferencias en el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que sugiere que las S27/S30 además de favorecer SOCE, también permiten una mayor entrada de Ca^{2+} estimulada por ATP y TG, este aumento en la entrada de Ca^{2+} podría ser independiente de STIM1, aunque esta afirmación requiere investigación adicional.

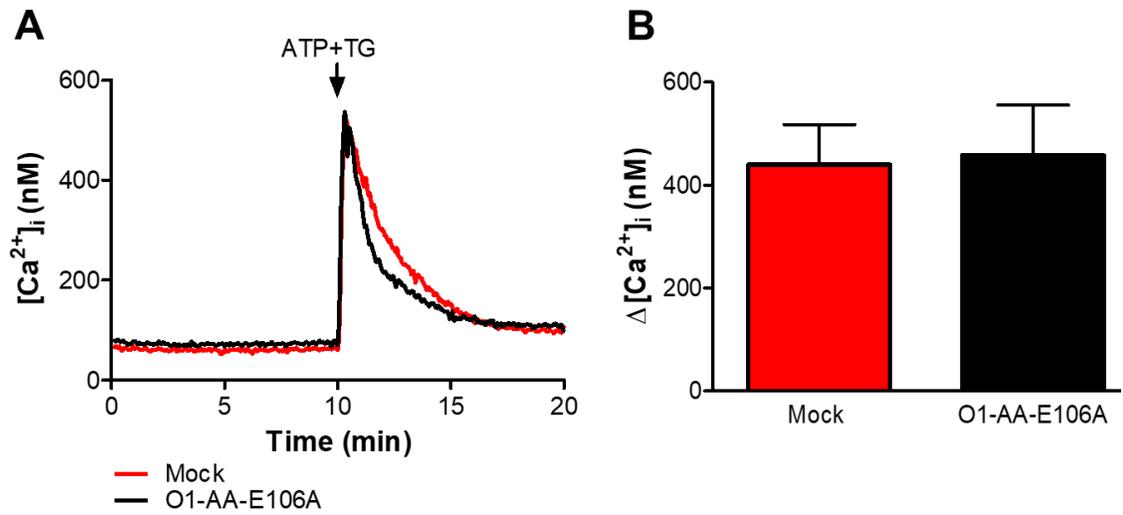


Fig. 8.20. La mutante O1-AA-E106A no mostró diferencias en la amplitud del transitorio de Ca²⁺ intracelular. (A) Células HeLa fueron transfectadas con el plásmido *mock* y con la mutante O1-AA-E106A durante 24 h. Las células se registraron en solución salina con 1.8 mM de Ca²⁺ y fueron estimuladas simultáneamente con 10 μM ATP y 1 μM TG. **(B)** El gráfico de barras muestra que la sobreexpresión de O1-AA-E106A no cambió el pico promedio del transitorio de Ca²⁺ intracelular, como sí ocurre con el canal funcional O1-AA (Figura 2.2, trazo azul).

8.16 La reducción en la liberación de Ca^{2+} del ER mediada por el canal Orai1 es insensible a los inhibidores de la PKC cuando las células son estimuladas con histamina y TG.

En este trabajo también se estudió de forma exploratoria si el canal Orai1 modifica la respuesta de Ca^{2+} cuando las células se estimularon con histamina, este agonista al igual que el ATP, libera Ca^{2+} vía el IP_3R . Sin embargo, se ha reportado que el IP_3 generado por la estimulación de las células con la histamina es menor comparado con otros agonistas (Rueda et al. 2002; van der Wal et al. 2001). Además, la histamina puede producir DAG por acción de la fosfolipasa D (PLD, por sus siglas en inglés) (Kolczynska et al. 2020; Oprins et al. 2002), favoreciendo la activación de PKCs clásicas y nuevas. Este perfil es diferente al de los receptores purinérgicos y sería interesante ver el efecto de histamina en el canal Orai1.

En la Fig. 8.21 A y B se presenta la respuesta del incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la liberación de Ca^{2+} del ER en células HeLa transfectadas ya sea con el plásmido vacío o sobreexpresando O1-wt. En este caso O1-wt no incrementó la amplitud del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como sí lo hizo cuando la liberación de Ca^{2+} fue inducida por ATP (ver Fig. 2.1 y Fig. 8.1). En el panel C se muestra el pico promedio del transitorio de Ca^{2+} intracelular estimulado por histamina y TG, en el que se puede ver que las diferentes condiciones experimentales no afectaron este parámetro.

El panel D muestra que la sobreexpresión de Orai1 redujo la liberación de Ca^{2+} del ER, aun cuando las células fueron incubadas con un inhibidor de las PKCs dependientes de Ca^{2+} (Gö 6976) o un inhibidor de las PKCs más generalizado (Gö 6983). Estos datos sugieren que la histamina podría activar otras cinasas diferentes a las PKCs, las cuales pueden fosforilar a los canales Orai1 de forma tardía. Esta observación muestra una diferencia importante, ya que la inhibición en la liberación de Ca^{2+} del ER inducida por ATP parece depender fuertemente de la actividad de las cPKC y del Ca^{2+} , mientras que la histamina parece depender principalmente de las nPKC y de otras cinasas de naturaleza desconocida.

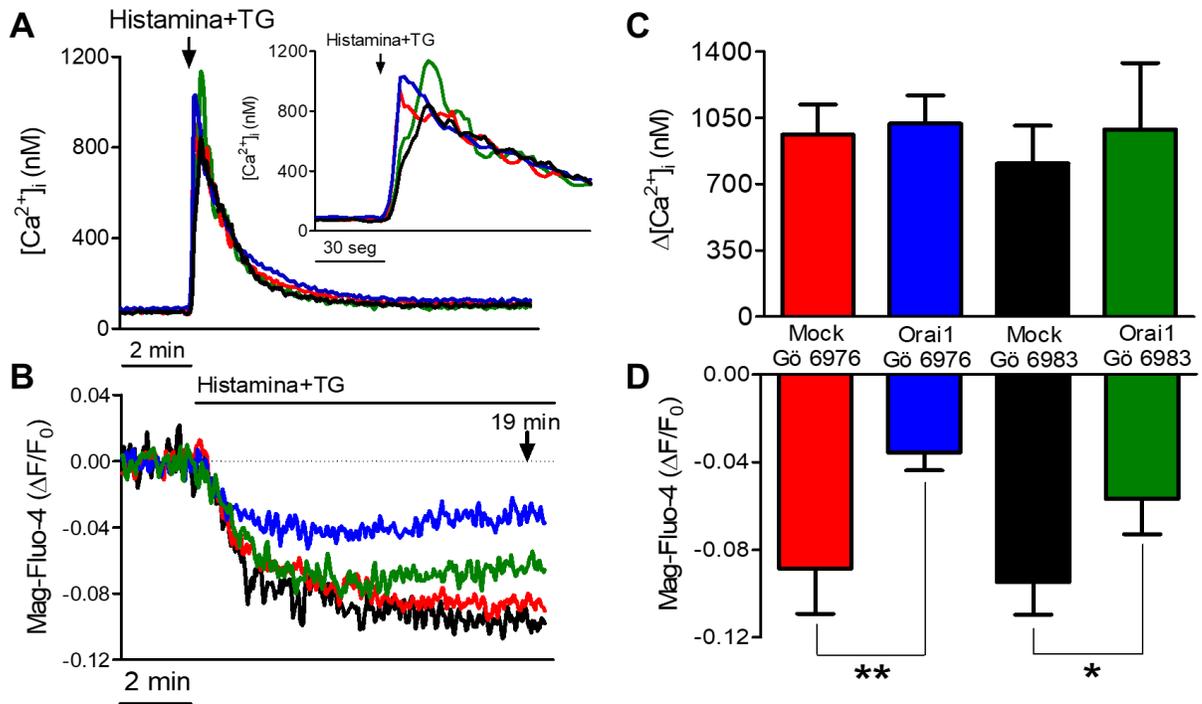


Fig. 8.21. El inhibidor de PKC Gö 6983 no modificó el efecto inhibitorio de Orai1 en células HeLa estimuladas con la histamina y TG. (A) Trazo representativo del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por histamina (100 μM) y TG (1 μM) en un medio extracelular suplementado con 1.8 mM Ca^{2+} de células transfectadas con el plásmido *mock* (trazo rojo), células sobreexpresando Orai1 (trazo azul) e incubadas con Gö 6976 (200 nM) o células transfectadas con el plásmido *mock* (trazo negro) o sobreexpresando Orai1 (trazo verde) e incubadas con Gö 6983 (200 nM). En el recuadro se puede notar que la liberación de Ca^{2+} citoplásmica fue más lenta cuando las células fueron incubadas con Gö 6983. (C) El gráfico de barras muestra que no fue modificada significativamente la amplitud del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ en ninguna condición. (B, D) La liberación de Ca^{2+} del ER fue inhibida cuando se sobreexpresó Orai1 tanto en células incubadas con Gö 6976 como en células incubadas con Gö 6983. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

8.17 El inhibidor Gö 6983 favoreció la liberación de Ca^{2+} del ER.

Con el objetivo de evaluar si el canal Orai1 endógeno pudiera inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER y si la inhibición de las PKC clásicas y nuevas por tiempos prolongados pudiera favorecer la liberación de Ca^{2+} del ER estimulada por histamina, se incubaron a las células HeLa con 200 nM de Gö 6983 durante 2 h y se estimularon únicamente con 100 μM de histamina en un medio suplementado con Ca^{2+} . Se utilizó solo el agonista con el propósito de visualizar el vaciamiento debido únicamente a la activación del IP_3R sin que se involucrara a los canales de la fuga de Ca^{2+} revelados por TG.

El panel A de la Fig. 8.22 muestra que la incubación con Gö 6983 tiende a incrementar el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$, aunque esta diferencia no fue significativa (Panel C). El panel B muestra que Gö 6983 aumentó la liberación de Ca^{2+} del ER inducida por la histamina y esta diferencia fue significativa (Panel D) ya que la adición de DMSO (el vehículo) presentó un incremento de Ca^{2+} del 3 % ($0.03 \pm 0.02 \Delta F/F_0$) mientras que Gö 6983 produjo un vaciamiento de Ca^{2+} del 4 % ($-0.04 \pm 0.02 \Delta F/F_0$). Con base en estas observaciones proponemos que la inhibición de la liberación de Ca^{2+} luminal puede ocurrir por la fosforilación de Orai1 endógeno e involucra la actividad tanto de las cPKC como de las nPKC, además de otras cinasas que falta por determinar (véase Fig. 8.21).

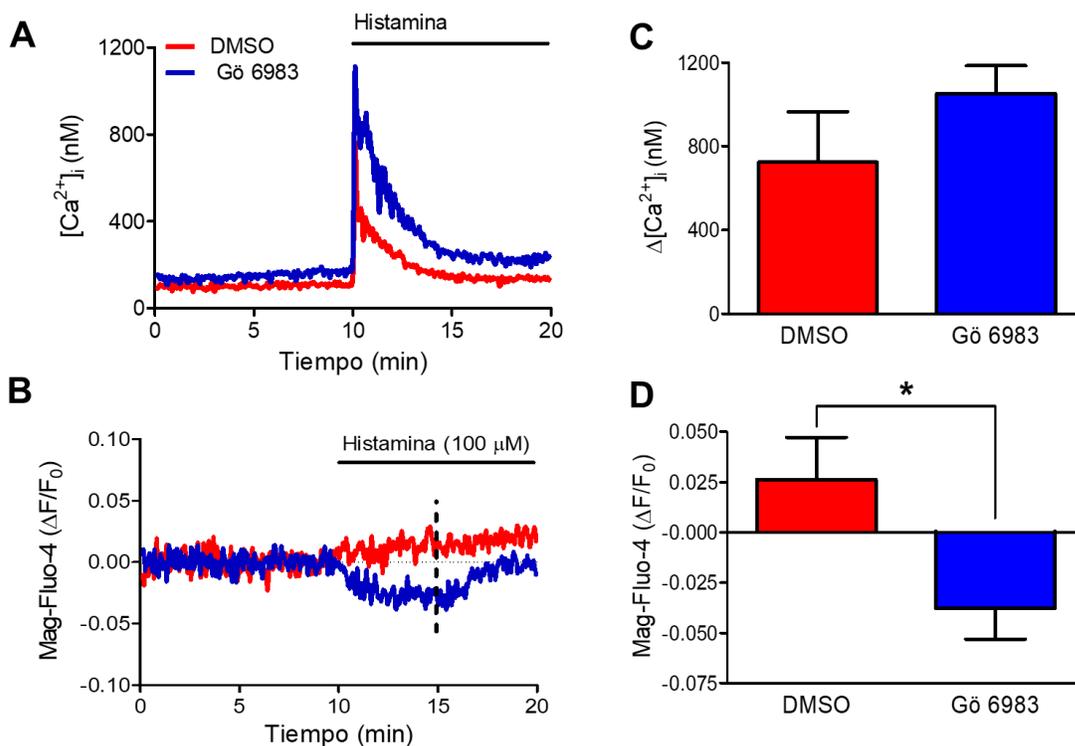


Fig. 8.22. Gö 6983 favoreció la liberación de Ca^{2+} del ER. Trazo representativo del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (A) y de la liberación del Ca^{2+} del ER (B) estimulados por la histamina (100 μ M) en solución salina con 1.8 mM Ca^{2+} . Las células se incubaron por 2 h con DMSO o con Gö 6983 (200 nM) y se estimularon después de 10 min de haber iniciado el registro. (C) La amplitud del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ no mostró diferencias en las células incubadas con Gö 6983. (D) La liberación de Ca^{2+} del ER se facilitó por la presencia de Gö 6983. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición. *, $p < 0.05$.

8.18 El activador de PKC, PDBu, suprime la liberación de Ca^{2+} inducida tanto por histamina como por la combinación de histamina y TG.

Para determinar el efecto de PKC en la liberación de Ca^{2+} inducida por histamina se realizaron experimentos en ausencia de Ca^{2+} externo y con el activador de PKC, PDBu. El PDBu es un éster de forbol análogo al DAG, pero que, a diferencia de este último, no es susceptible de ser metabolizado. Por tal motivo, PDBu produce una fuerte activación de las PKCs (Chiu et al. 1988; Isakov 2018; Newton 2018). En la Fig. 8.23 A y B se puede notar que las células incubadas por 10 min con PDBu, en un medio sin Ca^{2+} , mostraron una reducción del incremento transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a histamina y TG [de 302 ± 50 nM (DMSO) a 135 ± 40 nM (PDBu)]. Sin embargo, SOCE no se modificó significativamente, aunque mostró una tendencia a ser mayor, lo cual está en línea con observaciones previas que han reportado una mayor entrada de Ca^{2+} por acción de PKC (Camello et al. 1999). Estos datos sugieren que pudiese haber una entrada de Ca^{2+} independiente de STIM1, que estaría siendo facilitada por la fosforilación de PKC.

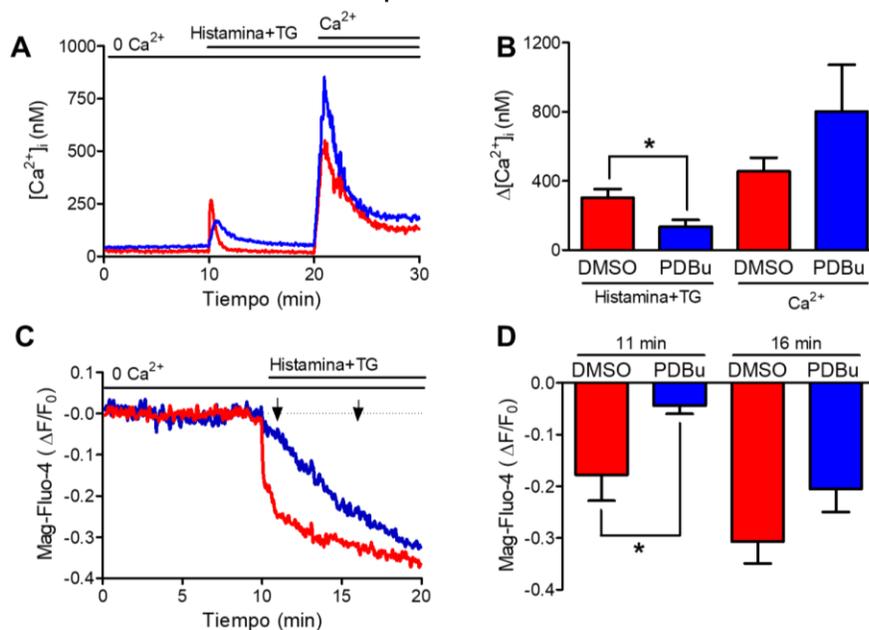


Fig. 8.23. La activación de las PKCs con PDBu disminuyó el incremento transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y modificó la liberación de Ca^{2+} del ER inducida por histamina y TG. Células HeLa fueron incubadas por 10 min con PDBu (1 μM) y estimuladas con la combinación de histamina (100 μM) y TG (1 μM) en solución salina sin Ca^{2+} . Para observar SOCE, se adicionó 2 mM de Ca^{2+} al medio extracelular. **(A)** El registro del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuyó cuando las células fueron incubadas con PDBu. **(B)** Las células incubadas con PDBu mostraron una reducción de la amplitud del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mientras que SOCE únicamente mostró una tendencia a incrementar. **(C)** Trazo representativo de la liberación de Ca^{2+} del ER. **(D)** Las células incubadas con PDBu mostraron una respuesta ralentizada en el min 11 respecto a las células incubadas con el vehículo DMSO (0.1 %), a partir del min 15 no hubo diferencias estadísticamente significativas. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes para cada condición. *, $p < 0.05$.

La liberación de Ca^{2+} del ER (Fig. 8.23 C y D) en células incubadas con PDBu mostró un curso temporal diferente a las células incubadas con DMSO, sugiriendo que el PDBu ralentiza la liberación de Ca^{2+} . El gráfico de barras muestra que la amplitud en la liberación de Ca^{2+} del ER fue reducida significativamente en el minuto 11 (de $-0.18 \pm 0.05 \Delta F/F_0$ a $-0.04 \pm 0.02 \Delta F/F_0$ para células incubadas con DMSO y PDBu, respectivamente). Estos datos sugieren que la fosforilación de Orai1 endógeno por PKC también podría estar inhibiendo la actividad del IP_3R ; este nuevo rol de Orai1 es relevante porque este canal podría tener una función dual para mantener la homeóstasis de Ca^{2+} del ER. Por un lado, su actividad bien conocida como canal altamente selectivo por Ca^{2+} y por otro, como inhibidor de la actividad del IP_3R .

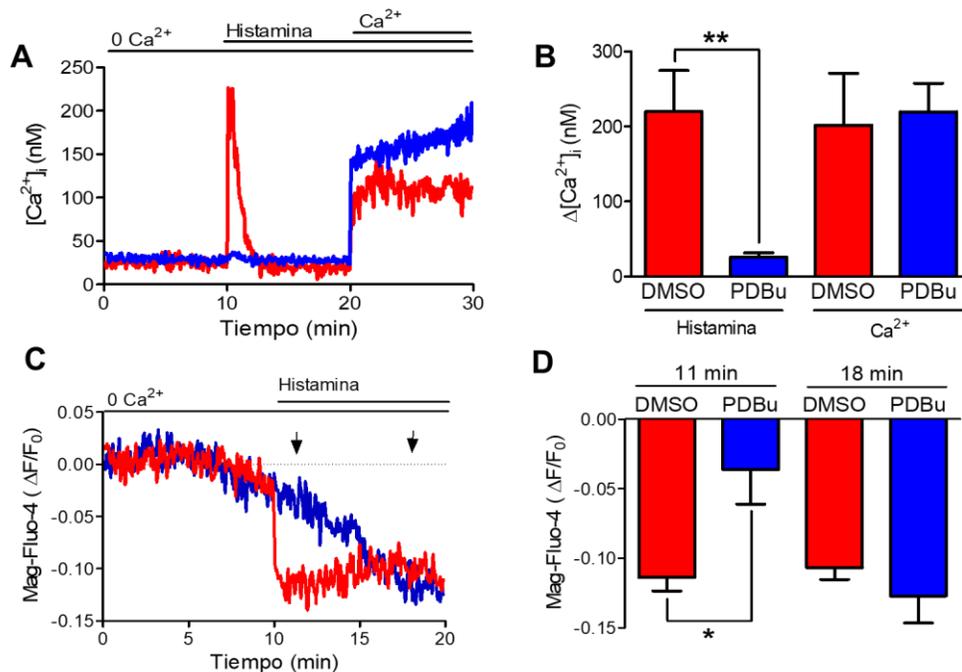


Fig. 8.24. El activador PDBu suprimió el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y modificó la liberación de Ca^{2+} del ER inducida por histamina. Las células HeLa fueron incubadas por 10 min con PDBu (1 μM) y estimuladas con histamina (100 μM) en un medio sin Ca^{2+} . Para observar SOCE se adicionó 2 mM de Ca^{2+} al medio extracelular. **(A-B)** El transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue totalmente suprimido cuando las células fueron incubadas con PDBu, mientras que SOCE no mostró diferencias significativas. **(C-D)** Las células incubadas con PDBu mostraron una liberación de Ca^{2+} del ER ralentizada respecto a las células incubadas con el vehículo DMSO (0.1 %), las flechas en (B) indican los puntos donde se realizó el análisis estadístico. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes para cada condición. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Debido que al estimular a las células con histamina y TG se ocasiona que la fuga de Ca^{2+} tenga un impacto en el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Leon-Aparicio, Chavez-Reyes, and Guerrero-Hernandez 2017), se realizó un experimento donde solamente se estimuló a las células con histamina. En la Fig. 8.24 A y B se puede observar que el activador de PKC (PDBu) suprimió fuertemente el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por histamina (de 220 ± 55 nM a 25 ± 6 nM para células incubadas con DMSO y PDBu, respectivamente). En el panel C y D se puede notar que nuevamente se modificó negativamente la liberación de Ca^{2+} del ER, provocando que la amplitud del vaciamiento de Ca^{2+} del ER se redujera significativamente al incubar a las células con PDBu (de $-0.11 \pm 0.01 \Delta F/F_0$ a $-0.03 \pm 0.02 \Delta F/F_0$ para células incubadas con DMSO y PDBu, respectivamente), sugiriendo que en células HeLa, la PKC es capaz de regular positivamente el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del citoplasma y negativamente el vaciamiento de Ca^{2+} del ER.

8.19 La inhibición de PKC favorece la liberación de Ca^{2+} del ER.

En este trabajo se evaluó si inhibir la actividad de PKC modifica la respuesta de Ca^{2+} del ER en células que fueron transfectadas con la mutante fosfomimética O1-DD. Esto indicaría que PKC tiene otros blancos diferentes a los residuos S27 y S30 que podrían estar participando en la regulación de los flujos de Ca^{2+} . En la Fig. 8.25 A y B se muestra la respuesta de Ca^{2+} intracelular y la liberación de Ca^{2+} del ER. Las células incubadas con el inhibidor generalizado de PKC, Gö 6983, mostraron una mayor liberación de Ca^{2+} del ER (de $-0.03 \pm 0.01 \Delta F/F_0$ a $-0.06 \pm 0.004 \Delta F/F_0$ para células incubadas con DMSO y Gö 6983, respectivamente).

En la Fig. 8.25 C y D se presenta el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la amplitud del vaciamiento de Ca^{2+} del ER inducido por histamina y TG. Las células que expresaron el canal O1-DD no modificaron su respuesta intracelular cuando se aplicó el estímulo. Sin embargo, la liberación de Ca^{2+} del ER incrementó significativamente, sugiriendo que hay otros sitios de fosforilación en el canal Orai1 que están participando negativamente en la liberación de Ca^{2+} del ER. Estos datos concuerdan con la propuesta de que PKC tiene otros blancos diferentes a las S27 y S30 que están participando negativamente en la liberación de Ca^{2+} del ER.

En este trabajo se propone que estas cinasas desconocidas son PKCs dependientes de Ca^{2+} debido a que cuando se sobreexpresó la mutante O1-DD en un medio sin Ca^{2+} , el estímulo de histamina y TG no inhibió la liberación de Ca^{2+} del ER y el transitorio de Ca^{2+} intracelular tampoco fue modificado por esta condición (Fig. 8.26 A-C). Como control de transfección y expresión de la mutante O1-DD, en el panel A, C se puede ver que SOCE fue suprimida (de 239 ± 53 nM a 168 ± 19 nM para las células transfectadas con el plásmido *mock* o las células que expresaron la mutante O1-DD, respectivamente) por haberse alterado la estequiometría Orai1:STIM1 (Soboloff et al. 2006).

A diferencia de lo reportado al sobreexpresar el canal O1-wt en ausencia de Ca^{2+} (Martínez-Martínez 2016), O1-DD no fue capaz de inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER y esto podría deberse a que O1-DD al mimetizar un canal permanentemente fosforilado, podría impedir la fosforilación de otros residuos que inhiben la liberación de Ca^{2+} del ER. Por ejemplo, la S25, que de acuerdo con el repositorio *NetPhos - 3.1*, esta serina podría ser fosforilada por PKC, cdc2 e incluso por una cinasa inespecífica (ver MS3). Investigar estos sitios adicionales de fosforilación, permitiría entender mejor el papel del canal Orai1 como un inhibidor de la liberación de Ca^{2+} de ER.

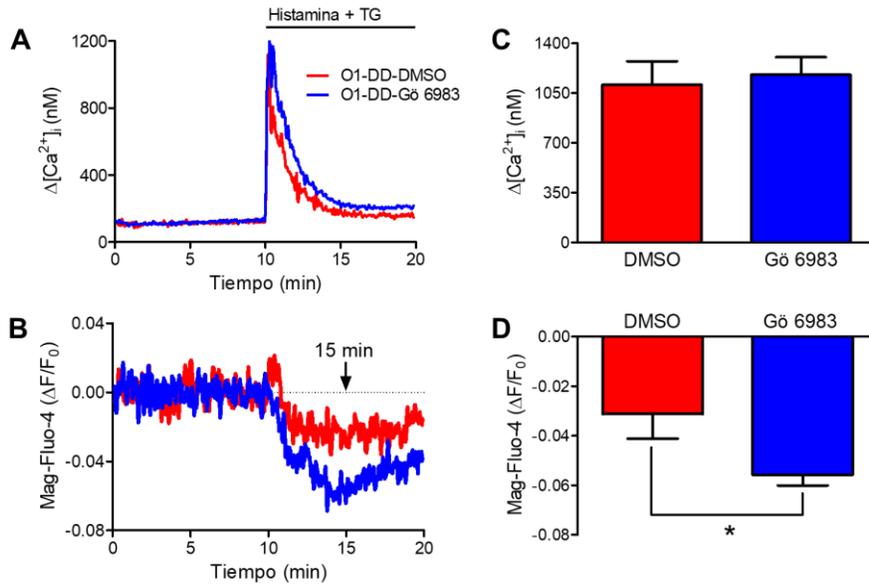


Fig. 8.25. Gö 6983 favorece el vaciamiento de Ca^{2+} del ER en células que expresan O1-DD. Células HeLa transfectadas con la mutante O1-DD e incubadas por 10 min con DMSO (0.1 %) o PDBu (1 μM) en solución salina con Ca^{2+} . Las células fueron estimuladas con histamina (100 μM) y TG (1 μM) y se registró (A) el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en cada condición y (B) la liberación de Ca^{2+} del ER. (C) El gráfico de barras muestra que la amplitud del transitorio de Ca^{2+} en (A) no fue modificada por Gö 6983. (D) La amplitud de vaciamiento del ER estimulada por histamina y TG incrementó significativamente cuando las células fueron incubadas con Gö 6983. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes para cada condición. *, $p < 0.05$.

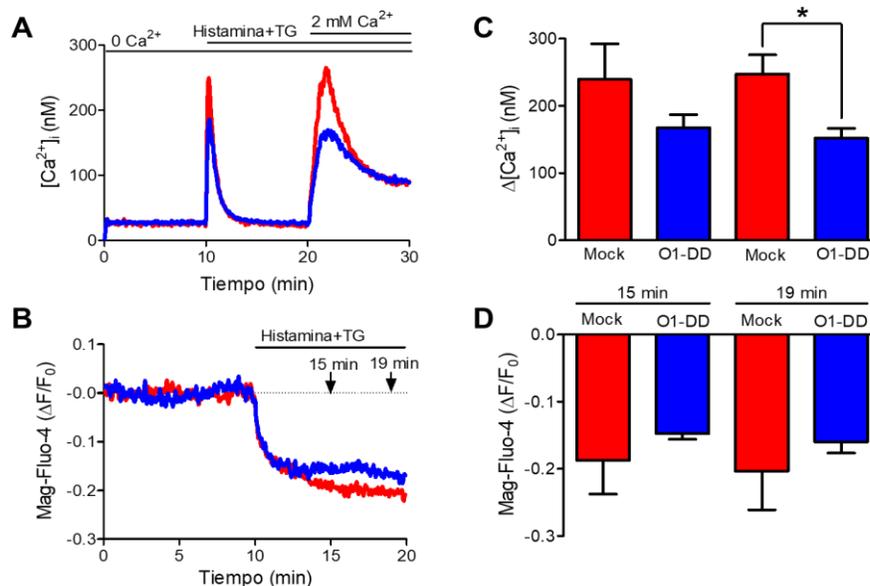


Fig. 8.26. O1-DD no modificó la respuesta citoplásmica o luminal en solución salina sin Ca^{2+} . (A) Trazo representativo del protocolo de SOCE en células HeLa transfectadas con la mutante O1-DD y de (B) la liberación de Ca^{2+} del ER. (C) El gráfico de barras muestra la amplitud del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulado por histamina y TG o el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la adición de Ca^{2+} al medio extracelular. (D) La amplitud del vaciamiento de Ca^{2+} del ER estimulada por histamina y TG no fue modificada al expresar la mutante O1-DD. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes. *, $p < 0.05$.

8.20 La interacción entre el IP₃R y Orai1 incrementa cuando las células se estimulan con histamina y TG.

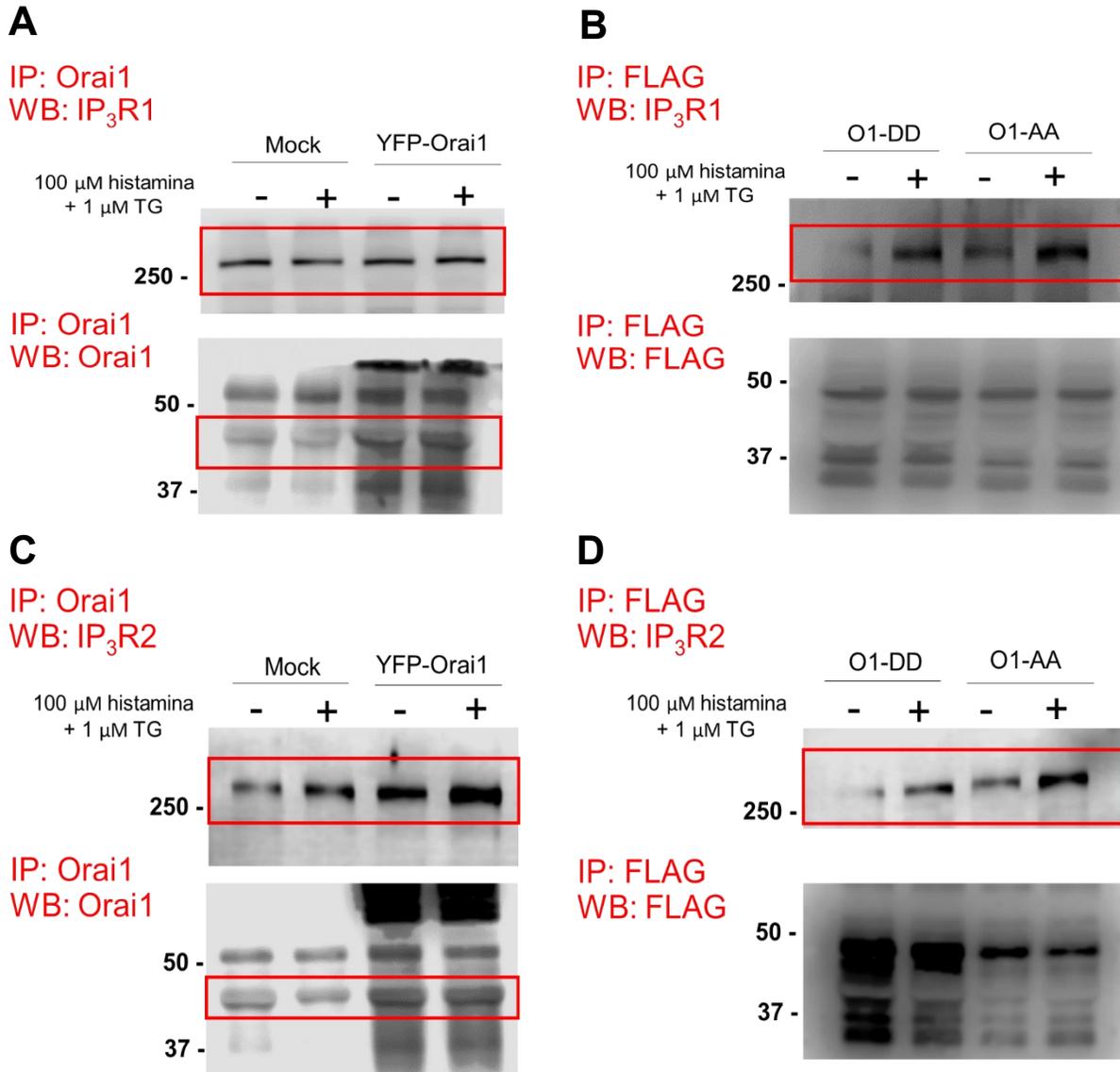


Fig. 8.27. Efecto de la combinación histamina y TG en la interacción entre Orai1 y IP₃R tipo 1 y tipo 2 en células HeLa. (A) Células transfectadas con el plásmido vacío o con YFP-Orai1 fueron estimuladas con histamina y TG durante 3 min. Se utilizó como control de carga el western blot de Orai1. El blot del IP₃R1 mostró que la interacción Orai1-IP₃R1 no cambió en células estimuladas con histamina y TG. (B) Células transfectadas con las mutantes O1-DD o O1-AA fueron estimuladas con histamina y TG durante 3 min. La inmunoprecitación fue realizada con el anticuerpo anti-FLAG, el western blot realizado con el anticuerpo anti-FLAG fue empleado como control de carga. La interacción de Orai1 y las mutantes O1-DD y O1-AA incrementó al aplicar el estímulo de histamina y TG. (C) Células transfectadas con el plásmido *mock* y con YFP-Orai1 fueron estimuladas con histamina y TG durante 3 min. El western blot contra el IP₃R2 mostró una mayor señal cuando las células fueron estimuladas o cuando se sobreexpresó el canal YFP-Orai1. Se utilizó como control de carga el western blot de Orai1. (D) Células transfectadas con las mutantes O1-DD o O1-AA fueron estimuladas con histamina y TG durante 3 min. El western blot realizado con el anticuerpo anti-FLAG fue empleado como control de carga. La interacción de las mutantes O1-DD u O1-AA y el canal Orai1 incrementó al aplicar el estímulo de histamina y TG. Los recuadros rojos señalan las bandas de la proteína de interés.

En este trabajo se realizó un experimento exploratorio en el que se evaluó la interacción de Orai1 y el IP₃R, isoformas 1 y 2. En la Fig. 8.27 A y B se muestra que en nuestras condiciones experimentales no observamos diferencias entre la señal de las células en reposo y las células estimuladas con histamina y TG, incluso cuando se sobreexpresó el canal Orai1. Sin embargo, tanto la mutante O1-DD como O1-AA incrementaron la señal del IP₃R1 después de que las células fueron estimuladas con histamina y TG, sugiriendo que este agonista puede activar otras cinasas que no son activadas por el ATP, las cuales podrían fosforilar otros blancos diferentes de las S27/S30. Sin embargo, las S27/S30 también estarían participando en la inhibición de la liberación de Ca²⁺ del ER (ver Fig. 2.2). Este mecanismo podría llevarse a cabo porque la histamina produce más DAG por otras vías de señalización, lo que activaría eficientemente a las PKCs favoreciendo su participación (Montero et al. 2003; Oprins et al. 2002).

Interesantemente, la interacción entre Orai1 y el IP₃R2 incrementó cuando las células fueron estimuladas con histamina y TG en células *mock* y en células sobreexpresando YFP-Orai1, lo que sugiere que el IP₃R2 es más sensible al estímulo. Consistentemente, con el efecto visto en el IP₃R1 inducido por histamina y TG, las mutantes O1-DD y O1-AA incrementaron su interacción con el IP₃R2 al estimular a las células. Estos datos fueron inesperados y de forma preliminar se podría sugerir que en el caso de la histamina se activarían otras cinasas que estarían regulando la interacción entre Orai1 y el IP₃R2. Se desconoce qué cinasas son, pero con base en estos datos se sabe que son dependientes de Ca²⁺, sensibles al inhibidor generalizado de PKC, Gö 6983 y probablemente fosforilan residuos de Orai1 cercanos a las S27/S30.

8.21 Representación esquemática del modelo de trabajo.

En la Fig. 8.28 se muestra una representación esquemática, tomando en cuenta los datos que se han presentados en este trabajo. Como ya se tiene bien descrito, el ATP libera Ca^{2+} del ER al citoplasma vía la producción de IP_3 ; la disminución de Ca^{2+} en el ER provoca que STIM1 se disocie del Ca^{2+} que se encuentra unido a su dominio mano EF en su extremo N terminal, orientado hacia el lumen del ER. Esta disociación permite que STIM1 se oligomerice y se agregue entre las regiones de la membrana del ER y la membrana plasmática. Este acercamiento de STIM1 a la membrana plasmática permite que esta proteína pueda reclutar y activar a los canales Orai1, induciendo el flujo de Ca^{2+} del espacio extracelular al citoplasma. La hidrólisis del PIP_2 , además de producir IP_3 también produce el segundo mensajero DAG. El DAG y el Ca^{2+} liberado del ER activan a las PKCs clásicas. Estas cinasas fosforilan a Orai1 en las S27/S30 reduciendo la entrada de Ca^{2+} operada por depósito.

En este trabajo se propone que la fosforilación de Orai1 por PKC en las S27/S30 facilitaría la internalización de Orai1 y el acercamiento de este canal al IP_3R , además de que se activaría una entrada de Ca^{2+} que probablemente no depende de STIM1, sino únicamente de la fosforilación por la PKC. La interacción Orai1- IP_3R reduciría fuertemente la actividad del IP_3R , inhibiendo la liberación de Ca^{2+} del ER; este efecto podría ser un nuevo papel fisiológico de Orai1 para limitar el excesivo vaciamiento de Ca^{2+} del ER. Adicionalmente, el agonista podría favorecer la interacción de Orai1 con el $\text{IP}_3\text{R1}$ o el $\text{IP}_3\text{R2}$ con la participación de otras cinasas que podrían fosforilar a Orai1 en residuos diferentes a las S27/S30 (ver MS3). En el caso de la histamina, se llevaría a cabo un mecanismo similar, pero este agonista podría estar activando a PKCs dependientes de DAG como un mecanismo tardío e incluso a otras cinasas diferentes a las PKCs que requerirían Ca^{2+} para su activación.

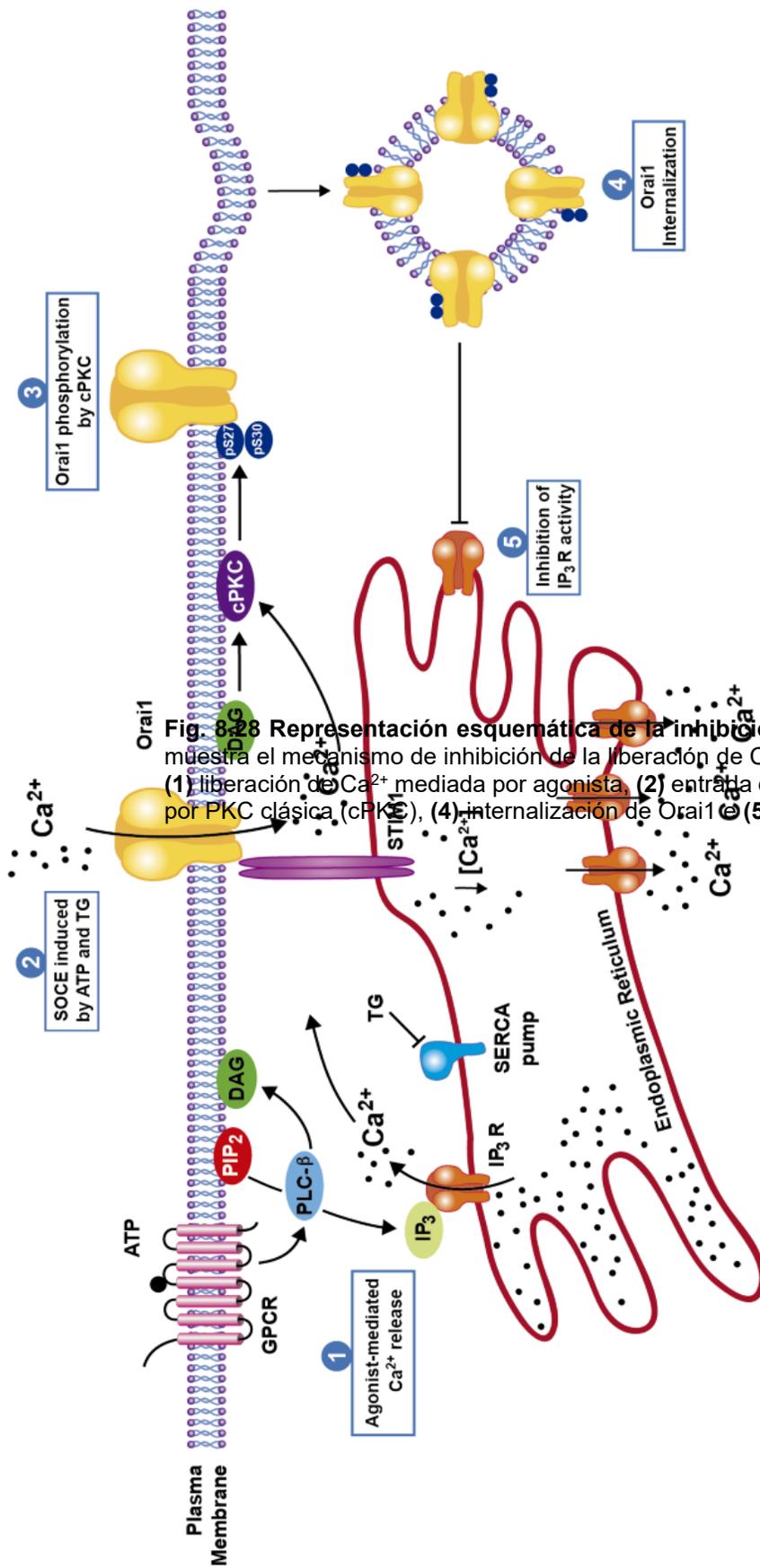


Fig. 8-28 Representación esquemática de la inhibición en la liberación de Ca^{2+} del ER muestra el mecanismo de inhibición de la liberación de Ca^{2+} del ER. El círculo azul muestra el orden de los eventos: (1) liberación de Ca^{2+} mediada por agonista, (2) entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE) inducida por PKC clásica (cPKC), (3) fosforilación de Orai1 por cPKC, (4) internalización de Orai1 y (5) inhibición de la actividad del IP_3R .

9. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este trabajo han mostrado dos eventos importantes: un incremento en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP y TG, el cual no fue reproducido al emplear histamina y TG, así como una fuerte inhibición en la liberación de Ca^{2+} que puede ser inducida tanto por la combinación de ATP y TG como por histamina y TG, en presencia de Ca^{2+} externo (1.8 mM). El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ requiere de un canal Orai1 funcional ya que la dominante negativa de Orai1 (O1-E106A) no incrementó el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$, mientras que la inhibición en la liberación de Ca^{2+} parece ser un evento que requiere a Orai1 como proteína más que como un canal funcional, sugiriendo un papel adicional para Orai1 al ya bien establecido como canal altamente selectivo por Ca^{2+} .

Kawasaki et al. (2010) reportaron que la PKC β puede fosforilar a Orai1 en los residuos de aminoácidos S27 y S30 y así reducir SOCE. Con base en estos datos, se estudió la importancia de emplear tanto un agonista que produce IP₃ y DAG, como un bloqueador de la bomba SERCA (TG). El DAG es un segundo mensajero que activa a las cPKCs y nPKCs, mientras que la TG produce un fuerte vaciamiento del ER. En este trabajo estudiamos si la fosforilación del canal Orai1 por PKC en los residuos de S27 y S30 podría también regular negativamente la liberación de Ca^{2+} del ER. Para dilucidar este escenario, se realizaron dos mutaciones puntuales para obtener una proteína que mimetizara un canal Orai1 permanentemente fosforilado, Orai1-S27D/S30D (O1-DD).

Nuestros datos han mostrado que la sobreexpresión de O1-DD inhibe fuertemente la liberación de Ca^{2+} del ER como lo hace el canal Orai1 silvestre (O1-wt). Sin embargo, O1-DD no incrementó el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ como se observó con la sobreexpresión de O1-wt y la mutante O1-S27A/S30A (O1-AA) (Martínez-Martínez 2016), lo que sugiere que los residuos de S27 y S30 también modulan la actividad de canal de Orai1 permitiendo la entrada de Ca^{2+} . Nosotros proponemos que este incremento del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ se debe a una mayor entrada de Ca^{2+} ya que la mutante Orai1-S27A/S30A-E106A (O1-AA-E106A) que no puede ser fosforilada por PKC y tampoco tiene actividad como canal, mostró un

transitorio de Ca^{2+} similar a las células *mock*. Además, proponemos que esta entrada de Ca^{2+} podría ser independiente de STIM1. Aunque STIM1 es el mecanismo más común para activar a Orai1, existen reportes utilizando tumores mamarios o en la línea celular epitelial de mama SCp2, donde observaron que SPCA2 (una bomba de calcio de la vía secretora) es capaz de activar a Orai1 e incrementar SOCE de forma independiente de la actividad de STIM1 (Cross et al. 2013; Feng et al. 2010).

Interesantemente, el inhibidor generalizado de PKC (Gö 6983) no modificó significativamente la reducción de la liberación de Ca^{2+} del ER ni el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ATP y TG, lo que sugiere que el incremento en la entrada de Ca^{2+} depende de la actividad de PKC. Con el propósito de estudiar si la inhibición en la liberación de Ca^{2+} del ER y el incremento en el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado al sobreexpresar O1-wt podría ser un mecanismo fisiológico, se realizaron experimentos en células sin transfectar, las cuales fueron incubadas por 2 h con el inhibidor Gö 6983. Cuando las células fueron estimuladas únicamente con el agonista, observamos un vaciamiento de Ca^{2+} que no se reproduce en las células control, por lo que proponemos que, al inhibir la actividad de las PKC, el canal Orai1 no puede ser fosforilado, ocasionando que no se inhiba eficientemente la actividad del IP_3R , lo que facilitaría la liberación de Ca^{2+} del ER.

Además, se mostró que la activación de las PKCs con PDBu permite ver una liberación de Ca^{2+} más lenta y un transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con una tendencia a estar reducido respecto a las células control. Inesperadamente, SOCE incrementó cuando se activó a las PKCs con PDBu; este último dato parece ser específico de la línea celular HeLa, ya que se ha reportado que dependiendo del tipo celular y las condiciones experimentales, la fosforilación de PKC puede incrementar o disminuir la entrada de Ca^{2+} operada por depósito (Camello et al. 1999; Hooper et al. 2015; Kawasaki et al. 2010). Esta mayor entrada de Ca^{2+} podría ser explicada como una participación de PKC en la actividad de otros canales; por ejemplo los TRPC3 (Woodard et al. 2010).

Debido a que la actividad de fuga de Ca^{2+} del ER revelado por la TG podría estar oscureciendo la inhibición en la liberación de Ca^{2+} por PDBu, se procedió a evaluar a las células estimuladas solo con el agonista en ausencia de Ca^{2+} extracelular. El transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue fuertemente suprimido, por lo que proponemos que activar a PKC con PDBu favorece la fosforilación de Orai1, facilitando que Orai1 bloquee fuertemente la actividad del IP_3R , suprimiendo casi completamente la liberación de Ca^{2+} del ER. La estimulación únicamente con ATP en un medio sin Ca^{2+} no nos permitió inducir SOCE, quizá porque el vaciamiento de Ca^{2+} del ER no es tan eficiente como al emplear la TG, que al bloquear la actividad de la bomba SERCA permite una mejor formación de los agregados de STIM1, provocando una fuerte entrada de Ca^{2+} a través de los canales Orai1 reclutados (Ahmad et al. 2022; Liou et al. 2005; Ong et al. 2015).

En ausencia de Ca^{2+} externo, la mutante O1-DD únicamente mostró una tendencia a reducir el transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mientras que la liberación de Ca^{2+} del ER fue similar entre las células que fueron transfectadas con la mutante O1-DD y las células transfectadas con el plásmido *mock*, lo que sugiere que es necesario un medio con Ca^{2+} extracelular para reproducir los efectos en el citoplasma y en el ER que hemos observado al sobreexpresar el canal O1-wt. Basándonos en estos datos proponemos que las S27/S30 no son suficientes para explicar estos hallazgos. La participación del Ca^{2+} podría ser indirecta o directamente sobre el IP_3R debido a que otras proteínas que unen Ca^{2+} participan en la regulación del IP_3R , modulando su actividad (Foskett and Mak 2010). Otra explicación podría ser que el Ca^{2+} es necesario si Orai1 estuviera estabilizando al IP_3R cuando este canal entra al estado inactivo, el cual requiere una elevación sustancial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Rossi et al. 2021; Taylor and Tovey 2010).

Los ensayos de sensibilidad al IP_3 mostraron que Orai1 no está cambiando significativamente la sensibilidad del IP_3R por su agonista IP_3 . Sin embargo, ensayos de FRET entre Orai1 y el IP_3R mostraron la importancia del Ca^{2+} , el cual también es un agonista del IP_3R . En este trabajo mostramos que la señal de FRET incrementó únicamente cuando las células fueron estimuladas con ATP y TG en un medio suplementado con Ca^{2+} , lo que sugiere que se requiere un fuerte vaciamiento

del ER provocado por la TG y los segundos mensajes IP₃ y DAG producidos por el agonista. Además, al evaluar la colocalización entre el IP₃R y Orai1, así como entre el IP₃R y las mutantes de Orai1 (O1-AA y O1-DD), observamos un incremento en el coeficiente de Manders cuando se expresó la mutante fosfomimética O1-DD, lo que sugiere que las S27/S30 podrían estar modificando el tráfico vesicular del canal Orai1, el cual depende tanto del lado N como del lado C terminal de Orai1 (Hodeify et al. 2015, 2021; Yu et al. 2009).

En este trabajo se ha reportado que expresar la mutante O1-DD reduce el transitorio de [Ca²⁺]_i cuando las células fueron estimuladas solo con el agonista ATP en un medio suplementado con Ca²⁺ extracelular, por lo que se sugiere que una pequeña fracción del canal Orai1 podría interactuar con el IP₃R en condiciones de reposo, reduciendo la respuesta inicial estimulada por ATP. El inhibir la actividad del IP₃R a través de Orai1 tendría relevancia fisiológica debido a que Orai1 podría facilitar el mantenimiento del estado estacionario de Ca²⁺ del ER de dos formas: la primera, como canal permitiendo la entrada de Ca²⁺ del espacio extracelular al citoplasma, y la segunda al evitar que el depósito se vacíe excesivamente.

Empleando ensayos de inmunoprecipitación Woodard et al. (2010) reportaron que tanto Orai1 y el IP₃R1, como Orai1 y el IP₃R2, muestran una mayor interacción cuando las células HeLa y HEK-293 fueron estimuladas con TG o con agonistas en un medio con Ca²⁺. Sin embargo, no se explicó la relevancia de la interacción Orai1-IP₃R en los flujos de Ca²⁺ del citoplasma y del ER, así como la importancia del agonista empleado para vaciar el ER. En este trabajo logramos reproducir estos datos estimulando a las células con la combinación de ATP y TG y mostramos que las S27/S30 son necesarias, pero no suficientes, para poder modular la interacción entre Orai1 y el IP₃R. Esto se deriva de los resultados donde las mutantes O1-AA y O1-DD fueron sensibles al agonista, lo que en un principio no se esperaba si la fosforilación de los residuos S27/S30 fuera la única condición requerida para explicar la interacción de Orai1 y el IP₃R.

Los datos mostraron que el vaciamiento del depósito con ATP y la TG incrementó la interacción entre Orai1 y el IP₃R2. Sin embargo, el IP₃R1 no mostró

ninguna diferencia debido al estímulo; esto podría deberse a que antes del estímulo, esta señal ya se encontraba elevada. Ambas isoformas del IP₃R incrementaron su interacción en células transfectadas con el canal Orai1, sin que se observara alguna diferencia significativa por acción del ATP y la TG. Inesperadamente, observamos que el agonista incrementó la señal en células transfectadas con la mutante O1-DD y fue el caso contrario para la mutante O1-AA, puesto que la señal se redujo con los agonistas. Para corroborar estos datos, se realizaron ensayos de ligación por proximidad (PLA) entre Orai1 y el IP₃R2, los resultados obtenidos concordaron con los ensayos de inmunoprecipitación, mostrando la relevancia de las S27/S30 en la interacción de Orai1 tanto con IP₃R1 como con IP₃R2.

La diferencia en la interacción que hay entre Orai1-IP₃R1 y Orai1-IP₃R2 podría ser debida a que en células HeLa el IP₃R1 constituye más del 50 % del total de los IP₃Rs (Hattori et al. 2004; Ivanova et al. 2014), lo que podría oscurecer el efecto del estímulo y en estas condiciones solo podemos ver un incremento al sobreexpresar Orai1. La sensibilidad que mostraron las mutantes O1-AA y O1-DD por el agonista, evidencia que no son suficientes las S27/S30 para explicar la interacción que hay entre este canal y el IP₃R. Debido a que Orai1 tiene muchos residuos posibles de fosforilación (consultar el sitio PhosphoSitePlus; ORAI1 human; mouse; rat), es factible pensar que hay otros residuos que modulan la interacción Orai1-IP₃R, los cuales podrían depender de cinasas que requieren del Ca²⁺ para su activación.

En este trabajo mostramos por primera vez que las S27/S30 tendrían un papel en el tráfico vesicular de Orai1. Con ensayos de microscopía confocal reportamos que la mutante mCherry-O1-DD se encuentra más internalizada que las construcciones mCherry-O1-wt y mCherry-O1-AA. Aunque, no tenemos evidencia de que haya una mayor colocalización entre mCherry-O1-DD y el indicador de ER (ER-Tracker), por lo que pensamos que los efectos que hemos visto en el citoplasma y el ER no se explican por una deslocalización de la mutante mCherry-O1-DD. Hodeify et al. (2021) reportaron que tanto el extremo N como el C terminal participan en la residencia de Orai1 en la membrana plasmática, por lo que es plausible pensar que las S27/S30, que están en el extremo N terminal de Orai1,

podrían participar en la regulación del tiempo de residencia de este canal en la membrana plasmática.

Para evaluar la participación de las S27/S30 en el tráfico vesicular, se realizó un curso temporal del cambio de fluorescencia entre los canales Orai1 después de estimular a las células con ATP y TG. Nuestros datos mostraron que únicamente la mutante mCherry-O1-DD incrementó su fluorescencia después de estimular a las células, por lo que hemos propuesto que el canal fosfomimético está más internalizado, además cuando el Ca^{2+} se libera del ER, O1-DD comienza a movilizarse con mayor facilidad a la membrana del ER para bloquear la actividad del IP_3R , aunque por la remoción que presentaron las células transfectadas con O1-DD no descartamos que también se pueda movilizar hacia la membrana plasmática puesto que este canal también puede reconstituir SOCE de magnitud similar a la del O1-wt.

Con ensayos de SOCE realizados en células transfectadas con el plásmido *mock* o únicamente con STIM1, así como en células cotransfectadas con los canales Orai1 y STIM1, mostramos que la liberación de Ca^{2+} inducida por TG no fue modificada en ninguna condición. La respuesta de SOCE incrementó significativamente al cotransfectar STIM1 y Orai1, así como por STIM1 y O1-AA. En el caso de O1-DD y STIM1, la entrada de Ca^{2+} mostró solo una pequeña disminución, lo que en un principio no se esperaba puesto que al estar el canal fosfomimético más internalizado, era previsible que SOCE estuviera sustancialmente disminuida. Sin embargo, el ajuste no lineal al curso temporal de la entrada de calcio no mostró ninguna diferencia en la velocidad de SOCE. Ensayos de western blot que no se muestran en este trabajo, sugieren que O1-DD se expresa hasta 24 % más que la mutante O1-AA, por lo que se propone que las célula podrían expresar más proteína como un mecanismo compensatorio para mantener ~40 % del canal Orai1 que regularmente se encuentra en la membrana plasmática en condiciones de reposo (Hodeify et al. 2015). Este mecanismo podría ayudar a que SOCE no sea fuerte suprimida al cotransfectar O1-DD y STIM1.

En este trabajo hemos mostrado que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la TG en ausencia de Ca^{2+} externo fue muy similar entre Orai1 y sus mutantes. Sin embargo, la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo incrementó de forma significativa. Por lo que, se propone que al sobreexpresar Orai1 y STIM1, estas proteínas podrían estar liberando Ca^{2+} de depósitos intracelulares incrementando la $[Ca^{2+}]_i$ (Dickson et al. 2012; Zbidi et al. 2011). En el caso de las células transfectadas con el canal O1-DD y STIM1, la $[Ca^{2+}]_i$ basal fue mayor que al expresar O1-wt y STIM1 u O1-AA y STIM1, esto podría deberse a que el canal fosfomimético se encuentra más internalizado, lo que favorece su residencia en membranas de depósitos intracelulares, liberando Ca^{2+} al citoplasma probablemente de depósitos ácidos como ya ha sido reportado en células PC12 y plaquetas humanas (Dickson et al. 2012; Zbidi et al. 2011).

Los datos de este trabajo, sugieren que las S27/S30 son necesarias, pero no suficientes, para permitir la interacción entre Orai1 y el IP_3R . Además, hemos mostrado que estos canales cambiaron el comportamiento de las oscilaciones de Ca^{2+} en solución salina con Ca^{2+} al estimular a las células únicamente con ATP. Estos datos son relevantes debido a que aportan evidencia de que la sobreexpresión de O1-wt podría estabilizar al IP_3R en su conformación inactivada, cambiando el tipo de oscilaciones de híbridas (oscilaciones montadas en una respuesta transitoria) a puramente oscilaciones. El canal O1-AA incrementó la moda de la frecuencia de las oscilaciones híbridas que se observaron en las células transfectadas con el plásmido *mock*. El canal O1-DD mostró un efecto contrario a O1-AA puesto que redujo la frecuencia de las oscilaciones. Ya que la frecuencia de las oscilaciones tiene un correlato claro con el nivel de IP_3 y por tanto con el número de IP_3R involucrados (Thomas et al. 1996), se propone que la fosforilación de Orai1 y su actividad como inhibidor del IP_3R podría ser un evento fisiológico que limitaría la excesiva liberación de Ca^{2+} del ER.

El ATP desencadena una vía de señalización para liberar Ca^{2+} que comparte similitudes con la vía de señalización desencadenada por la histamina, aunque hay reportes que sugieren que la histamina produce poco IP_3 comparado con otros agonistas (van der Wal et al. 2001). Así mismo, la histamina puede incrementar su producción de DAG por otros vías que no requieren hidrolizar PIP_2 (Oprins et al.

2002). Nuestros datos han mostrado que Orai1 puede inhibir la liberación por Ca^{2+} inducida tanto por ATP y TG como por histamina y TG. Sin embargo, hemos observado que el mecanismo de inhibición entre estos dos agonistas muestra diferencias, por lo que estudiamos algunas de sus características más relevantes.

Nosotros ya hemos reportado que al incubar a las células con un inhibidor de PKCs dependientes de Ca^{2+} (Gö 6976) no se abate la inhibición de la liberación de Ca^{2+} a través de Orai1 (Martínez-Martínez 2016) cuando las células fueron estimuladas con histamina y TG. En el presente trabajo, se ha mostrado que al inhibir a las PKCs con Gö 6983, el cual es un inhibidor más generalizado que bloquea tanto a las PKCs dependiente de Ca^{2+} como a las PKCs activadas por DAG, seguimos observando inhibición en el vaciamiento de Ca^{2+} de ER vía O1-wt, por lo que proponemos que la histamina además de activar a cPKCs y nPKCs podría activar otras cinasas dependientes de Ca^{2+} .

En adición a las anteriores observaciones, hemos reportado que al incubar a las células por 2 h con Gö 6983 se produjo un vaciamiento marginal al estimular a las células solo con histamina, por lo que se propone que la histamina está activando a otras cinasas que estarían reduciendo la liberación de Ca^{2+} del ER, lo que sugiere que de forma fisiológica Orai1 podría estarse uniendo al IP_3R y bloqueando su actividad. Una diferencia relevante que hemos encontrado entre estos dos agonistas es que la histamina puede inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER en un medio sin Ca^{2+} si se activa a las PKCs con PDBu, mientras que para la inhibición observada con ATP es imprescindible la participación del Ca^{2+} , lo que sugiere que la histamina podría depender sustancialmente de la actividad de PKCs nuevas, que son activadas solo con DAG para bloquear la actividad del IP_3R , además del papel que PKC tiene directamente sobre la actividad del IP_3R (Bartlett et al. 2015; Isakov 2018; Mikoshiba 2015; Montero et al. 2003).

El incubar a las células por 10 min con un activador de PKC (PDBu) que mimetiza al DAG, mostró que, al estimular a las células solo con histamina, la participación de las PKC nuevas es la más relevante. Esto fue evidente ya que la liberación de Ca^{2+} del ER fue reducida significativamente cuando se estimuló a las

células con histamina en un medio sin Ca^{2+} extracelular. Sin embargo, esta reducción inducida por PDBu no fue reproducible al estimular a las células con ATP. Adicionalmente, se ha mostrado que sin importar si las células fueron estimuladas con histamina o con histamina y TG, la liberación de Ca^{2+} del ER fue más lenta cuando las células fueron incubadas con PDBu. El transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también fue fuertemente suprimido debido a la acción de PDBu, lo que aporta evidencia de que PKC regula tanto el vaciamiento del Ca^{2+} del ER como el transitorio de Ca^{2+} intracelular. En este trabajo se ha propuesto que la PKC regula los flujos de Ca^{2+} del citoplasma y del ER debido a que al fosforilar a Orai1 en las S27/S30, este canal puede estabilizar al IP_3R en su estado inactivado.

Nuestros datos han mostrado que las S27/S30 tienen un papel relevante tanto al estimular a las células con el ATP como con la histamina, debido a que la mutante O1-DD es capaz de inhibir la liberación de Ca^{2+} del ER cuando las células fueron estimuladas en un medio con Ca^{2+} extracelular. Sin embargo, al inhibir a las PKC con Gö 6983 y expresar la mutante O1-DD, se facilitó la liberación de Ca^{2+} , lo que sugiere que hay una participación adicional por cPKCs y/o nPKCs cuyo blanco es diferente a las S27/S30. En un experimento exploratorio de coimmunoprecipitación entre el IP_3R y los diferentes canales de Orai1, hemos mostrado que el $\text{IP}_3\text{R}2$ mostró ser más sensible al estímulo de histamina y TG que el $\text{IP}_3\text{R}1$, consistente con lo observado al estimular a las células con ATP y TG. En estos ensayos se observó que tanto la mutante O1-AA y O1-DD incrementaron su interacción con el $\text{IP}_3\text{R}1$ y el $\text{IP}_3\text{R}2$ después de ser estimuladas con histamina y TG, lo que sugiere que la histamina podría prender una nPKC cuyo blanco no es interferido por las mutaciones en las S27/S30. Es posible que estas serinas se encuentren en el extremo C terminal que también participa en el tráfico vesicular de Orai1 (Hodeify et al. 2015, 2021).

Todos estos datos se han conceptualizado como a continuación se menciona: el vaciamiento de Ca^{2+} del ER inducido ya sea por ATP y TG o histamina y TG, activa a las PKCs clásicas, las cuales depende de Ca^{2+} y DAG, así como a las PKC nuevas que dependen solamente de DAG para su activación, lo que permite que Orai1 sea fosforilado en las S27/S30. En el este trabajo se propone que estas

fosforilaciones internalizan al canal que se encuentra en la membrana plasmática, permitiendo su acercamiento al IP₃R que se encuentra en la membrana del ER; la interacción Orai1-IP₃R inhibiría la liberación de Ca²⁺ del ER. Con base en nuestros datos en ausencia de Ca²⁺, se propone que Orai1 pudiese estar estabilizando al IP₃R en su estado inactivo (Fig. 8.28).

Nuestro modelo de trabajo aporta información nueva para encontrar una razón plausible para que solo en mamíferos se expresen una isoforma de Orai1 α larga (Sanchez-Collado et al. 2019), la cual cuenta con 63 residuos adicionales en el extremo N terminal comparada con la isoforma corta Orai1 β (Fukushima et al. 2012); la relevancia de los dominios adicionales en Orai1 α han comenzado a dilucidarse en los últimos años (Zhang et al. 2019), pero aún falta mucha investigación. Nosotros proponemos que la isoforma larga de Orai1 (Orai1 α) requiere de las S27/S30 para tener una señal que le permita internalizarse y acercarse de la membrana plasmática a la membrana del ER, para así bloquear la actividad del IP₃R y evitar una excesiva liberación de Ca²⁺ del ER (Fig. 8.28).

Alterar el estado estacionario de Ca²⁺ dentro del ER, ya sea por mutaciones en Orai, STIM o el IP₃R está asociado a diferentes enfermedades con un amplio espectro de síntomas (Conte et al. 2021; Feske 2019; Hisatsune and Mikoshiba 2017; Ivanova et al. 2014; Silva-Rojas, Laporte, and Böhm 2020; Terry et al. 2020), por lo que una fina regulación de la dinámica de Ca²⁺ resulta muy relevante en diferentes enfermedades humanas. Nuestros datos aportan información relevante sobre otra función de Orai1 que también participa en la dinámica de Ca²⁺ del citoplasma y del ER, por lo que resulta interesante conocer la relevancia de las S27/S30 de Orai1 en otros modelos celulares que tiene porcentajes de expresión variadas de las tres isoformas del IP₃R (Ivanova et al. 2014).

10. CONCLUSIONES

La inhibición de la liberación de Ca^{2+} del ER a través de Orai1 requiere del Ca^{2+} extracelular cuando las células fueron estimuladas con ATP y TG.

La histamina es un agonista que puede activar fuertemente a las PKC dependientes de DAG, por lo que la inhibición de la liberación de Ca^{2+} del ER a través de Orai1 se puede observar en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

La activación de la PKC participa en la inhibición de la liberación de Ca^{2+} del ER, así como en una mayor entrada de Ca^{2+} extracelular, lo que sugiere que PKC además de fosforilar las S27/S30 tiene otros blancos que regulan los flujos de Ca^{2+} .

La fosforilación de Orai1 en las S27/S30 por la PKC permite que este canal se pueda internalizar, cambiando su ubicación de la membrana plasmática a una más cercana a la del ER, donde reside el IP_3R y así facilitar su inactivación.

La internalización de Orai1 facilita su interacción con el IP_3R , lo que estabiliza a este canal en su estado inactivo, el cual es alcanzado debido a un incremento sustancial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Orai1 además de participar como canal de Ca^{2+} , también participa como inhibidor de la liberación de Ca^{2+} del ER, teniendo un papel dual que favorece el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} del ER.

11. PERSPECTIVAS

Determinar qué cinasa estaría participando en la inhibición de la liberación de Ca^{2+} activada por histamina.

Determinar si el canal O1-DD únicamente puede inactivar al IP_3R una vez que el Ca^{2+} induce que el IP_3R entre al estado inactivado.

Determinar si las S27/S30 podrían modificar las oscilaciones de Ca^{2+} en un medio en alto K^+ donde las PKCs sean activadas por PDBu.

Estudiar la región rica en serinas que se encuentra en el extremo C terminal del canal Orai1 y su importancia en la liberación de Ca^{2+} del ER.

Estudiar si la interacción entre STIM1 y Orai1 es modificada por las mutantes O1-AA y O1-DD.

12. MATERIAL SUPLEMENTARIO

```

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
801 ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC 900
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
19  -----GCAGAGC 25
      *

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
901 TCGTTTAGTGAAACCGTCAGAAITAAACCATGGACTACAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAAGCTTG 1000
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
26  TCGTTTAGTG-ACCGTCAGAAITAAACCATGGACTACAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAAGCTTG 124
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
1001 CGGCCGCGAATTCcatgcatccggagcccgccccgccccgagccgcagcagtcctccccaagcggcggcagcaccaccagcggcGCccgccc 1100
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
125 CGGCCGCGAATTCATGCTCCGGAGCCCGCCCCGCCCCGAGCCGCGAGCTCCCGAGCTTCCCCCAAGCGGCGGCGAGCACCACCAGCGGGGACCCGCGC 224
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
1101 gGCccgcccgcagcggggacggggagccccgggggccccgccaccgcccgcctccgcccgcctccctaccggactggatcggccagagttactccgag 1200
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
225 GGCccgcccgcagcggggacggggagccccgggggccccgccaccgcccgcctccgcccgcctccctaccggactggatcggccagagttactccgag 324
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
1201 gtgatgagcctcaacgagcactccatgacaggcgctgctctggcgcaagctctacttgagccgcgccaagccttaaagcctccagccggacctcggtctg 1300
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
325 GTGATGAGCCTCAACGAGCACTCCATGCGAGGCGCTGCTCCTGGCGCAAGCTCTACTTTGAGCCGCGCCAAGCTTAAAGCCTCCAGCCGGACCTCGGCTCTGC 424
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
1301 tctccggcttcgccatggtggcaatggtggagggtgacgctggacgctgaccacgactaccaccgggctgctcatcgccctcagtgctcaccacagt 1400
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
425 TCTCCGGCTTCGCCATGTTGGCAATGTTGGAGGTGCAGCTGGACGCTGACCACGACTACCCACGGGGCTGCTCATCGCCTTCAGTGCCTGCACCACAGT 524
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  
```

MS1. Alineación de la secuencia de nucleótidos de las mutantes Orai1 S27D/S30D y Orai1 S27A/S30A. El recuadro rojo muestra el cambio de nucleótidos que se realizó para obtener una mutante Orai1 S27D/S30D a partir de la mutante Orai1 S27A/S30A (GCC → GAC).

Tabla suplementaria 1. Tabla comparativa de los inhibidores selectivos de PKC, Gö 6983 y Gö 6976. Los valores de IC₅₀ muestran que el Gö 6976 y Gö 6983 inhiben diferentes isoformas de PKC en el orden nM.

Inhibidor	IC ₅₀	Isoformas
Gö 6976	2.3 nM	PKC _α
	6.2 nM	PKC _{β1}
	20 nM	PKC _μ
Gö 6983	7 nM	PKC _α
	7 nM	PKC _{β1}
	6 nM	PKC _γ
	10 nM	PKC _δ
	60 nM	PKC _ζ
	20 μM	PKC _μ

(Martiny-Baron et al., 1993; Gschwendt et al., 1996; Young et al., 2005)

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1001 CGGCCGCGAATTCCatgcatccggagcccgccccgccccgagccgcagcagtcgccgagcttcccccaagcggcggcagcaccaccagggcGCccgccg 1100
      |
249 CGGCCGCGAATTCCATGCATCCGGAGCCCGCCCGCCCGAGCCGCAGCAGTCCCGAGCTTCCCCAAGCGGCGGCAGCACCCAGCGGGCCCGCCG 348
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1101 gGCccgcccgcagcggggacggggagccccgggggccccgccaccgcgcgctccgccgtcacctaccggactggatcggccagagtactccgag 1200
      |
349 GSCCCGCGCCCGCAGCGGGGACGGGGAGCCCCGGGGCCCGCCACCGCCCGCTCCGCCGTACCTACCCGGACTGGATCGGCCAGAGTTACTCCGAG 448
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1201 gtgatgagcctcaacgagcactccatgcaggcgtgtcctggcgcaagctctacttgagccgcgccaagcttaaagcctccagccggacctcggctctgc 1300
      |
449 GTGATGAGCCTCAACGAGCACTCCATGCAGGCGCTGTCTTGCGCAAGCTCTACTTGAGCCGCGCCAAGCTTAAAGCCTCCAGCCGGACCTCGGCTCTGC 548
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1301 tctccggttcgccatggtggcaatggtgaggtgcagctggacgtgaccacgactaccaccggggctgctcatcgctcagtcctgcacc-acag 1399
      |
549 TCTCCGGCTTCGCCATGGTGGCAATGGTGGCCGTGCAGCTGGACGCTGACCACGACTACCCACCGGGGCTGCTCATCGCCTTCAGTGCCTGCACCCACAG 648
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1400 tgctggtggctgtgcacctgtttgcgctcatgatcagcacctgcatcctgcccacatcgaggcggtagcaacgtgcacaatctcaactcggtaagga 1499
      |
649 TGCTGGTGGCTGTGCACCTGTTTGCCTCATGATCAGCACCTGCATCCTGCCCAACATCGAGGCGGTGAGCAACGTGCACAATCTCAACTCGGTCAAGGA 748
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

MS2. Alineación de la secuencia de nucleótidos de la mutante Orai1 S27A/S30A_E106A. El recuadro rojo muestra el cambio de nucleótidos que se realizó para obtener una mutante Orai1 S27A/S30A-E106A a partir de la mutante Orai1 S27A/S30A.

>Sequence 301 amino acids

#

netphos-3.1b prediction results

#

#	Sequence	#	x	Context	Score	Kinase	Answer
---	----------	---	---	---------	-------	--------	--------

#

#	Sequence	10	S	APPPSRSSP	0.936	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	10	S	APPPSRSSP	0.514	GSK3	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	12	S	PPSRSSPEL	0.924	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	12	S	PPSRSSPEL	0.564	PKG	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#

#	Sequence	13	S	PSRSSPELP	0.998	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	13	S	PSRSSPELP	0.626	cdk5	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	13	S	PSRSSPELP	0.543	p38MAPK	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	---------	-----

#	Sequence	13	S	PSRSSPELP	0.503	GSK3	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	19	S	ELPPSGGST	0.947	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	19	S	ELPPSGGST	0.506	GSK3	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	22	S	PSGGSTTSG	0.655	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	22	S	PSGGSTTSG	0.507	cdc2	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	23	T	SGGSTTSGS	0.524	cdc2	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	25	S	GSTTSGSRR	0.782	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	25	S	GSTTSGSRR	0.628	PKC	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#	Sequence	25	S	GSTTSGSRR	0.559	cdc2	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	27	S	TTSGSRRSR	0.953	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	27	S	TTSGSRRSR	0.754	PKC	YES
---	-----------------	-----------	----------	------------------	--------------	------------	------------

#

#	Sequence	30	S	GSRRSRRRS	0.997	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	30	S	GSRRSRRRS	0.862	PKC	YES
---	-----------------	-----------	----------	------------------	--------------	------------	------------

#

#	Sequence	34	S	SRRRSGDGE	0.998	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	34	S	SRRRSGDGE	0.810	PKA	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#	Sequence	34	S	SRRRSGDGE	0.692	PKB	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#	Sequence	34	S	SRRRSGDGE	0.615	RSK	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#	Sequence	34	S	SRRRSGDGE	0.523	PKG	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#

#	Sequence	48	S	PPPPSAVTY	0.573	PKG	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#

#	Sequence	59	S	WIGQSYSEV	0.540	CKII	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	65	S	SEVMSLNEH	0.933	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	65	S	SEVMSLNEH	0.577	CKII	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	65	S	SEVMSLNEH	0.513	DNAPK	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-------	-----

#

#	Sequence	75	S	MQALSWRKL	0.960	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	75	S	MQALSWRKL	0.781	PKC	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#	Sequence	75	S	MQALSWRKL	0.527	cdc2	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#

#	Sequence	82	S	KLYLSRAKL	0.737	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	82	S	KLYLSRAKL	0.713	PKC	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	-----	-----

#

#	Sequence	89	S	KLKASSRTS	0.888	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	89	S	KLKASSRTS	0.511	cdc2	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

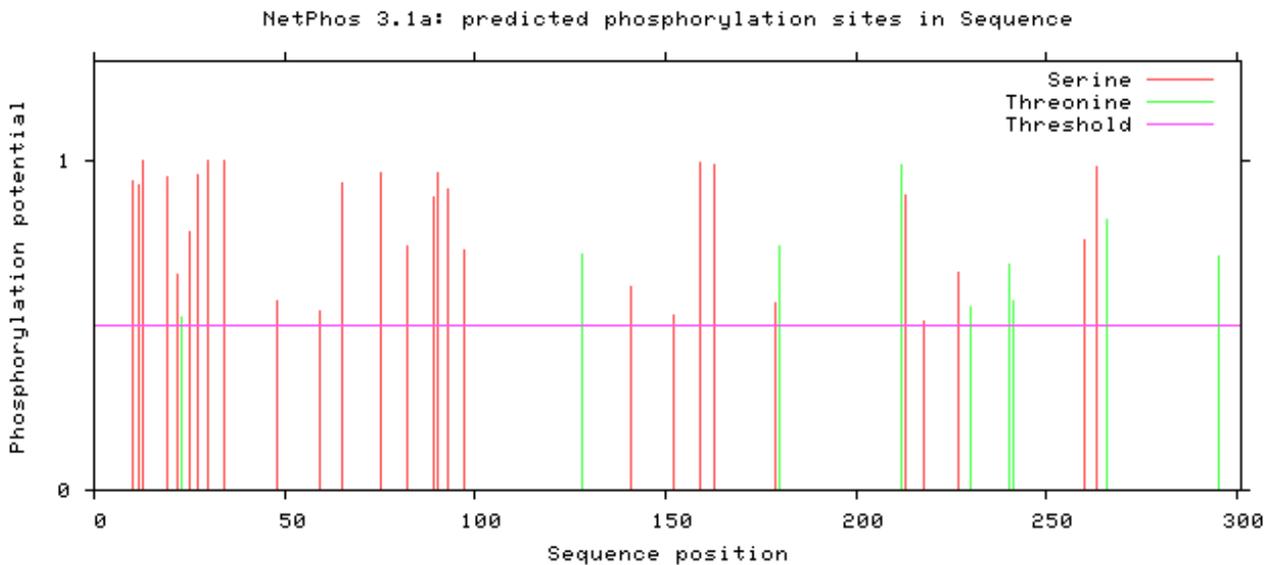
#

#	Sequence	90	S	LKASSRTSA	0.959	unsp	YES
---	----------	----	---	-----------	-------	------	-----

#	Sequence	90	S	LKASSRTSA	0.615	PKA	YES
#	Sequence	90	S	LKASSRTSA	0.534	cdc2	YES
#							
#	Sequence	93	S	SSRTSALLS	0.910	unsp	YES
#							
#	Sequence	97	S	SALLSGFAM	0.726	PKC	YES
#							
#	Sequence	128	T	SACTTVLVA	0.716	PKC	YES
#							
#	Sequence	141	S	ALMISTCIL	0.618	PKA	YES
#							
#	Sequence	152	S	IEAVSNVHN	0.532	cdc2	YES
#							
#	Sequence	159	S	HNLNSVKES	0.990	unsp	YES
#	Sequence	159	S	HNLNSVKES	0.883	PKC	YES
#							
#	Sequence	163	S	SVKESPHER	0.988	unsp	YES
#	Sequence	163	S	SVKESPHER	0.575	cdk5	YES
#	Sequence	163	S	SVKESPHER	0.522	CKII	YES
#	Sequence	163	S	SVKESPHER	0.510	PKG	YES
#	Sequence	163	S	SVKESPHER	0.506	GSK3	YES
#							
#	Sequence	179	S	AWAFSTVIG	0.565	cdc2	YES
#							
#	Sequence	180	T	WAFSTVIGT	0.739	PKC	YES
#	Sequence	180	T	WAFSTVIGT	0.579	unsp	YES
#							
#	Sequence	212	T	QPRPTSKPP	0.984	unsp	YES
#	Sequence	212	T	QPRPTSKPP	0.572	PKG	YES
#							
#	Sequence	213	S	PRPTSKPPA	0.893	unsp	YES
#	Sequence	213	S	PRPTSKPPA	0.512	PKG	YES
#							
#	Sequence	218	S	KPPASGAAA	0.508	cdc2	YES
#							
#	Sequence	227	S	NVSTSGITP	0.660	unsp	YES
#							
#	Sequence	230	T	TSGITPGQA	0.554	cdk5	YES
#	Sequence	230	T	TSGITPGQA	0.534	p38MAPK	YES
#							
#	Sequence	240	T	AIASTTIMV	0.684	PKC	YES
#							
#	Sequence	241	T	IASTTIMVP	0.573	unsp	YES
#							
#	Sequence	260	S	HFYRSLVSH	0.757	PKC	YES
#							
#	Sequence	263	S	RSLVSHKTD	0.979	unsp	YES
#	Sequence	263	S	RSLVSHKTD	0.661	PKC	YES
#							
#	Sequence	266	T	VSHKTDQRQF	0.817	PKC	YES
#	Sequence	266	T	VSHKTDQRQF	0.808	unsp	YES
#							
#	Sequence	295	T	DHPLTPGSH	0.707	cdk5	YES
#	Sequence	295	T	DHPLTPGSH	0.581	unsp	YES
#	Sequence	295	T	DHPLTPGSH	0.570	p38MAPK	YES
#	Sequence	295	T	DHPLTPGSH	0.514	GSK3	YES
#							

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAV	#	50
TYPDWIGQSYSEVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLIKASSRTSALLSGFA	#	100
MVAMVEVQLDADHDYPPGLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEA	#	150

VSNVHNLNSVKES	PHERMHRHIELAWAFSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFL	#	200
PLKKQPGQPRPTS	SKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIAS	#	250
IVFAVHFYRSLV	SHKTDQRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHY	#	300
A		#	350
%1S.SS.....S..ST.S.S..S...S.....S..	#	50
%1S.....S.....S.....S.....SS..S..S...	#	100
%1T.....S.....	#	150
%1	.S.....S..S.....ST.....	#	200
%1TS.....S.....S..T.....TT.....	#	250
%1S..S..T.....T.....	#	300
%1	.		



MS3. Predicción de los sitios de fosforilación de Orai1 determinados en NetPhos - 3.1.

El programa predice los sitios de fosforilación de la proteína Orai1 y asigna un valor a cada residuo de acuerdo a la probabilidad de que sean fosforilados, en esta lista se muestran los sitios de serina y treonina susceptibles a ser fosforilados con valores mayor a 0.5.

13. REFERENCIAS

- Abdullaev, Iskandar F., Jonathan M. Bisailon, Marie Potier, Jose C. Gonzalez, Rajender K. Motiani, and Mohamed Trebak. 2008. "Stim1 and Orai1 Mediate CRAC Currents and Store-Operated Calcium Entry Important for Endothelial Cell Proliferation." *Circulation Research* 23:1289–99.
- Ahmad, Moaz, Hwei Ling Ong, Hassan Saadi, Ga-Yeon Son, Zahra Shokatian, Lara E. Terry, Mohamed Trebak, David I. Yule, and Indu Ambudkar. 2022. "Functional Communication between IP3R and STIM2 at Subthreshold Stimuli Is a Critical Checkpoint for Initiation of SOCE." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(3):e2114928118.
- Albarran, Letizia, Jose J. Lopez, Nidhal Ben Amor, Francisco E. Martin-cano, Alejandro Berna-erro, Tarik Smani, Gines M. Salido, and Juan A. Rosado. 2016. "Dynamic Interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to Modulate Store- Operated Calcium Entry." *Scientific Reports* 6:24452.
- Ando, Hideaki, Katsuhiko Kawaai, Benjamin Bonneau, and Katsuhiko Mikoshiba. 2018. "Remodeling of Ca²⁺ Signaling in Cancer: Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors through Oncogenes and Tumor Suppressors." *Advances in Biological Regulation* 68:64–76.
- Bartlett, Paula J., Walson Metzger, Lawrence D. Gaspers, and Andrew P. Thomas. 2015. "Differential Regulation of Multiple Steps in Inositol 1,4,5-Trisphosphate Signaling by Protein Kinase C Shapes Hormone-Stimulated Ca²⁺ Oscillations." *The Journal of Biological Chemistry* 290(30):18519–33.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, and P. Lipp. 1998. "Calcium - a Life and Death Signal." *Nature* 395(6703):645–48.
- Bohórquez-Hernández, A., Enrico Gratton, Jonathan Pacheco, Alexander Asanov, and Luis Vaca. 2017. "Cholesterol Modulates the Cellular Localization of Orai1 Channels and Its Disposition among Membrane Domains." *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862:1481–90.
- Bollimuntha, Sunitha, Biswaranjan Pani, and Brij B. Singh. 2017. "Neurological and Motor Disorders: Neuronal Store-Operated Ca²⁺ Signaling: An Overview and Its Function." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 993:535–56.
- Bootman, Martin D., Katja Rietdorf, Tony Collins, Simon Walker, and Michael Sanderson. 2013. "Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging." *Cold Spring Harbor Protocols* (2):83–99.
- Bronner, Felix. 2001. "Extracellular and Intracellular Regulation of Calcium Homeostasis." *The Scientific World* 1:919–25.
- Byun, Minji, Avinash Abhyankar, Virginie Lelarge, Sabine Plancoulaine, Ayse Palanduz, Leyla Telhan, Bertrand Boisson, Capucine Picard, Scott Dewell, Connie Zhao, Emmanuelle Jouanguy, Stefan Feske, Laurent Abel, and Jean Laurent Casanova. 2010. "Whole-Exome Sequencing-Based Discovery of STIM1 Deficiency in a Child with Fatal Classic Kaposi Sarcoma." *The Journal of Experimental Medicine* 207(11):2307–12.
- Camello, C., J. A. Pariente, G. M. Salido, and P. J. Camello. 1999. "Sequential Activation of Different Ca²⁺ Entry Pathways upon Cholinergic Stimulation in Mouse Pancreatic Acinar Cells." *Journal of Physiology* 516(2):399–408.
- Chiu, P. J. .. S., G. Tetzloff, M. Chatterjee, and E. J. Sybertz. 1988. "Phorbol 12 , 13-Dibutyrate , an Activator of Protein Kinase C , Stimulates Both Contraction and Ca²⁺ Fluxes in Dog Saphenous Vein." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 338:114–20.
- Chong, Zhi Xiong, Swee Keong Yeap, and Wan Yong Ho. 2021. "Transfection Types , Methods and Strategies: A Technical Review." *PeerJ* 9:e11165.
- Cole, L., D. Davies, G. J. Hyde, and A. E. Ashford. 2000. "ER-Tracker Dye and BODIPY-Brefeldin A

- Differentiate the Endoplasmic Reticulum and Golgi Bodies from the Tubular-Vacuole System in Living Hyphae of *Pisolithus Tinctorius*." *Journal of Microscopy* 197(3):239–48.
- Conte, Elena, Paola Imbrici, Paola Mantuano, Maria Antonietta Coppola, Giulia Maria Camerino, Annamaria De Luca, and Antonella Liantonio. 2021. "Alteration of STIM1/Orai1-Mediated SOCE in Skeletal Muscle: Impact in Genetic Muscle Diseases and Beyond." *Cells* 10:2722.
- Cross, Brandie M., Anniesha Hack, Timothy A. Reinhardt, and Rajini Rao. 2013. "SPCA2 Regulates Orai1 Trafficking and Store Independent Ca²⁺ Entry in a Model of Lactation." *PLoS ONE* 8(6):e67348.
- Decuyper, Jean Paul, Giovanni Monaco, Santeri Kiviluoto, Masatsugu Oh-hora, Tomas Luyten, Humbert De Smedt, Jan B. Parys, Ludwig Missiaen, and Geert Bultynck. 2010. "STIM1, but Not STIM2, Is Required for Proper Agonist-Induced Ca²⁺ Signaling." *Cell Calcium* 48:161–67.
- Dickson, Eamonn J., Joseph G. Duman, Mark W. Moody, Liangyi Chen, and Bertil Hille. 2012. "Orai-STIM-Mediated Ca²⁺ Release from Secretory Granules Revealed by a Targeted Ca²⁺ and PH Probe." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(51):E3539–48.
- van Dorp, Stijn, Ruoyi Qiu, Ucheor B. Choi, Minnie M. Wu, Michelle Yen, Michael Kirmiz, Axel T. Brunger, and Richard S. Lewis. 2021. "Conformational Dynamics of Autoinhibition in the ER Calcium Sensor STIM1." *ELife* 10:e66194.
- Emrich, Scott M., Ryan E. Yoast, Ping Xin, Vikas Arige, Larry E. Wagner, Nadine Hempel, Donald L. Gill, James Sneyd, David I. Yule, and Mohamed Trebak. 2021a. "Omnitemporal Choreographies of All Five STIM/Orai and IP3Rs Underlie the Complexity of Mammalian Ca²⁺ Signaling." *Cell Reports* 34(9):108760.
- Fahrner, M., R. Schindl, and C. Romanin. 2018. *Studies of Structure-Function and Subunit Composition of Orai/STIM Channel*.
- Fahrner, Marc and Christoph Romanin. 2021. "The Many States of STIM1." *ELife* 10:e75174.
- Fasolato, Cristina, Michela Zottini, Emilio Clementi, Daniele Zacchetti, Jacopo Meldolesi, and Tullio Pozzan. 1991. "Intracellular Ca²⁺ Pools in PC12 Cells. Three Intracellular Pools Are Distinguished by Their Turnover and Mechanisms of Ca²⁺ Accumulation, Storage, and Release." *The Journal of Biological Chemistry* 266(30):20159–67.
- Fein, David E., Robert Bucki, Fitzroy Byfield, Katarzyna Leszczynska, Paul A. Janmey, and Scott L. Diamond. 2010. "Novel Cationic Lipids with Enhanced Gene Delivery and Antimicrobial Activity." *Molecular Pharmacology* 78(3):402–10.
- Feng, Mingye, Desma M. Grice, Helen M. Faddy, Nguyen Nguyen, Sharon Leitch, Yingyu Wang, Sabina Muend, Paraic A. Kenny, Saraswati Sukumar, Sarah J. Roberts-Thomson, Gregory R. Monteith, and Rajini Rao. 2010. "Store-Independent Activation of Orai1 by SPCA2 in Mammary Tumors." *Cell* 143:84–98.
- Feske, Stefan. 2019. "CRAC Channels and Disease – From Human CRAC Channelopathies and Animal Models to Novel Drugs." *Cell Calcium* 80:112–16.
- Feske, Stefan, Yousang Gwack, Murali Prakriya, Sonal Srikanth, Sven-Holger Puppel, Bogdan Tanasa, Patrick G. Hogan, Richard S. Lewis, Mark Daly, and Anjana Rao. 2006. "A Mutation in Orai1 Causes Immune Deficiency by Abrogating CRAC Channel Function." *Nature* 441:179–85.
- Foskett, J. Kevin and Don-On Daniel Mak. 2010. "Regulation of IP3R Channel Gating by Ca²⁺ and Ca²⁺ Binding Proteins." *Methods Molecular Biology* 66:235–72.
- Frischauf, Irene, Vasilina Zayats, Michael Deix, Anna Hochreiter, Isaac Jardin, Martin Muik, Barbara Lackner, Barbora Svobodová, Teresa Pammer, Monika Litviňuková, Amrutha Arumbakam

- Sridhar, Isabella Derler, Ivan Bogeski, Christoph Romanin, Rüdiger H. Ettrich, and Rainer Schindl. 2015. "A Calcium-Accumulating Region, CAR, in the Channel Orai1 Enhances Ca²⁺ Permeation and SOCE-Induced Gene Transcription." *Science Signaling* 8(408):rat 131.
- Fukushima, Miwako, Takuro Tomita, Agnes Janoshazi, and James W. Putney. 2012. "Alternative Translation Initiation Gives Rise to Two Isoforms of Orai1 with Distinct Plasma Membrane Mobilities." *Journal of Cell Science* 125:4354–61.
- Gee, K. R., K. A. Brown, W. N. U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, and I. Johnson. 2000. "Chemical and Physiological Characterization of Fluo-4 Ca²⁺-Indicator Dyes." *Cell Calcium* 27(2):97–106.
- Grabmayr, Herwig, Christoph Romanin, and Marc Fahrner. 2021. "STIM Proteins: An Ever-Expanding Family." *International Journal of Molecular Sciences* 22(378).
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb. 1973. "A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA." *Virology* 42(2):456–67.
- Grimes, Derayvia, Ryan Johnson, Madeline Pashos, Celeste Cummings, Chen Kang, Georgia R. Sampedro, Eric Tycksen, Helen J. McBride, Rajan Sah, Clifford A. Lowell, and Regina A. Clemens. 2020. "ORAI1 and ORAI2 Modulate Murine Neutrophil Calcium Signaling, Cellular Activation, and Host Defense." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(39):24403–14.
- Gryniewicz, Grzegorz, Martin Poenie, and Roger Y. Tsien. 1985. "A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties." *The Journal of Biological Chemistry* 260:3440–50.
- Gschwendt, Michael, Sabine Dieterich, Joerg Rennecke, Walter Kittstein, Hans-joachim Mueller, and Franz-josef Johannes. 1996. "Inhibition of Protein Kinase C μ by Various Inhibitors . Differentiation from Protein Kinase c Isoenzymes." *FEBS Letters* 392:77–80.
- Guerrero-Hernandez, Agustin, Adan Dagnino-Acosta, and Alexei Verkhratsky. 2010. "An Intelligent Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Store: Release and Leak Channels Have Differential Access to a Concealed Ca²⁺ Pool." *Cell Calcium* 48:143–49.
- Guerrero-Hernández, Agustín, Víctor Hugo Sánchez-Vázquez, Ericka Martínez-Martínez, Lizeth Sandoval-Vázquez, Norma C. Perez-Rosas, Rodrigo Lopez-Farias, and Adan Dagnino-Acosta. 2020. "Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium Release Model Based on Changes in the Luminal Calcium Content." Pp. 337–70 in *Calcium Signaling*. Vol. 1131. Springer, Cham.
- Hattori, Mitsuharu, Akinobu Z. Suzuki, Takayasu Higo, Hiroshi Miyauchi, Takayuki Michikawa, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, and Katsuhiko Mikoshiba. 2004. "Distinct Roles of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Types 1 and 3 in Ca²⁺ Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 279(12):11967–75.
- Heckman, Karin L. and Larry R. Pease. 2007. "Gene Splicing and Mutagenesis by PCR-Driven Overlap Extension." *Nature Protocols* 2:924–32.
- Hegazy, Marihan, Eran Cohen-Barak, Jennifer L. Koetsier, Nicole A. Najor, Constadina Arvanitis, Eli Sprecher, Kathleen J. Green, and Lisa M. Godsel. 2020. "Proximity Ligation Assay for Detecting Protein-Protein Interactions and Protein Modifications in Cells and Tissues in Situ." *Current Protocols in Cell Biology* 89:e115.
- Hess, Simon, Christophe Pouzat, Lars Paeger, Andreas Pippow, and Peter Kloppenburg. 2021. "Analysis of Neuronal Ca²⁺ Handling Properties by Combining Perforated Patch Clamp Recordings and the Added Buffer Approach." *Cell Calcium* 97:102411.
- Hisatsune, Chihiro and Katsuhiko Mikoshiba. 2017. "IP3 Receptor Mutations and Brain Diseases in Human and Rodents." *Journal of Neurochemistry* 141:790–807.

- Hodeify, Rawad, Maya Dib, Ethel Alcantara-Adap, Raphael Courjaret, Nancy Nader, Cleo Z. Reyes, Ayat S. Hammad, Satanay Hubrack, Fang Yu, and Khaled Machaca. 2021. "The Carboxy Terminal Coiled-Coil Modulates Orai1 Internalization during Meiosis." *Scientific Reports* 11:2290.
- Hodeify, Rawad, Senthil Selvaraj, Jennifer Wen, Abdelilah Arredouani, Satanay Hubrack, Maya Dib, Sara N. Al-Thani, Timothy McGraw, and Khaled Machaca. 2015. "A STIM1-Dependent ' Trafficking Trap ' Mechanism Regulates Orai1 Plasma Membrane Residence and Ca²⁺ Influx Levels." *Journal of Cell Science* 128:3143–54.
- Hogan, Patrick G. 2015. "The STIM1-ORAI1 Microdomain." *Cell Calcium* 58(4):357–67.
- Hogan, Patrick G. and Anjana Rao. 2015. "Store-Operated Calcium Entry: Mechanisms and Modulation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460:40–49.
- Hong, Jeong Hee, Qin Li, Min Seuk Kim, Dong Min Shin, Stefan Feske, Lutz Birnbaumer, Kwong Tai Cheng, Indu S. Ambudkar, and Shmuel Muallem. 2011. "Polarized but Differential Localization and Recruitment of STIM1, Orai1 and TRPC Channels in Secretory Cells." *Traffic* 12:232–45.
- Hooper, Robert, Xuexin Zhang, Marie Webster, Christina Go, Joseph Kedra, Katie Marchbank, Donald L. Gill, Ashani T. Weeraratna, Mohamed Trebak, and Jonathan Soboloff. 2015. "Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma." *Molecular and Cellular Biology* 35(16):2790–98.
- Hoover, Paul J. and Richard S. Lewis. 2011. "Stoichiometric Requirements for Trapping and Gating of Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ (CRAC) Channels by Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(32):13299–304.
- Hou, Xiaowei, Leanne Pedi, Melinda M. Diver, and Stephen B. Long. 2012. "Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai." *Science (New York, N.Y.)* 338(December):1308–13.
- Isakov, Noah. 2018. "Protein Kinase C (PKC) Isoforms in Cancer, Tumor Promotion and Tumor Suppression." *Seminars in Cancer Biology* 48:36–52.
- Ivanova, Hristina, Tim Vervliet, Ludwig Missiaen, Jan B. Parys, Humbert De Smedt, and Geert Bultynck. 2014. "Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Isoform Diversity in Cell Death and Survival." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843:2164–83.
- Kawano, Takahito, Junichi Inokuchi, Masatoshi Eto, Masaharu Murata, and Jeong Hun Kang. 2021. "Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials." *Pharmaceutics* 13:1748.
- Kawasaki, Takumi, Ingo Lange, and Stefan Feske. 2009. "A Minimal Regulatory Domain in the C Terminus of STIM1 Binds to and Activates ORAI1 CRAC Channels." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385:49–54.
- Kawasaki, Takumi, Takehiko Ueyama, Ingo Lange, Stefan Feske, and Naoaki Saito. 2010. "Protein Kinase C-Induced Phosphorylation of Orai1 Regulates the Intracellular Ca²⁺ Level via the Store-Operated Ca²⁺ Channel." *The Journal of Biological Chemistry* 285(33):25720–30.
- Kay, Taryn M., Cody P. Aplin, Rowan Simonet, Julie Beenken, Robert C. Miller, Christin Libal, Arnold J. Boersma, Erin D. Sheets, and Ahmed A. Heikal. 2021. "Molecular Brightness Approach for FRET Analysis of Donor-Linker-Acceptor Constructs at the Single Molecule Level: A Concept." *Frontiers in Molecular Biosciences* 8:730394.
- Kolczynska, Katarzyna, Angel Loza-Valdes, Izabela Hawro, and Grzegorz Sumara. 2020. "Diacylglycerol-Evoked Activation of PKC and PKD Isoforms in Regulation of Glucose and Lipid Metabolism: A Review." *Lipids in Health and Disease* 19:113.

- Kumar, Priti, Arvindhan Nagarajan, and Pradeep D. Uchil. 2019. "DNA Transfection Mediated by Cationic Lipid Reagents." *Cold Spring Harbor Protocols* 3:215–23.
- Kwakye, Gunnar F., Daphne Li, Olympia A. Kabobel, and Aaron B. Bowman. 2011. "Cellular Fura-2 Manganese Extraction Assay (CFMEA)." *Current Protocols in Toxicology* (SUPPL.48):1–20.
- Lacruz, Rodrigo S. and Stefan Feske. 2015. "Diseases Caused by Mutations in ORAI1 and STIM1." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1356:45–79.
- Laude, Alex J., Stephen C. Tovey, Skarlatos G. Dedos, Barry V. L. Potter, Sarah C. R. Lummis, and Colin W. Taylor. 2005. "Rapid Functional Assays of Recombinant IP3receptors." *Cell Calcium* 38:45–51.
- Leon-Aparicio, Daniel, Jesus Chavez-Reyes, and Agustin Guerrero-Hernandez. 2017. "Activation of Endoplasmic Reticulum Calcium Leak by 2-APB Depends on the Luminal Calcium Concentration." *Cell Calcium* 65:80–90.
- Leon Aparicio, Daniel, Jonathan Pacheco, Jesus Chavez-Reyes, Jose M. Galindo, Jesus Valdes, Luis Vaca, and Agustin Guerrero-Hernandez. 2017. "Orai3 Channel Is the 2-APB-Induced Endoplasmic Reticulum Calcium Leak." *Cell Calcium* 65:91–101.
- Liou, Jen, Man Lyang Kim, Won Do Heo, Joshua T. Jones, Jason W. Myers, James E. Ferrell Jr, and Tobias Meyer. 2005. "STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx." *Current Biology* 15:1235–41.
- Lock, Jeffrey T. and Ian Parker. 2020. "Ip3 Mediated Global Ca²⁺ Signals Arise through Two Temporally and Spatially Distinct Modes of Ca²⁺ Release." *ELife* 9:e55008.
- Lur, Gyorgy, Mark W. Sherwood, Etsuko Ebisui, Lee Haynes, Stefan Feske, Sutton Robert, Robert D. Burgoyne, Katsuhiko Mikoshiba, Ole H. Petersen, and Alexei V. and Tepikin. 2011. "InsP3 Receptors and Orai Channels in Pancreatic Acinar Cells: Co-Localization and Its Consequences." *Biochemical Journal* 436:231–39.
- Majewski, Lukasz and Jacek Kuznicki. 2015. "SOCE in Neurons: Signaling or Just Refilling?." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1853:1940–52.
- Manders, E. M. M., F. J. Verbeek, and J. A. Aten. 1993. "Measurement of Co-Localization of Objects in Dual-Colour Confocal Images." *Journal of Microscopy* 169(3):375–82.
- Martínez-Martínez, Ericka. 2016. "Posible Participación de Orai1 Como Modulador de La Salida de Ca²⁺ Del Retículo Endoplásmico."
- Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marmé, and C. Schächtele. 1993. "Selective Inhibition of Protein Kinase C Isozymes by the Indolocarbazole Gö 6976*." *The Journal of Biological Chemistry* 268(13):9194–97.
- Miederer, Anna Maria, Dalia Alansary, Gertrud Schwär, Po Hsien Lee, Martin Jung, Volkhard Helms, and Barbara A. Niemeyer. 2015. "A STIM2 Splice Variant Negatively Regulates Store-Operated Calcium Entry." *Nature Communications* 6.
- Mikoshiba, Katsuhiko. 2015. "Role of IP3 Receptor Signaling in Cell Functions and Diseases." *Advances in Biological Regulation* 57:217–27.
- Montero, Mayte, Javier Alvarez, Wilhelm J. J. Scheenen, Rosario Rizzuto, Jacopo Meldolesi, and Tullio Pozzan. 1997. "Ca²⁺ Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum: Coexistence of High and Low [Ca²⁺] Subcompartments in Intact HeLa Cells." *The Journal of Cell Biology* 139(3):601–11.
- Montero, Mayte, Carmen D. Lobatón, Silvia Gutierrez-Fernández, Alfredo Moreno, and Javier Alvarez. 2003. "Modulation of Histamine-Induced Ca²⁺ Release by Protein Kinase C." *The Journal of Biological Chemistry* 278(50):49972–79.

- Motiani, Rajender K., Judith A. Stolwijk, Rachel L. Newton, Xuexin Zhang, and Mohamed Trebak. 2013. "Emerging Roles of Orai3 in Pathophysiology." *Channels* 7(5):392–401.
- Muik, Martin, Marc Fahrner, Isabella Derler, Rainer Schindl, Judith Bergsmann, Irene Frischauf, Klaus Groschner, and Christoph Romanin. 2009. "A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels." *Journal of Biological Chemistry* 284(13):8421–26.
- Newton, Alexandra C. 1995. "Protein Kinase C : Structure , Function , and Regulation*." *The Journal of Biological Chemistry* 270(48):28495–98.
- Newton, Alexandra C. 2018. "Protein Kinase C: Perfectly Balanced." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 53(2):208–30.
- Newton, Alexandra C., Martin D. Bootman, and John D. Scott. 2016. "Second Messengers." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(8):a005926.
- Nishizuka, Yasutomi. 1995. "Protein Kinase C and Lipid Signaling for Sustained Cellular Responses." *The FASEB Journal* 9(7):484–96.
- Novello, Matthew J., Jinhui Zhu, MengQi Zhang, Qingping Feng, and Peter B. Stathopoulos. 2020. "Synergistic Stabilization by Nitrosoglutathione-Induced Thiol Modifications in the Stromal Interaction Molecule-2 Luminal Domain Suppresses Basal and Store Operated Calcium Entry." *Scientific Reports* 10:10177.
- Ong, Hwei Ling, Lorena Brito De Souza, Changyu Zheng, Kwong Tai Cheng, Xibao Liu, Corinne M. Goldsmith, Stefan Feske, and Indu S. Ambudkar. 2015. "STIM2 Enhances Receptor-Stimulated Ca²⁺ Signaling by Promoting Recruitment of STIM1 to the Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions." *Science Signaling* 8(359):ra3.
- Ooi, Amanda, Aloysius Wong, Luke Esau, Fouad Lemtiri-Chlieh, and Chris Gehring. 2016. "A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization." *Frontiers in Physiology* 7:1–15.
- Oprins, J. C. J., C. Van Der Burg, H. P. Meijer, T. Munnik, and J. A. Groot. 2002. "Tumour Necrosis Factor α Potentiates Ion Secretion Induced by Histamine in a Human Intestinal Epithelial Cell Line and in Mouse Colon: Involvement of the Phospholipase D Pathway."
- Paila, Yamuna Devi, Thomas J. Pucadyil, and Amitabha Chattopadhyay. 2005. "The Cholesterol-Complexing Agent Digitonin Modulates Ligand Binding of the Bovine Hippocampal Serotonin 1A Receptor." *Molecular Membrane Biology* 22(3):241–49.
- Paredes, R. Madelaine, Julie C. Etzler, Lora Talley Watts, and James D. Lechleiter. 2008. "Chemical Calcium Indicators." *National Institutes of Health* 46(3):143–51.
- Park, Chan Young, Paul J. Hoover, Franklin M. Mullins, Priti Bachhawat, Elizabeth D. Covington, Stefan Raunser, Thomas Walz, K. Christopher Garcia, Ricardo E. Dolmetsch, and Richard S. Lewis. 2009. "STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1." *Cell* 136:876–90.
- Perez-Rosas, Norma C., Norma L. Gomez-Viquez, Adan Dagnino-Acosta, Moises Santillan, and Agustín Guerrero-Hernandez. 2015. "Kinetics on Demand Is a Simple Mathematical Solution That Fits Recorded Caffeine-Induced Luminal SR Ca²⁺ Changes in Smooth Muscle Cells." *PLoS ONE* 10(9):e0138195.
- Piston, David W. and Gert Jan Kremers. 2007. "Fluorescent Protein FRET: The Good, the Bad and the Ugly." *Trends in Biochemical Sciences* 32(9):407–14.
- Poenie, M. 1990. "Alteration of Intracellular Fura-2 Fluorescence by Viscosity: A Simple Correction." *Cell Calcium* 11:85–91.

- Prakriya, Murali, Stefan Feske, Yousang Gwack, Sonal Srikanth, Anjana Rao, and Patrick G. Hogan. 2006. "Orai1 Is an Essential Pore Subunit of the CRAC Channel." *Nature* 443:230–33.
- Putney, James W. 1986. "A Model for Receptor-Regulated Calcium Entry." *Cell Calcium* 7(1):1–12.
- Putney Jr., J. W. and C. M. Pedrosa Ribeiro. 2000. "Signaling Pathways between the Plasma Membrane and Endoplasmic Reticulum Calcium Stores." *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:1272–86.
- Rana, Anshul, Michelle Yen, Amir Masoud Sadaghiani, Seth Malmersjö, Chan Young Park, Ricardo E. Dolmetsch, and Richard S. Lewis. 2015. "Alternative Splicing Converts STIM2 from an Activator to an Inhibitor of Store-Operated Calcium Channels." *Journal of Cell Biology* 209(5):653–70.
- Rossi, Ana M., Andrew M. Riley, Geneviève Dupont, Taufiq Rahman, Barry V. L. Potter, and Colin W. Taylor. 2021. "Quantal Ca²⁺ Release Mediated by Very Few IP₃ Receptors That Rapidly Inactivate Allows Graded Responses to IP₃." *Cell Reports* 37(5).
- Rossi, Ana M. and Colin W. Taylor. 2020. "Reliable Measurement of Free Ca²⁺ Concentrations in the ER Lumen Using Mag-Fluo-4." *Cell Calcium* 87:102188.
- Rueda, A., L. García, L. E. Soria-Jasso, J. A. Arias-Montaño, and A. Guerrero-Hernández. 2002. "The Initial Inositol 1,4,5-Trisphosphate Response Induced by Histamine Is Strongly Amplified by Ca²⁺ Release from Internal Stores in Smooth Muscle." *Cell Calcium* 31(4):161–73.
- Sampieri, Alicia, Karla Santoyo, Alexander Asanov, and Luis Vaca. 2018. "Association of the IP₃R to STIM1 Provides a Reduced Intraluminal Calcium Microenvironment, Resulting in Enhanced Store-Operated Calcium Entry." *Scientific Reports* 8:13252.
- Sanchez-Collado, Jose, Jose J. Lopez, Isaac Jardin, Pedro J. Camello, Debora Falcon, Sergio Regodon, Gines M. Salido, Tarik Smani, and Juan A. Rosado. 2019. "Adenylyl Cyclase Type 8 Overexpression Impairs Phosphorylation-Dependent Orai1 Inactivation and Promotes Migration in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells." *Cancers* 11(1624):1–24.
- Shen, Luyan, Naiyan Wen, Meihui Xia, Yu Zhang, Weimin Liu, Ye Xu, and Liankun Sun. 2016. "Calcium Efflux from the Endoplasmic Reticulum Regulates Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Cervical Cancer HeLa Cells." *Oncology Letters* 11:2411–19.
- Shuttleworth, Trevor J. 2012. "Orai3 - the 'exceptional' Orai?" *Journal of Physiology* 590(2):241–57.
- Silva-Rojas, Roberto, Jocelyn Laporte, and Johann Böhm. 2020. "STIM1/ORAI1 Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutations Inversely Impact on SOCE and Calcium Homeostasis and Cause Multi-Systemic Mirror Diseases." *Frontiers in Physiology* 11:604941.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150:76–85.
- Smyth, Jeremy T., Sung Yong Hwang, Takuro Tomita, Wayne I. DeHaven, Jason C. Mercer, and James W. Putney. 2010. "Activation and Regulation of Store-Operated Calcium Entry." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14(10):2337–49.
- Soboloff, Jonathan, Brad S. Rothberg, Muniswamy Madesh, and Donald L. Gill. 2012. "STIM Proteins: Dynamic Calcium Signal Transducers." *Molecular Cell Biology* 32(9):549–65.
- Soboloff, Jonathan, Maria A. Spassova, Xiang D. Tang, Thamara Hewavitharana, Wen Xu, and Donald L. Gill. 2006. "Orai1 and STIM Reconstitute Store-Operated Calcium Channel Function." *The Journal of Biological Chemistry* 281:20661–65.
- Stathopoulos, Peter B., Guang Yao Li, Michael J. Plevin, James B. Ames, and Mitsuhiko Ikura. 2006. "Stored Ca²⁺ Depletion-Induced Oligomerization of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) via

- the EF-SAM Region: An Initiation Mechanism for Capacitive Ca²⁺ Entry." *Journal of Biological Chemistry* 281(47):35855–62.
- Stegner, David, Sebastian Hofmann, Michael K. Schuhmann, Peter Kraft, Alexander M. Herrmann, Sandy Popp, Marlen Höhn, Michael Popp, Vanessa Klaus, Antonia Post, Christoph Kleinschnitz, Attila Braun, Sven G. Meuth, Klaus Peter Lesch, Guido Stoll, Robert Kraft, and Bernhard Nieswandt. 2019. "Loss of Orai2-Mediated Capacitative Ca²⁺ Entry Is Neuroprotective in Acute Ischemic Stroke." *Stroke* 50(11):3238–45.
- Taylor, Colin W. and Stephen C. Tovey. 2010. "IP₃ Receptors: Toward Understanding Their Activation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:a004010.
- Tennant, Judith R. 1964. "Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability." *Transplantation* 2(4):685–94.
- Terry, Lara E., Kamil J. Alzayady, Amanda M. Wahl, Sundeep Malik, and David I. Yule. 2020. "Disease-Associated Mutations in Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subunits Impair Channel Function." *Journal of Biological Chemistry* 295(52):18160–78.
- Thomas, Andrew P., Gary St. J. Bird, György Hajnóczky, Lawrence D. Robb-Gaspers, and James W. Putney. 1996. "Spatial and Temporal Aspects of Cellular Calcium Signaling." *The FASEB Journal* 10(13):1505–17.
- Tiffner, Adéla, Lena Maltan, Sarah Weiß, and Isabella Derler. 2021. "The Orai Pore Opening Mechanism." *International Journal of Molecular Sciences* 22(2):533.
- Tiffner, Adéla, Romana Schober, Carmen Höglinger, Daniel Bonhenry, Saurabh Pandey, Victoria Lunz, Matthias Sallinger, Irene Frischauf, Marc Fahrner, Sonja Lindinger, Lena Maltan, Sascha Berlansky, Michael Stadlbauer, Rainer Schindl, Rudiger Ettrich, Christoph Romanin, and Isabella Derler. 2021. "CRAC Channel Opening Is Determined by a Series of Orai1 Gating Checkpoints in the Transmembrane and Cytosolic Regions." *Journal of Biological Chemistry* 296(39):100224.
- Vaeth, Martin, Jun Yang, Megumi Yamashita, Isabelle Zee, Miriam Eckstein, Camille Knosp, Ulrike Kaufmann, Peter Karoly Jani, Rodrigo S. Lacruz, Veit Flockerzi, Imre Kacskovics, Murali Prakriya, and Stefan Feske. 2017. "ORAI2 Modulates Store-Operated Calcium Entry and T Cell-Mediated Immunity." *Nature Communications* 8(14714):14714.
- Vay, Laura, Esther Hernández-SanMiguel, Jaime Santo-Domingo, Carmen D. Lobatón, Alfredo Moreno, Mayte Montero, and Javier Alvarez. 2007. "Modulation of Ca²⁺ Release and Ca²⁺ Oscillations in HeLa Cells and Fibroblasts by Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Stimulation." *Journal of Physiology* 580(1):39–49.
- van der Wal, Jose, Ron Habets, Péter Várnai, Tamas Balla, and Kees Jalink. 2001. "Monitoring Agonist-Induced Phospholipase C Activation in Live Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer." *The Journal of Biological Chemistry* 276(18):15337–44.
- Wegierski, Tomasz and Jacek Kuznicki. 2018. "Neuronal Calcium Signaling via Store-Operated Channels in Health and Disease." *Cell Calcium* 74:102–11.
- Woodard, Geoffrey E., José J. López, Isaac Jardín, Ginés M. Salido, and Juan A. Rosado. 2010. "TRPC3 Regulates Agonist-Stimulated Ca²⁺ Mobilization by Mediating the Interaction between Type I Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, RACK1, and Orai1." *The Journal of Biological Chemistry* 285:8045–53.
- Wu, Luling, Chusen Huang, Ben P. Emery, Adam C. Sedgwick, Steven D. Bull, Xiao Peng He, He Tian, Juyoung Yoon, Jonathan L. Sessler, and Tony D. James. 2020. "Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Small-Molecule Sensors and Imaging Agents." *Chemical Society Reviews* 49:5110–39.

- Yeh, Yi Chun, Yu Ping Lin, Holger Kramer, and Anant B. Parekh. 2020. "Single-Nucleotide Polymorphisms in Orai1 Associated with Atopic Dermatitis Inhibit Protein Turnover, Decrease Calcium Entry and Disrupt Calcium-Dependent Gene Expression." *Human Molecular Genetics* 29(11):1808–23.
- Yeung, Priscilla See-Wai, Megumi Yamashita, and Murali Prakriya. 2020. "Molecular Basis of Allosteric Orai1 Channel Activation by STIM1." *The Journal of Physiology* 598(9):1707–23.
- Young, Lindon H., Brian J. Balin, and Margaret T. Weis. 2005. "Gö 6983: A Fast Acting Protein Kinase C Inhibitor That Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury." *Cardiovascular Drug Reviews* 23:255–72.
- Yu, Fang, Lu Sun, and Khaled Machaca. 2009. "Orai1 Internalization and STIM1 Clustering Inhibition Modulate SOCE Inactivation during Meiosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(41):17401–6.
- Yu, Fang, Lu Sun, and Khaled Machaca. 2010. "Constitutive Recycling of the Store-Operated Ca²⁺ Channel Orai1 and Its Internalization during Meiosis." *The Journal of Cell Biology* 191(3):523–35.
- Yuan, Joseph P., Weizhong Zeng, Michael R. Dorwart, Young-Jin Choi, Paul F. Worley, and Shmuel Muallem. 2009. "SOAR and the Polybasic STIM1 Domains Gate and Regulate Orai Channels." *Nature Cell Biology* 11:337–43.
- Zbidi, Hanene, Isaac Jardin, Geoffrey E. Woodard, Jose J. Lopez, Alejandro Berna-Erro, Ginés M. Salido, and Juan A. Rosado. 2011. "STIM1 and STIM2 Are Located in the Acidic Ca²⁺ Stores and Associates with Orai1 upon Depletion of the Acidic Stores in Human Platelets." *Journal of Biological Chemistry* 286(14):12257–70.
- Zhang, Isis and Huijuan Hu. 2020. "Store-Operated Calcium Channels in Physiological and Pathological States of the Nervous System." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14:600758.
- Zhang, Xuexin, Trayambak Pathak, Ryan Yoast, Scott Emrich, Ping Xin, Robert M. Nwokonko, Martin Johnson, Shilan Wu, Céline Delierneux, Maxime Gueguinou, Nadine Hempel, James W. Putney Jr., Donald L. Gill, and Mohamed Trebak. 2019. "A Calcium/CAMP Signaling Loop at the ORAI1 Mouth Drives Channel Inactivation to Shape NFAT Induction." *Nature Communications* 10:1–13.
- Zheng, Sisi, Lijuan Zhou, Guolin Ma, Tian Zhang, Jindou Liu, Jia Li, Nhung T. Nguyen, Xiaoyan Zhang, Wanjie Li, Robert Nwokonko, Yandong Zhou, Fukuan Zhao, Jingguo Liu, Yun Huang, Donald L. Gill, and Youjun Wang. 2018. "Calcium Store Refilling and STIM Activation in STIM- and Orai-Deficient Cell Lines." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 470:1555–67.