



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**IDENTIFICACIÓN DE UN DOMINIO DE UNIÓN A COLESTEROL EN STIM1 Y SU PAPEL EN LA
REGULACIÓN DE LA ENTRADA DE CALCIO OPERADA POR LAS RESERVAS**

TESIS

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

**PRESENTA:
JONATHAN ENRIQUE PACHECO ROMERO**

TUTOR PRINCIPAL: DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
DEPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR Y DEL DESARROLLO, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ
DEPTO. DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
DEPTO. NEUROLOGÍA MOLECULAR, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

Ciudad Universitaria, CDMX., Enero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

AGRADECIMIENTOS:

A México, un baluarte de región, que generoso otorga y da.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Fisiología Celular y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A las instituciones que auspiciaron esta investigación: CONACYT (127822), DGAPA (IN203315) y la Secretaria de Ciencia, tecnología e innovación de la Ciudad de México.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Luis Vaca Domínguez por brindarme un lugar en su laboratorio, por otorgarme libertad académica bien dirigida, por sus enseñanzas y por alentarme siempre a hacer más, con ingenio y dedicación.

A la Dra. Laura Domínguez por su colaboración en las pruebas de simulación molecular, al Dr. Alexander Asanov por su importante participación en la realización de los experimentos de electrofisiología y los arreglos de péptidos y al Dr. León David Islas Suárez por la síntesis del compuesto DPA.

A los miembros del jurado de examen de grado que enriquecieron este trabajo con sus oportunas observaciones: Dr. León David Islas Suárez, Dr. Agustín Guerrero Hernández, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Alberto Darszon Israel y al Dr. Luis Vaca Domínguez.

A los integrantes del laboratorio 126 norte, en especial a la Dra. Alicia Sampieri García y a la laboratorista Salustia Salgado, por su desinteresada amabilidad y alegría.

A los amigos que acompañaron esta etapa de mi vida, Josué, Jesús, Laura, Margarita, Arlette, Adolfo, Israel, Gustavo, Daniel y Erick.

A mis padres, Hortensia y Cuauhtémoc. A Yiss y Ricardo por tolerar todas mis ausencias y brindarme siempre su incondicionalidad desmesurada.

A mis Tíos: Lulú, Chela, Margarita, Azucena, Gonzalo y Ricardo, por ser mi segundo hogar lejos de casa.

Finalmente, a Silvia por acompañarme siempre. Por todas sus enseñanzas que me enriquecen día a día en lo académico y lo personal.

A todos, Gracias!

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ACRONIMOS Y ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. La entrada de calcio operada por las reservas.....	6
1.1.1. STIM1	7
1.1.2. Orai1.....	11
1.1.3. Mecanismo de activación de Orai1.....	13
1.2 Uniones RE-MP	16
1.4 Las balsas lipídicas	21
1.5 El colesterol.....	23
1.5.1. Dominios de unión a colesterol.....	25
1.5.2. Dominios CRAC.....	26
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVOS	27
4. RESULTADOS	28
4.1. El tratamiento con M β CD remueve colesterol sin afectar la viabilidad.....	28
4.2. Remover colesterol aumenta la actividad de Orai1	30
4.3. El colesterol regula la interacción de Orai1 con el dominio SOAR	34
4.4. Identificación de un dominio de unión a colesterol en SOAR.....	37
4.5. La isoleucina 364 es importante para mediar el efecto del colesterol en SOAR 39	
4.6. SOAR se asocia a la membrana plasmática por medio de colesterol.....	43
4.7. El fenotipo de la mutante de I364 es extensible a la proteína STIM1 completa.....	50
4.8. STIM1 y Orai1 coordinan su regulación por colesterol.....	53
5. DISCUSIÓN.....	57

5.1.	El colesterol regula la actividad de Orail por medio del dominio SOAR.....	57
5.2.	Caracterización del dominio de unión a colesterol en SOAR	60
5.3.	El papel de la Isoleucina 364 en el dominio CRAC de STIM1	61
5.4.	Modelo de interacción de Orail y STIM1 con colesterol.....	63
5.5.	Relevancia fisiológica de la interacción de STIM1 con colesterol	66
6.	CONCLUSION	68
7.	PERSPECTIVAS.....	68
8.	MATERIALES Y METODOS.....	71
8.1.	Cultivos celulares y transfección	71
8.2.	Plásmidos empleados.....	71
8.3.	Remoción o incorporación de colesterol.....	72
8.4.	Viabilidad y medición de colesterol.....	73
8.5.	Mediciones de calcio intracelular.....	74
8.6.	Ensayo de co-inmunoprecipitación.....	75
8.7.	Medición de colesterol asociado a inmunoprecipitados (Col-IP).....	76
8.8.	Ensayos de FRET	77
8.9.	Ensayos de electrofisiología.....	80
8.10.	Arreglos de péptidos.....	80
8.11.	Simulación de dinámica molecular.....	81
9.	REFERENCIAS.....	82
	ANEXOS.....	92
10.	Anexo 1	93
11.	Anexo 2.....	94
12.	Anexo 3.....	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de punta de STIM1.....	9
Figura 2. Topología de STIM1.....	10
Figura 3. Topología de Orai1 y arreglo estequiométrico.....	12
Figura 4. Estructura cristalográfica de SOAR.....	14
Figura 5. Estructura cristalográfica de la región CC1-CC2 de STIM1	15
Figura 6. Proteínas accesorias de STIM1 y Orai1.....	18
Figura 7. Ruta de biosíntesis de colesterol.	24
Figura 8. Determinación del contenido de colesterol y viabilidad celular.....	28
Figura 9. Primer y segundo estímulo de calcio en células que expresan Orai1 y SOAR con colesterol empobrecido.	31
Figura 10. Primer estímulo de calcio en células tratadas con M β CD o Filipina III.	32
Figura 11. Registros electrofisiológicos de células que expresan SOAR y Orai1.....	33
Figura 12. Ensayo de Co-inmunoprecipitación.	34
Figura 13. Ensayos de FRET por fotoblanqueo del aceptor	36
Figura 14. Dominio de unión a colesterol en SOAR.....	37
Figura 15. Colesterol asociado a inmunoprecipitados de STIM1.	38
Figura 16. Arreglo de péptidos.....	39
Figura 17. FRET entre SOAR I364A y Orai1.....	41
Figura 18. SOAR I364A incrementa la actividad de Orai1.....	43
Figura 19. FRET por fotoblanqueo de DPA.....	44
Figura 20. Proximidad de SOAR a la membrana plasmática.....	45
Figura 21. SOAR se posiciona en una plano yuxtamembranal para interactuar con colesterol.....	48
Figura 22. Colesterol asociado a inmunoprecipitados de STIM1-I364A.....	50
Figura 23. STIM1-I364A incrementa la actividad de Orai1.....	52
Figura 24. Protocolo largo para medición de la SOCE con bajo colesterol.....	53
Figura 25. La regulación de Orai1 por colesterol es el mismo mecanismo que implica a SOAR.....	55

Figura 26. Modelo de la regulación del colesterol en la asociación funcional del complejo STIM1-Orai1	66
Figura 27. Curso temporal de fotoblanqueo del aceptor.....	78

RESUMEN

STIM1 y Orai1 son los componentes moleculares de la entrada de calcio operada por las reservas. Para que se dé la apertura de los canales Orai1 debe ocurrir un vaciamiento de los reservorios de calcio en el retículo endoplásmico, lo que produce que STIM1, residente del retículo endoplásmico, se oligomerize y migre a regiones cercanas a la membrana plasmática. Cuando STIM1 y Orai1 están en estrecha proximidad se da la activación de los canales. Sin embargo, evidencia creciente muestra la importancia del ambiente lipídico para la regulación de la asociación STIM1 y Orai1. En este trabajo se identificó y caracterizó un dominio de unión a colesterol en la proteína STIM1, específicamente en la región mínima de activación de STIM1 a Orai1 (en inglés SOAR, STIM Orai Activating Region). La región de interacción con colesterol es importante para acoplar al dominio SOAR en un plano yuxtamembranal en regiones enriquecidas en colesterol, lo que ocasiona una activación parcial de Orai1. Por el contrario, remover colesterol lleva a un incremento en la actividad del canal como consecuencia de un incremento en la interacción de SOAR con Orai1. Nuestros resultados llevaron a la identificación de la Isoleucina 364 como un residuo clave en la interacción con colesterol, puesto que experimentos con la mutante de isoleucina recapitula el fenotipo de remover colesterol. Finalmente se propone que el colesterol compite con Orai1 por la región SOAR de STIM1 cuando la interacción de Orai1-STIM1 se ha establecido.

ABSTRACT

STIM1 and Orai1 are the main components of the store-operated calcium entry. For activation of Orai1, STIM1 performs a series of molecular rearrangements until the exposure of the SOAR (Stim Orai Activating Region) domain. In addition, coupling between STIM1 and Orai1 requires specialized microdomains of the plasma membrane enriched in cholesterol. In this study we provide clear evidence that STIM1 has a cholesterol-binding region located inside the SOAR domain. We demonstrate that SOAR should be intimately closer to inner layer of the plasma membrane in order to interact with cholesterol. The depletion of cholesterol induces the SOAR detachment from the plasma membrane and enhances its association with Orai1. Our results show that mutation of a single isoleucine inside the SOAR domain eliminates the cholesterol binding properties resulting in stronger activation of Orai1. The effect of removing cholesterol can be recapitulated by full length STIM1 with the Isoleucine mutated. These results suggest that cholesterol plays a role as a negative modulator of Orai1 channel activation.

ACRONIMOS Y ABREVIATURAS

APC. Adenomatous polyposis coli

AUC . Área bajo la curva (Area under the curve)

CCE. Capacitative calcium entry

CPE. Células progenitoras endoteliales

CRAC. Cholesterol Recognition/Interaction Amino acids Consensus

DHE. Dehidrocolesterol

DPA. Dipicrilamina

DPB. Dominio polibásico

DRMs. Detergent Resistance Membranes

FRET. Förster Resonance Energy transfer

Icrac. Current Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels

M β CD. Metil β ciclodextrina

NMR. Resonancia magnética nuclear

MP. Membrana plasmática

PIP2. Fosfatidilinositol bifosfato

PLC. Fosfolipasa C

POPC. 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

RE. Retículo endoplásmico

SLO. Smith-Lemli-Opitz

SOAR. STIM-Orai activating region

SOCE. Store operated calcium entry

TG. Tapsigargina

1. INTRODUCCIÓN

El calcio (Ca^{2+}) en la célula es un importante segundo mensajero. Como tal, está implicado en transducir una gran variedad de funciones celulares que pueden ser tan diversas y antagónicas como la proliferación y la apoptosis. Por esta razón la célula ha desarrollado una serie de estrategias que evitan la libre difusión de Ca^{2+} y los efectos citotóxicos que esto pudiera desencadenar. En consecuencia la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma se encuentra restringida en el orden nanomolar (≈ 20 nM) que contrasta por 6 órdenes de magnitud con la concentración en el medio extracelular (1.8 mM) (1). Los diversos mecanismos encargados de mantener esta concentración de Ca^{2+} incluyen transportadores, cotransportadores, canales y proteínas amortiguadoras. Además, organelos como la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE) funcionan como reservorios de Ca^{2+} , alcanzando concentraciones que varían de 100 a 800 μM (2).

La célula libera Ca^{2+} de los reservorios del RE para producir incrementos transitorios en el espacio citoplásmico y activar diversas e importantes funciones, como tráfico vesicular, síntesis de proteínas, modificaciones post-traduccionales o proliferación entre otras (3). Por lo tanto la homeostasis de Ca^{2+} en el lumen del RE debe ser finamente contralada para evitar efectos tan severos como el incorrecto plegamiento de proteínas o la apoptosis (4).

El mecanismo encargado de rellenar los reservorios intracelulares de Ca^{2+} y ubicuo en todas las células de organismos metazoarios se conoce como la Entrada de Calcio Operada por las Reservas o SOCE por sus siglas en inglés (Store Operated Calcium Entry) (5). La SOCE activa importantes funciones fisiológicas, principalmente en el sistema inmunológico donde el influjo de Ca^{2+} exclusivamente por esta vía activa a calcineurina, una fosfatasa dependiente de calmodulina que defosforila al factor de

transcripción NFAT para translocarlo al núcleo y producir la expresión de importantes citocinas, que incluyen interleucinas IL-2, IL-4 e interferón (6). La inhibición de la SOCE conlleva a graves inmunodeficiencias, aunque los defectos en el funcionamiento de la SOCE no están restringidos a la respuesta inmune y actualmente existe una larga lista de canalopatías asociadas a mutaciones que suprimen o incrementan la SOCE (7).

Los componentes moleculares que conforman esta entrada de Ca^{2+} constan de por lo menos 2 proteínas, una en la membrana plasmática (MP) y otra en la membrana del RE. La primera es un canal iónico denominado Orai y la segunda es STIM (Stromal Interaction Molecule), la proteína sensor de la concentración de Ca^{2+} en el interior del RE y al mismo tiempo encargada de activar a Orai (8). Esto implica que STIM y Orai interaccionan en microdominios restringidos donde el RE y la MP están en extrema proximidad (10–25 nm) (9), en las llamadas uniones de retículo endoplásmico y membrana plasmática (10). En estas estructuras celulares se agrupan un gran número de proteínas que incluyen a STIM y Orai pero además otros componentes que brindan soporte estructural y regulador al complejo de la SOCE, e incluso microdominios de lípidos de la MP como el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) y el colesterol han mostrado fungir como centros neurálgicos en los pasos previos a la activación de este mecanismo de movilización de Ca^{2+} (11–13).

Actualmente existe un gran progreso en nuestra comprensión de la SOCE, hemos pasado de conocer aspectos fisiológicos y moleculares a un entendimiento estructural. Sin embargo, aún quedan preguntas sin responder. En las siguientes secciones se describe como STIM conlleva el mensaje de vaciamiento del RE a la activación de Orai en la MP. Y se da énfasis en los mecanismos que la célula ha desarrollado para regular a la SOCE mediante microdominios de lípidos de colesterol altamente especializados.

1.1. La entrada de calcio operada por las reservas

Los primeros conceptos acerca de la entrada de Ca^{2+} operada por las reservas surgieron poco tiempo después del descubrimiento del inositol trifosfato (InsP3). Esta molécula, producto de la hidrólisis del PIP_2 al activarse receptores acoplados a la vía de la fosfolipasa C (PLC), producía un incremento de Ca^{2+} proveniente del RE (14, 15). Poco tiempo después Casteels y Droogmans demostrarían que las reservas de Ca^{2+} sensibles a agonistas eran capaces de regular una entrada de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular (16). Más tarde, Putney propondría en 1986 un modelo en donde señalaba que el responsable de la entrada de calcio extracelular no era el agonista *per se*, si no el vaciamiento de Ca^{2+} del RE (17). Putney denominó a este mecanismo como entrada de calcio capacitiva (en inglés, CCE), al hacer la analogía con un capacitor, con una continua carga y descarga de Ca^{2+} en el RE que detona un flujo de Ca^{2+} de la MP, más tarde sería renombrada como SOCE al hacer más explícito el mecanismos de activación de estos canales (8).

La corriente iónica que caracteriza a la SOCE es conocida como Icrac (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current), esta corriente fue inicialmente descrita y caracterizada por Hoth y Penner en mastocitos (18). Además de un mecanismo de activación único, la Icrac presenta características biofísicas notablemente distintas a otros canales permeables a Ca^{2+} . Esta corriente es rectificadora entrante y extremadamente selectiva a Ca^{2+} , llegando a permear más de 1000 iones de Ca^{2+} por uno de Na^+ (19). No obstante, la corriente unitaria es tan pequeña que solo ha podido medirse por medio de análisis de ruido (20). Se considera que la corriente unitaria de Ca^{2+} presenta una magnitud de 10 a 35 fS. En condiciones libres de cationes divalentes los canales de la SOCE pueden permear Na^+ produciendo corrientes de 1 pS (21). De hecho emplear Na^+ como ion acarreador ha sido una estrategia

ampliamente usada para caracterizar corrientes macroscópicas en la SOCE, ya que la magnitud de las corrientes de Na^+ están cerca de 1 nA, mientras que las de Ca^{2+} son solo de unas decenas de pA (21).

Las características biofísicas y farmacológicas de la SOCE fueron determinadas mucho antes de dar con la identificación de los genes responsables de constituir la SOCE y no fue hasta el 2005 y 2006 que se realizaron distintos experimentos de tamizajes masivos con ARN interferente (ARNi), entre otras estrategias, para encontrar a las proteínas encargadas de reconstituir a la Icrac (22–25). Resultando en la identificación de STIM y de Orai, proteínas de las cuales se hablará a continuación.

1.1.1. STIM1

STIM es una proteína multidominios, con un cruce transmembranal y residente del RE (9, 26). Inicialmente STIM fue descrita como una proteína supresora de crecimiento tumoral en la MP de células del tejido conectivo (estromales) (27), pero la atención se centraría en su papel como miembro clave en la entrada de calcio operada por las reservas al ser identificado de entre más de 2000 genes silenciados con ARNi y evaluados para la entrada de Ca^{2+} después de vaciar el RE con tapsigargina (TG), un potente bloqueador de la ATPasa de Ca^{2+} del RE (22, 23).

STIM tiene 2 homólogos en mamíferos (STIM1 y STIM2) (28). Sin embargo, hay suficiente evidencia de que eliminar la expresión de STIM1 lleva a la completa supresión de la SOCE (22). Por lo que se considera que STIM2 tiene un papel regulador de los niveles de Ca^{2+} en respuesta a variaciones en el interior del RE de alrededor de 500 μM (28). En contraste, STIM1 activa a la SOCE durante descensos en la concentración de Ca^{2+} más drásticos, de aproximadamente 200 μM (29). STIM posee un dominio de unión

a Ca^{2+} de tipo mano-EF en el extremo amino terminal localizado en el lumen del RE. Posterior a la mano-EF se encuentra un dominio tipo SAM (motivo alfa estéril), encargado de formar homo-oligómeros de STIM1 cuando descienden los niveles de Ca^{2+} (30). La oligomerización promueve una serie de cambios conformacionales que dirigen a STIM1 a regiones cercanas a la MP (26). El mecanismo encargado de direccionar a STIM1 a las uniones de RE-MP se desconoce, sin embargo los microtúbulos podrían desempeñar un papel importante, ya que durante condiciones basales STIM1 es altamente dinámico en el RE asociado a EB1 (en inglés, End-binding 1), una proteína de unión a microtúbulos. La interacción con EB1 se pierde durante el vaciamiento del RE lo que estabiliza a los oligómeros de STIM1 en estructuras denominadas “*puncta*” (31-33) (Fig. 1).

La parte citosólica de STIM1 es mucho más compleja, consta de 3 dominios de hélices súper enrolladas (coiled-coil), la región comprendida entre las hélices súper enrolladas 2 y 3 (CC2 y CC3) se le conoce como SOAR (en inglés, STIM-Orai activating region) y es la región mínima requerida de STIM1 para activa a los canales Orai (34, 35). La primera hélice súper enrollada (CC1) interacciona directamente con CC2 para evitar el despliegue del dominio SOAR y la posterior activación del canal, por lo que se conoce como hélice inhibitoria (HI) (36) (Fig.2).

STIM1 además de ser el activador de los canales Orai, también es un componente esencial en su regulación. Una vez que se da la activación de la SOCE, un segmento de residuos ácidos que abarca los aminoácidos 470 a 491 participa en la inactivación dependiente de Ca^{2+} de Orai1 (37). “Rio abajo” en el extremo carboxilo de STIM1 se encuentra un dominio rico en aminoácidos

básicos, o dominio polibásico (DPB), que interacciona con las cargas negativas de los fosfoinosítidos, especialmente PIP_2 y PIP_3 (38, 39) (Fig.2).

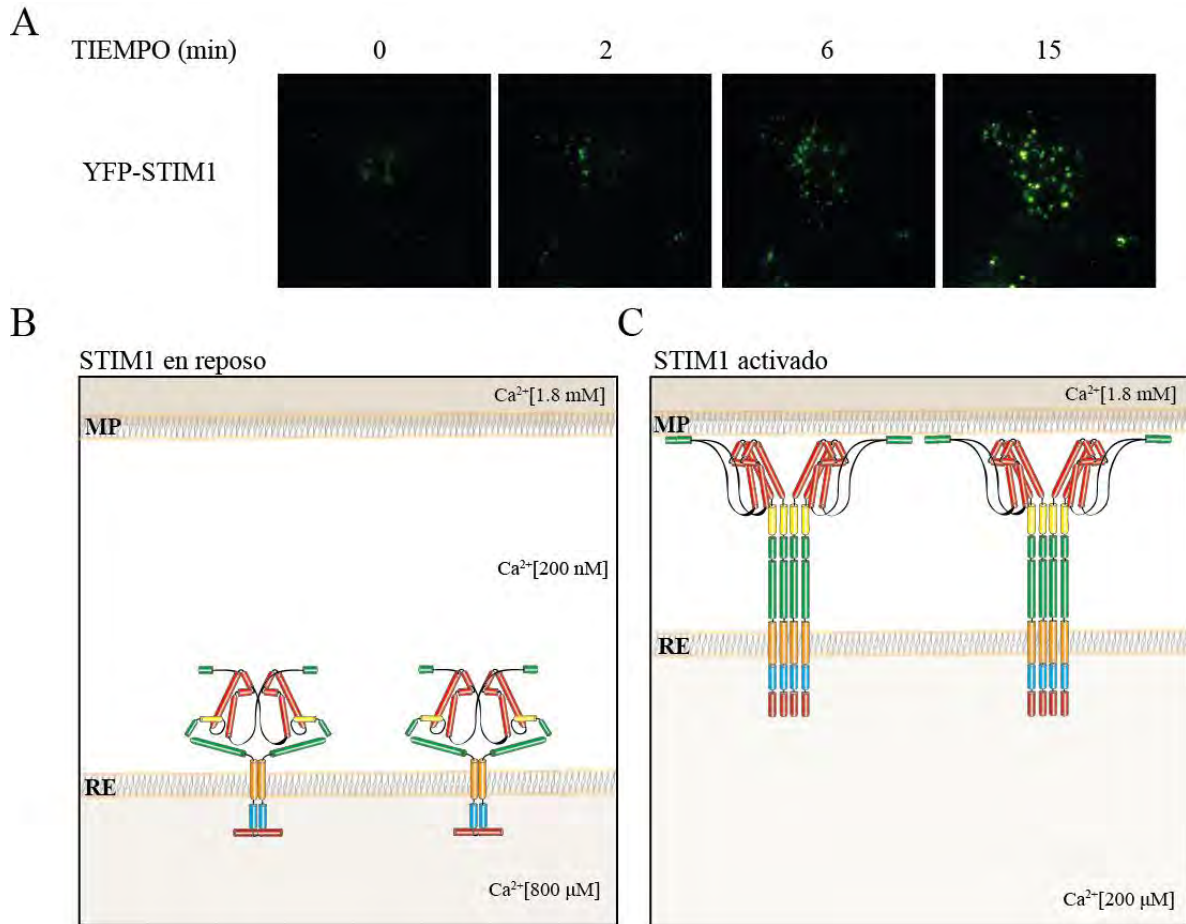


Figura 1. Formación de punta de STIM1. **A.** STIM1 se acumula cerca de la MP cuando se vacía el RE de calcio. Por medio de microscopía de reflexión total interna de fluorescencia (TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence) se observan células transfectadas con YFP-STIM1 cuando se vacía el RE con tapsigargina ($1\mu\text{M}$) y se visualiza la relocalización de STIM1 cerca de la MP. **B.** Esquema de localización de STIM1 antes de vaciar el RE. STIM1 se encuentra formando dímeros y se distribuye homogéneamente en la membrana del RE. **C.** Esquema de formación de punta de STIM1, La proteína se homooligomeriza en regiones cercanas a la membrana plasmática cuando desciende la concentración de calcio en el RE. Por claridad no se esquematiza el canal Orail en la membrana.

La interacción con los lípidos de la MP facilita la acumulación de STIM1 en las uniones de RE-MP. Así mismo, las regiones enriquecidas en PIP_2 favorecen el reclutamiento de proteínas accesorias que regulan la actividad de Orail (40). Eliminar el DPB no afecta la oligomerización de

STIM1 pero suprime la formación de *puncta* en la proximidad de la MP, provocando una inhibición parcial de la SOCE (41).

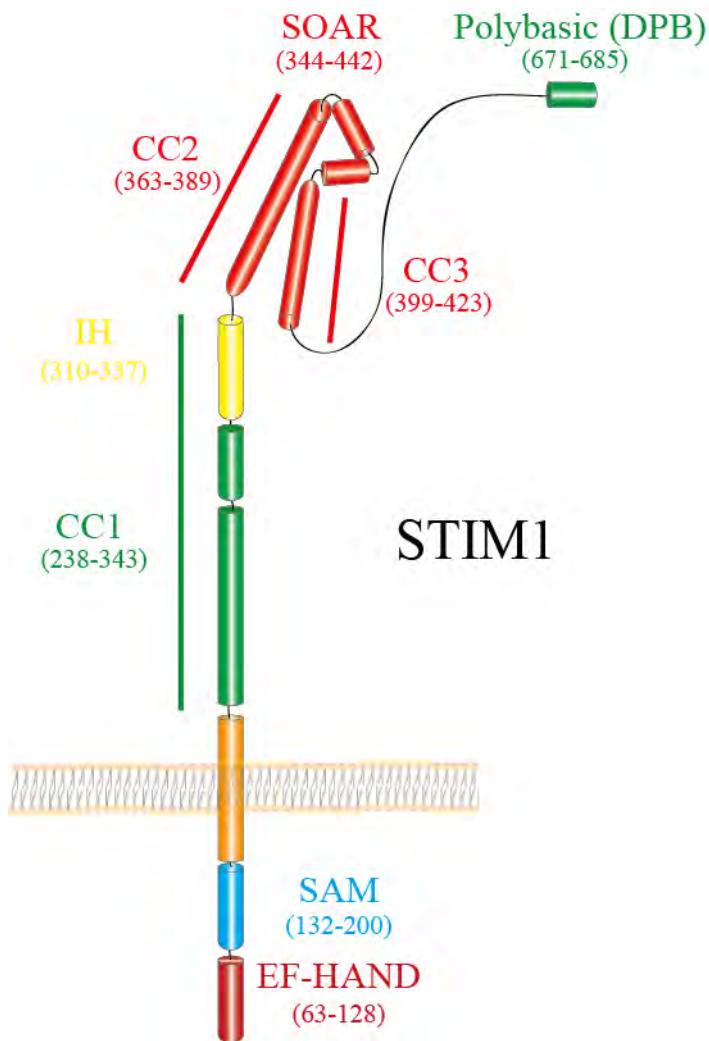


Figura 2. Topología de STIM1.

Esquema de los múltiples dominios que presenta STIM1. En la parte que da al lumen del RE se encuentra un dominio de unión a calcio (EF-HAND) y dominio α -estéril (SAM) que ayuda a la oligomerización. STIM1 presenta un cruce transmembranaral y en la región citoplasmática hay 3 dominios hélices super enrolladas (CC1,CC2 y CC3). En la región CC1 se encuentra la hélice inhibitoria. En la región CC2 y CC3 se encuentra la región conocida como SOAR o CAD (STIM-Orai activating región o CRAC activation domain). En el extremo carboxilo se encuentra el dominio polibásico (DPB) importante para anclar a STIM1 a la MP.

Es importante indicar que STIM1 puede interaccionar y activar canales TRPC (Transient Receptor Potential Canonical) de forma dependiente de las reservas de Ca^{2+} (42, 43). De hecho hasta antes del 2005 los canales TRPC1 y TRPC3 eran los mejores candidatos a ser los canales operados por las reservas (SOCs). No obstante, los canales TRPC no recapitulan todas las características biofísicas de la Icrac, al ser catiónicos no selectivos además de presentar una gran variedad de estímulos que los pueden activar (diacilglicerol, receptores acoplados a proteínas G, Ca^{2+} , carbacol) (8).

Actualmente se considera que los canales TRPC pueden funcionar como SOCs dependiendo el tipo celular y los niveles de expresión de STIM1 y Orai1, por lo que se vuelve muy complejo entender papel de las subunidades TRPC en la entrada de calcio operada por las reservas (44).

1.1.2. Orai1

Un año después de la identificación de STIM1 como miembro de la SOCE, 2 grupos descubrieron casi simultáneamente a Orai1. El primer grupo, identificó un polimorfismo de nucleótido único en una familia que presentaba un tipo de síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SICS) atribuida a defectos en la SOCE de sus linfocitos T (24). En tanto que ambos grupos emplearon tamizajes masivos de ARNi en células S2 de *Drosophila* y evaluaron la translocación de NFAT al activar la SOCE con TG o evaluaron la supresión de la SOCE mediante imagenología Ca^{2+} (24, 25).

En mamíferos la familia de canales Orai cuenta con 3 homólogos (Orai1-3). Todos ellos son altamente selectivos a Ca^{2+} pero con distintas cinéticas de activación e inactivación dependiente de Ca^{2+} (45, 46). Orai presenta 4 cruces transmembranales y sus extremos amino y carboxilo terminal están ubicados hacia el citoplasma. Orai puede formar heteromultímeros entre Orai1 y Orai3 para formar canales activados por ácido araquidónico o por leucotrieno C4 (47, 48). Sin embargo, los canales activados por el vaciamiento de Ca^{2+} del RE son obligadamente homómeros de subunidades de Orai (49, 50).

Con base en la estructura cristalográfica obtenida de dOrai (de *Drosophila*) (51) la estequiometría de los canales Orai1 funcionales es de hexámeros, no obstante existe una vasta evidencia experimental que señala

un arreglo tetramérico (49, 50, 52–54). Por lo que aún hay controversia respecto a este problema (Fig.3).

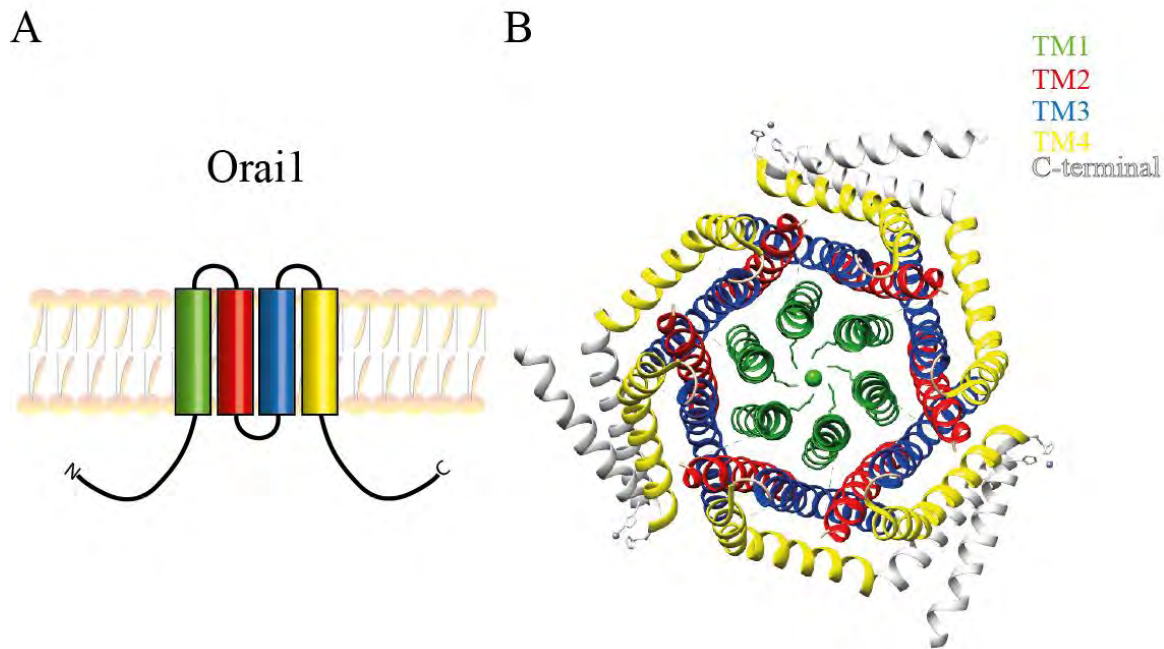


Figura 3. Topología de Orai1 y arreglo estequiométrico. **A.** Topología de Orai1, el canal cuenta con 4 cruces transmembranales y los extremos amino y carboxilo dan hacia la parte citoplasmática. **B.** Hexámeros de Orai de acuerdo a la estructura cristalográfica obtenida de *Drosophila* (51). Se puede observar que el segmento transmembranal 1 es el formador del poro del canal. Código de acceso PDB 4HK.

Los canales Orai1 presentan una selectividad 1000 veces mayor por Ca^{2+} que por Na^{+} , esta característica viene dada principalmente por el glutamato extracelular 106 que se localiza al inicio del poro del canal (51, 55, 56). De acuerdo a la estructura cristalográfica de dOrai y a experimentos de accesibilidad de cisteínas el poro del canal está formado exclusivamente por el primer segmento transmembranal (TM1) (51, 56). En cuanto al lado intracelular, el carboxilo terminal de Orai1 es el mayor implicado en la interacción con STIM1 durante su activación, mientras que el papel de la región amino terminal aún está en debate, puesto que tiene una interacción

débil con STIM1 pero diferentes mutantes de Orai1 en donde se ha eliminado el amino terminal suprimen por completo la SOCE (35, 57).

1.1.3. Mecanismo de activación de Orai1

El mecanismo de activación de Orai1 está directamente relacionado con la serie de cambios conformacionales que llevan a STIM1 a una distancia accesible para interactuar con Orai1 en la MP. Como se mencionó en las secciones previas el primer paso que acciona el mecanismo de activación de la SOCE se da cuando desciende la concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE, esto produce la oligomerización de moléculas de STIM1 hasta formar conglomerados localizados en las uniones de RE-MP. Durante este proceso el fragmento SOAR queda expuesto para interactuar con el amino y carboxilo terminal de Orai1 y de esta forma producir la apertura del canal (58, 59).

Actualmente existe un gran interés en conocer los detalles moleculares de la asociación STIM1-Orai1, la ausencia de una estructura cristalográfica que comprenda a STIM1 completo, durante su estado quiescente y activo (interactuando con Orai1) conlleva a emplear fragmentos de STIM1 para determinar su papel en el mecanismo de activación de Orai1. Tal es el caso de la estructura cristalográfica del fragmento SOAR de humano (60). El fragmento SOAR que corresponde del aminoácido 345 al 444 de STIM1 presenta una estructura en forma de “R” mayúscula, que se agrupa en dímeros de cadenas paralelas y presenta una marcada polaridad (60) (Fig.4). La formación del dímero se da por interacciones hidrofóbicas entre los residuos Leu347, Trp350 y Leu351 de un monómero con Leu436, Ile433 y Trp430 de otro monómero, por puentes de hidrógeno entre Thr354 con Arg429 y por apilamiento de la Tyr361 de ambos monómeros (61, 62). La

conformación en dímero de SOAR es necesaria para interactuar con Orai1 por medio de una región compuesta de 4 lisinas y una arginina (Lys382, Lys384, Lys385, Lys386, y Arg387) que en conjunto forman el denominado parche básico (60) (Fig.4).

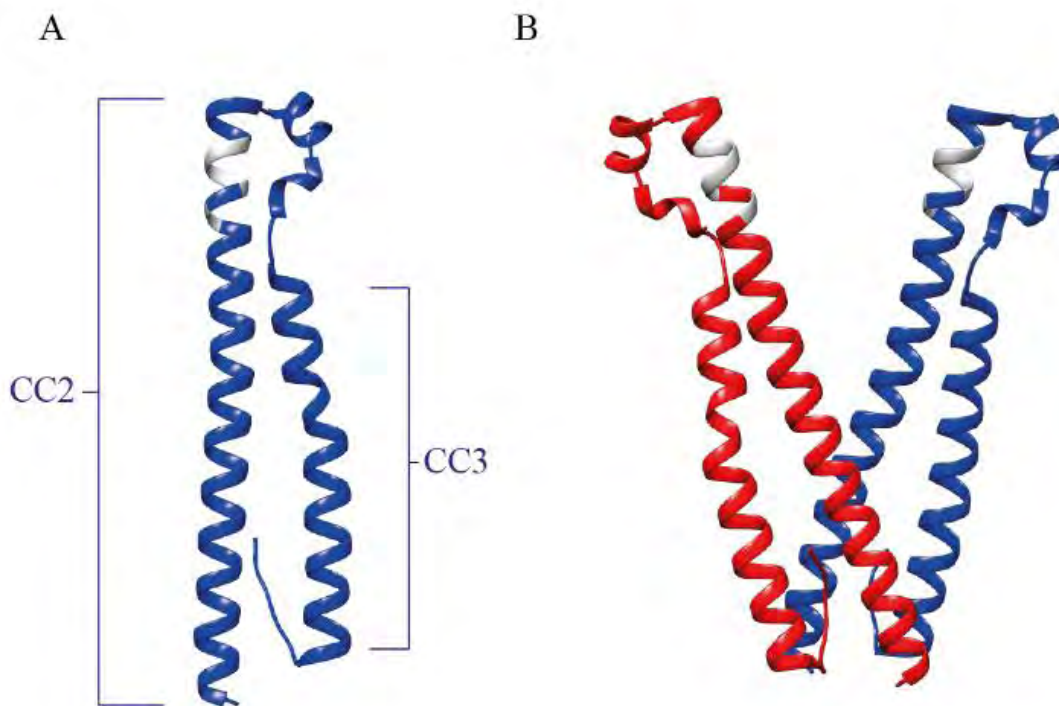


Figura 4. Estructura cristalográfica de SOAR. **A.** Monómero de SOAR presenta una estructura de “R” mayúscula. Se esquematiza la localización de los dominios CC2 y CC3. En gris se remarca la región del parche básico que interacciona con Orai1. **B.** Dímero de SOAR. En gris se remarca la región del parche básico y se observa una interacción paralela entre ambas cadenas de cada monómero. Estructura cristalográfica tomada de (59). Código de acceso PDB: 3TEQ. Las imágenes se generaron con el software Chimera 1.9

Estudios sugieren que el parche básico interacciona con una región abundante en residuos ácidos en el carboxilo terminal de Orai1 (63–65). Mutaciones que neutralizan las cargas en Orai1 o STIM1 desacoplan la interacción e inhiben la SOCE, sin embargo mutar las cargas en ambas proteínas produce la inhibición de la SOCE pero no la supresión de la

interacción, sugiriendo una segunda región de interacción entre STIM1 y Orai1 (66).

Posterior a la cristalización del fragmento SOAR, el grupo de Romanin empleó resonancia magnética nuclear (NMR) de fragmentos resistentes a proteólisis para resolver la región CC1-CC2 de STIM1(67). La región obtenida abarca de los aminoácidos 312 a 387 y presenta diferencias notables con la estructura cristalográfica de SOAR, entre las diferencias más notables están los residuos importantes para la interacción con Orai1 y la formación del dímero por medio de interacciones anti-paralelas de sus cadenas (67) (Fig. 5).

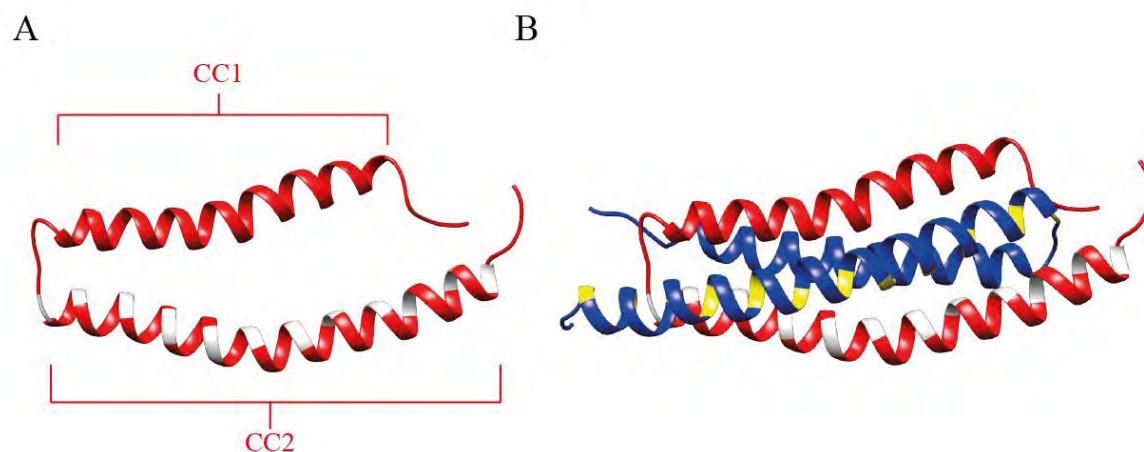


Figura 5. Estructura cristalográfica de la región CC1-CC2 de STIM1. **A.** Monómero de CC1-CC2. Se esquematiza la localización de los dominios CC1 y CC2. En gris se remarca la región propuesta para interactuar con Orai1. **B.** Dímero de CC1-CC2. Nótese que la disposición entre ambos monómeros es por interacción anti-paralela de cada cadena. En gris se remarca la región de interacción con Orai1 para el monómero de color rojo y en amarillo se remarcan los residuos de interacción con Orai1 para el monómero en color azul. Estructura tomada de (66). Código de acceso PDB: 2MAJ. Las imágenes se generaron con el software Chimera 1.9

Adicional a la estructura CC1-CC2, en el mismo trabajo se reportó el homodímero CC1-CC2 en complejo con el carboxilo terminal de Orai1 (67). Esta estructura muestra importantes cambios conformacionales en CC1-CC2 para acoplar el fragmento de Orai1 y señala a los residuos de Pro344, Leu347, Leu351, His355 y Val359 del lado amino terminal de un monómero y Tyr362, Lys366, Ala369, Leu373, Ala376, Ala380 e Ile383 del lado carboxilo del otro monómero como los aminoácidos que interaccionan con Orai1. Por otro lado en el fragmento carboxilo de Orai1 ningún residuo ácido interacciona directamente con CC1-CC2 (67). De esta forma ambas estructuras señalan modelos muy distintos con sitios de unión y regiones de dimerización inconsistentes. Algunos autores señalan que la estructura cristalográfica de SOAR es la conformación en estado quiescente de STIM1, mientras que el fragmento CC1-CC2 obtenido por NMR es la conformación activa que interacciona con Orai1 (68). No obstante, hace falta más información para resolver como se produce el acoplamiento entre STIM1 y Orai1.

1.2 Uniones RE-MP

La localización de Orai1 en las uniones de RE-MP es dependiente de la interacción con STIM1, por lo que el complejo molecular de la SOCE está restringido a uniones de RE-MP (69, 70). La localización de cúmulos de activación de STIM1-Orai1 en regiones delimitadas tiene importantes consecuencias fisiológicas, como el control localizado en el incremento de Ca^{2+} o un rellenado del RE más eficiente (11).

Las uniones de RE-MP son ubicuas en células eucariotas e involucran la aproximación de la membrana del RE y la de la MP, usualmente de 7 a 30 nm de separación, sin que haya fusión entre ambas membranas. Estas

estructuras son muy dinámicas ensamblándose y desensamblándose continuamente, su papel como puentes moleculares facilita eventos de recambio de lípidos, tráfico de proteínas y señalización de Ca^{2+} (10, 71). Se han encontrado más de 70 proteínas diferentes en las uniones de RE-MP (72), incluyendo junctinas, mitsuguminas, sinaptotagminas y junctofilinas (10).

Las uniones de RE-MP mejor caracterizadas son las de musculo estriado esquelético y cardiaco, aquí el receptor de rianodina y los canales de calcio activados por voltaje sensibles a dihidropiridinas forman uniones denominadas triadas o diadas según el número de contactos entre el retículo sarcoendoplásmico con la MP (71). La activación sincrónica de los canales sensibles a dihidropiridinas y los receptores a rianodina producen señales de Ca^{2+} esenciales para la contracción muscular (10). No obstante, ratones knockout para STIM1 han mostrado fatiga muscular y muertes prematuras producidas por miopatías, lo que sugiere un papel importante de STIM1 en células del musculo estriado y cardiaco (73).

STIM1 funge como puente molecular entre el RE y la MP, su sobreexpresión aumenta el número de uniones de RE-MP por célula (74). STIM1 se ancla a la MP mediante el dominio polibásico en su extremo carboxilo que interacciona con las cargas negativas de los fosfoinosítidos (41, 75). La distancia calculada mediante microscopía electrónica sugiere que STIM1 está de 10 a 17 nm de distancia de la MP (9, 76). Otros estudios empleando un sistema inducible de unión química muestran que STIM1 puede reacomodarse en espacios entre el RE y la MP de 6 nm, mientras que Orail requiere de 11 a 14 nm para acomodar sus porciones citosólicas (77).

Recientemente el grupo de Zhou desarrolló una nueva técnica para hacer proteómica de las uniones de RE-MP, identificando a más de 70 proteínas asociadas a estas estructuras (72). Con esta técnica TMEM110 (también llamado STIMATE) fue identificado como un nuevo miembro de la SOCE al interactuar con STIM1 y promover cambios conformacionales que favorecen su localización en las uniones de RE-MP (72, 78). Sin embargo, existe una vasta lista de proteínas que se localizan en las uniones de RE-MP y regulan la entrada de Ca^{2+} . Algunas de estas proteínas accesorias incluyen a septina (79), APC (Adenomatous polyposis coli) (33), ERp57(80), P100(81), golli(82), calmodulina (83), POST (Partner of STIM) (84), CRACR2A (85), E-Syt1 (Extended synaptotagmin-1) y SARAF (40) (Fig. 6).

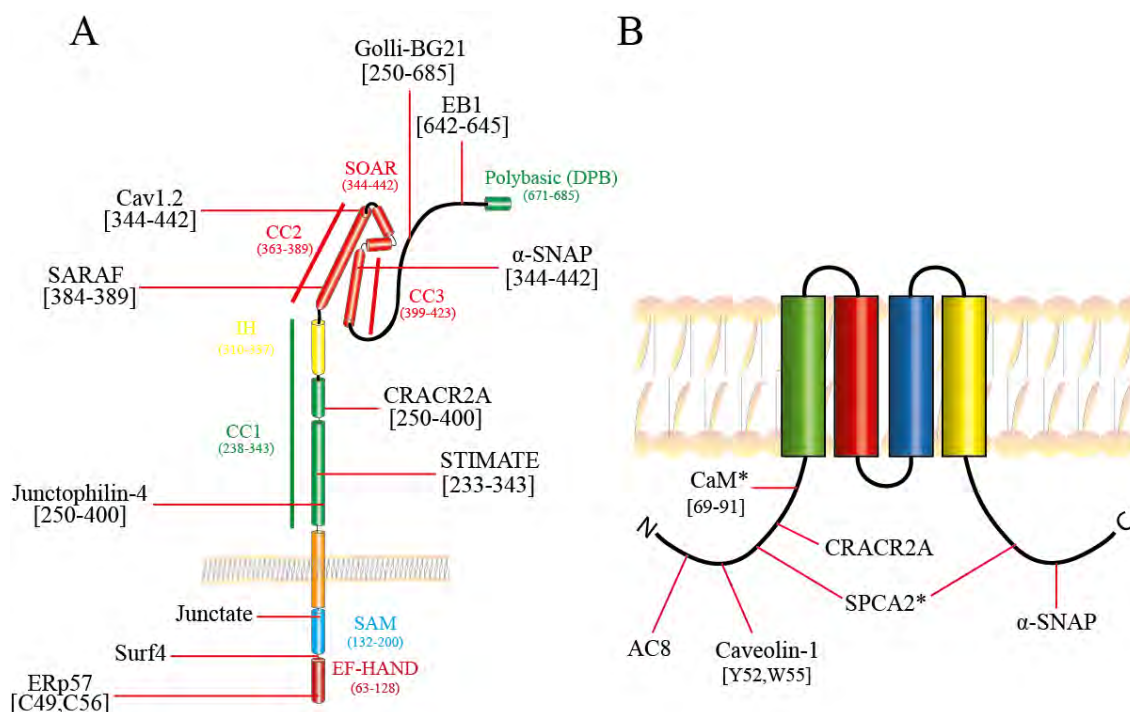


Figura 6. Proteínas accesorias de STIM1 y Orai1. A. Esquema de las proteínas que interactúan con STIM1, entre corchetes se marca la región de amino ácidos importantes para proporcionar la interacción. B. Esquema de las proteínas que interactúan con Orai1. El asterisco indica proteínas que interactúan bajo condiciones particulares o están en debate.

Resulta interesante el hecho de que proteínas accesorias como STIMATE y E-Syt1 presentan dominios polibásicos de unión a fosfoinosítidos al igual que STIM1 (72, 86). De esta forma los dominios enriquecidos en PIP₂ juegan un papel importante para agrupar componentes de la SOCE (39, 87, 88). Además, disminuir los niveles de PIP₂ y de PIP₃ lleva a la inhibición en la formación de punta y la supresión de la SOCE (88). Por otro lado el colesterol también es un componente importante en las uniones de RE-MP, su transporte no vesicular se da en estas estructuras mediante la participación de proteínas de la familia ORP (Oxysterol-binding related proteins) que además de transportar colesterol han probado interactuar con fosfoinosítidos (10, 89). Además, el colesterol membranal ha demostrado ser un regulador muy importante de la SOCE, puesto que disminuir el colesterol lleva a la inhibición de punta de STIM1 lo que provoca la inhibición de la SOCE.

1.3 El papel de las balsas lipídicas en la regulación de la SOCE

Experimentos de expresión heteróloga en levaduras muestran que STIM1 y Orai1 son los componentes básicos que reconstituyen la SOCE (90). Sin embargo, una multitud de proteínas accesorias y dominios de lípidos juegan un papel importante en su regulación. Tal es el caso de las balsas lipídicas, que son regiones de la MP ricas en esfingolípidos y colesterol, altamente dinámicas con tiempos cortos de vida (menos de 1 segundo) y que abarcan una superficie de 10 a 200 nm² (91).

Los primeros reportes que evidenciaron el ensamblaje de los componentes de la SOCE en balsas lipídicas provienen de experimentos en células endoteliales con ratones knockout para caveolina-1 (Cav-1) (92), una proteína esencial para formar un tipo de balsas lipídicas denominadas caveolas (93). Ratones deficientes en Cav-1 mostraron una disminución en

la entrada de Ca^{2+} activada por acetilcolina (92). Posteriormente el grupo de J. Rosado demostraría que la asociación entre STIM1/Orai1/TRPC1 se veía afectada al tratar las células con metil- β -ciclodextrina (M β CD), un compuesto que reduce los niveles de colesterol en la MP (94, 95).

Al parecer, el carácter regulador de las balsas lipídicas recae fuertemente sobre STIM1. Un ejemplo son los canales TRPC1 que muestran 2 formas de activación, una de manera dependiente de STIM1 al producirse el vaciamiento de Ca^{2+} del RE y la otra cuando son activados por agonistas. STIM1 interacciona y activa a TRPC1 cuando se produce el vaciamiento del RE solo si el canal se localizan en balsas lipídicas, de lo contrario STIM1 no se asocia a TRPC1 y la apertura del canal es por agonistas (13, 96).

El mecanismo molecular que dirige a STIM1 a las balsas lipídicas permanece sin explorar, aunque la evidencia señala que afectar la integridad de las balsas lipídicas con M β CD produce la inhibición de la formación de punta de STIM1, un paso indispensable para la activación de Orail (13, 94, 97). Debido al complejo número de proteínas involucradas en las uniones de RE-MP, la inhibición en la formación de punta de STIM1 al reducir los niveles de colesterol sugiere tener efecto en más de una proteína involucrada en la formación de las uniones de RE-MP, pero a la fecha se desconoce el papel de las balsas lipídicas en la regulación de estas estructuras celulares.

Las balsas lipídicas son críticas durante los primeros pasos del ensamblaje de los componentes de la SOCE, ya que remover el colesterol con M β CD una vez que se ha formado el complejo de STIM1-Orai1, no produce la inhibición de la entrada de Ca^{2+} (98). Recientemente el grupo de Romanin empleó células tratadas con colesterol oxidasa para eliminar el colesterol membranal, arrojando resultados contradictorios a los reportados previamente. De acuerdo a estos estudios, Orail presenta un dominio de unión a colesterol (en inglés, CB domain) en su región amino terminal,

mutaciones en amino ácidos clave que conforman el dominio CB incrementan la actividad del canal al igual que eliminar el colesterol, todo esto de manera dependiente de STIM1 (99).

1.4 Las balsas lipídicas

El concepto de balsas lipídicas es un término que se ha ido refinando en la última década, los primeros indicios de la existencia de dominios heterogéneos en la MP provienen del análisis de la composición lipídica en membranas de células epiteliales, donde quedó demostrado que distintas áreas de la MP presentan diferente composición de fosfolípidos y colesterol (100, 101). Simons y Van Meer atribuyeron la distribución asimétrica de lípidos al aparato de Golgi y a las interacciones intermoleculares de los esfingolípidos que ocasionan áreas enriquecidas y delimitadas (102). Más tarde, el uso de membranas lipídicas artificiales llevó a la caracterización fisicoquímica de regiones ordenadas y desordenadas, identificando al colesterol como un componente clave en la organización de las fases ordenadas (103, 104).

El estudio de las balsas lipídicas en su contexto biológico ha sido un reto metodológico importante. La restricción espacial de estos dominios membranales, aunado a los tiempos cortos de vida genera controversias respecto a los alcances y conclusiones de la metodología empleada para el estudio de las balsas lipídicas. Tal es el caso del aislamiento de las membranas resistentes a detergentes (DRMs, detergent-resistance membranes). Esta metodología representa el procedimiento bioquímico más utilizado para caracterizar proteínas residentes a balsas lipídicas y consiste en tratar a las células con detergentes no iónicos a 4°C (105). El uso de las DRMs ha permitido identificar una gran cantidad de proteínas asociadas a

regiones enriquecidas en colesterol (106). Así mismo se ha encontrado una estrecha relación en la composición lipídica de las DRMs y las regiones ordenadas de membranas artificiales (107). Además, está demostrado que liposomas enriquecidos en colesterol presentan insolubilidad a detergentes no iónicos y de manera análoga, membranas de células empobrecidas en colesterol incrementan su solubilidad a detergentes (108). Los puntos en contra del uso de las DRMs señalan la necesidad de extraer las fracciones membranales a una temperatura no fisiológica, al mismo tiempo, el uso de detergentes supone una dramática perturbación de las membranas, pudiendo ocasionar desorganización de los lípidos y las proteínas asociadas a éstos (109, 110).

No obstante, las limitaciones de emplear las DRMs, el desarrollo de nuevas metodologías de microscopía y técnicas espectroscópicas han permitido tener una mejor idea de los dominios de balsas lipídicas (111). De tal forma que se ha generalizado el concepto hasta reconocer importantes funciones fisiológicas y patológicas que involucran el establecimiento de complejos protéicos y vías de señalización asociadas a balsas lipídicas.

La función a cargo del microdominio de balsas lipídicas estará estrechamente relacionada con el tipo celular de que se trate, pero en términos generales fungen como reservorios de lípidos durante procesos de deformación de membrana, que incluye fenómenos de migración, fagocitosis, sinápsis inmunológica, vesiculación e internalización de bacterias y virus (112). Además participan directamente en la organización de proteínas, un ejemplo bien conocido es durante la activación de células-T, donde los receptores TCR, BCR, FcR y cinasas Src, proteínas clave en procesos de señalización de inmunoreceptores se localizan en balsas lipídicas (113).

Dado que las balsas lipídicas funcionan como centros de señalización y coordinan procesos de reclutamiento y organización de proteínas. Una consecuencia directa es la ocurrencia de diversas patologías asociadas a balsas lipídicas, incluyendo diabetes, envejecimiento y aterosclerosis (114). También se ha encontrado una estrecha relación entre los dominios de balsas lipídicas y la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer, dado que los procesos amiloidogénicos ocurren en regiones enriquecidas en colesterol (115, 116).

1.5 El colesterol

Las células eucariotas poseen 3 clases principales de lípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Los glicerofosfolípidos y esfingolípidos pueden variar para producir una diversidad de más de 1000 diferentes estructuras. En contraste, el colesterol representa el único tipo de esteroide en células de mamífero (117). El colesterol es el principal componente de las balsas lipídicas y puede llegar a constituir del 20 al 25% de los lípidos de la MP (118). Además el colesterol es el precursor de todas las hormonas esteroideas y sales biliares, otorgando importantes funciones a nivel sistémico durante procesos de inflamación, metabolismo y desarrollo (119).

Las células animales obtienen colesterol a través de la dieta diaria o por la biosíntesis de *novo*. Cuando es por ingesta, involucra una vía bien caracterizada de transportadores y receptores que lo empaquetan y movilizan por el torrente sanguíneo para depositarlo en tejidos periféricos. Por otro lado, su síntesis ocurre en el RE de cualquier célula animal. Para esto emplea al Acetil coenzima A como primer intermediario, posterior a varias reacciones enzimáticas que involucran a más de 30 enzimas se finaliza con la síntesis de colesterol (118)(Fig. 7).

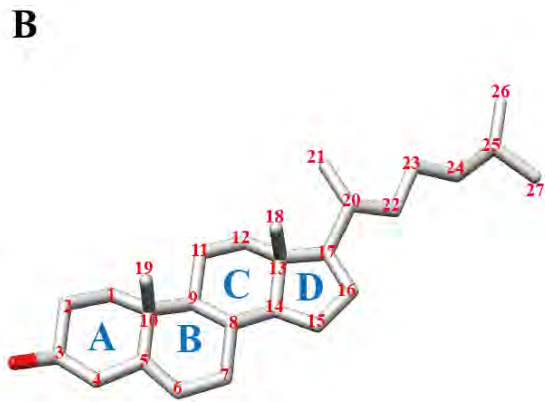
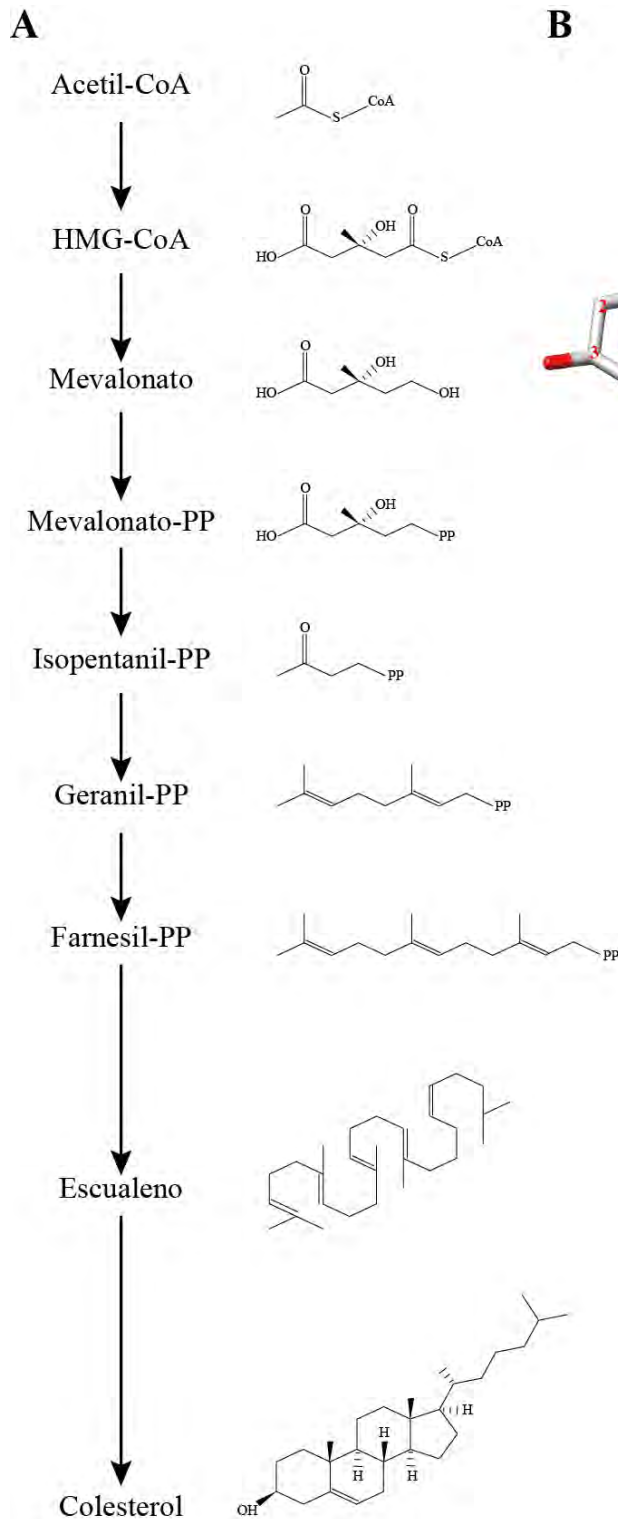


Figura 7. Ruta de biosíntesis de colesterol. A. A partir de 3 moléculas de Acetil coenzima A (CoA) se produce 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Posteriormente el HMG-CoA se reduce a Mevalonato y se fosforila 2 veces para después sufrir una reacción de descarboxilación y producir Isopentil pirofosfato. Este último se isomeriza y reacciona con otra molécula de Isopentil pirofosfato para producir Geranyl pirofosfato. El Geranyl pirofosfato reacciona con Isopentil pirofosfato para producir Farnesil pirofosfato. 2 moléculas de Farnesil pirofosfato reaccionan para formar Escualeno. Finalmente el Escualeno sufre varias reacciones de ciclación para formar colesterol. **B.** Estructura de colesterol. Se muestran sus 27 carbonos y los anillos que lo componen.

La molécula del colesterol está compuesta por 4 anillos de carbono fusionados, la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo A le

brinda un carácter anfipático. Los carbonos 10 y 13 presentan radicales metilo y una insaturación entre los carbonos 5 y 6. Del lado del anillo D en el carbono 17 se encuentra una cadena alifática de 8 carbonos, lo que le brinda propiedades hidrofóbicas.

La conformación en anillos esteroideos le confiere una estructura plana y de alta rigidez (119)(Fig. 7). Estas características hacen posible que la molécula se intercale entre los fosfolípidos para generar bicapas lipídicas ordenadas y de baja fluidez (120). De la misma forma, la estructura plana e hidrofóbica del colesterol favorece la interacción con proteínas transmembranales. Los ejemplos son extensos e incluyen receptores, transportadores y canales iónicos. Es importante discriminar los cambios funcionales promovidos por el colesterol a los efectos indirectos que ocasiona el colesterol en las membranas biológicas (121). Para discernir entre estas 2 opciones hay diversas metodologías que buscan identificar regiones de aminoácidos que interaccionan de manera no covalente con él colesterol. En la siguiente sección se discuten los principales dominios de unión a colesterol.

1.5.1. Dominios de unión a colesterol

Para la identificación de una proteína residente de balsas lipídicas las metodologías que más se emplean son el aislamiento de la proteína en DRMs y estudios funcionales donde se remueve el colesterol con M β CD, filipinas o mediante oxidación enzimática con la enzima colesterol oxidasa (99, 122). Solo una menor proporción del total de las proteínas de la MP se localizan en balsas lipídicas (123). Por lo que la identificación de dominios de unión a colesterol es un buen referente para indicar que una proteína se encuentra en balsas lipídicas. Se reconocen distintos dominios de interacción con

colesterol, pero quizá el más simple y de alta frecuencia en proteínas que unen colesterol es el dominio de **Amino ácidos Consenso que Interacciona y Reconoce Colesterol (CRAC**, en inglés Cholesterol recognition/interaction amino acid consensus, Homónimo de Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current¹) (124). En contraste con otros dominios de interacción con colesterol, como el dominio sensor de esteroides (SSD, sterol sensing domain) o el dominio START (steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain) abarcan grandes regiones de la proteína o implican un arreglo estructural bien definido (124, 125).

Los sitios CRAC se han encontrado en distintas proteínas que interaccionan fuertemente con colesterol. Entre ellas caveolina-1, el péptido β -amiloide y el virus de VIH (125). Sin embargo, dada la simplicidad de la secuencia consenso de los dominios CRAC, su presencia no es garantía para la unión con colesterol, por lo que deben existir otros factores que aumentan la probabilidad de identificar un verdadero dominio CRAC.

1.5.2. Dominios CRAC

Los dominios CRAC se describieron por primera vez en el receptor de benzodiazepinas (126). Consecuentemente, a partir del análisis de las secuencias de distintas proteínas previamente descritas para interaccionar con colesterol, se llegó a la secuencia consenso L/V-X(1-5)-Y-X(1-5)-R/K, donde X puede ser de 1 a 5 amino ácidos cualesquiera (126).

Estructuralmente los dominios CRAC están formados por una región hidrofóbica en su lado amino terminal (L/V) y una región polar del lado carboxilo (R/K). Comúnmente el anillo aromático de la tirosina se apila con

¹ A partir de este punto se empleará la abreviación CRAC como dominio de unión a colesterol

el anillo A del grupo esterol y mediante interacciones electrostáticas con el grupo OH. El carácter hidrofóbico de la leucina o la valina provee afinidad para interactuar con la cadena alifática del colesterol, mientras que la arginina o lisina forma una cavidad para alojar a toda la molécula (124, 126).

Posterior a la identificación del dominio CRAC, distintas proteínas, incluyendo a Orail han sido identificadas para interactuar con colesterol (99), demostrando alta sensibilidad al pegado de colesterol cuando se mutan residuos del dominio CRAC, principalmente la tirosina central (124). De manera análoga, recientemente se describió la secuencia orientada en la dirección inversa a los dominios CRAC, las regiones CARC, que difieren en el amino ácido aromático central, donde la secuencia CARC puede ser indistintamente de tirosina o fenilalanina (127).

2. HIPÓTESIS

STIM1 presenta un dominio de unión a colesterol que es importante para la interacción con Orail.

3. OBJETIVOS

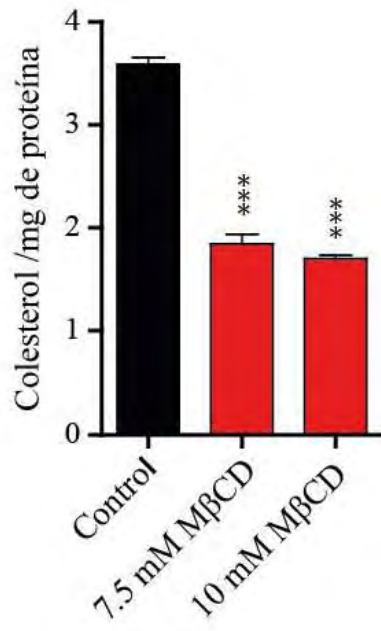
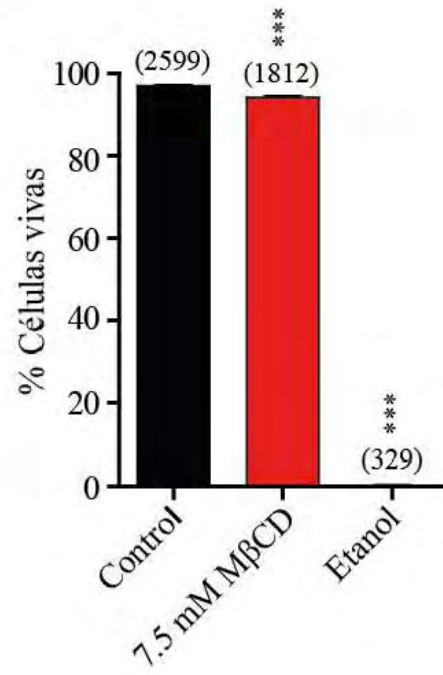
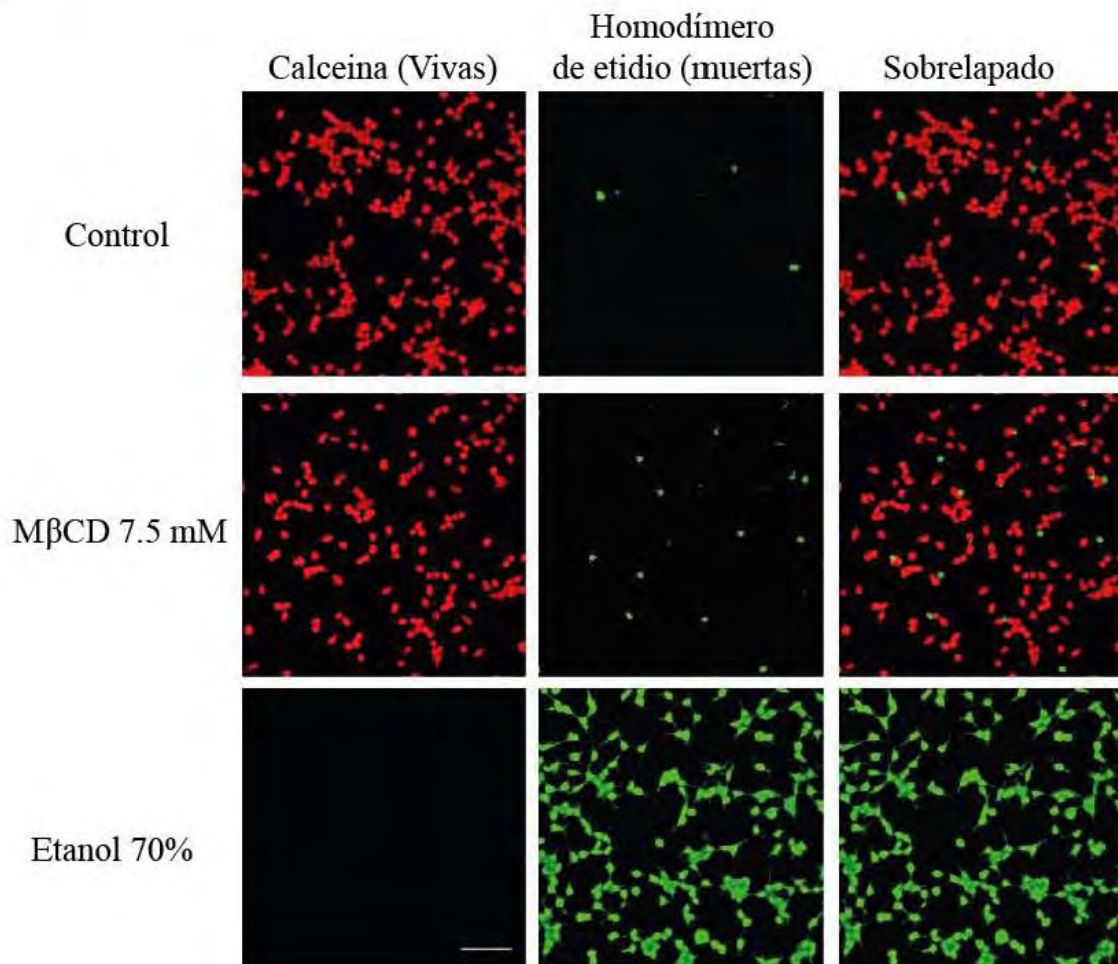
Identificar un dominio de unión a colesterol en STIM1 y determinar qué papel juega en la función de la SOCE.

4. RESULTADOS

4.1. El tratamiento con M β CD remueve colesterol sin afectar la viabilidad

Previo al desarrollo experimental se cuantificó la concentración de colesterol en células HEK293 tratadas con 10 mM y 7.5 mM de metil- β ciclodextrina (M β CD) por 50 y 90 minutos respectivamente para reducir su colesterol (122, 128). Los niveles de colesterol en comparación con células sin tratamiento fueron de 47 y 51% con 10 mM y 7.5 mM de M β CD respectivamente (Fig. 8A). Dada la escasa diferencia entre ambas condiciones, se tomó la concentración de 7.5 mM de M β CD puesto que la examinación al microscopio mostraba células con buena morfología, mientras que las células tratadas con 10 mM de M β CD se observaron con morfología esférica. Para descartar un efecto citotóxico de la M β CD se realizó un ensayo de viabilidad celular. Las células sometidas al tratamiento de 7.5 mM de M β CD mostraron una ligera, aunque significativa disminución en la viabilidad celular (Fig. 8B), del 94.14%, comparada con el 97.04% en células control. Con estos resultados, se procedió a emplear esta estrategia experimental en todos los ensayos, salvo otra cosa se indique en el texto.

Figura 8. Determinación del contenido de colesterol y viabilidad celular. **A.** Cuantificación del contenido de colesterol por mg de proteína total en lisados de células previamente tratadas con 7.5 mM y 10 mM de M β CD por 1.5 horas y 50 minutos respectivamente. Barra negra representa células sin tratamiento. **B.** Porcentaje de células vivas y viables cuando se tratan con 7.5mM de M β CD por 1.5 horas a 37°C. La barra control son células sin ningún tratamiento y como control negativo, células tratadas con etanol al 70% por 2 min. **C.** Ejemplo de células con los tratamientos de panel B. Calceína (en rojo) es el indicador de células vivas y el homodímero de etidio (en verde) es el indicador de células muertas. Escala de 100 micrometros.

A**B****C**

4.2. Remover colesterol aumenta la actividad de Orai1

Para evaluar el efecto del colesterol en la asociación funcional de Orai1 y STIM1, se emplearon células transfectadas con los plásmidos de Orai1 y SOAR. De esta forma evitamos el efecto de inhibición de punta de STIM1 al remover colesterol (13), produciendo canales constitutivamente activos e independientes del contenido de calcio en el RE. Para reducir el efecto citotóxico del calcio se usaron tiempos cortos de transfección (menos de 24 horas) y se mantuvieron los cultivos en medio Opti-MEM que presenta concentraciones bajas de calcio (0.9 mM) en comparación con el medio DMEM (1.8 mM).

Experimentos de medición de calcio citosólico, empleando reporteros fluorescentes, mostraron un incremento en la entrada de calcio por Orai1 cuando las células fueron tratadas con M β CD en comparación con células con niveles estándares de colesterol (Fig. 9A). El protocolo consistió en estimular con calcio extracelular (1.8mM) y realizar la medición del aumento de calcio citosólico. Posteriormente se removió el calcio extracelular y se siguió con el protocolo clásico para medir la SOCE. Para este procedimiento se empleó tapsigargina (TG), un inhibidor de la Bomba de calcio del RE (SERCA), éste fármaco se adicionó en una solución libre de calcio extracelular lo que lleva al vaciamiento pasivo de calcio en el RE y posteriormente al componente de entrada mediada por Orai1 cuando se repone el calcio en el medio extracelular (Fig. 9A). Siguiendo este protocolo las respuestas máximas en cada adición de calcio extracelular fueron significativamente mayor en células con bajos niveles de colesterol (Fig. 9B).

Sin embargo, explicar el comportamiento del segundo componente de entrada de calcio en células que expresan el dominio SOAR puede resultar

complicado puesto que STIM1 endógeno debiera estar participando. Por esta razón el análisis de la activación de Orail por SOAR se realizó solo con el primer estímulo de calcio extracelular (Fig. 10A).

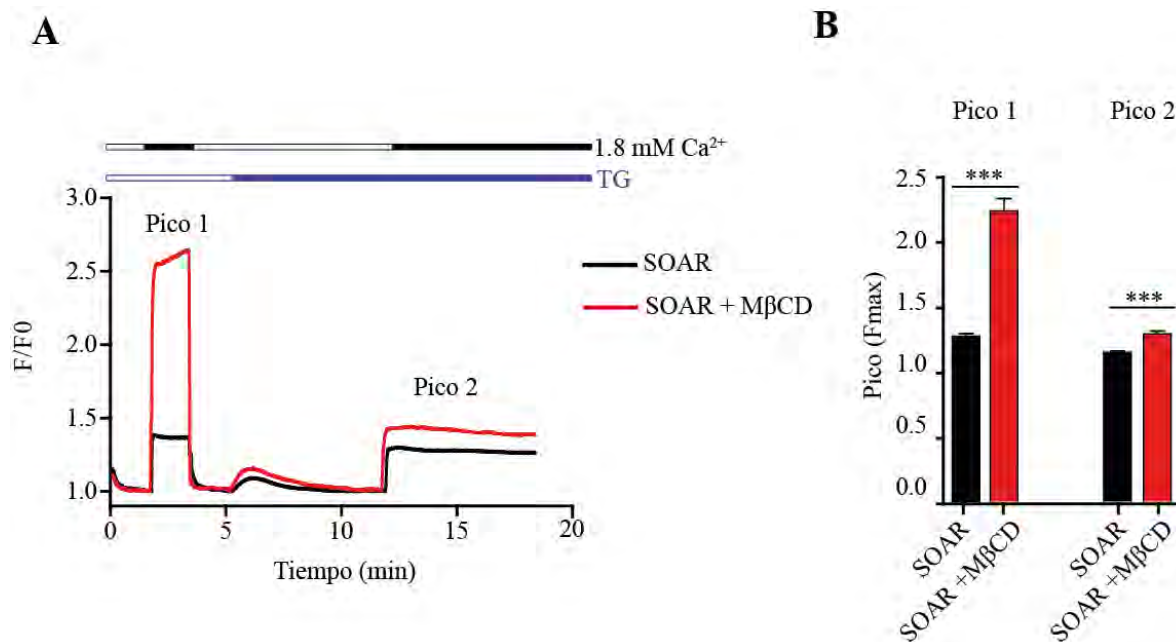


Figura 9. Primer y segundo estímulo de calcio en células que expresan Orail y SOAR con colesterol empobrecido. A. Trazo representativo de la respuesta de incremento de calcio en células que expresan SOAR y Orail, con y sin MβCD. La adición de calcio se etiquetó como pico 1 y pico 2, se hace referencia a ellos en el panel B. **B.** Promedio de los picos máximos de fluorescencia del indicador de calcio en experimentos como los del panel A. Las barras negras representan el promedio de 49 células y las barras rojas fueron 28 células tratadas con MβCD. *** p < 0.001 por un análisis estadístico T-student.

Por medio de un análisis del área bajo la curva (AUC) se observaron diferencias significativas en células con colesterol empobrecido en comparación con células con niveles de colesterol estándar (Fig. 10B). La forma para remover el colesterol membranal fue mediante el compuesto MβCD y adicionalmente se empleó Filipina, un agente quelante de colesterol (129), obteniendo el incremento de entrada de calcio cuando se reduce el colesterol por cualquiera de las 2 estrategias (Fig. 10 A y B). Para corroborar que el efecto observado se debe a la remoción del colesterol, se incubaron las células con una solución equimolar de MβCD y colesterol (1:1 molar),

obteniendo un fenotipo indistinguible al obtenido en las células sin tratamiento (Fig. 10 A y B). Estos resultados fueron confirmados mediante el registro electrofisiológico de la Icrac con la técnica de patch-clamp en su modalidad de célula completa. Para evaluar el papel del colesterol en la actividad de Orail activado por SOAR se aplicó un pulso cuadrado de voltaje desde un potencial de mantenimiento de +50 mV. La activación del canal se realizó mediante un pulso hiperpolarizante a -100 mV durante 100 segundos. Debido a que se trata de un canal fuertemente rectificante, la corriente a potenciales positivos, por arriba de +30mV es prácticamente nula (130, 131).

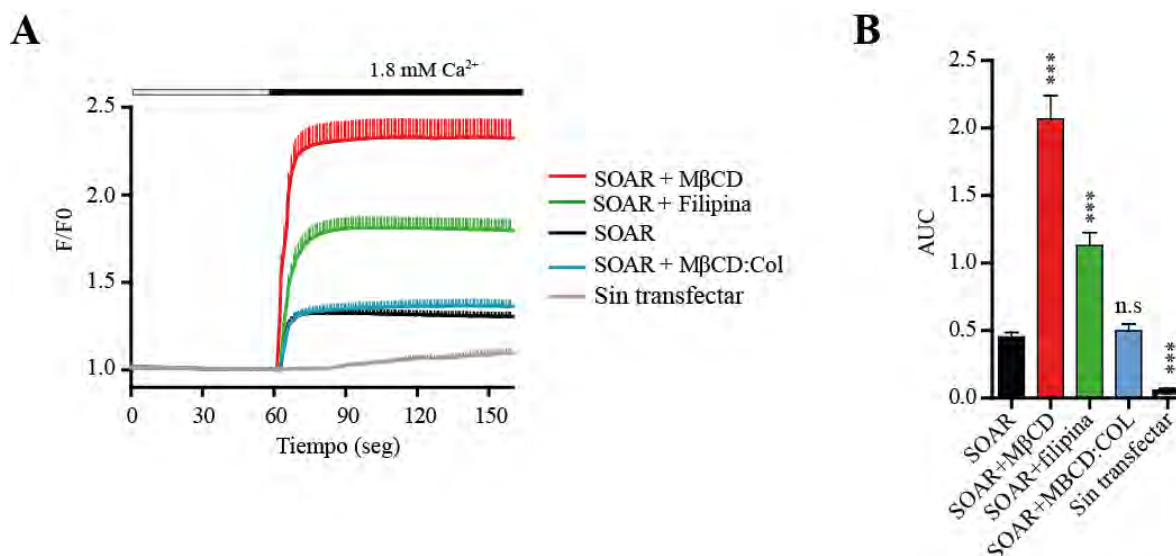


Figura 10. Primer estímulo de calcio en células tratadas con MβCD o Filipina III. **A.** Promedio de las respuestas al primer estímulo de calcio en células que expresan Orail y SOAR. El trazo negro representa células transfectadas sin ningún tratamiento (n=49 células), en rojo células incubadas con MβCD (n=28), en verde células incubadas con filipina (n=35 células), en azul células incubadas con una solución de MβCD y colesterol (n=25) y el trazo gris es la respuesta de células sin transfectar (n=11). **B.** Área bajo la curva (AUC) de experimentos en panel A. Las barras representan el promedio ± el error estándar. *** Diferencias significativas con p<0.0001 con un análisis estadístico de ANOVA con una prueba Bonferroni. Todo comparado contra el control sin tratamiento de remoción de colesterol.

El curso temporal de activación de Orail en células tratadas con M β CD o filipina mostraron mayor densidad de corriente que células con niveles normales de colesterol (Fig. 11 A y B).

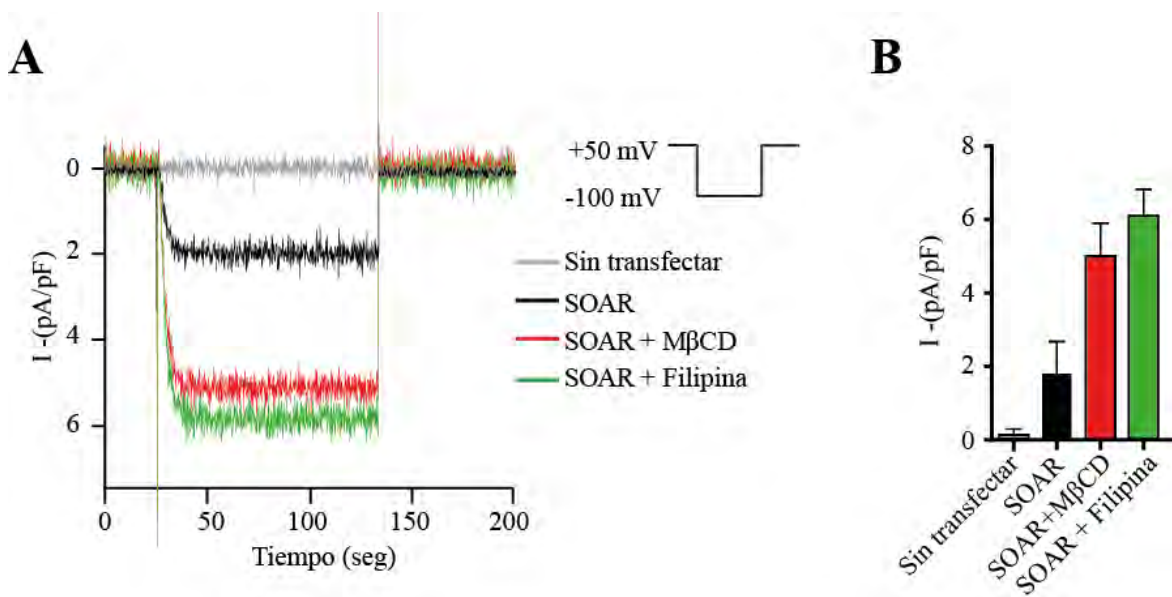


Figura 11. Registros electrofisiológicos de células que expresan SOAR y Orail. **A.** El trazo negro representa células transfectadas en concentraciones estándar de colesterol, en rojo y verde se observan células tratadas con M β CD y filipina respectivamente y en gris células sin transfectar. El protocolo para obtener estos trazos se esquematiza en la parte superior derecha. **B.** Densidad de corriente promedio medida a -100mV de experimentos como los del panel A. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de al menos 15 células en 3 transfecciones independientes.

Es importante mencionar que la activación de los canales que conforman la SOCE presentan constantes de tiempo de 44 segundos cuando se usa EGTA como quelante de calcio en la solución intracelular y se emplea a STIM1 como activador de los canales Orail (19). En nuestro caso, la activación de Orail por el fragmento SOAR presenta constantes de tiempo mucho más rápidas, de alrededor de 7 segundos, indicativo de que el dominio SOAR está disponible para activar a Orail, independientemente del contenido de calcio del RE y de la relocalización de STIM1 en las uniones de RE-MP.

En conjunto, estos resultados señalan que remover o impedir al colesterol en la membrana plasmática ocasiona un incremento en la actividad

de Orai1 cuando se activa por la región SOAR de STIM1. El incremento en la actividad es debido a este lípido, puesto que 2 procedimientos distintos que afectan al colesterol, así como la sustitución de colesterol con M β CD señalan una fuerte regulación de la actividad del canal por este esterol.

4.3. El colesterol regula la interacción de Orai1 con el dominio SOAR

Dado que la disminución de colesterol lleva a un incremento en la actividad de Orai1, nos preguntamos si la interacción entre Orai1 y SOAR se estaría afectando al remover colesterol. Para contestar esta pregunta seguimos 2 estrategias. La primera consistió en un ensayo de co-inmunoprecipitación para observar la cantidad de SOAR asociado a inmunoprecipitados de Orai1 (Fig. 12).

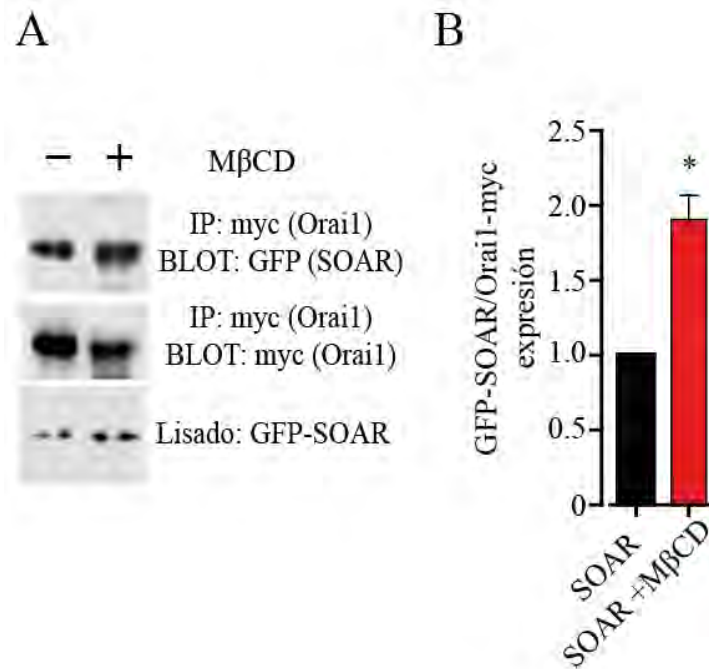


Figura 12. Ensayo de Co-inmunoprecipitación. **A.** Blot representativo de lisados celulares transfectados con GFP-SOAR y Orai1-myc. La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo anti-myc y se probó con el anticuerpo anti-GFP. **B.** Análisis de densitometría de al menos 4 experimentos independientes. La relación de la señal co-inmunoprecipitada (SOAR) entre la señal inmunoprecipitada (Orai1) se normalizó a 1 en la condición control y se comparó con las células tratadas con M β CD. * $p < 0.05$ por un análisis estadístico T-student.

Los resultados de la co-inmunoprecipitación demostraron una fracción de Orail enriquecida en SOAR cuando se trataron las células con M β CD. Este enriquecimiento fue consistente en experimentos independientes. El análisis de densitometría demostró un incremento del doble en la asociación de SOAR con Orail en células empobrecidas en colesterol (Fig. 12B).

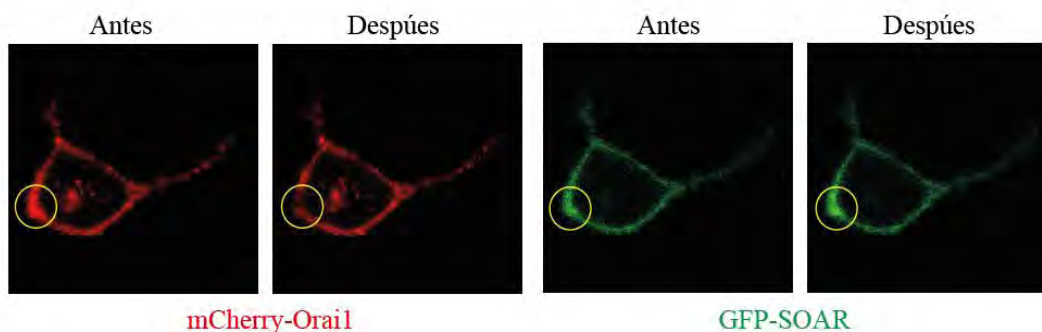
La segunda estrategia consistió en hacer experimentos de transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) para evaluar la proximidad entre ambas proteínas. El método de FRET que se utilizó fue mediante el fotoblanqueo del aceptor. Esta técnica consiste en registrar la recuperación de la fluorescencia de la molécula donadora cuando se destruye irreversiblemente la proteína fluorescente aceptora de energía por resonancia. Para esto se emplearon células transfectadas con Orail y SOAR fusionados a proteínas fluorescentes mCherry y GFP respectivamente.

En la figura 13A se observa un experimento representativo de la intensidad de fluorescencia antes y después del blanqueamiento de la mCherry-Orail y el efecto en la GFP fusionada a SOAR. Para el caso de células sin tratamiento se observó una eficiencia de FRET de 6.68 ± 0.60 mientras que las células tratadas con M β CD incrementaron su eficiencia de FRET a 13.71 ± 0.97 (Fig. 13B). Como control negativo de interacción se usó la mutante de SOAR LQ/AA que no interacciona con Orail (34). La eficiencia de FRET para SOAR LQ/AA fue de 0.39 ± 0.20 (Fig. 13B).

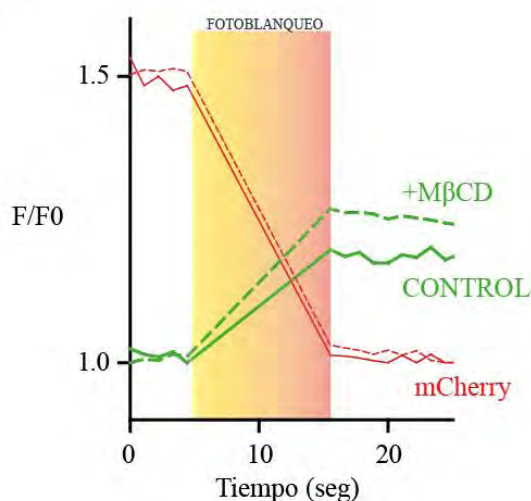
Estos resultados prueban 2 consecuencias interesantes de la remoción de colesterol sobre en la asociación de Orail con el fragmento SOAR. La primera conclusión, obtenida a partir de los resultados de la co-inmunoprecipitación muestra que la afinidad del fragmento SOAR por el canal incrementa con bajo colesterol membranal. Por otro lado, los experimentos

de FRET revelan que aumenta la proximidad entre el fragmento SOAR y Orai1 cuando se remueve colesterol. En consecuencia, esto lleva al incremento en la actividad de Orai1.

A



B



C

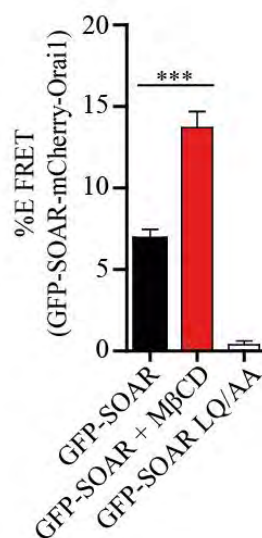


Figura 13. Ensayos de FRET por fotoblanqueo del aceptor. A. Células que expresan a mCherry-Orai1 y GFP-SOAR antes y después del fotoblanqueo de la proteína mCherry en la región de interés señalada por el círculo amarillo. B. Ejemplo de un experimento de fotoblanqueo del aceptor. Líneas continuas representan la fluorescencia en la condición control. Líneas discontinuas ilustran la fluorescencia de células con colesterol empobrecido. En rojo se observa la fluorescencia de la proteína mCherry-Orai1 y como se apaga la fluorescencia con el pulso de fotoblanqueo (representado por el rectángulo amarillo). En verde se observa la fluorescencia de GFP-SOAR y como se recupera la fluorescencia. C. Cuantificación de la eficiencia de FRET para la condición control (células sin tratamiento n=136), células tratadas con M β CD (Barra roja n=90) y la mutante LQ/AA como control negativo (n=33). . *** Diferencias significativas con $p < 0.0001$ con un análisis estadístico de ANOVA.

4.4. Identificación de un dominio de unión a colesterol en SOAR

Un análisis de la secuencia de amino ácidos de STIM1 nos llevó a la identificación de un dominio tipo CRAC trasladado en la región que corresponde a los amino ácidos 357 a 366, en el dominio de hélice super enrollada 2 (CC2) de SOAR (Fig. 14).

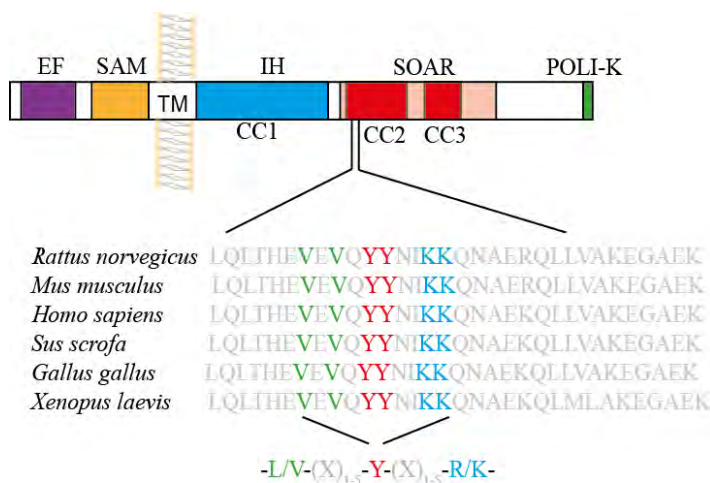


Figura 14. Dominio de unión a colesterol en SOAR. Topología de STIM1 y la localización del dominio putativo de unión a colesterol dentro de SOAR. En la parte inferior se observa un alineamiento de la secuencia primaria de la proteína y como esta región se encuentra bien conservada en distintas especies, conservando la secuencia básica de los dominios tipo CRAC.

Dado que el dominio CRAC pudiera constituir una región potencial de interacción con colesterol, se analizó el contenido de colesterol endógeno asociado a inmunoprecipitados de STIM1-YFP. En la figura 15 se observa la cuantificación de colesterol en inmunoprecipitados de STIM1 pre-tratados con TG o sin tratar. Se observó que la cantidad de colesterol en los inmunoprecipitados de células con TG se incrementó casi al doble. Por otro lado, como control negativo de acarreo de colesterol se emplearon células transfectadas con GFP libre, resultando en una asociación de colesterol menor que STIM1 en condiciones basales (Fig. 15). Estos datos sugieren que STIM1 se asocia a colesterol cuando se da el vaciamiento del RE.

Para determinar si el dominio CRAC trasladado de SOAR es funcional, se desarrolló una librería de arreglos de péptidos que contenían la secuencia

de amino ácidos del 350 al 380 de STIM1. Esta región corresponde a la región CC2 de STIM1 con el probable dominio CRAC central, flanqueado por 7 y 13 amino ácidos hacia el amino y carboxilo terminal respectivamente. Se excluyó la región 382 a 387 por ser rica en residuos básicos y de esta forma descartar interacciones electrostáticas del grupo OH⁻ del colesterol con las cargas positivas de la región básica. Al mismo tiempo porque es la región propuesta para interactuar con Orai1. Adicionalmente se hizo un barrido de mutaciones puntuales de alanina para evaluar la importancia de cada residuo en el pegado de colesterol.

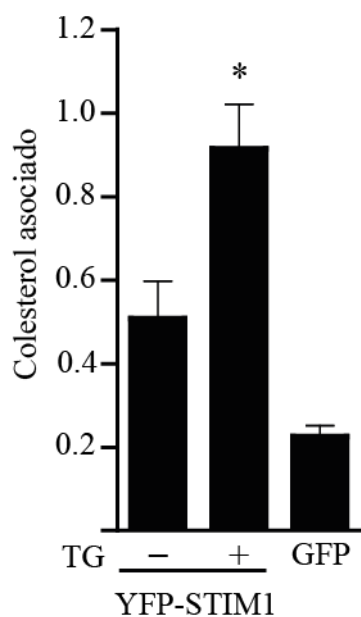


Figura 15. Colesterol asociado a inmunoprecipitados de STIM1. La gráfica de barras señala el promedio de al menos 5 experimentos de cuantificación de colesterol endógeno asociado a inmunoprecipitados de YFP-STIM1. La señal de colesterol detectado se normalizó por la fluorescencia de YFP en cada inmunoprecipitado. Como control se empleó células que expresaron la GFP libre. * $p < 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba Bonferroni.

Para determinar la afinidad de los péptidos por el colesterol, se empleó dehidroergosterol (DHE), un compuesto fluorescente análogo al colesterol (132). Los péptidos con la secuencia silvestre (WT) demostraron pegado a DHE, mientras que las mutaciones puntuales de alanina afectaron el pegado a DHE solo cuando sustituyeron los residuos V357, V359, Y361, Y362, I364, K365 y K366. Es importante hacer notar que a excepción de la I364, todos los residuos que afectan el pegado a DHE corresponden a la secuencia

consenso CRAC (Fig. 16). Estos resultados sugieren la presencia de un dominio CRAC en la región CC2 de SOAR.

#	SECUENCIA DE PEPTIDOS	PEGADO
WT	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
1	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEA	+
2	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKAG	+
3	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
4	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
5	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLAAKEG	+
6	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLVAKEG	+
7	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLVAKEG	+
8	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKALLVAKEG	+
9	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEAQLLVAKEG	+
10	WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAAKQLLVAKEG	+
11	WLQLTHEVEVQYYNIKKQAAEKQLLVAKEG	+
12	WLQLTHEVEVQYYNIKKANA EKQLLVAKEG	+
13	WLQLTHEVEVQYYNIKAQNAEKQLLVAKEG	-
14	WLQLTHEVEVQYYNIAKQNAEKQLLVAKEG	-
15	WLQLTHEVEVQYYNAKKQNAEKQLLVAKEG	-
16	WLQLTHEVEVQYYAIAIKKQNAEKQLLVAKEG	+
17	WLQLTHEVEVQYANIKKQNAEKQLLVAKEG	-
18	WLQLTHEVEVQAYNIKKQNAEKQLLVAKEG	-
19	WLQLTHEVEVAYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
20	WLQLTHEVEAQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	-
21	WLQLTHEVAVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
22	WLQLTHEAEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	-
23	WLQLTHAEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
24	WLQLTAEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
25	WLQLAHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
26	WLQATHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
27	WLAALTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
28	WAAQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
29	AAQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG	+
SC	IQTAWVLEYEANKQEQVKLKHVYEQKGNL	-

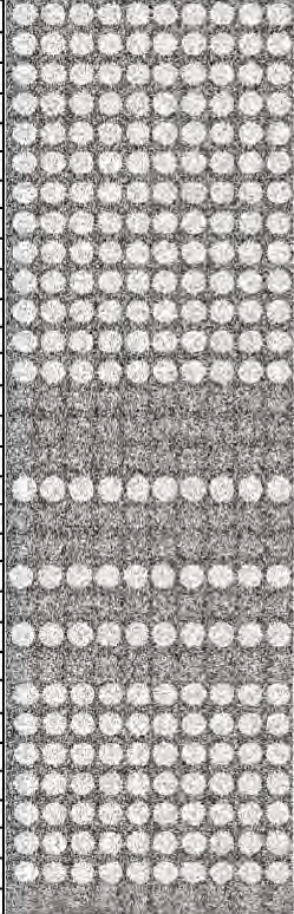


Figura 16. Arreglo de péptidos. Secuencia de amino ácidos que cubren del residuo 350 al 380 de STIM1. Los péptidos se incubaron con 10 μ M de DHE y la señal fue detectada por medio de microscopía de TIRF. La primera línea (WT) indica la secuencia silvestre y la última línea (SC) es una secuencia aleatorizada de la secuencia silvestre. Se realizó un barrido de mutaciones de alanina.

4.5. La isoleucina 364 es importante para mediar el efecto del colesterol en SOAR

Se evaluó la participación de residuos importantes para recapitular el efecto de remover colesterol en el complejo SOAR–Orail. No obstante, el fragmento SOAR, al ser la región mínima para la interacción y activación de

Orai1, presenta amino ácidos clave que al ser mutados podrían afectar la estructura y el acoplamiento con el canal. Tal es el caso de la Y362 que es importante para la conformación dimérica de SOAR (67). Entonces, para discernir entre los residuos importantes para la regulación de SOAR por colesterol y los residuos que promueven cambios estructurales y afectan la asociación con Orai1 se evaluó la interacción y la actividad del canal, buscando el fenotipo que se produce cuando se reduce el colesterol membranaral.

Los ensayos de FRET con mutaciones en las tirosinas centrales del dominio CRARC resultaron en la supresión de la interacción con Orai1, como ha sido previamente reportado para la Y362 (67). Por otro lado la mutante para Y361 no afectó la interacción con el canal y produjo eficiencias de FRET similares a la condición silvestre (Fig. 17B). El único residuo que incrementó la eficiencia de FRET a niveles comparables con células sin colesterol fue la mutante I364A. Además, remover colesterol en la mutante SOAR-I364A no afectó la eficiencia de FRET (Fig. 17 A y B). Estos resultados indican que el residuo I364 es importante para aumentar la interacción con Orai1 y remover colesterol ya no promueve efectos en la interacción.

Por otro lado, mediciones de calcio citosólico con SOAR-I364A produjo un incremento significativo en la entrada de calcio en comparación con el SOAR silvestre. Además se observó una respuesta parecida a SOAR silvestre tratado con M β CD (Fig. 18A). En contraste, remover colesterol con M β CD o filipina en SOAR-I364A no adicionó un incremento en la entrada de calcio (Fig. 18 B y D).

Las mediciones de calcio intracelular fueron corroboradas por medio de mediciones de densidad de corriente activada por SOAR-I364A. En la

figura 18E se puede observar como las células que expresaron a SOAR-I364A con o sin M β CD y las células con SOAR silvestre y M β CD produjeron corrientes de mayor magnitud en comparación con células que expresaron SOAR y Orai1 silvestres en condiciones normales de colesterol (Fig. 18 E y F). Estos resultados muestran que la mutación en la isoleucina 364 recapitula los efectos de remover colesterol. Lo que sugiere su participación en la regulación de SOAR por este lípido.

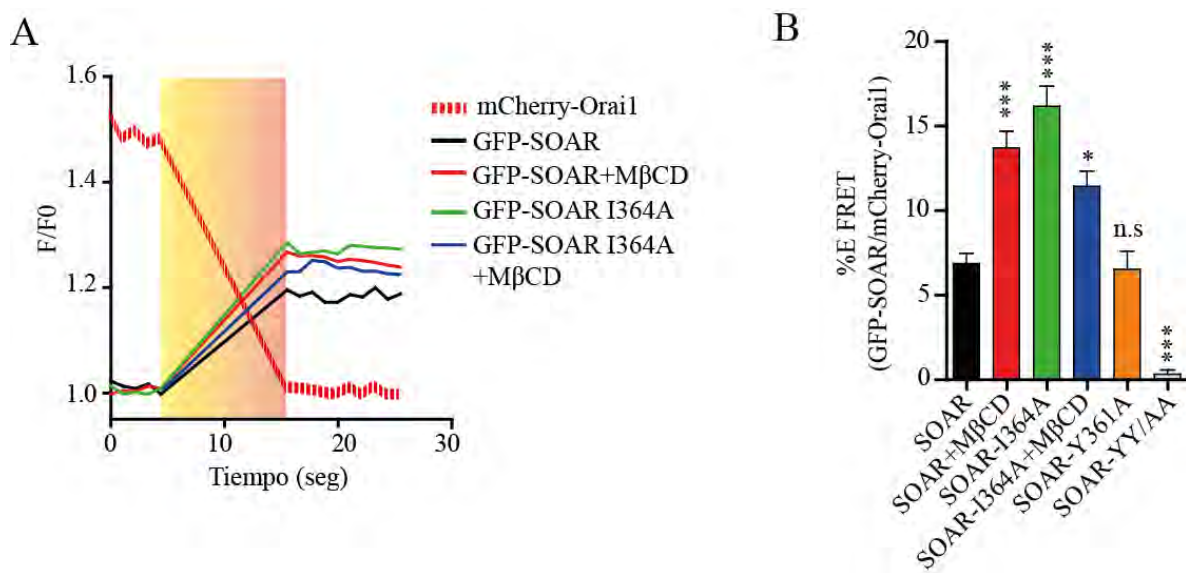


Figura 17. FRET entre SOAR I364A y Orai1. **A.** Experimento representativo de fotoblanqueo del aceptor. Líneas continuas roja y negra representan la intensidad de fluorescencia de GFP-SOAR, con y sin M β CD respectivamente. Líneas azul y verde representa la fluorescencia de GFP-SOAR-I364A con y sin M β CD respectivamente. Por claridad solo se muestra la fluorescencia de mCherry-Orai1 para la condición control (Línea discontinua). **B.** Gráfica de barras del promedio de la eficiencia de FRET para SOAR (barra negra n=136), SOAR con M β CD (barra roja n=90), SOAR I364A (barra verde n=34), SOAR I364A con M β CD (barra azul n=27), SOAR Y361A (barra naranja n=42) y SOAR YY/AA (barra blanca n=35). *** Diferencias significativas con $p < 0.0001$ con un análisis estadístico de ANOVA y una prueba Bonferroni.

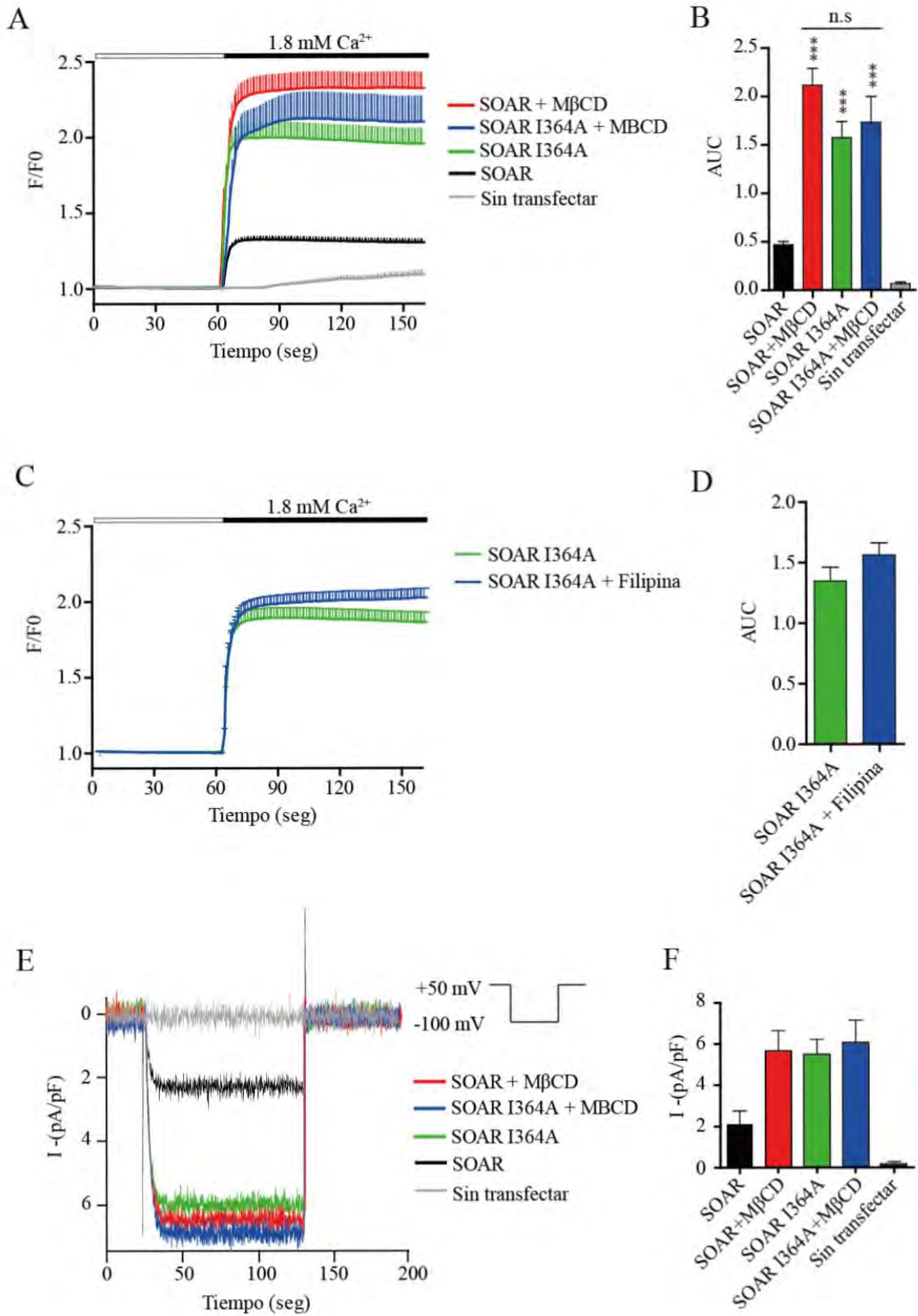


Figura 18. SOAR I364A incrementa la actividad de Orai1. **A.** Promedio de las respuestas al primer estímulo de calcio en células que expresan Orai1 y las formas mutantes de SOAR. EL trazo rojo y negro son células que expresan SOAR silvestre con y sin tratamiento de M β CD respectivamente. En azul (n=11) y verde (n=40) se observa la respuesta de células que expresan a SOAR-I364A con y sin tratamiento de M β CD respectivamente. En gris la respuesta de células sin transfectar. **B.** La gráfica de barras representa el promedio del área bajo la curva de los experimentos del panel A. **C.** Respuesta de primer estímulo de calcio en SOAR-I364A con niveles estándar de colesterol (trazo verde, n=35) y células tratadas con filipina (trazo azul, n=26). **D.** Área bajo la curva (AUC) de experimentos del panel C. **E.** Registros de patch-clamp en célula completa. Trazo negro y rojo representa células que expresan a SOAR silvestre y Orai1 con estándar y condición de bajo colesterol respectivamente. Células que expresan a Orai1 y a SOAR-I364A sin tratamiento y tratadas con M β CD se muestran en verde y azul respectivamente. **F.** Gráfica de barras de la densidad de corriente promedio de experimentos como los del panel E. *** Diferencias significativas con $p < 0.0001$ con un análisis estadístico de ANOVA con una prueba Bonferroni. Todo comparado contra el control sin tratamiento de remoción de colesterol.

4.6. SOAR se asocia a la membrana plasmática por medio de colesterol

Dado que la interacción de SOAR con el colesterol membranal sugiere una alta proximidad con la MP, se determinó la distancia del dominio SOAR a la MP, para esto realizamos experimentos de FRET empleando el compuesto dipicrilamina (DPA), un compuesto lipofílico no fluorescente que se intercala en la bicapa lipídica y que absorbe la emisión de fluorescencia de las proteínas verde y azul cuando se encuentra a menos de 10 nm (133). En la figura 19A se observa un ejemplo de células que expresan a mCherry-Orai1 y GFP-SOAR, antes y después de tratarlas con DPA por 30 min. Transcurridos los 30 min con DPA, la fluorescencia de la GFP disminuyó por acción directa del DPA a una distancia de FRET (1 a 10 nm) y de igual forma la fluorescencia de mCherry se observó ligeramente fotoblanqueada.

Un análisis de la distribución de fluorescencia en estas células muestra el grado de apagado de fluorescencia por transferencia de energía, antes y después del tratamiento con DPA (Fig. 19B). El curso temporal de la tasa de

foto-apagado de la GFP-SOAR se observa en la figura 20A. De manera interesante las células tratadas con M β CD mostraron una disminución en la eficiencia de foto-apagado de GFP-SOAR en comparación con la condición control, este resultado indica una menor eficiencia de FRET y por ende una mayor distancia a la MP. Debido a que la molécula de DPA responde a cambios en el potencial de membrana, movilizándose a la cara interna de la bicapa lipídica a potenciales despolarizantes, se adicionó una solución alta en potasio. Este procedimiento aumento la eficiencia de FRET en un 12 y 13% para GFP-SOAR con y sin colesterol empobrecido respectivamente (Fig. 20A). La cuantificación de la eficiencia de FRET en este punto resultó en 0.74 ± 0.019 para SOAR en condiciones normales de colesterol mientras que las células tratadas con M β CD mostraron una eficiencia de FRET del 0.54 ± 0.036 . Adicionalmente la mutante SOAR-I364A presentó eficiencias de FRET similares a SOAR silvestre con M β CD (Fig. 20B).

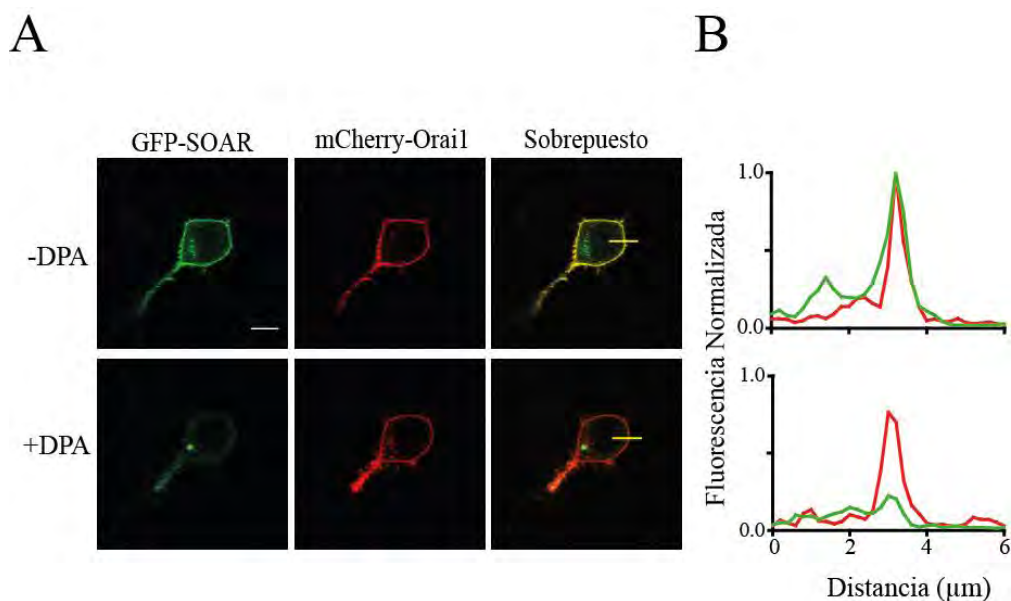


Figura 19. FRET por fotoblanqueo de DPA. A. Imágenes representativas de células que expresan GFP-SOAR y mCherry-Orai1 antes y después de la adición de DPA. B. Distribución de fluorescencia de mCherry y GFP en la célula del panel A. El segmento amarillo en la imagen con los canales sobrepuestos corresponde a las gráficas de distribución de fluorescencia antes y después de la adición de DPA.

Estos resultados sugieren que el fragmento SOAR se encuentra íntimamente ligado a la MP, remover colesterol lleva al incremento en la distancia del fragmento SOAR a la interface membranal y de igual forma la mutante SOAR-I364A presenta un grado de proximidad similar al SOAR silvestre con bajo colesterol.

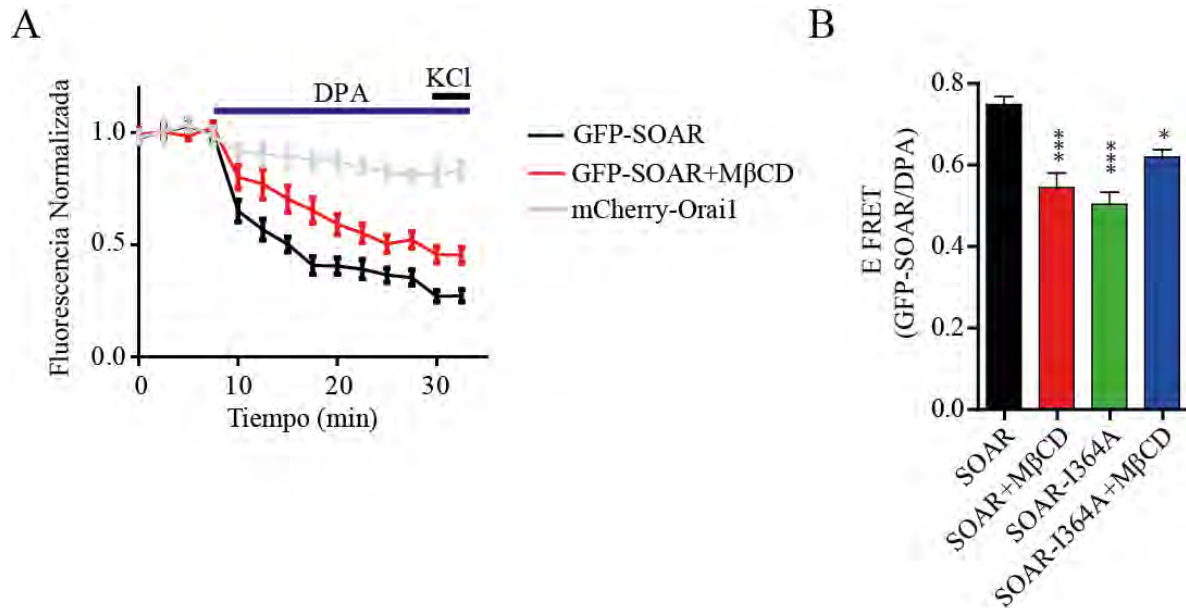


Figura 20. Proximidad de SOAR a la membrana plasmática. **A.** Cinética de foto-blanqueamiento de GFP-SOAR y mCherry-Orail1 cuando se adiciona DPA. El trazo negro representa células con condiciones estándar de colesterol, el trazo rojo son células tratadas con M β CD y en gris se observa la cinética de blanqueamiento de mCherry-Orail1. En los últimos 2 puntos se adicionó una solución de alto potasio para producir una despolarización en la membrana plasmática. **B.** Gráfica de columnas muestra el promedio de la eficiencia de FRET en GFP-SOAR (n=16), SOAR con M β CD (n=24), SOAR-I364A (n=24) y SOAR-I364A con M β CD (n=22). *** Diferencias significativas con $p < 0.0001$, * $p < 0.05$ con un análisis estadístico de ANOVA con una prueba Bonferroni. Todo comparado contra el control

Es importante señalar que la menor eficiencia de FRET entre mCherry-Orail y DPA en comparación con GFP-SOAR (Fig. 20A), no representa una mayor distancia entre Orail con la MP de lo que se encuentra la proteína GFP-SOAR, puesto que el factor R_0 entre ambos par FRET difiere por tratarse de distintas proteínas fluorescentes con distintos grados de

sobreposición entre los espectros de emisión de las proteínas donadoras (Revisar anexo 2). Esto significa que no pueden compararse las eficiencias de FRET entre la proteína mCherry fusionada a Orail y el GFP-SOAR.

SOAR se estabiliza en la membrana plasmática por medio de colesterol

Para corroborar la asociación de SOAR con la MP por medio de colesterol, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con el fragmento SOAR en bicapas lipídicas de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) con y sin colesterol (POPC:colesterol, 6:4 mol). En simulaciones de 400 ns se observó una interacción específica del fragmento SOAR con el colesterol. En la bicapa de POPC:colesterol se observó que el fragmento SOAR se estabiliza en paralelo al plano de la membrana e interacciona con la región hidrofóbica de los fosfolípidos (Fig. 21A). Por otro lado, en ausencia de colesterol el fragmento SOAR se despega de la bicapa lipídica y ningún amino ácido queda inmerso en la membrana (Fig. 21A).

Un análisis de las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF), como medida de la movilidad individual de cada amino ácido en SOAR, refleja que la movilidad de la proteína se ve reducida en presencia de colesterol, es decir es más estable en comparación con las fluctuaciones de SOAR en una bicapa lipídica sin colesterol (Fig. 21B).

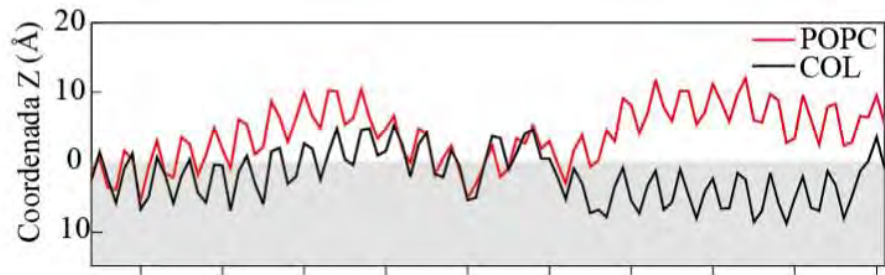
Los resultados de dinámica molecular confirman que el colesterol en la bicapa lipídica tiene un fuerte efecto en la unión de SOAR con la región hidrofóbica de la membrana. Analizando el tiempo de residencia de cada residuo que conforma al fragmento SOAR con moléculas de colesterol a menos de 3.5 Å se observaron 2 regiones de interacción específica con colesterol. La región que muestra más avidez por colesterol ésta compuesta

por I364 y Y361. La I364 se une a colesterol por medio de interacciones hidrofóbicas mientras el grupo hidroxilo del colesterol tiene una interacción polar con la Y361. La segunda región de interacción se da con los anillos esteroides del colesterol por medio de un plano hidrofóbico formado por L411 y A415 (Fig. 21C).

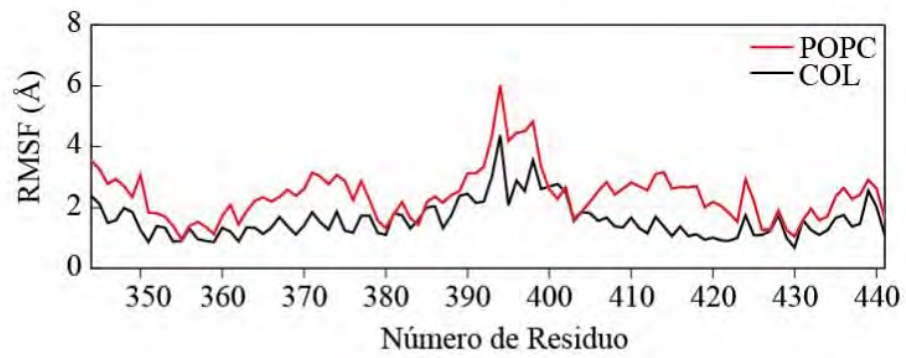
Las simulaciones de dinámica molecular confirmaron las observaciones experimentales y corroboraron el papel del residuo de I364 de SOAR en su asociación con colesterol, estabilizando la proteína cuando la membrana contiene colesterol y evitando la unión de SOAR con la bicapa lipídica en ausencia de colesterol (Fig. 21D).

Figura 21. SOAR se posiciona en una plano yuxtamembranal para interactuar con colesterol. **A.** Diagrama de accesibilidad de los residuos de SOAR a la membrana plasmática. La parte sombreada del diagrama representa la región lipídica y el z-coordinado es la distancia de inserción relativa a las cabezas polares de los fosfolípidos en una bicapa de POPC (línea roja) o una bicapa de POPC:Colesterol (6:4 mol) (línea negra). **B.** Raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de cada residuo de SOAR, empleando el átomo de Ca como estereocentro de cada amino ácido en SOAR. **C.** Tiempo de residencia (ns) de cada amino ácido de SOAR a menos de 3.5 Å de una molécula de colesterol. La escala de color representa la fracción de tiempo de residencia con el lípido. En el recuadro se presenta la avidéz del fragmento SOAR por moléculas de colesterol. **D.** Capturas de pantalla de las simulaciones de dinámica molecular del fragmento SOAR en una bicapa de POPC y colesterol.

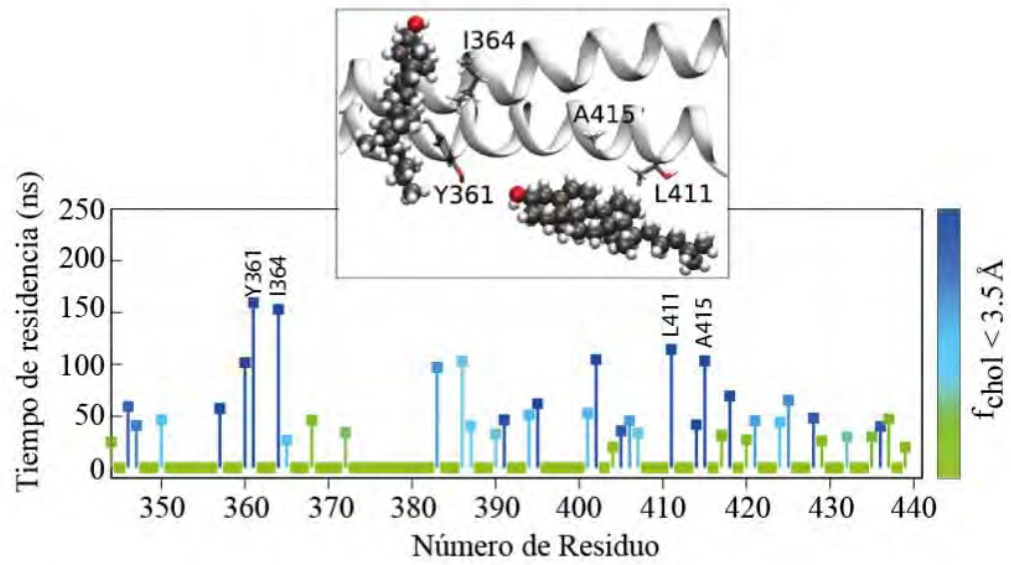
A



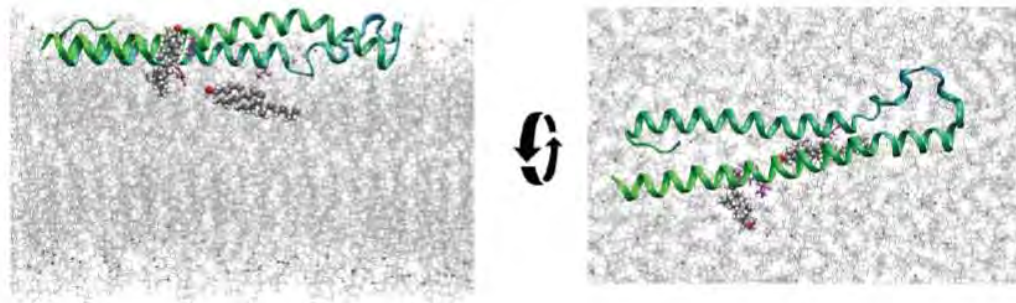
B



C



D



4.7. El fenotipo de la mutante de I364 es extensible a la proteína STIM1 completa

Se realizó el ensayo de colesterol asociado en inmunoprecipitados de STIM1-I364A-CFP y silvestre. La cantidad de colesterol detectado en STIM1-CFP silvestre fue muy similar a los resultados de la figura 15. El colesterol co-inmunoprecipitado en células tratadas con TG aumentó en comparación con células sin tratar (Fig. 22). Mientras que las células transfectadas con STIM1-I364A presentaron una ligera disminución en la cantidad de colesterol asociado a inmunoprecipitados de STIM1-I364A cuando se vació el RE con TG. Los niveles de colesterol en condiciones basales fueron indistinguibles para STIM1 mutante y silvestre. Las pruebas estadísticas demostraron que no hubo diferencias significativas en la cantidad de colesterol entre STIM1-I364A con y sin TG (Fig. 22).

Posteriormente, se analizó la entrada de calcio mediada por TG. Para esto se realizó en protocolo clásico para medir la SOCE, este procedimiento consiste en colocar a las células en una solución libre de calcio extracelular y estimular con TG para vaciar de calcio el RE, en seguida se añade solución fisiológica con calcio para observar la entrada operada por las reservas.

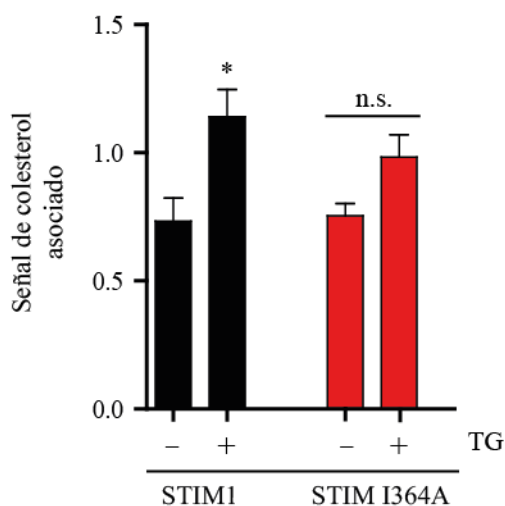


Figura 22. Colesterol asociado a inmunoprecipitados de STIM1-I364A. La gráfica de barras señala el promedio de al menos 6 experimentos de cuantificación de colesterol endógeno asociado a inmunoprecipitados de STIM1-CFP y STIM1-I364A-CFP con y sin la adición de taspigargina (TG). La señal de colesterol detectado se normalizó por la fluorescencia de CFP en cada inmunoprecipitado. * $p < 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba Bonferroni. No significativo n.s.

Seguindo este protocolo se observó una magnitud mayor en células que co-expresaron STIM1-I364A y Orai1 en comparación con células que expresaron STIM1 silvestre y Orai1 (Fig. 23A). El análisis del área bajo la curva de la entrada de calcio corroboró el mayor incremento en la entrada de calcio cuando se expresa a STIM1-I364A (Fig. 23B). Estos resultados se ratificaron mediante registros electrofisiológicos. En este caso la activación del canal se realizó por el vaciamiento de calcio del RE usando TG con un potencial de mantenimiento de -100mV durante todo el experimento. En la figura 23C se observa la corriente activada por TG en células transfectadas con STIM1-I364A y STIM1 silvestre. La densidad de corriente producida por STIM1-I364A fue de más del doble de magnitud que STIM1 silvestre (Fig. 23 C y D).

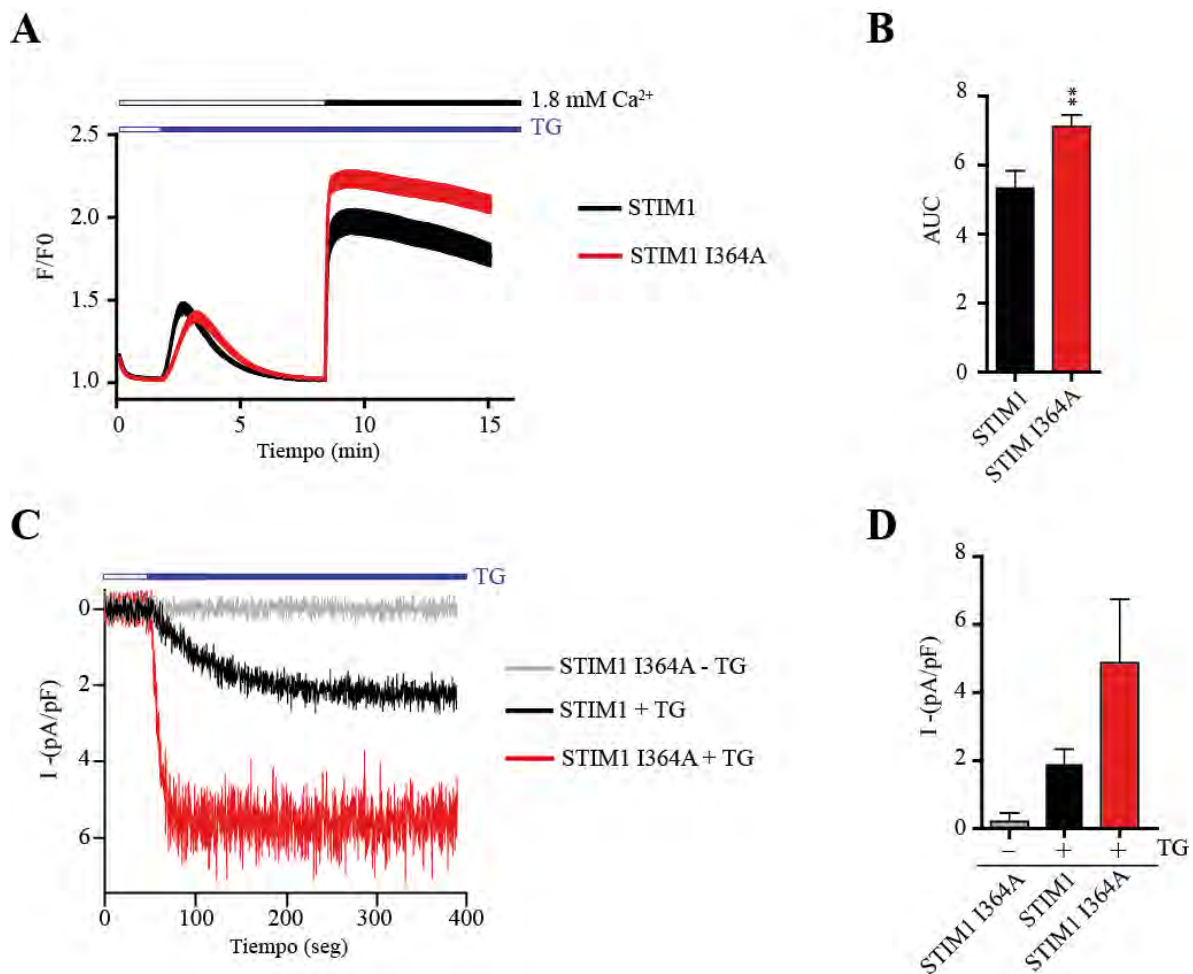


Figura 23. STIM1-I364A incrementa la actividad de Orai1. **A.** Mediciones de la entrada de calcio operada por las reservas en células que expresan Orai1 y STIM1. Trazo negro representa la expresión de STIM1 silvestre (n=38) y trazo rojo representa la expresión de STIM1-I364A (n=49). **B.** Gráfica de barras del área bajo la curva promedio de la entrada de calcio en experimentos del panel A. * p<0.05 por un análisis de t-student. **C.** Cursos temporales de la corriente entrante activada por la adición de TG (rectángulo azul). El trazo rojo y gris es la corriente en células transfectadas con STIM1-I364A con y sin la adición de TG respectivamente, el trazo negro es la corriente en células transfectadas con STIM1 silvestre. **D.** Densidad de corriente promedio en experimentos del panel C.

Para evaluar el efecto de remover colesterol en STIM1 y evitar el efecto de inhibición de formación de puncta, se realizaron experimentos en poblaciones de células (más de un millón de células por experimento) previamente activadas con TG, seguido del tratamiento con M β CD. De esta forma se induce la formación del complejo STIM1-Orai1, después se remueve el colesterol y se evalúa la entrada de calcio. Mediciones de calcio intracelular demostraron una mayor entrada de calcio cuando las células fueron tratadas con M β CD en STIM1 silvestre. De igual forma la expresión de STIM1-I364A con o sin M β CD produjo una entrada de calcio similar a STIM1 con colesterol empobrecido. Añadir solución fisiológica en lugar de M β CD (condición control) mostró la entrada de calcio basal en STIM1 que fue significativamente menor (Fig. 24A). Estos resultados demuestran que los efectos medidos en SOAR al remover colesterol y mutar la I364A se observan también en STIM1 completo.

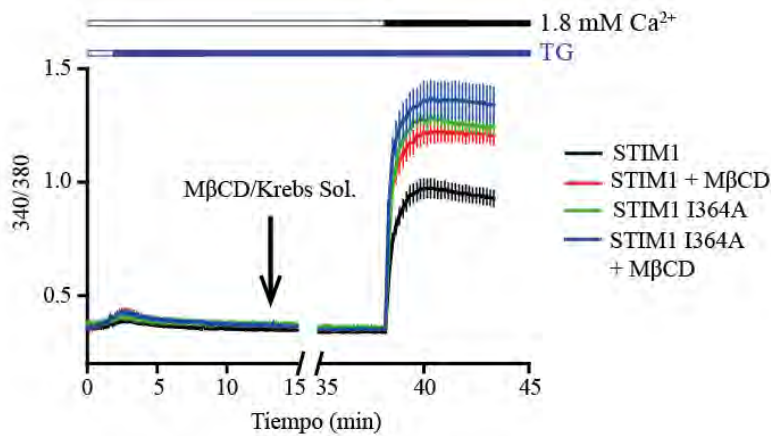
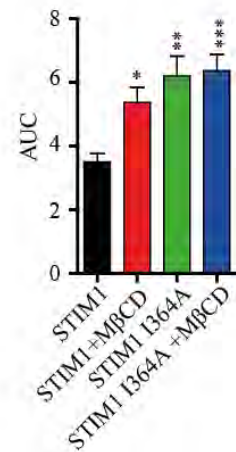
A**B**

Figura 24. Protocolo largo para medición de la SOCE con bajo colesterol. **A.** Respuestas poblacionales promedio de la entrada de calcio en células que expresan a STIM1 silvestre con y sin MβCD y STIM1-I364A con y sin MβCD. El complejo STIM1/Orai1 se indujo con TG, seguido de MβCD o solución de Krebs sin calcio por 25 minutos antes de la estimulación con calcio extracelular. **B.** Área bajo la curva promedio de al menos 4 experimentos independientes del panel A. *** Diferencias significativas con $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ por un análisis estadístico de ANOVA con una prueba Bonferroni. Todo comparado contra el control sin tratamiento de remoción de colesterol.

4.8. STIM1 y Orai1 coordinan su regulación por colesterol

Recientemente, el grupo de Romanin identificó un dominio de unión a colesterol en el extremo amino terminal de Orai1 (99). Los residuos identificados en este trabajo implican a Y80 y la L74 de Orai1 como una región importante para la interacción con colesterol (99). Para ver los efectos de Orai1 con su sitio de unión a colesterol mutado sobre la mutante de I364 identificada en este trabajo se realizaron mediciones de calcio citosólico con SOAR y STIM1.

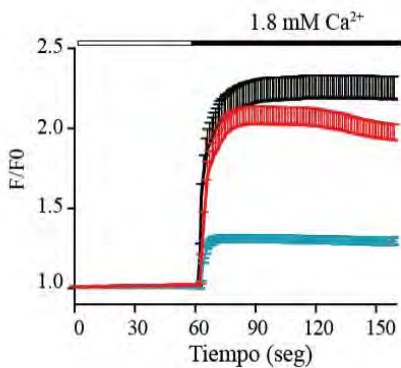
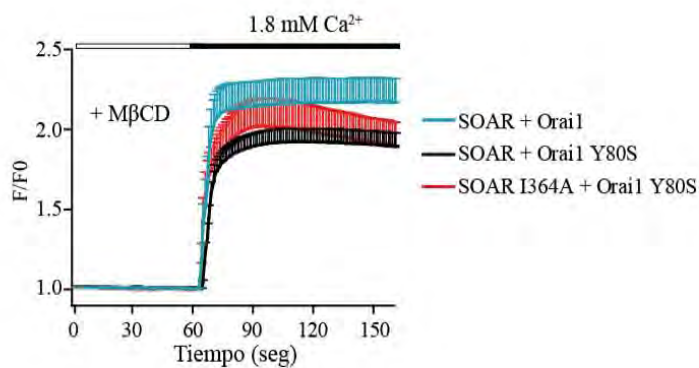
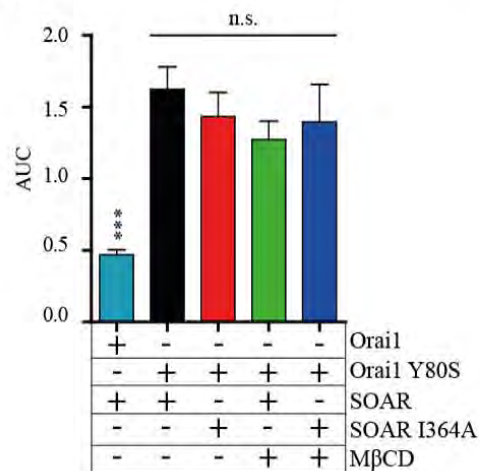
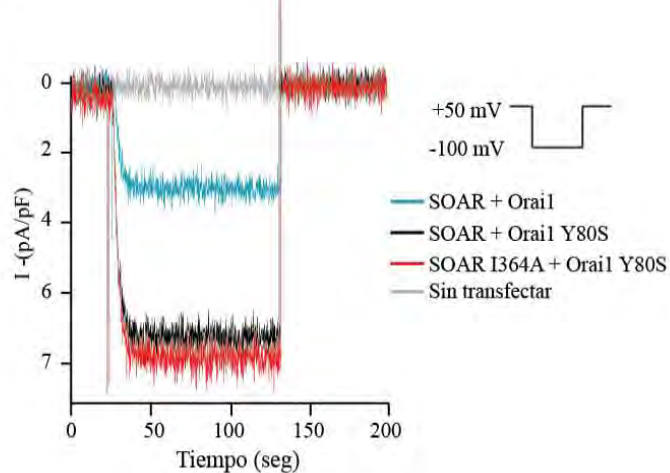
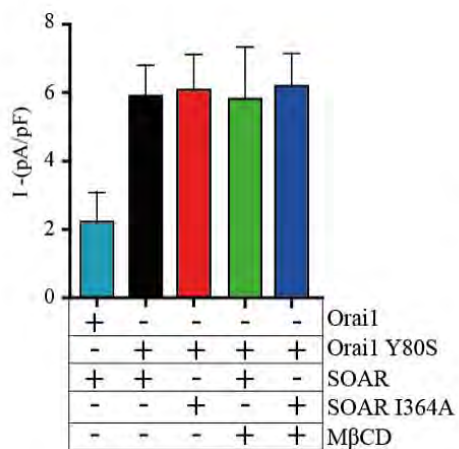
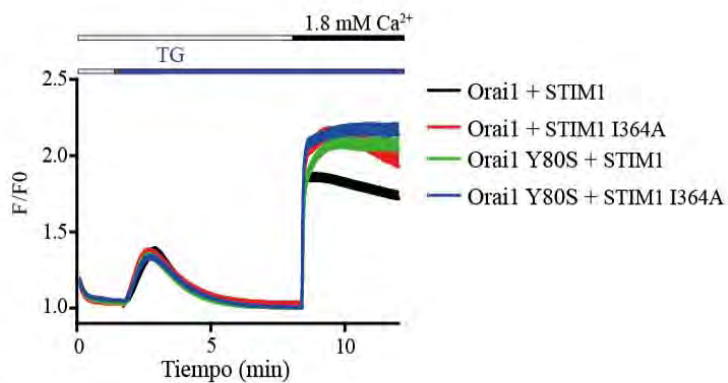
En la figura 25 se observa la entrada de calcio en células que co-expresan Orai1-Y80S y la combinación de SOAR-I364A o silvestre.

Experimentos en condiciones estándares de colesterol con la mutante Y80S en Orai1 produjo un incremento en la entrada de calcio, en comparación con células que co-expresaron a SOAR y Orai1 silvestres. La co-expresión de SOAR-I364A no incrementó la entrada de calcio (Fig. 25A). Por otro lado, al disminuir el colesterol en Orai1-Y80S con SOAR-I364A o silvestre no incrementó más la entrada de calcio en comparación con la co-expresión de Orai1 y SOAR silvestres, que presentaron un aumento en calcio similar a los de células que expresaron Orai1-Y80S (Fig. 25B). El resumen de los resultados de los experimentos de las figuras 25 A y B se realizó cuantificando el área bajo la curva en cada condición (Fig. 25C). El incremento de calcio producido por Orai1-Y80S fue indistinguible de la entrada de calcio mediada por Orai1 y SOAR silvestres con colesterol empobrecido. Además, Orai1-Y80S no incrementó su entrada de calcio cuando se co-expresó con SOAR-I364A. Los registros electrofisiológicos resultaron en las mismas conclusiones (Fig. 25D). La corriente producida por SOAR-I364A o silvestre co-expresado con Orai1-Y80S fue notoriamente mayor que células que expresaron a SOAR y Orai1 silvestres (Fig. 25 D y E).

Finalmente, se realizaron mediciones de la SOCE en células que expresaron a STIM1-I364A con Orai1-Y80S y sus combinaciones con STIM1 y Orai1 silvestres. La entrada de calcio activada por el vaciamiento del RE en Orai1-Y80S con STIM1-I364A o silvestre y Orai1 con STIM1 I364A fue notoriamente mayor que células que expresaron las formas silvestres de STIM1 y Orai1 (Fig. 25F). En conjunto, estos y los resultados previos demuestran que tanto la mutante I364A en STIM1 y la mutante Y80S en Orai1 producen incrementos de calcio similares y no aditivos cuando se presentan ambas al mismo tiempo. Por lo que se sugiere que el dominio de unión a colesterol de Orai1 es coordinado por el dominio CRAC de SOAR en STIM1

y basta con modificar uno para desaparecer el efecto del colesterol en la regulación de la SOCE.

Figura 25. La regulación de Orai1 por colesterol es el mismo mecanismo que implica a SOAR. **A.** Estímulo de calcio en células con niveles de colesterol estándar. En azul se presenta la respuesta de células que expresan SOAR y Orai1 silvestres, El trazo negro muestra la respuesta de células que expresan a SOAR y a Orai1-Y80S (n=27) y en rojo se observa la respuesta de células que expresan a SOAR-I364A y Orai-Y80S (n=24). **B.** Estímulo de calcio en células tratadas con M β CD. En azul se presenta la respuesta de células que expresan SOAR y Orai1 silvestres, el trazo negro muestra la respuesta de células que expresan a SOAR y a Orai1-Y80S (n=17) y en rojo se observa la respuesta de células que expresan a SOAR-I364A y Orai-Y80S (n=12). **C.** La gráfica de barras sintetiza la respuesta promedio del área bajo la curva de los paneles A y B. **D.** Registros electrofisiológicos en modalidad de célula entera. Las células presentan niveles de colesterol estándar con las co-transfecciones indicadas. **E.** Gráfica de barras muestra la densidad de corriente promedio de células transfectadas con Orai1 silvestre y la mutación Y80S en combinación con la expresión de SOAR silvestre y la mutante I364A. Tratamientos con y sin colesterol empobrecido. **F.** Entrada de calcio operada por las reservas en células que expresan a Orai1 (silvestre y Y80S) en combinación con STIM1 (Silvestre y mutante I364A). El trazo negro y rojo representa la co-expresión de Orai1 con STIM1 silvestre (n=24) y con STIM1-I364A (n=17) respectivamente. El trazo verde y azul representa la co-expresión de Orai1-Y80S con STIM1 y STIM1-I364A (n=16 y n=22) respectivamente. No significativo n.s. por un análisis de ANOVA con prueba de Bonferroni en panel C.

A**B****C****D****E****F**

5. DISCUSIÓN

La SOCE es un complejo mecanismo de movilización de calcio. Sus funciones fisiológicas son variadas y pueden ir desde el relleno de calcio del RE a promover la activación de la respuesta inmune entre muchas otras funciones. En este trabajo hemos descrito una nueva región de unión a colesterol en la proteína STIM1, componente clave en el mecanismo de entrada de calcio mediado por Orai1. A continuación se analizan los resultados obtenidos en este trabajo y se discute sobre las implicaciones celulares y fisiológicas que conlleva la regulación del colesterol sobre la SOCE.

5.1. El colesterol regula la actividad de Orai1 por medio del dominio SOAR

Durante la última década el papel de los lípidos en la regulación de la SOCE se reconocía básicamente dentro de 2 esquemas moduladores. El primero mediado por PIP2, un componente importante para anclar la región poli-básica de STIM1 a la MP (39, 40). En el segundo mecanismo, se demostró que el colesterol es necesario para la formación de punta de STIM1 en regiones cercanas a la MP (13). Ambos lípidos funcionan como acopladores de la formación de cúmulos de STIM1 lo que asegura la posterior interacción con el canal Orai1. Sin embargo, estos mecanismos están limitados a los procesos previos, antes de la activación de Orai1 e incluso previo a la interacción entre STIM1 y Orai1.

No obstante, en los últimos años se describió el papel regulador de los microdominios enriquecidos en PIP2 una vez activado el complejo STIM1/Orai1, encontrando que el PIP2 promueve la acumulación de la proteína SARAF para interactuar con el dominio SOAR de STIM1 y producir

la inactivación lenta dependiente de calcio en Orai1 (40, 134). De manera análoga al efecto del PIP2, en este trabajo encontramos que el colesterol lleva a reducir la actividad de Orai1 por un mecanismo mediado por STIM1 y en particular por la regulación del fragmento SOAR.

Este hallazgo contrasta con los reportes previos en los que la remoción de colesterol inhibe la SOCE (13, 94, 97, 98), con la única excepción que para el presente trabajo se empleó la región mínima de STIM1 que activa a Orai1 (SOAR) (34, 35), lo que hace que la activación del canal sea independiente de las pozas intracelulares de calcio y de la relocalización de STIM1, mientras que en los reportes previos el colesterol se remueve antes del vaciamiento del RE y se evalúa la activación del canal pero además la relocalización de STIM1 de la membrana del RE a la MP. Nosotros creemos que remover colesterol antes de la interacción STIM1-Orai1 es un fenómeno sin sustento fisiológico, puesto que es un tratamiento agresivo que no refleja algo que pudiera ocurrir en una célula. Sin embargo, la existencia de regiones heterogéneas enriquecidas en colesterol simulan mejor los efectos que pudieran ocurrir simultáneamente en una célula.

Siguiendo nuestra estrategia experimental, nos enfocamos en complejos activos de SOAR/Orai1, lo que resultó en una respuesta de Orai1 notoriamente mayor que en células con bajo colesterol, ya sea que se haya removido el colesterol con M β CD o Filipina III. Incluso enriquecer el contenido de colesterol en la MP incubando con una solución saturada de colesterol y M β CD llevó a alcanzar magnitudes de entrada de calcio iguales a células sin tratamiento. Esto corroboró que el fenómeno se debe específicamente al colesterol y descarta un posible efecto secundario de la M β CD, ya que existen algunos reportes que señalan que la M β CD también puede remover algunos fosfolípidos e incluso proteínas de la MP (128).

La regulación a la alza de Orai1 se verificó midiendo la entrada de calcio con reporteros fluorescentes y también mediante registros electrofisiológicos. En ambos casos la actividad de Orai1 se incrementó por los tratamientos con M β CD o Filipina III. Estos resultados concuerdan con los experimentos reportados por Galan et. al. en 2010, donde removió colesterol después del vaciamiento de calcio del RE, encontrando que la inhibición de la SOCE ya no se producía (98). Es decir, el vaciamiento del RE lleva a la formación de los complejos de STIM1/Orai1 y posteriormente se remueve el colesterol. En este sentido, los experimentos poblacionales en la figura 24 demostraron lo obtenido por Galan et. al. 2010. Llegando a la conclusión de que el colesterol inhibe la SOCE si se remueve antes de la formación del complejo STIM1/Orai1, mientras que en complejos previamente formados, ya sea empleando a SOAR o STIM1, la remoción del colesterol aumenta la SOCE mediante la región CRAC identificada en este trabajo, que parece no estar involucrada en primer efecto.

Para dilucidar el mecanismo encargado de este fenómeno se realizaron experimentos para evaluar la asociación entre el fragmento SOAR y Orai1, resultando en un aumento en la interacción cuando se remueve colesterol. Los ensayos de co-inmunoprecipitación probaron que inmunoprecipitados de Orai1 se asocian con mayor avidéz al fragmento SOAR en células tratadas con M β CD. De igual forma los experimentos de FRET por foto-blanqueo demostraron una mayor interacción cuando se remueve el colesterol.

A la luz de estos datos parece haber una coincidencia entre el aumento en la actividad de Orai1 y el incremento en la interacción con el fragmento SOAR en condiciones de bajo colesterol.

5.2. Caracterización del dominio de unión a colesterol en SOAR

Existe evidencia que sugiere una alta sensibilidad de STIM1 por colesterol (13, 96, 135). Esta evidencia incluye la inhibición de formación de punta en ausencia de colesterol (13), la distribución polarizada de STIM1 en fenómenos de sinapsis inmunológica (regiones enriquecidas en colesterol) (136) y el control que STIM1 ejerce para activar y localizar al canal TRPC1 en balsas lipídicas (96, 135). Sin embargo, a la fecha se desconocían los mecanismos moleculares que regulan a STIM1 por colesterol.

En este trabajo se identificó por primera vez un dominio de unión a colesterol del tipo CRAC traslapado en la región SOAR de STIM1. Esta región presenta una alta sensibilidad por moléculas de colesterol, como se describió en este trabajo, los efectos incluyen el incremento en la interacción de SOAR con Orail en ausencia de colesterol, la presencia de colesterol en inmunoprecipitados de STIM1, la unión de DHE en péptidos sintéticos que presentan la secuencia CRAC y la regulación de la distancia de SOAR a la MP por colesterol. Además, estos resultados sugieren que la secuencia CRAC de SOAR interacciona con colesterol solamente en el estado conformacional activo de STIM1, probablemente en consecuencia de la relocalización que sufre STIM1 por el vaciamiento del RE. Dado que la MP presenta un 90% del colesterol celular total, mientras que en el RE, la mitocondria y vesículas intracelulares se distribuye el 10% restante (137, 138). Nuestros experimentos de mediciones de colesterol asociado a inmunoprecipitados de STIM1 demostraron la asociación de colesterol solo cuando se tratan las células con TG. Esto sugiere que STIM1 migra a las uniones de RE-MP donde hay presencia de colesterol y el dominio SOAR está en estrecha proximidad para interactuar con la MP. No obstante, los experimentos *in-vitro* con arreglos de péptidos demostraron una alta capacidad de unión a DHE por la

secuencia que abarca del 350 al 380 de STIM1, lo que sugiere que la secuencia *per se* presenta alta afinidad por DHE. En este sentido, se puede argumentar que el DHE es una buena aproximación al colesterol, solo difiriendo por 3 dobles enlaces y un grupo metilo extra en el carbono 24. Además, se ha demostrado que el DHE es análogo, inocuo y capaz de integrarse en la vía de síntesis de hormonas esteroideas en mamíferos, mientras que en levaduras es el esteroles natural (132). Por lo que emplear DHE como molécula análoga al colesterol es una buena aproximación para los experimentos *in-vitro*. Aquí, los arreglos de péptidos mostraron que la secuencia silvestre de SOAR se une a DHE y se observó que mutaciones puntuales de Alanina en los residuos importantes para conformar la secuencia putativa CRAC (L/V-X₍₁₋₅₎-Y-X₍₁₋₅₎-R/K) produce la supresión de la unión a DHE.

Sin embargo, la probabilidad de encontrar una o varias secuencias CRAC en una misma proteína resulta en un alto número de regiones potenciales CRAC (125), pero existen algunos criterios que aumentan la probabilidad de encontrar una verdadera secuencia CRAC; estas características incluyen que la secuencia CRAC esté posicionada en una región transmembranal o adyacente, que la proteína se localice en balsas lipídicas o dominios enriquecidos en colesterol y finalmente que la secuencia CRAC se presente en regiones de α -hélices (139). STIM1 cumple con todos estos criterios cuando está en conformación activa, es decir, cuando se vacía el RE de calcio y está próximo a la MP.

5.3. El papel de la Isoleucina 364 en el dominio CRAC de STIM1

El escaneo de mutaciones de Alanina en los arreglos de péptidos demostró que la substitución de cualquiera de los residuos que conforman el

dominio CRAC traslapado provoca la supresión de la unión de DHE, también se identificó que la mutación de la Isoleucina 364, que no forma parte de los dominios CRAC canónicos, produce la disociación del DHE.

Los experimentos en células, así como las simulaciones de dinámica molecular coincidieron en que el residuo de Isoleucina es un componente esencial para la interacción con colesterol. Dado que la ausencia de colesterol aumenta la interacción de SOAR con Orail, produciendo el incremento de la actividad de Orail. De la misma forma, la mutante I364A en el fragmento SOAR o el STIM1 completo recapitula el fenotipo de células con bajo colesterol.

Con base en reportes previos donde se ha observado un papel preponderante de las tirosinas en los dominios CRAC, ya que forman apilados de anillos esteroideos del colesterol con el grupo fenol de la cadena lateral de la tirosina. Nosotros analizamos el efecto en la tirosina 361 o la doble mutante de tirosinas (361 y 362), resultando sin consecuencias en la interacción o aboliendo la asociación de SOAR con Orail respectivamente. En este sentido, la Y362 de STIM1 ha sido descrita como un amino ácido importante para la formación de hélices superenrolladas (coiled-coil) entre las cadenas antiparalelas de 2 dímeros de SOAR (67). Por lo que se puede explicar el efecto de la doble mutante de tirosinas (361 y 362) a un desacople estructural en SOAR y no a un efecto promovido por colesterol. En nuestro caso la mutante I364A recapitula todos los efectos de remover colesterol, incluyendo la distancia de SOAR a la membrana plasmática, el aumento en la interacción con Orail y además, el remover colesterol en el contexto de la mutante I364A no adiciona un efecto extra.

No descartamos que otros amino ácidos interaccionen con colesterol, pero identificar otros residuos es una tarea complicada ya que la región SOAR representa el fragmento mínimo de STIM1, haciendo que otras mutaciones puedan afectar la estructura y funcionamiento de SOAR, por lo que sería complicado discernir entre un efecto mediado por colesterol a una consecuencia de una modificación estructural en la proteína.

En las simulaciones de dinámica molecular se puede apreciar que los residuos próximos a la I364 presentan mayor tiempo de residencia con moléculas de colesterol, estos residuos incluyen a la Y361, L411 y A415, que en conjunto conforman una región de alta afinidad a colesterol ya que corresponden a los amino ácidos que se contraponen en el bucle que forma la estructura de SOAR. Este dato sugiere que el fragmento CRAC traslapado de STIM1 no es un dominio CRAC convencional y es toda una región en la estructura terciaria de SOAR.

5.4. Modelo de interacción de Orai1 y STIM1 con colesterol

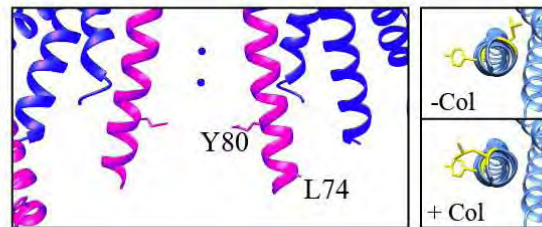
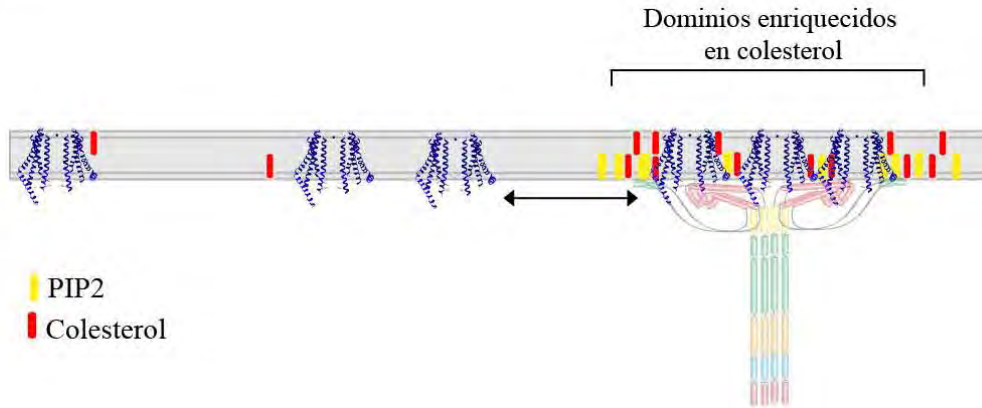
Los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con los publicados por el grupo de Romanin et. al. en 2016 arrojan un panorama que describe con gran detalle el arreglo molecular del complejo STIM1-Orai1 activado con el papel del colesterol membranar (Fig. 26).

En estado basal, Orai1 presenta una distribución homogénea y un movimiento browniano en la membrana plasmática (140, 141). Cuando se produce el vaciamiento del RE, STIM1 se acumula en las uniones de RE y MP donde Orai1 es reclutado a dominios enriquecidos en PIP2 y colesterol (13, 40). La formación de los complejos de STIM1-Orai1 es altamente dinámica y ha demostrado ser reversible con un constante recambio entre unidades de Orai1 que escapan de las regiones de localización de STIM1 (141) (Fig. 26A).

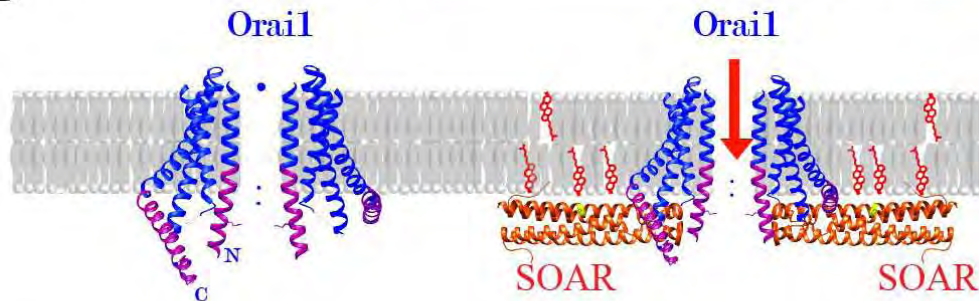
Los resultados de este trabajo sugieren un panorama en donde la región SOAR de STIM1 además de interactuar con el amino y carboxilo terminal de Orai1 (58, 59), también presenta una constante interacción con moléculas de colesterol por su dominio CRAC. Adicionalmente, en presencia de colesterol el extremo amino de Orai1 interactúan con colesterol membranar. Los residuos reportados para la unión con colesterol son la Y80, y la L74 en Orai1 (99), mientras que en STIM1 la I364 tiene un papel importante para mediar la interacción con colesterol. Las consecuencias moleculares de la interacción de SOAR con Orai1 en presencia de colesterol llevan a la estabilización de SOAR en un plano yuxtamembranal, produciendo una menor afinidad por las regiones de interacción con Orai1, esto sugiere un efecto de competencia entre colesterol y Orai1 por el fragmento SOAR (Fig. 26B). A su vez la región amino terminal de Orai1 sufre un cambio conformacional en presencia de colesterol, alineando los residuos Y80 y L74 en el mismo lado de la cadena alfa-hélice que da origen al segmento transmembranar 1 (142) (Fig. 26 B). En contraparte, en ausencia de colesterol el fragmento SOAR fluctúa a mayor distancia de la interfase membranar, incrementando su afinidad por los sitios de interacción con Orai1 y aumentando la actividad del canal. En conjunto, los cambios conformacionales producidos por la ausencia de colesterol llevan a la activación de Orai1 a niveles mayores que cuando hay colesterol (Fig. 26C).

Reposo \longrightarrow Activado

A



B



C

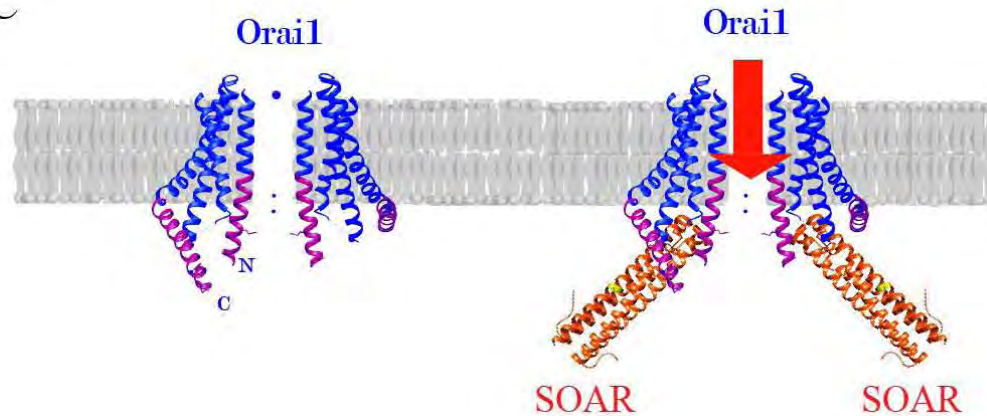


Figura 26. Modelo de la regulación del colesterol en la asociación funcional del complejo STIM1-Orai1. **A.** Distribución del canal Orai1 en la membrana plasmática cuando Orai1 está en reposo o activado por STIM1. En el esquema se ilustran las zonas enriquecidas en PIP2 y colesterol y como Orai1 se acumula de manera reversible en estas regiones para activarse por STIM1. **B.** Arreglo molecular de la asociación de SOAR con Orai1, en el recuadro se observa el detalle del cambio conformacional que sufre la región amino terminal de Orai1 en los residuos Y80 y L74 en presencia de colesterol. También se observa la posición de SOAR en un plano paralelo a la MP ocasionado por el colesterol membranaral. **C.** Arreglo molecular de la asociación de SOAR con Orai1 en ausencia de colesterol. Se observa como el dominio SOAR incrementa su distancia a la MP, lo que produce un cambio en la interacción con Orai1 que ocasiona un aumento en la actividad de Orai1.

5.5. Relevancia fisiológica de la interacción de STIM1 con colesterol

El papel del colesterol en la regulación de la SOCE puede tener distintas consecuencias, que van desde la regulación de los microdominios de calcio a nivel celular hasta los efectos patológicos y fisiológicos. La alta heterogeneidad en la membrana plasmática, con regiones enriquecidas en colesterol y esfingolípidos que transitan a distintas velocidades de difusión (143, 144), sugiere la existencia de 2 poblaciones de Orai1 con distintos grados de actividad. De la misma forma, Maléth *et al.* demuestran 2 dominios de PIP2 que generan 2 poblaciones con distinta actividad de Orai1 (40). Especialmente en células polarizadas la generación de dominios con distribuciones de lípidos distintas y de proteínas de membrana funcionan como un mecanismo para restringir espacialmente las señales de calcio. Un ejemplo son los microdominios de calcio proveniente de Orai1 que activan a los factores de transcripción c-fos, NFAT1 y NFAT2 en células RBL-1 (145, 146). En estas mismas células se ha demostrado que la proteína de andamiaje de balsas lipídicas, caveolina-1 es importante para incrementar la formación de puntos de STIM1 y aumentar la SOCE (147). Además, en linfocitos T, STIM1 y Orai1 presentan una distribución preferencial en la sinapsis

inmunológica (136), que está demostrado estar enriquecidas en colesterol y esfingolípidos (148). La dinámica de calcio intracelular en las inmediaciones de la sinapsis inmunológica presenta concentraciones de calcio bajas para asegurar la actividad sostenida de Orail y evitar mecanismos de inactivación dependientes de calcio (149). No obstante se atribuye el efecto amortiguador de calcio a la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) y a la mitocondria (149). A la luz de los nuevos hallazgos se podría especular que los dominios enriquecidos en colesterol de la sinapsis inmunológica estarían funcionando como moduladores de la actividad de Orail para evitar los fenómenos de inactivación dependiente de calcio.

El papel del colesterol toma especial importancia en el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO), una patología que produce microcefalia, retraso mental y problemas de desarrollo y crecimiento. Este síndrome se presenta por la mutación del gen DHCR7, que codifica para la enzima 3β -hidroxisterol- $\Delta 7$ -reductasa que cataliza la conversión de 7-Dehidrocolesterol a colesterol, como resultado los pacientes con síndrome de SLO se caracterizan por presentar altos niveles de 7-Dehidrocolesterol y bajos niveles de colesterol en plasma sanguíneo (150-152). Adicionalmente, la caracterización de los mastocitos de pacientes con síndrome de SLO mostraron alta degranulación y acumulación de 7-Dehidrocolesterol, que ocasiona baja estabilidad en balsas lipídicas (153). Este hecho nos hace sugerir la relación de la baja en colesterol con una alta actividad de Orail, dado que la entrada de calcio por la SOCE es clave para accionar el fenómeno de degranulación en mastocitos (99, 154).

Finalmente, el papel de la SOCE en relación con el colesterol se ha visto implicada en fenómenos de migración durante procesos de metástasis de hueso (155). En este caso, los canales de potasio SK3, que son activados por

calcio, muestran una interrelación entre el calcio que entra por Orai1 cuando ambos se encuentran en dominios de balsas lipídicas. Hacer silenciamiento genético del canal SK3 inhibe el proceso de metástasis al igual que tratar a las células con agentes que alteran la estabilidad de las balsas lipídicas (155).

6. CONCLUSION

En este trabajo se identificó por primera vez un dominio de unión a colesterol en la proteína STIM1, en particular en el dominio SOAR. Contrario a los reportes previos en donde se observaba un efecto inhibitorio de la SOCE cuando se removía colesterol de la MP. Nosotros encontramos que remover colesterol lleva al aumento en la entrada de calcio por Orai1. El mecanismo que explica este fenómeno es por la competencia que el colesterol membranal ejerce sobre el dominio SOAR una vez que STIM1 está en su estado activado, es decir, posterior al vaciamiento de calcio del RE. En consecuencia, remover colesterol de la MP lleva a que las regiones de interacción de Orai1 y el dominio SOAR tengan máxima disponibilidad, incrementando la actividad de Orai1. Cabe mencionar que el mecanismo que promueve el incremento en la actividad de Orai1 es coordinado por las 2 proteínas básicas que dan la identidad molecular a la entrada de calcio operada por las reservas, Orai1 y STIM1.

7. PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio abren interesantes preguntas que pueden abordarse a distintos niveles, incluyendo el molecular y celular, hasta los efectos sistémicos que involucren a la SOCE y patologías asociadas con fenómenos de colesterolemia.

En primera instancia, resulta atractivo entender a mayor detalle como ocurre la regulación del colesterol sobre STIM1 y Orai1. Establecer si

existe relación entre los cambios conformacionales de una u otra proteína para que en consecuencia ambas respondan a los niveles de colesterol membranal.

Los dominios heterogéneos de la membrana plasmática, con regiones enriquecidas en colesterol supone la existencia de poblaciones o conjuntos de canales con distintos niveles de activación. De hecho, Dynes et.al. demostró que Orai1 fusionado a un sensor de calcio genéticamente codificado forma cúmulos en la MP con distintos grados de activación (156). En este tenor, faltarían pruebas que correlacionen los distintos grados de activación de Orai1 con el colesterol presente entorno al canal. Sin embargo, lo efímero de los tiempos de vida de las balsas lipídicas y la ausencia de buenas herramientas para visualizar moléculas de colesterol hace complicado abordar este tema. No obstante, algunas alternativas podrían hacer factible el estudio de los nanodominios de activación de Orai1 y su ambiente lipídico. La microscopía de superresolución y el uso de técnicas como RISC (Raster Image Spectroscopy Correlation) brindan atractivas soluciones para explorar la dinámica de Orai1 en relación con colesterol. Adicionalmente, este tipo de preguntas podrían dirigirse a entender la función de Orai1 en sistemas como la sinapsis inmunológica en linfocitos. Dado que las repercusiones de la SOCE en el sistema inmune son cruciales, aunado a los niveles altos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en plasma sanguíneo se presentan en fenómenos de hipercolesterolemia, llevando probablemente a una desregulación en la señalización de calcio por Orai1.

Finalmente, se propone como tópico interesante por explorar, el papel de la SOCE en aterosclerosis y enfermedades coronarias. Existen pruebas que las células progenitoras endoteliales (CPE) participan en la

reparación del tejido vascular durante la formación de la placa aterosclerótica (157). Por el contrario, la desregulación de las CPE llevan al endotelio a perder la capacidad vasodilatadora y se produce fibrosis (158). Existe evidencia que la disminución de la SOCE es un fenómeno que se presenta durante la aterosclerosis en CPE, lo que conlleva a la disminución en la proliferación y migración en este tipo celular (159). Dado que un factor de riesgo para presentar aterosclerosis es la hiperlipidemia, una alternativa interesante por explorar sería estudiar el papel de la regulación del colesterol en la disminución de la entrada de calcio por Orail en células CPE de regiones con aterosclerosis.

En resumen, estas son algunas perspectivas que se abren como alternativa de estudio con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin olvidar remarcar que patologías como la hipercolesterolemia son enfermedades sistémicas que tienen efectos en todo el organismo, pudiendo repercutir en decenas de eventos que relacionan a la entrada de calcio operada por las reservas.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1. Cultivos celulares y transfección

Para todos los experimentos se emplearon células HEK293 cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina y estreptomycin a una concentración final de 50 µg/ml. Las condiciones de mantenimiento del cultivo celular fueron en una atmosfera humidificada de 5% de CO₂ y 95% aire a una temperatura de 37°C.

Las transfecciones se realizaron con el reactivo lipofectamina 2000 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se empleó 1 µg de ADN para cajas de superficie de 35 mm. En el caso de co-transfecciones se empleó 1 µg de ADN de cada plásmido. Dado que la expresión de SOAR produce canales constitutivamente activos, se mantuvieron las células en medio Opti-MEM (0.9 mM de CaCl₂) y se analizaron antes de 24 hrs post-transfección.

8.2. Plásmidos empleados

Los plásmidos que se ocuparon para este trabajo son los siguientes:

eGFP-SOAR (Kan), eGFP-SOAR L/Q (Kan), YFP-STIM1 (Amp) y mCherry-Orai1 (Amp) fueron donados por S. Muallem. STIM1-CFP (Kan) y STIM1-YFP (Kan) fueron un generoso obsequio de M. Prakriya y Myc-Orai1 Y80S (Kan) fue donado por Richard Lewis. Orai1-myc (Amp, 21638) se compró en Addgene. Entre paréntesis se señala la resistencia al antibiótico de cada plásmido y el número de acceso si es el caso.

Para generar las mutaciones se empleó el kit QuikChange site-directed mutagenesis (Stratagene). La mutante GFP-SOAR Y361A se obtuvo con los oligonucleótidos (en dirección 5' a 3') gtggaggtgcaagctgacaacatcaagaag y

cttcttgatgttgtcagcttgcacctccac. Sobre la base de esta mutante se generó la segunda mutante doble de tirosinas empleando los oligonucleótidos gaggtgcaagctgccaacatcaagaagc y gcttcttgatgttggcagcttgcacctc. La mutante I364A en SOAR y STIM1 se obtuvo con los oligonucleótidos ggaggtgcaatattacaacgccaagaagcaaaatgctgag y ctcagcattttgcttcttggcggttgtaattgcacctcc. Todos los plásmidos mutados se confirmaron por secuenciación.

8.3. Remoción o incorporación de colesterol

Para disminuir o afectar la concentración de colesterol membranar se siguieron 2 procedimientos. Uno mediante el compuesto M β CD que remueve el colesterol y otro por la acción de Filipina III, un compuesto quelante de colesterol (129).

Los tratamientos con M β CD se realizaron a una concentración de 7.5 mM o 10 mM según se especifica en los pies de figura. La M β CD se disolvió en solución de Krebs que contenía: 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucosa y ajustada a pH 7.4. Los tratamientos con 7.5 mM de M β CD se incubaron por 1.5 horas a 37°C, mientras que los tratamientos a 10 mM se incubaron por 25 minutos. Previo a la incubación, las células fueron lavadas 2 veces con solución de Krebs para remover residuos de suero.

Los procedimientos con Filipina III consistieron en incubar a las células por 1 hora a 37°C con una solución de Krebs conteniendo 1 μ g/ml de Filipina III.

Los ensayos de incorporación de colesterol se realizaron a partir de una solución de Krebs saturada con colesterol libre de calcio. Esta solución se

preparó a partir de una mezcla 1:1 molar de M β CD y colesterol. El colesterol se disolvió por agitación en vortex, sonicación por 5 minutos y filtrado con jeringa por un poro de 0.2 μ m para remover cristales de colesterol sin disolver. Las células se incubaron por 1.5 horas con la solución de Krebs saturada de colesterol.

8.4. Viabilidad y medición de colesterol

La determinación de concentración de colesterol se hizo mediante el kit Amplex® Red cholesterol assay (Molecular Probes) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, los cultivos de células HEK293 se crecieron en cajas de 35 mm y se lavaron con solución fisiológica libre de calcio para después incubarlas con M β CD (7.5 mM y 10 mM 90 y 50 minutos respectivamente) o con solución fisiológica en la condición control. Posteriormente las células se lisaron con PBS adicionado con Triton 10%, 1% de SDS y un coctel de inhibidor de proteasas (Roche). Los lisados se incubaron por 30 minutos a 37°C con una solución que contenía: reactivo Amplex Red 300 μ M, HRP (en inglés Horseradish peroxidase) 2 U/mL, colesterol oxidasa 2 U/mL y colesterol esterasa 2 U/mL. La detección de colesterol se hizo en un espectrofotómetro Aminco-Bowman (Thermo Electron). Los parámetros usados para excitar al reactivo Amplex red fue 540 nm y la luz de emisión se colectó a 590 nm con un ancho de banda de 30 nm. La concentración de colesterol detectada en unidades de fluorescencia relativa se estandarizó con la concentración de proteína total en cada lisado. La cuantificación de proteína se realizó mediante el kit Pierce BCA protein® de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

La medición de viabilidad celular se determinó en un microscopio confocal Olympus® FV10i con un objetivo 10X mediante el kit Live/Dead®

viability/cytotoxicity kit (Molecular Probes) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron crecidas en cajas de 35 mm y tratadas con 7.5 mM de M β CD. El compuesto calceína (indicador de células vivas) fue excitado con la línea laser de 473 nm y la luz de emisión se colectó a 519 nm. El homodímero de etidio (indicador de células inviables) fue registrado a 559 y 619 nm de excitación y emisión respectivamente.

8.5. Mediciones de calcio intracelular

Para los registros de calcio citoplasmático se crecieron las células en portaobjetos circulares de 25 mm de diámetro y un día antes del experimento se transfectaron con el plásmido de interés. Las células se incubaron 30 minutos a 25°C con 2 μ M de Fluo4-AM (Molecular probes) en solución de Krebs (119 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 1 mM de NaH₂PO₄, 1.3 mM de MgCl₂, 20 mM de HEPES, 11 mM de glucosa y ajustado a pH 7.4). Las células cargadas con el indicador de calcio fluorescente fueron colocadas en solución Krebs adicionada con 500 μ M de EGTA. El estímulo de calcio se preparó a partir de una solución principal 1M de CaCl₂ disuelto en 20 mM de HEPES a pH 7.4. Para los registros de medición de la SOCE, el vaciamiento de calcio del RE se indujo con 1 μ M de tapsigargina (TG). Los registros de fluorescencia se condujeron a través de una cámara Andor iXon-897 acoplada a un microscopio invertido IX81 Olympus® de epifluorescencia con un objetivo 40X de apertura numérica 1.3. Se usó una lámpara de argón-xenón acoplada a un sistema de iluminación MT-20 con un filtro de excitación de 484nm/25 y un filtro de emisión de 520nm/40. La adquisición de los datos se dio tomando un cuadro por segundo con una exposición de 100 ms. La secuencia de cuadros fue analizada con el software Olympus Cell^R.

Para los experimentos poblacionales se emplearon cajas de 35 mm de superficie transfectadas con los plásmidos de interés un día antes del experimento. Las cajas de Petri que contenían las células fueron cargadas con el indicador de calcio Fura-2 AM (Molecular probes) a una concentración final de 2 μ M disuelto en solución de Krebs e incubado por 30 minutos a 25°C. Al momento de iniciar el experimento las células se colocaron en una cubeta de espectrofotómetro con 2mL de solución de Krebs adicionada con 1mM de EGTA. Se usó una concentración de 1 μ M de TG para vaciar el RE por 11 minutos. Posteriormente, se añadió 10 mM de M β CD por 25 minutos hasta añadir el estímulo de calcio. Los registros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman (Thermo Electron) equipado con módulo de agitación. La longitud de onda de excitación fue de 340 y 380 nm con un ancho de banda de 8 nm. La emisión fue colectada a 510 nm con el mismo ancho de banda. La adquisición se dio por muestreo cada 10 segundos en agitación constante.

8.6. Ensayo de co-inmunoprecipitación

Se crecieron células en cajas de cultivo de 60 mm de superficie y se transfectaron con GFP-SOAR y Orail-myc. Los lisados celulares se obtuvieron con 300 μ l de PBS adicionado con 5% de triton X-100 y un coctel de inhibidor de proteasas (Roche). Después de 2 horas a 4°C en agitación constante se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 13600 rpm por 20 minutos. Para descartar artefactos de expresión en las células tratadas y sin tratar con M β CD se determinaron mediante Western-blot en los lisados totales los niveles de expresión de la proteína a co-inmunoprecipitar (GFP-SOAR). Un volumen equivalente se inmunoprecipitó con 2.5 μ g de anticuerpo contra myc y perlas de sefarosa acoplada a proteína A/G. El anticuerpo y las perlas se incubaron por 3 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron las perlas

4 veces con PBS sin detergente y se eluyeron las proteínas con amortiguador Laemli a 90°C por 5 minutos. Las muestras inmunoprecipitadas se sometieron a un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Después, se transfirieron las muestras a membranas de nitrocelulosa y se analizaron por Western-blot con el anticuerpo contra GFP. Las membranas de nitrocelulosa fueron reanalizadas contra el epítopo myc previo a un tratamiento con una solución de 0.2M de glicina, 0.1% de SDS, 1% de Tween-20 a un pH de 2.2 por 20 minutos a 80°C seguido de 5 minutos a temperatura ambiente con solución fresca.

8.7. Medición de colesterol asociado a inmunoprecipitados (Col-IP)

La medición de colesterol asociado a inmunoprecipitados se realizó modificando la técnica de Zheng (160). Las células que expresaron los plásmidos de interés fueron lisadas con un “amortiguador complejo” que contenía: 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 50 mM de NaF, 1mM de DTT, 0.5 mM de PMSF, 50 mM de Na₄P₂O₇, 10 mM Na₃VO₄, 0.25% de deoxicolato de sodio, 0.1% de Nonidet P40, 0.5% de Triton X-100, 0.1% de digitonina, inhibidor de proteasas (Roche) y un pH ajustado a 7.4. El sobrenadante de los lisados celulares se recuperó por 20 minutos de centrifugación a 13600 rpm. Posteriormente se inmunoprecipitó con proteína A/G acoplada a perlas de sefarosa y anticuerpo anti-GFP. Después de una noche de incubación a 4°C se lavaron las perlas 4 veces con la solución amortiguadora compleja y la proteína se eluyó con una solución con glicina al 0.2M a pH 2.5 por 10 minutos. Inmediatamente el eluido se neutralizó 1:1 (vol/vol) por 10 minutos más con una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM y EDTA 2 mM a un pH de 8.0.

La detección de colesterol endógeno en los inmunoprecipitados se cuantificó con el kit Amplex Red colesterol (Molecular probes) como se describió en la sección 7.4 de medición de colesterol. Adicionalmente, se normalizó la cantidad de colesterol detectada por la señal de proteína fluorescente presente en la misma reacción. La YFP se excitó a 510/9nm y se registró su emisión a 535/9nm de ancho de banda. Para el caso de los experimento de STIM1-CFP a 405/9nm y 485/9nm de excitación y emisión respectivamente. El análisis de los datos se realizó por el cociente entre la señal de colesterol detectada y la señal de proteína fluorescente en la misma muestra.

8.8. Ensayos de FRET

Los experimentos de FRET por fotoblanqueo de mCherry se desarrollaron en un microscopio confocal espectral FV100 de Olympus. Se emplearon células que expresaron a mCherry-Orai1 y GFP-SOAR. Se empleó la línea de laser 488nm y 543nm para excitar a GFP y mCherry respectivamente. La fluorescencia fue colectada a 515nm con un ancho de banda de 30nm para GFP y a 605nm con un ancho de banda de 100nm para mCherry. El pulso de fotoblanqueo se estandarizó para no afectar la fluorescencia de GFP y fotoblanquear la proteína mCherry al menos un $66 \pm 2.93\%$ (Fig. 27). El pulso de fotoblanqueo se realizó con un 80% de la potencia de la línea laser 543 por 10 segundos en una región de interés (ROI) específica. Se adquirieron un total de 15 imágenes, 5 previas al pulso de fotoblanqueo y 10 posteriores al pulso, tomando un cuadro por segundo.

La eficiencia de FRET (E) se calculó con la fórmula:

$$E_{FRET} = 100 \left(1 - \frac{D_{pre}}{D_{post}} \right)$$

Donde D_{pre} y D_{post} es la fluorescencia de GFP antes y después del fotoblanqueo de la mCherry respectivamente. Los datos se corrigieron para eliminar fluctuaciones de fluorescencia en la muestra por la adquisición y exposición al laser. Para esto se analizaron ROIs en áreas sin exposición al pulso de fotoblanqueo y se sustrajo la eficiencia de FRET (E) espuria en cada experimento.

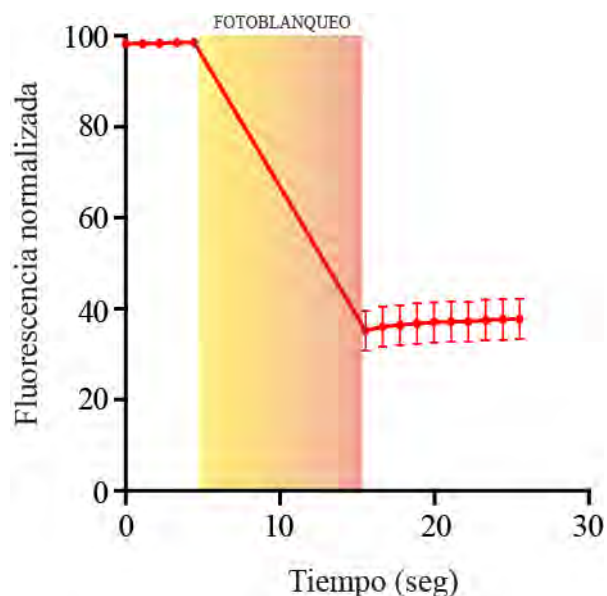


Figura 27. Curso temporal de fotoblanqueo del aceptor. La línea roja representa la fluorescencia de mCherry-Orai1 antes y después de aplicar un pulso de blanqueo con la línea del laser 543 (rectángulo amarillo).

Los ensayos de FRET entre dipicrilamina (DPA) y GFP se realizaron en células co-transfectadas con mCherry-Orai1 y GFP-SOAR. Se registró la fluorescencia de GFP (Donador) en un lapso de 32.5 minutos totales, tomando una imagen cada 2.5 minutos. Se tomaron 4 imágenes previo a la adición de DPA (20 μ M) disuelto en solución de Krebs. Los últimos 5 minutos del experimento, cuando se observó la estabilización del fotoblanqueo de GFP, se adicionó una solución alta en potasio que contenía 95 mM de NaCl, 40mM de KCl, 17mM de HEPES y ajustado a un pH de 7.4. Para los cursos temporales se emplearon células con alta expresión y una potencia del láser <10%. De Esta forma se descartaron artefactos de fotoblanqueo por exposición al láser durante el experimento.

Dado que la fluorescencia puede variar por movimientos de la membrana plasmática o movimientos celulares, para registrar la intensidad de fluorescencia de GFP-SOAR a lo largo del experimento se usó el punto de máxima intensidad de señal de mCherry-Orai1 que no se fotoblanquea por DPA. En base a que ambas proteínas interactúan y vistas bajo microscopía de luz presentan altos índices de colocalización. Además de que cambios en la interacción que alteren la distancia a la membrana plasmática caen por debajo del límite de resolución de la luz lo que hace indetectable por colocalización y conveniente para el análisis de FRET.

La eficiencia de FRET se calculó con la fórmula:

$$E_{FRET} = 1 - (I_{DA}/I_D)$$

Donde I_D es el promedio de intensidad de fluorescencia de GFP en las primeras 4 imágenes normalizado a 1 e I_{DA} es la intensidad de fluorescencia de GFP después de la estimulación con la solución alta en potasio.

Para estimar la distancia de GFP-SOAR a la MP se usó la fórmula:

$$r = R_0[(1/E) - 1]^{1/6}$$

Donde r es la distancia en angstroms (Å), R_0^2 es 37 Å y E es la eficiencia de FRET para cada experimento.

² R_0 es la distancia de Förster, a la cual se da el 50% de la eficiencia de transferencia de energía. Para el caso del par FRET GFP-DPA es 37 Å de acuerdo a Wang et. al. 2010

8.9. Ensayos de electrofisiología

Los registros electrofisiológicos se realizaron en células cultivadas en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y transfectadas con los plásmidos de interés. Los registros se hicieron en la modalidad de célula entera, usando un amplificador EPC-9 (Heka Elektronik), las pipetas de patch-clamp fueron preparadas con capilares Corning 7052 a una resistencia de 1-5 MΩ. Se utilizó un electrodo de Ag/AgCl para conseguir continuidad eléctrica en una solución extracelular vía un puente de agar-KCl.

La solución en la pipeta contenía: aspartato de cesio 120mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 2mM y NaCl 8mM a un pH de 7.2 ajustado con CsOH. La solución extracelular contenía: NaCl 120mM, Cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl) 10mM, CaCl₂ 10mM, MgCl₂ 2mM, glucosa 30mM y HEPES 10mM a un pH de 7.2 ajustado con NaOH. La osmolaridad de ambas soluciones se ajustó a 320 mOsm con manitol.

Los experimentos para evaluar las corrientes entrantes de Orail activado por SOAR consistieron en mantener el potencial de membrana a +50mV seguido de un segundo pulso a -100mV por 100 segundos. Para los experimentos con STIM1 y sus mutantes el potencial de membrana se mantuvo a -100mV y se midió la corriente activada por la aplicación de 1 μM de TG en la solución extracelular.

8.10. Arreglos de péptidos

Para fabricar los arreglos de péptidos, se sintetizaron los amino ácidos que corresponden a la región de 350 a 380 de STIM1. Todos los péptidos fueron sintetizados por la compañía JPT Peptide Technologies (Berlín, Alemania) e impresos manualmente en portaobjetos tratados con poli-L-

lisina mediante un TIRF MicroArrayer (TIRF Labs). Se usó un sistema de iluminación Lg-TIRFM-1000 en combinación con una cámara EMCCD Andor iXon (Andor Technology). Los arreglos de péptidos fueron incubados con 10 μ M de dehidroergosterol (DHE) y las imágenes fueron analizadas con el software Igor pro (Wavemetrics).

8.11. Simulación de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de 400 ns de “todos los átomos” con el software GROMACS (v5.05). Se asignaron los campos de fuerza para la proteína, la bicapa lipídica y el solvente con el paquete CHARMM36. Las bicapas lipídicas de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) y POPC:Coolesterol suspendidas en un solvente de KCl a una concentración de 0.15M se construyeron con CHARMM-GUI membrane builder. Se empleó la estructura cristalográfica de SOAR monomérico de Homo sapiens (3TEQ) y se asignó su orientación en la MP usando la base de datos “Orientations of Proteins in Membranes” (OPM database). La composición final de las simulaciones de SOAR-POPC consistieron en el fragmento monomérico de SOAR, 299 lípidos de POPC, 13,123 moléculas de H₂O, 41 K⁺ y 44 átomos de Cl⁻. Para las simulaciones con 40% de colesterol el sistema contuvo 144 moléculas de colesterol, 216 lípidos de POPC, 14,383 moléculas de H₂O, 43 K⁺ y 46 átomos de Cl⁻. El sistema fue minimizado y equilibrado a 310 K a una presión constante de 1 atm. Las simulaciones se realizaron en la supercomputadora Miztli (DGTIC, UNAM). El análisis de las simulaciones se realizaron con Python y MDAnalysis libraries. Todas las imágenes se generaron con VMD.

9. REFERENCIAS

1. Berridge, M. J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *The Journal of physiology* **499 (Pt 2)**, 291-306
2. Lam, A. K., and Galione, A. (2013) The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 2542-2559
3. Burdakov, D., Petersen, O. H., and Verkhratsky, A. (2005) Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell calcium* **38**, 303-310
4. Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J. B., De Smedt, H., and Missiaen, L. (2011) Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**
5. Vaca, L. (2010) SOCIC: the store-operated calcium influx complex. *Cell calcium* **47**, 199-209
6. Feske, S., Giltnane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M., and Rao, A. (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature immunology* **2**, 316-324
7. Lacruz, R. S., and Feske, S. (2015) Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1356**, 45-79
8. Prakriya, M., and Lewis, R. S. (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* **95**, 1383-1436
9. Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M., and Lewis, R. S. (2006) Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* **174**, 803-813
10. Carrasco, S., and Meyer, T. (2011) STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annual review of biochemistry* **80**, 973-1000
11. Hogan, P. G. (2015) The STIM1-ORAI1 microdomain. *Cell calcium*
12. Cao, X., Choi, S., Maleth, J. J., Park, S., Ahuja, M., and Muallem, S. (2015) The ER/PM microdomain, PI(4,5)P(2) and the regulation of STIM1-Orai1 channel function. *Cell calcium* **58**, 342-348
13. Pani, B., Ong, H. L., Liu, X., Rauser, K., Ambudkar, I. S., and Singh, B. B. (2008) Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). *The Journal of biological chemistry* **283**, 17333-17340
14. Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321
15. Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325
16. Casteels, R., and Droogmans, G. (1981) Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *The Journal of physiology* **317**, 263-279
17. Putney, J. W., Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium* **7**, 1-12
18. Hoth, M., and Penner, R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**, 353-356
19. Hoth, M., and Penner, R. (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The Journal of physiology* **465**, 359-386
20. Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1993) Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6295-6299
21. Prakriya, M., and Lewis, R. S. (2006) Regulation of CRAC channel activity by recruitment of silent channels to a high open-probability gating mode. *The Journal of general physiology* **128**, 373-386

22. Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., and Stauderman, K. A. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* **169**, 435-445
23. Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., and Meyer, T. (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology* **15**, 1235-1241
24. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-185
25. Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J. P. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* **312**, 1220-1223
26. Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2006) Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16704-16709
27. Oritani, K., and Kincade, P. W. (1996) Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol* **134**, 771-782
28. Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., and Gill, D. L. (2012) STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 549-565
29. Stathopoulos, P. B., Li, G. Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., and Ikura, M. (2006) Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *The Journal of biological chemistry* **281**, 35855-35862
30. Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., and Lewis, R. S. (2008) Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* **454**, 538-542
31. Grigoriev, I., Gouveia, S. M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M. O., Putney, J. W., Jr., Hoogenraad, C. C., and Akhmanova, A. (2008) STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Current biology : CB* **18**, 177-182
32. Sampieri, A., Zepeda, A., Asanov, A., and Vaca, L. (2009) Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member. *Cell calcium* **45**, 439-446
33. Asanov, A., Sherry, R., Sampieri, A., and Vaca, L. (2013) A relay mechanism between EB1 and APC facilitate STIM1 puncta assembly at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell calcium* **54**, 246-256
34. Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F., and Muallem, S. (2009) SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature cell biology* **11**, 337-343
35. Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., and Lewis, R. S. (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* **136**, 876-890
36. Yu, F., Sun, L., Hubrack, S., Selvaraj, S., and Machaca, K. (2013) Intramolecular shielding maintains the ER Ca(2+)(+) sensor STIM1 in an inactive conformation. *Journal of cell science* **126**, 2401-2410

37. Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E., and Lewis, R. S. (2009) STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 15495-15500
38. Heo, W. D., Inoue, T., Park, W. S., Kim, M. L., Park, B. O., Wandless, T. J., and Meyer, T. (2006) PI(3,4,5)P₃ and PI(4,5)P₂ lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* **314**, 1458-1461
39. Korzeniowski, M. K., Popovic, M. A., Szentpetery, Z., Varnai, P., Stojilkovic, S. S., and Balla, T. (2009) Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21027-21035
40. Maleth, J., Choi, S., Muallem, S., and Ahuja, M. (2014) Translocation between PI(4,5)P₂-poor and PI(4,5)P₂-rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating. *Nature communications* **5**, 5843
41. Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9301-9306
42. Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., and Muallem, S. (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature cell biology* **9**, 636-645
43. Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., and Worley, P. F. (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nature cell biology* **8**, 1003-1010
44. DeHaven, W. I., Jones, B. F., Petranka, J. G., Smyth, J. T., Tomita, T., Bird, G. S., and Putney, J. W., Jr. (2009) TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *The Journal of physiology* **587**, 2275-2298
45. Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007) CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Current biology : CB* **17**, 794-800
46. Lee, K. P., Yuan, J. P., Zeng, W., So, I., Worley, P. F., and Muallem, S. (2009) Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14687-14692
47. Thompson, J. L., Mignen, O., and Shuttleworth, T. J. (2013) The ARC channel--an endogenous store-independent Orai channel. *Current topics in membranes* **71**, 125-148
48. Zhang, X., Gonzalez-Cobos, J. C., Schindl, R., Muik, M., Ruhle, B., Motiani, R. K., Bisailon, J. M., Zhang, W., Fahrner, M., Barroso, M., Matrougui, K., Romanin, C., and Trebak, M. (2013) Mechanisms of STIM1 activation of store-independent leukotriene C₄-regulated Ca²⁺ channels. *Molecular and cellular biology* **33**, 3715-3723
49. Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2008) Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *The Journal of physiology* **586**, 419-425
50. Ji, W., Xu, P., Li, Z., Lu, J., Liu, L., Zhan, Y., Chen, Y., Hille, B., Xu, T., and Chen, L. (2008) Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13668-13673
51. Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., and Long, S. B. (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* **338**, 1308-1313
52. Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2013) How many Orai's does it take to make a CRAC channel? *Scientific reports* **3**, 1961

53. Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kato, K., Kaneko, T., Kiyonaka, S., Mori, Y., and Sato, C. (2009) Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* **284**, 13676-13685
54. Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2008) The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**, 116-120
55. Yamashita, M., Navarro-Borelly, L., McNally, B. A., and Prakriya, M. (2007) Orai1 mutations alter ion permeation and Ca²⁺-dependent fast inactivation of CRAC channels: evidence for coupling of permeation and gating. *The Journal of general physiology* **130**, 525-540
56. McNally, B. A., Yamashita, M., Engh, A., and Prakriya, M. (2009) Structural determinants of ion permeation in CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 22516-22521
57. Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L., and Xu, T. (2007) Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 29448-29456
58. McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M., and Prakriya, M. (2013) The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *The Journal of physiology* **591**, 2833-2850
59. Palty, R., Stanley, C., and Isacoff, E. Y. (2015) Critical role for Orai1 C-terminal domain and TM4 in CRAC channel gating. *Cell research* **25**, 963-980
60. Yang, X., Jin, H., Cai, X., Li, S., and Shen, Y. (2012) Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5657-5662
61. Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., Stathopoulos, P. B., Ikura, M., Rao, A., and Hogan, P. G. (2013) Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nature structural & molecular biology* **20**, 973-981
62. Zhou, Y., Wang, X., Wang, X., Loktionova, N. A., Cai, X., Nwokonko, R. M., Vrana, E., Wang, Y., Rothberg, B. S., and Gill, D. L. (2015) STIM1 dimers undergo unimolecular coupling to activate Orai1 channels. *Nature communications* **6**, 8395
63. Korzeniowski, M. K., Manjarres, I. M., Varnai, P., and Balla, T. (2010) Activation of STIM1-Orai1 involves an intramolecular switching mechanism. *Science signaling* **3**, ra82
64. Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., Kahr, H., Madl, J., Gruber, H., Groschner, K., and Romanin, C. (2008) Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *The Journal of biological chemistry* **283**, 8014-8022
65. Calloway, N., Holowka, D., and Baird, B. (2010) A basic sequence in STIM1 promotes Ca²⁺ influx by interacting with the C-terminal acidic coiled coil of Orai1. *Biochemistry* **49**, 1067-1071
66. Calloway, N., Vig, M., Kinet, J. P., Holowka, D., and Baird, B. (2009) Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamically on depletion of Ca²⁺ stores and on electrostatic interactions. *Molecular biology of the cell* **20**, 389-399
67. Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Fahrner, M., Zheng, L., Gasmi-Seabrook, G. M., Muik, M., Romanin, C., and Ikura, M. (2013) STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nature communications* **4**, 2963
68. Shim, A. H., Tirado-Lee, L., and Prakriya, M. (2015) Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation. *Journal of molecular biology* **427**, 77-93

69. Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., and Lewis, R. S. (2006) The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* **174**, 815-825
70. Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L., and Xu, T. (2006) Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochemical and biophysical research communications* **350**, 969-976
71. Stefan, C. J., Manford, A. G., and Emr, S. D. (2013) ER-PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication. *Current opinion in cell biology* **25**, 434-442
72. Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., Tan, P., Liang, X., Zheng, X., Chen, L., Shi, X., Zhang, S. L., Zhong, L., Huang, Y., Dong, M. Q., Walker, C. L., Hogan, P. G., Wang, Y., and Zhou, Y. (2015) Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca influx. *Nature cell biology*
73. Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z. S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., Ward, C. C., Seth, M., Finch, E., Malouf, N., Williams, R. S., Eu, J. P., and Rosenberg, P. (2008) STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nature cell biology* **10**, 688-697
74. Orci, L., Ravazzola, M., Le Coadic, M., Shen, W. W., Demaurex, N., and Cosson, P. (2009) From the Cover: STIM1-induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19358-19362
75. Collins, S. R., and Meyer, T. (2011) Evolutionary origins of STIM1 and STIM2 within ancient Ca²⁺ signaling systems. *Trends in cell biology* **21**, 202-211
76. Lur, G., Haynes, L. P., Prior, I. A., Gerasimenko, O. V., Feske, S., Petersen, O. H., Burgoyne, R. D., and Tepikin, A. V. (2009) Ribosome-free terminals of rough ER allow formation of STIM1 puncta and segregation of STIM1 from IP(3) receptors. *Current biology : CB* **19**, 1648-1653
77. Varnai, P., Toth, B., Toth, D. J., Hunyady, L., and Balla, T. (2007) Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *The Journal of biological chemistry* **282**, 29678-29690
78. Quintana, A., Rajanikanth, V., Farber-Katz, S., Gudlur, A., Zhang, C., Jing, J., Zhou, Y., Rao, A., and Hogan, P. G. (2015) TMEM110 regulates the maintenance and remodeling of mammalian ER-plasma membrane junctions competent for STIM-ORAI signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
79. Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G. M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., Nilsson, R., Rao, A., and Hogan, P. G. (2013) An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca²⁺ entry. *Nature* **499**, 238-242
80. Prins, D., Groenendyk, J., Touret, N., and Michalak, M. (2011) Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57. *EMBO reports* **12**, 1182-1188
81. Woodward, O. M., Li, Y., Yu, S., Greenwell, P., Wodarczyk, C., Boletta, A., Guggino, W. B., and Qian, F. (2010) Identification of a polycystin-1 cleavage product, P100, that regulates store operated Ca entry through interactions with STIM1. *PLoS one* **5**, e12305
82. Walsh, C. M., Doherty, M. K., Tepikin, A. V., and Burgoyne, R. D. (2010) Evidence for an interaction between Golgi and STIM1 in store-operated calcium entry. *The Biochemical journal* **430**, 453-460
83. Bauer, M. C., O'Connell, D., Cahill, D. J., and Linse, S. (2008) Calmodulin binding to the polybasic C-termini of STIM proteins involved in store-operated calcium entry. *Biochemistry* **47**, 6089-6091

84. Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Stotz, S. C., Manasian, Y., and Clapham, D. E. (2011) POST, partner of stromal interaction molecule 1 (STIM1), targets STIM1 to multiple transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 19234-19239
85. Srikanth, S., Jung, H. J., Kim, K. D., Souda, P., Whitelegge, J., and Gwack, Y. (2010) A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nature cell biology* **12**, 436-446
86. Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S. F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013) PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* **153**, 1494-1509
87. Chang, C. L., Hsieh, T. S., Yang, T. T., Rothberg, K. G., Azizoglu, D. B., Volk, E., Liao, J. C., and Liou, J. (2013) Feedback regulation of receptor-induced Ca²⁺ signaling mediated by E-Syt1 and Nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell reports* **5**, 813-825
88. Walsh, C. M., Chvanov, M., Haynes, L. P., Petersen, O. H., Tepikin, A. V., and Burgoyne, R. D. (2010) Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. *The Biochemical journal* **425**, 159-168
89. Yang, H. (2006) Nonvesicular sterol transport: two protein families and a sterol sensor? *Trends in cell biology* **16**, 427-432
90. Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H. T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P. G. (2010) STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nature structural & molecular biology* **17**, 112-116
91. Pike, L. J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research* **47**, 1597-1598
92. Murata, T., Lin, M. I., Stan, R. V., Bauer, P. M., Yu, J., and Sessa, W. C. (2007) Genetic evidence supporting caveolae microdomain regulation of calcium entry in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **282**, 16631-16643
93. Gratton, J. P., Bernatchez, P., and Sessa, W. C. (2004) Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circulation research* **94**, 1408-1417
94. Jardin, I., Salido, G. M., and Rosado, J. A. (2008) Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1. *Channels* **2**, 401-403
95. Dionisio, N., Galan, C., Jardin, I., Salido, G. M., and Rosado, J. A. (2011) Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 431-437
96. Alicia, S., Angelica, Z., Carlos, S., Alfonso, S., and Vaca, L. (2008) STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell calcium* **44**, 479-491
97. Gwozdz, T., Dutko-Gwozdz, J., Schafer, C., and Bolotina, V. M. (2012) Overexpression of Orai1 and STIM1 proteins alters regulation of store-operated Ca²⁺ entry by endogenous mediators. *The Journal of biological chemistry* **287**, 22865-22872
98. Galan, C., Woodard, G. E., Dionisio, N., Salido, G. M., and Rosado, J. A. (2010) Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca(2+) entry. *Biochimica et biophysica acta* **1803**, 1083-1093
99. Derler, I., Jardin, I., Stathopoulos, P. B., Muik, M., Fahrner, M., Zayats, V., Pandey, S. K., Poteser, M., Lackner, B., Absolonova, M., Schindl, R., Groschner, K., Etrich, R., Ikura, M., and Romanin, C. (2016) Cholesterol modulates Orai1 channel function. *Science signaling* **9**, ra10

100. Kawai, K., Fujita, M., and Nakao, M. (1974) Lipid components of two different regions of an intestinal epithelial cell membrane of mouse. *Biochimica et biophysica acta* **369**, 222-233
101. Forstner, G. G., Tanaka, K., and Isselbacher, K. J. (1968) Lipid composition of the isolated rat intestinal microvillus membrane. *The Biochemical journal* **109**, 51-59
102. Simons, K., and van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202
103. Sankaram, M. B., and Thompson, T. E. (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8686-8690
104. Brown, D. A., and London, E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *The Journal of membrane biology* **164**, 103-114
105. Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544
106. Sonnino, S., and Prinetti, A. (2013) Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Current medicinal chemistry* **20**, 4-21
107. Brown, D. A., and London, E. (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochemical and biophysical research communications* **240**, 1-7
108. Ahmed, S. N., Brown, D. A., and London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* **36**, 10944-10953
109. Melkonian, K. A., Chu, T., Tortorella, L. B., and Brown, D. A. (1995) Characterization of proteins in detergent-resistant membrane complexes from Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Biochemistry* **34**, 16161-16170
110. Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388
111. Klotzsch, E., and Schutz, G. J. (2013) A critical survey of methods to detect plasma membrane rafts. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **368**, 20120033
112. Carquin, M., D'Auria, L., Pollet, H., Bongarzone, E. R., and Tyteca, D. (2015) Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains. *Progress in lipid research* **62**, 1-24
113. Horejsi, V., and Hrdinka, M. (2014) Membrane microdomains in immunoreceptor signaling. *FEBS letters* **588**, 2392-2397
114. Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Hayashi, M., and Inomata, M. (2010) Plasma membrane microdomains in aging and disease. *Geriatrics & gerontology international* **10 Suppl 1**, S41-52
115. Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., and Simons, K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6460-6464
116. Beel, A. J., Sakakura, M., Barrett, P. J., and Sanders, C. R. (2010) Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochimica et biophysica acta* **1801**, 975-982
117. Blom, T., Somerharju, P., and Ikonen, E. (2011) Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a004713
118. Ikonen, E. (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 125-138

119. Pikuleva, I. A., and Curcio, C. A. (2014) Cholesterol in the retina: the best is yet to come. *Progress in retinal and eye research* **41**, 64-89
120. Silvius, J. R. (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochimica et biophysica acta* **1610**, 174-183
121. (2010) Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Structure and Function in Health and Disease. *Subcell Biochem* **51**, 1-631
122. Harris, J. R. (2010) *Cholesterol binding and cholesterol transport proteins : structure and function in health and disease*, Springer, Dordrecht
123. Plowman, S. J., Muncke, C., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2005) H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15500-15505
124. Fantini, J., and Barrantes, F. J. (2013) How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Frontiers in physiology* **4**, 31
125. Epanand, R. M. (2006) Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Progress in lipid research* **45**, 279-294
126. Li, H., and Papadopoulos, V. (1998) Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* **139**, 4991-4997
127. Baier, C. J., Fantini, J., and Barrantes, F. J. (2011) Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Scientific reports* **1**, 69
128. Zidovetzki, R., and Levitan, I. (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et biophysica acta* **1768**, 1311-1324
129. Gimpl, G., and Gehrig-Burger, K. (2007) Cholesterol reporter molecules. *Bioscience reports* **27**, 335-358
130. Bird, G. S., DeHaven, W. I., Smyth, J. T., and Putney, J. W., Jr. (2008) Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* **46**, 204-212
131. Parekh, A. B., and Putney, J. W. J. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews* **85**, 757-810
132. McIntosh, A. L., Atshaves, B. P., Huang, H., Gallegos, A. M., Kier, A. B., and Schroeder, F. (2008) Fluorescence techniques using dehydroergosterol to study cholesterol trafficking. *Lipids* **43**, 1185-1208
133. Wang, D., Zhang, Z., Chanda, B., and Jackson, M. B. (2010) Improved probes for hybrid voltage sensor imaging. *Biophysical journal* **99**, 2355-2365
134. Jha, A., Ahuja, M., Maleth, J., Moreno, C. M., Yuan, J. P., Kim, M. S., and Muallem, S. (2013) The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function. *J Cell Biol* **202**, 71-79
135. Pani, B., Ong, H. L., Brazer, S. C., Liu, X., Rauser, K., Singh, B. B., and Ambudkar, I. S. (2009) Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20087-20092
136. Lioudyno, M. I., Kozak, J. A., Penna, A., Safrina, O., Zhang, S. L., Sen, D., Roos, J., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2008) Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2011-2016

137. Lange, Y. (1991) Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *Journal of lipid research* **32**, 329-339
138. Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., and Steck, T. L. (1999) Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *Journal of lipid research* **40**, 2264-2270
139. Epand, R. M. (2008) Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 1576-1582
140. Perni, S., Dynes, J. L., Yeromin, A. V., Cahalan, M. D., and Franzini-Armstrong, C. (2015) Nanoscale patterning of STIM1 and Orai1 during store-operated Ca²⁺ entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E5533-5542
141. Wu, M. M., Covington, E. D., and Lewis, R. S. (2014) Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at ER-plasma membrane junctions. *Molecular biology of the cell*
142. Hooper, R., Rothberg, B. S., and Soboloff, J. (2016) Sterol hindrance of Orai activation. *Science signaling* **9**, fs4
143. Honigsmann, A., Mueller, V., Ta, H., Schoenle, A., Sezgin, E., Hell, S. W., and Eggeling, C. (2014) Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nature communications* **5**, 5412
144. Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., and Horber, J. K. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* **148**, 997-1008
145. Samanta, K., Kar, P., Mirams, G. R., and Parekh, A. B. (2015) Ca²⁺ Channel Re-localization to Plasma-Membrane Microdomains Strengthens Activation of Ca²⁺-Dependent Nuclear Gene Expression. *Cell reports* **12**, 203-216
146. Kar, P., and Parekh, A. B. (2015) Distinct spatial Ca²⁺ signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Molecular cell* **58**, 232-243
147. Yeh, Y. C., and Parekh, A. B. (2015) Distinct structural domains of caveolin-1 independently regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ microdomain-dependent gene expression. *Molecular and cellular biology* **35**, 1341-1349
148. Owen, D. M., Oddos, S., Kumar, S., Davis, D. M., Neil, M. A., French, P. M., Dustin, M. L., Magee, A. I., and Cebecauer, M. (2010) High plasma membrane lipid order imaged at the immunological synapse periphery in live T cells. *Molecular membrane biology* **27**, 178-189
149. Quintana, A., Pasche, M., Junker, C., Al-Ansary, D., Rieger, H., Kummerow, C., Nunez, L., Villalobos, C., Meraner, P., Becherer, U., Rettig, J., Niemeyer, B. A., and Hoth, M. (2011) Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *The EMBO journal* **30**, 3895-3912
150. Waterham, H. R., Wijburg, F. A., Hennekam, R. C., Vreken, P., Poll-The, B. T., Dorland, L., Duran, M., Jira, P. E., Smeitink, J. A., Wevers, R. A., and Wanders, R. J. (1998) Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *American journal of human genetics* **63**, 329-338
151. Fitzky, B. U., Witsch-Baumgartner, M., Erdel, M., Lee, J. N., Paik, Y. K., Glossmann, H., Utermann, G., and Moebius, F. F. (1998) Mutations in the Delta7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8181-8186
152. Wassif, C. A., Maslen, C., Kachilele-Linjewile, S., Lin, D., Linck, L. M., Connor, W. E., Steiner, R. D., and Porter, F. D. (1998) Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *American journal of human genetics* **63**, 55-62

153. Kovarova, M., Wassif, C. A., Odom, S., Liao, K., Porter, F. D., and Rivera, J. (2006) Cholesterol deficiency in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz syndrome reveals increased mast cell responsiveness. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1161-1171
154. Hajkova, Z., Bugajev, V., Draberova, E., Vinopal, S., Draberova, L., Janacek, J., Draber, P., and Draber, P. (2011) STIM1-directed reorganization of microtubules in activated mast cells. *Journal of immunology* **186**, 913-923
155. Chantome, A., Potier-Cartereau, M., Clarysse, L., Fromont, G., Marionneau-Lambot, S., Gueguinou, M., Pages, J. C., Collin, C., Oullier, T., Girault, A., Arbion, F., Haelters, J. P., Jaffres, P. A., Pinault, M., Besson, P., Joulin, V., Bougnoux, P., and Vandier, C. (2013) Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer research* **73**, 4852-4861
156. Dynes, J. L., Amcheslavsky, A., and Cahalan, M. D. (2016) Genetically targeted single-channel optical recording reveals multiple Orai1 gating states and oscillations in calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 440-445
157. Georgescu, A., Alexandru, N., Andrei, E., Dragan, E., Cochior, D., and Dias, S. (2016) Effects of transplanted circulating endothelial progenitor cells and platelet microparticles in atherosclerosis development. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **108**, 219-243
158. Zhang, M., Malik, A. B., and Rehman, J. (2014) Endothelial progenitor cells and vascular repair. *Current opinion in hematology* **21**, 224-228
159. Wang, L. Y., Zhang, J. H., Yu, J., Yang, J., Deng, M. Y., Kang, H. L., and Huang, L. (2015) Reduction of Store-Operated Ca(2+) Entry Correlates with Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Atherosclerotic Mice. *Stem cells and development* **24**, 1582-1590
160. Zheng, H., Pearsall, E. A., Hurst, D. P., Zhang, Y., Chu, J., Zhou, Y., Reggio, P. H., Loh, H. H., and Law, P. Y. (2012) Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize mu-opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC cell biology* **13**, 6
161. DiFranco, M., Capote, J., Quinonez, M., and Vergara, J. L. (2007) Voltage-dependent dynamic FRET signals from the transverse tubules in mammalian skeletal muscle fibers. *The Journal of general physiology* **130**, 581-600

ANEXOS

10. Anexo 1

Potencial de membrana en reposo de células que expresan las diferentes construcciones:

Condición	Potencial de membrana en reposo
Células HEK239 sin transfectar	-35 ± 7 mV
STIM1	-39 ± 8 mV
Orai1	-37 ± 6 mV
STIM1+ Orai1	-34 ± 8 mV
STIM1+ Orai1+ TG	$+ 3 \pm 5$ mV
SOAR+ Orai1	$+ 19 \pm 7$ mV

11. Anexo 2

Calculo de la distancia de Förster (R_0) entre mCherry y DPA

La distancia de Förster (R_0) se define como la distancia a la cual la eficiencia de FRET entre una molécula donadora y una aceptora es del 50%. R_0 está en función de la sobreposición del espectro de emisión de la molécula donadora y el espectro de absorción de la molécula aceptora en unidades de Ångström. R_0 está dada por la siguiente expresión:

$$R_0 = 0.211 \left[\frac{\kappa^2 \Phi_D J(\lambda)}{n^4} \right]^{\frac{1}{6}}$$

Donde κ es un factor de orientación entre el donador y el aceptor, n es el índice de refracción, Φ_D es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador en ausencia del aceptor y J es la integral de sobreposición entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del acepto. J se define como:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 F_D(\lambda) d\lambda$$

Donde $\epsilon_A(\lambda)$ es el espectro de absorción molar del acepto (DPA), que se calcula como el espectro de absorción normalizado multiplicado por el máximo coeficiente de extinción molar ($20,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en agua), λ es la longitud de onda en nm, $F_D(\lambda)$ es el pico normalizado del espectro de emisión del donador. Las unidades de J son $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$.

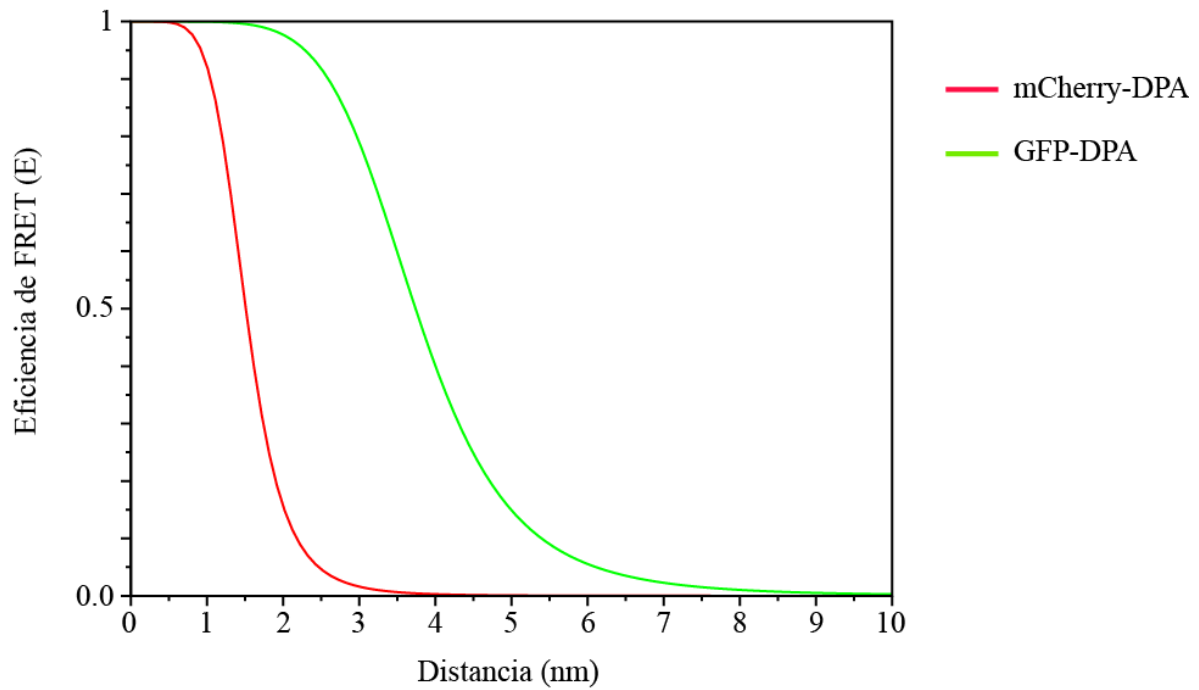
Se empleó el software a/e UV-Vis-IR Spectral para el cálculo de sobreposición de espectros, tomando un índice de refracción n de 1.29, un factor κ de 2/3 y un rendimiento cuántico Φ_D para mCherry de 0.22 de acuerdo

a <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html>. El espectro de absorción del DPA se obtuvo a partir de (161). Los espectros de emisión de GFP y mCherry se obtuvieron de una base de datos del laboratorio del Dr. Tsien (<http://www.tsienlab.ucsd.edu/>).

El valor R_0 para GFP-DPA fue de 3.74 nm, que contrasta con el R_0 de 1.51 nm para el par mCherry-DPA. De acuerdo a estos valores se modeló en Scilab la eficiencia de FRET siguiendo la fórmula:

$$r = R_0 \left[\left(\frac{1}{E} \right) - 1 \right]^{1/6}$$


Donde E es la eficiencia de FRET y r es la distancia en nanómetros entre el donador y el aceptor.



12. Anexo 3

Publicaciones obtenidas durante la estancia doctoral

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1-Orai1 physical and functional interactions

Jonathan Pacheco¹, Laura Dominguez², A. Bohórquez-Hernández¹, Alexander Asanov³ & Luis Vaca¹

Received: 01 April 2016

Accepted: 20 June 2016

Published: 27 July 2016

STIM1 and Orai1 are the main components of a widely conserved Calcium influx pathway known as store-operated calcium entry (SOCE). STIM1 is a calcium sensor, which oligomerizes and activates Orai channels when calcium levels drop inside the endoplasmic reticulum (ER). The series of molecular rearrangements that STIM1 undergoes until final activation of Orai1 require the direct exposure of the STIM1 domain known as SOAR (Stim Orai Activating Region). In addition to these complex molecular rearrangements, other constituents like lipids at the plasma membrane, play critical roles orchestrating SOCE. PI(4,5)P₂ and enriched cholesterol microdomains have been shown as important signaling platforms that recruit the SOCE machinery in steps previous to Orai1 activation. However, little is known about the molecular role of cholesterol once SOCE is activated. In this study we provide clear evidence that STIM1 has a cholesterol-binding domain located inside the SOAR region and modulates Orai1 channels. We demonstrate a functional association of STIM1 and SOAR to cholesterol, indicating a close proximity of SOAR to the inner layer of the plasma membrane. In contrast, the depletion of cholesterol induces the SOAR detachment from the plasma membrane and enhances its association to Orai1. These results are recapitulated with full length STIM1.

STIM1 and Orai1 are essential molecular components of the Store Operated Calcium Entry (SOCE), a well-conserved mechanism of Calcium signaling present from insects to humans and critical during the activation of T-cells in the immune response¹. Orai1 functions as the pore-forming channel activated when intracellular calcium stores are depleted, most notably the endoplasmic reticulum (ER). Under these conditions STIM1 senses the reduction in luminal calcium concentration and undergoes a series of molecular rearrangements that culminate with the exposure of the so-called SOAR (Stim Orai Activating Region) or CAD (CRAC Activation Domain)^{2,3} responsible to directly interact and activate Orai channels. The SOAR region covers from amino acids 340 to 450 of STIM1 and falls within the coiled-coil CC2 and CC3 domains⁴. Expression of SOAR has been shown to be sufficient to induce constitutive activation of Orai channels^{2,3}.

In order for SOAR to interact with the Orai1 N and C-terminal domains⁵, STIM1 must adopt an extended conformation⁶ and migrate to ER regions that are in closed appositions to the plasma membrane (PM). Such regions are recognized as ER-PM junctions^{7,8}. The molecular mechanism controlling the translocation of STIM1 to ER-PM junctions are not well understood. However, several proteins have emerged recently as partners in facilitating and tethering ER-PM membranes to favor STIM1 movement to these sites⁹. These proteins include septins¹⁰, synaptotagmins¹¹, and the transmembrane protein TMEM110 (also called STIMATE)^{12,13}. The dynamic formation of these cellular structures seems to be highly complex due to the fact that 70 different proteins participate in this event¹².

An additional level of complexity arises from the intervention of specific lipids at these microdomains, most notably the PI(4,5)P₂ that recruits tethered proteins, including STIM1 by mean of a direct association to the lysine-rich region at its C-terminal domain¹⁴. On the other hand, cholesterol is enriched at ER-PM junctions where oxysterol-binding proteins (OSBP) perform non-vesicular sterol lipid transfer between membranes^{9,15}. In addition, cholesterol has been shown to be ubiquitous component of specialized PM microdomains^{16,17}. These participating as signaling platforms to recruit SOCE components at ER-PM junctions¹⁸⁻²¹. In that regard,

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, México. ²Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México. ³TIRFLabs Inc. 106 Grendon Place. Cary, NC 27519, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.V. (email: lvaca@ifc.unam.mx)

disruption of cholesterol microdomains by reducing PM cholesterol via methyl β -cyclodextrin (M β CD) results in the attenuation of SOCE and reduction of the Orai1-STIM1 interaction^{20,22}. However, the molecular mechanism by which cholesterol modulates STIM1 is not fully understood, most of the evidence points to the inhibition of clustering of STIM1 at cell periphery under reduced cholesterol conditions¹⁸. In contrast, the modulation of cholesterol on the already formed STIM1-Orai1 complex remains unexplored, in spite of the importance of the lipid's environment on the regulation of a variety of ionic channels²³. Here, we investigated the role of cholesterol once the STIM1/Orai1 complex has been formed. All the studies published to this date indicate that cholesterol reduction prior to ER depletion results in the reduction of SOCE, diminishes STIM1/Orai1 association and generates STIM1 puncta at ER regions away from the PM.

Our results show that cholesterol depletion from the PM after the STIM1/Orai1 complex has been assembled results in enhanced SOCE and increased association between STIM1 and Orai1. Furthermore, we show that the mechanism by which cholesterol downregulates Orai1 involves STIM1 association to the PM cholesterol via a novel cholesterol-binding domain (CB domain) contained within SOAR. Most strikingly, a single mutation of isoleucine (I364) disrupts SOAR-cholesterol association and enhances the association of the SOAR domain with Orai1 channels. Similar results are obtained by removing cholesterol from the PM with M β CD or Filipin with SOAR wild type. The SOAR I364A mutant recapitulates the phenotype obtained with wild type SOAR in cells depleted of cholesterol. The effect of reducing cholesterol prior to STIM1-Orai1 complex formation is not altered in the I364 mutant, indicating that such effect is controlled by a different (yet unidentified) cholesterol-binding domain within STIM1 or its auxiliary proteins. Our experimental results and molecular dynamics simulations strongly suggest that the interaction of SOAR to PM cholesterol provides an anchoring platform for STIM1 to be attached to the PM. These results unveil a detailed molecular mechanism of how STIM1 is directly regulated by cholesterol content at the PM, facilitating or impeding the presentation of the SOAR region to Orai1 channels. Altogether, our data highlights the importance of enriched cholesterol microdomains to modulate the STIM1-Orai1 interaction after SOCE activation and differentiates this mechanism from the cholesterol actions previous to STIM1/Orai1 complex formation.

Results

Role of cholesterol in SOAR-Orai1 interaction. It has been previously demonstrated that the expression of the SOAR domain results in a constitutive interaction with Orai1 channels, activating Orai1 independently of endoplasmic reticulum (ER) calcium store content^{2,3}. To evaluate the role of cholesterol once the STIM1-Orai1 (SOCE) complex is established, we used cells overexpressing SOAR and Orai1. By using the SOAR fragment we discarded the effects of inhibition of STIM1 puncta when cholesterol is removed from the PM, a phenomenon that has been previously reported^{14,18,22}. Intracellular calcium measurements were performed in cells treated with methyl- β -cyclodextrin (M β CD). Figure 1a shows cytoplasmic calcium influx mediated by cells expression of SOAR and Orai1. Very interestingly, cells depleted of cholesterol showed a drastic increase of cytoplasmic calcium when compared to cells expressing SOAR and Orai1 with normal cholesterol levels (Fig. 1a). In order to show that this response was dependent on cholesterol levels and not by an unrelated effect of M β CD treatment, we incubated cells with equimolar concentrations of M β CD and cholesterol, producing very similar calcium increments to those obtained in cells expressing SOAR with normal cholesterol levels (Fig. 1a). The addition of extracellular calcium resulted in five times larger calcium influx in cholesterol depleted conditions compared to cells with normal cholesterol levels (Fig. 1b). In addition, treatment with filipin, a cholesterol-binding agent, produced indistinguishable results to those obtained using M β CD (see Supplementary Fig. S1A). Furthermore, calcium entry post-TG addition was also higher in cells expressing SOAR with reduced cholesterol content (see Supplementary Fig. S1C,D).

Correspondingly, we recorded Orai1 currents activated by SOAR upon treatment with M β CD or filipin (Fig. 1c). Resulting in larger currents when PM cholesterol was reduced with either of the 2 agents (Fig. 1d). In contrast, when cholesterol was reduced before the formation of the STIM1-Orai1 complex (using cells expressing SOAR, or full length STIM1 without ER depletion) we observed the already reported effect of reduced calcium entry (see Supplementary Fig. S2). Quantification of cholesterol content with M β CD treatment resulted in a reduction of 84% without affecting significantly cell viability (see Supplementary Fig. S3).

To evaluate if cholesterol was affecting the association between SOAR and Orai1 (one of several feasible mechanisms to explain the enhanced calcium influx), we co-immunoprecipitated SOAR associated to Orai1. The co-immunoprecipitation assay showed an enhanced association of SOAR to Orai1 in cholesterol depleted cells (Fig. 1e). Average densitometric quantification of SOAR co-immunoprecipitated with Orai1 is shown in Fig. 1f. To corroborate this result, we performed acceptor photobleaching FRET studies in cells overexpressing GFP-SOAR and mCherry-Orai1. Figure 1g shows representative fluorescence measurements before and after triggering a photobleaching pulse for mCherry (acceptor). The FRET signal was observed as an increment in GFP fluorescence (donor) after photobleaching the acceptor. Under normal cholesterol levels the FRET efficiency of SOAR-Orai1 was significantly higher than the negative control SOAR LQ/AA (6.86 ± 0.60 FRET efficiency and 0.39 ± 0.20 $n = 33$ respectively), a SOAR mutant previously reported not to interact with Orai1². However, after removing cholesterol, the FRET efficiency between SOAR-Orai1 was significantly enhanced (13.71 ± 0.97 $n = 90$). Results are summarized as FRET efficiency in Fig. 1h. These data indicate an increased association of the SOAR-Orai1 complex in cholesterol poor conditions, which may explained the resulting increment in calcium influx.

A cholesterol-binding domain in SOAR. The previous section showed that activated SOAR-Orai1 complex is enhanced by cholesterol removal from the PM. In consequence we hypothesized that STIM1 and in particular the SOAR domain may have a cholesterol-binding domain. By analyzing the sequence of STIM1 we identified a putative cholesterol-binding (CB) domain²⁴ (Fig. 2a). CB domain of this type are characterized by the

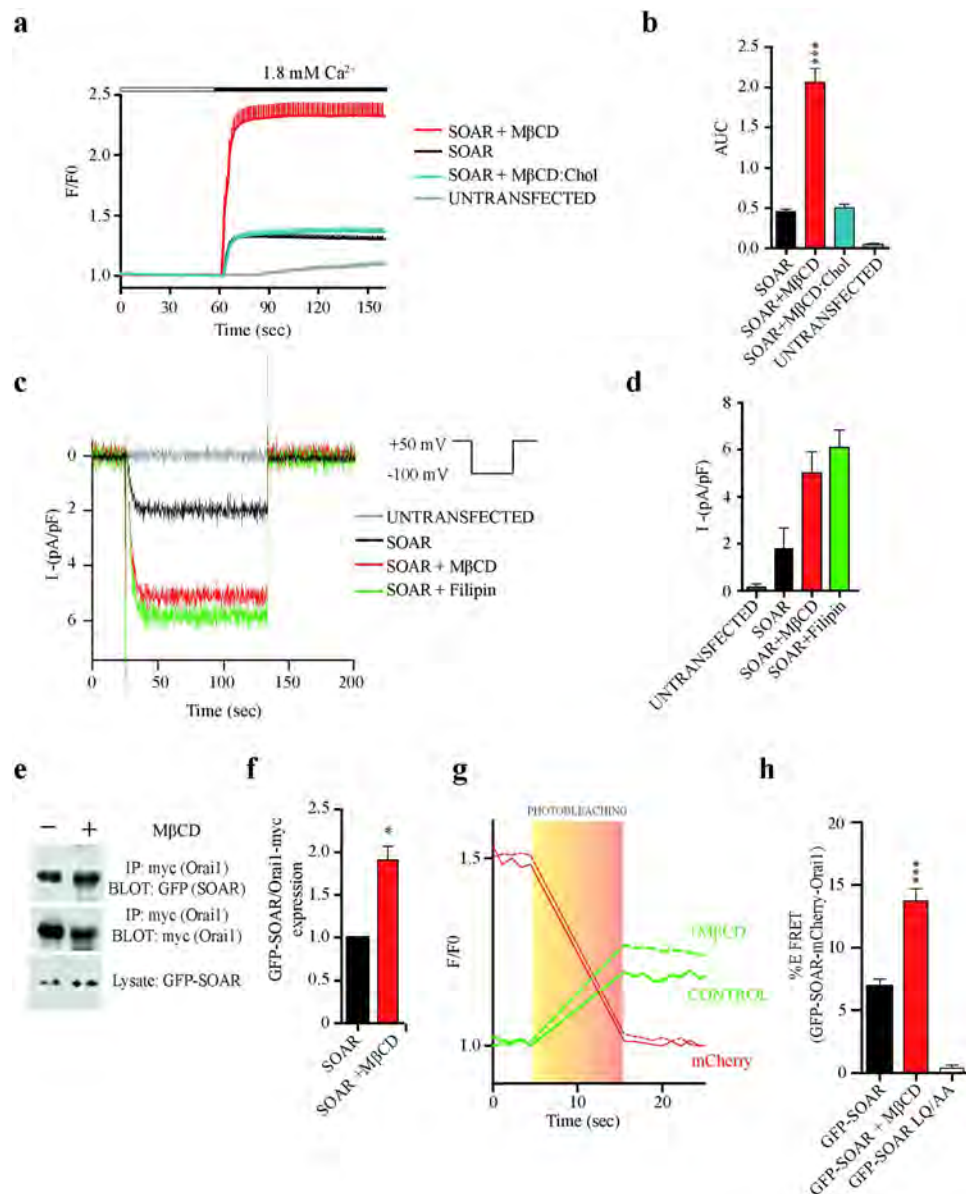


Figure 1. Cholesterol depletion increases functional association of SOAR and Orai1. (a) Average calcium response of cells expressing SOAR and Orai1. Control cells present standard cholesterol conditions (Black line), cells depleted of cholesterol with 7.5 mM of M β CD (Red line), cells treated with M β CD:cholesterol (1:1 mole ratio) (Blue line) and untransfected cells (gray line). For clarity error bars are show only from above of the mean. (b) Summary graph bars of area under de curve (AUC) from the calcium addition of control (n = 49 cells), M β CD treated cells (n = 28), M β CD:cholesterol (n = 25) and untransfected cells (n = 11). (c) Whole-cell patch-clamp recordings of cells transfected with mCherry-Orai1 and GFP-SOAR. Black trace represent cells expressing SOAR and Orai1 with standard cholesterol conditions, red and green line show cells treated with M β CD and filipin respectively. Gray trace represent cells without transfection. The protocol to obtain these traces is shown at top right. (d) Bar graph summarizes current density measured at -100 mV. Data represent mean \pm standard deviation from at least 15 cells from 3 transfections. (e) Representative blots from at least 4 independent experiments. Control and M β CD treated cells were transfected with Orai1-myc and GFP-SOAR and immunoprecipitated with anti-myc antibody and probe for co-immunoprecipitation of SOAR with anti-GFP antibody. (f) Graph bars obtained by densitometry analysis of western blot data. Ratio of co-immunoprecipitated (SOAR) and immunoprecipitated (Orai1) signal of individual experiments were normalized at 1 for control (Black bar) and compared with M β CD treatment (Red Bar). (g) Example of acceptor photobleaching FRET experiment. Continuous and discontinuous red lines (acceptor) represent fluorescence of mCherry-Orai1 in control and M β CD treated cells respectively. Continuous and discontinuous green lines show fluorescence of GFP-SOAR with normal cholesterol and poor cholesterol conditions respectively. Light box indicates the photobleaching time-lapse of mCherry. (h) Bar graphs summarize FRET efficiencies from control (Black bar n = 136), M β CD treated cells (Red bar n = 90) and the mutant SOAR LQ/AA used as negative control (White bar n = 33). Bars represent mean \pm s.e.m. *p < 0.05 and by two-tailed Student's t-test in f. ***p < 0.0001 by one-way ANOVA with Bonferroni post-test analysis for b and h.

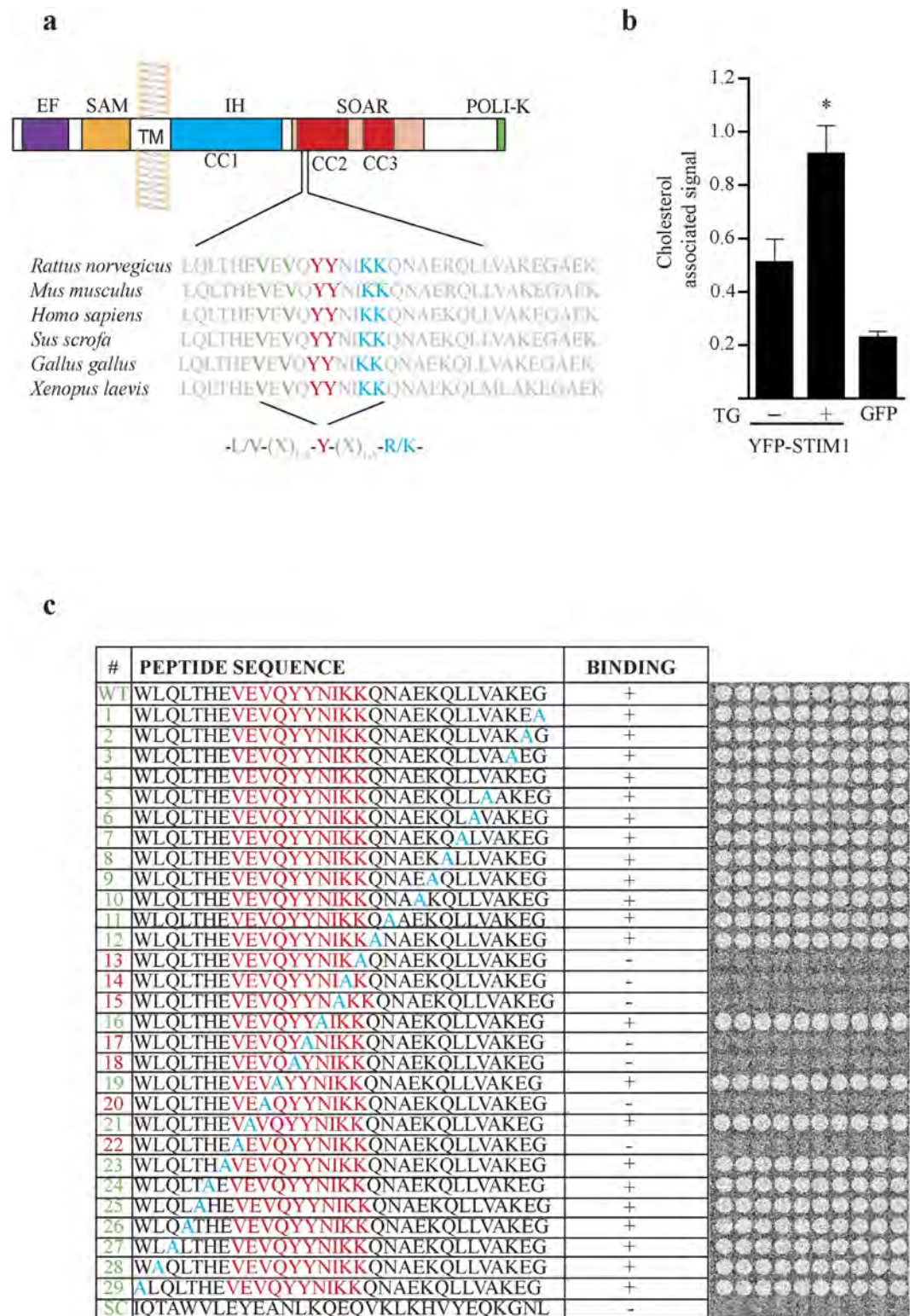


Figure 2. STIM1 interacts with cholesterol in calcium store dependent manner. (a) Putative CB domain within SOAR. Topology and sequence alignment of STIM1 show a conserved putative CB domain, this region falls in the first residues of SOAR in CC2. (b) Endogenous cholesterol associated to immunoprecipitates of STIM1. Bar graph show cholesterol signal normalized with YFP fluorescence in each immunoprecipitate. Data summarize results from at least 5 experiments. As control GFP was expressed alone and probed to measure the amount of associated cholesterol. (c) Peptide array covering from 350 to 380 amino acids of STIM1 and incubated with $10\ \mu\text{M}$ of DHE. Signal was detected by TIRF excitation to eliminate background noise. First line (WT) shows wild type sequence, from line numbered 1 to 29 alanine-scanning mutations were performed, last line (SC) is a scramble sequence as negative control. Red letters depict the putative CB domain. Bars represent mean \pm s.e.m. * $p < 0.05$ by one-way ANOVA with Bonferroni post-test analysis.

consensus sequence L/V-X(1–5)-Y-X(1–5)-R/K, where X represents from 1 to 5 any amino acids before the next conserved residue²⁴. Using a method developed by Zheng²⁵, we measured the amount of endogenous cholesterol associated to STIM1. The assay consisted in detecting cholesterol incorporated to immunoprecipitates of STIM1 fused to YFP. Following this procedure, we found a constitutive amount of cholesterol associated to STIM1 in conditions where the ER is filled (0.51 ± 0.08 cholesterol associated signal). In comparison, cells treated with TG to deplete the ER showed a greater association of STIM1 to cholesterol (0.97 ± 0.02), which indicates that STIM1 is immunoprecipitated with significant larger amounts of endogenous cholesterol after store depletion, compared to basal conditions (Fig. 2b). GFP was expressed alone to evaluate constitutive association of cholesterol to this tag (Fig. 2b).

To confirm the specific STIM1 interaction with cholesterol we developed specifically for this study a peptide (30 amino acids in length) screening method consisting in a library array comprising from amino acids 350 to 380 of STIM1. Peptide arrays contain almost the entire CC2 domain of STIM1 but excludes the basic patch (382–387), which is the region reported to interact with Orai1^{26,27}. In addition, the basic patch was discarded from the array to avoid the possibility that the polar head of cholesterol may interact with the peptides mainly through electrostatic interactions²⁸. The peptide array was incubated with Dehydroergosterol (DHE), a fluorescent analog structurally and functionally similar to cholesterol²⁹. In Fig. 2c the peptide array (WT) show positive binding, meanwhile the last line (SC), show a negative control produced by scrambling the WT sequence, which does not bind DHE. By using alanine substitutions we identified important residues involved in the DHE interaction. Alanine scanning resulted in the abolition of DHE binding when the mutation fell in V357, V359, Y361, Y362, I364, K365 and K366 (Fig. 2c). These data suggest that SOAR presents a CB domain and single mutations on residues constituting the CB domain completely abolished DHE binding *in vitro*.

Identification of the residues implicated in cholesterol interaction. According to the peptide array, residues covering from V357 to K366 form a potential cholesterol interacting site in STIM1. However, mutations of some of these residues might result in a complete disruption of the α -helix or the coiled coil domains leading to the loss of dimer conformation in STIM1 and its subsequent loss of interaction with Orai1, as previously reported^{4,30}. Such is the case of Y362 involved in the α -helix interactions that controls STIM1 homodimers^{4,30}. Thus, we searched for residues implicated in cholesterol interactions that do not disrupt the SOAR structure. First, several SOAR mutations covering the potential site for interaction with cholesterol were evaluated to determine if that mutation disrupted the interaction with Orai1 (Fig. 3a). FRET results show that mutations of tyrosine (361 and 362) produced an impaired SOAR-Orai1 coupling, characterized by the loss of FRET signal. Evaluating Y361 resulted in the same levels of FRET efficiency than the control (Fig. 3b) remarking the role of Y362 in the homodimer conformation of SOAR. Meanwhile, testing SOAR I364A produced high levels of FRET efficiency ($16.18 \pm 1.184\%$ efficiency of FRET) with comparable levels of FRET obtained after M β CD treatment ($13.71 \pm 0.972\%$ Efret). Removing cholesterol with SOAR I364A produced no significant reduction on FRET efficiency (11.72 ± 0.885 Efret) compared with SOAR I364A with normal cholesterol levels. In this way SOAR I364A in both conditions showed comparable levels of FRET to those obtained with cells expressing SOAR WT with M β CD treatment ($13.71 \pm 0.972\%$ Efret) (Fig. 3b). All these results indicated that I364 is involved in cholesterol recognition and the mutation I364A did not alter SOAR-Orai1 interactions.

Measurements of calcium influx were conducted with SOAR I364A co-expressed with Orai1. Figure 3c shows calcium increments of SOAR and Orai1 expressing cells with and without M β CD treatment. Interestingly SOAR I364A with and without M β CD presented elevated calcium responses (Fig. 3c). This result further strengthened the idea that I364 participated in cholesterol recognition by SOAR. The area under the curve from experiments in Fig. 3c shows no significant differences between SOAR with M β CD and SOAR I364A with and without M β CD (Fig. 3d). SOAR I364A treated with filipin showed same responses to calcium entry that SOAR I364A untreated (see Supplementary Fig. S4). Electrophysiological recordings confirmed increased Orai1 currents when SOAR I364A was coexpressed (Fig. 3e). Producing same levels of current density than SOAR WT with M β CD (Fig. 3f).

Our results suggest that SOAR must be positioned in closed proximity to the PM in order to interact with plasmalemmal cholesterol. To evaluate if SOAR is located at a suitable distance from the PM, we used FRET between GFP and dipicrylamine (DPA)³¹, a lipophilic nonfluorescent anion that inserts into the hydrophobic core of the lipid bilayer and absorbs emission of green and blue fluorescent proteins³¹. Cells overexpressing both GFP-SOAR and mCherry-Orai1 showed quenching of GFP fluorescence upon DPA addition (Fig. 3g,h). DPA is also used as a voltage sensor that responds to changes in membrane potential³¹. Here, maximum FRET was reached when a high potassium solution was added to the extracellular media, producing the movement of DPA molecules to the inner leaf of the PM, which results in increased FRET with GFP-SOAR (0.74 ± 0.01 FRET efficiency, Efret) (Fig. 3i). In addition, removal of cholesterol resulted in a reduction of FRET efficiency (0.54 ± 0.03 Efret), which indicates a greater distance between SOAR and the PM interface (Fig. 3i). Remarkably, SOAR I364A showed similar FRET efficiency to SOAR WT with M β CD (0.50 ± 0.02 Efret) and cholesterol depletion in this mutant produced only a slightly increase in FRET efficiency (0.62 ± 0.01 Efret) (Fig. 3j).

From the FRET efficiencies we calculated distances between SOAR and the PM, resulting in 3.12 ± 0.075 nm ($n = 20$) for GFP-SOAR and 3.61 ± 0.097 nm ($n = 24$) for GFP-SOAR without cholesterol. These results indicate that SOAR distance itself from the PM about 0.5 nm when cholesterol is removed (even though SOAR remains associated to Orai1). Furthermore, the interaction of SOAR with Orai1 improved when cholesterol is reduced (Fig. 3a,b) indicating that the SOAR distance to the PM is controlled by cholesterol and that it is inversely proportional to its interaction with Orai1. A stronger interaction between SOAR and Orai1 results in enhanced calcium influx. In addition, these results show that the I364 mutation recapitulates the effect of cholesterol removal in the SOAR-Orai1 complex.

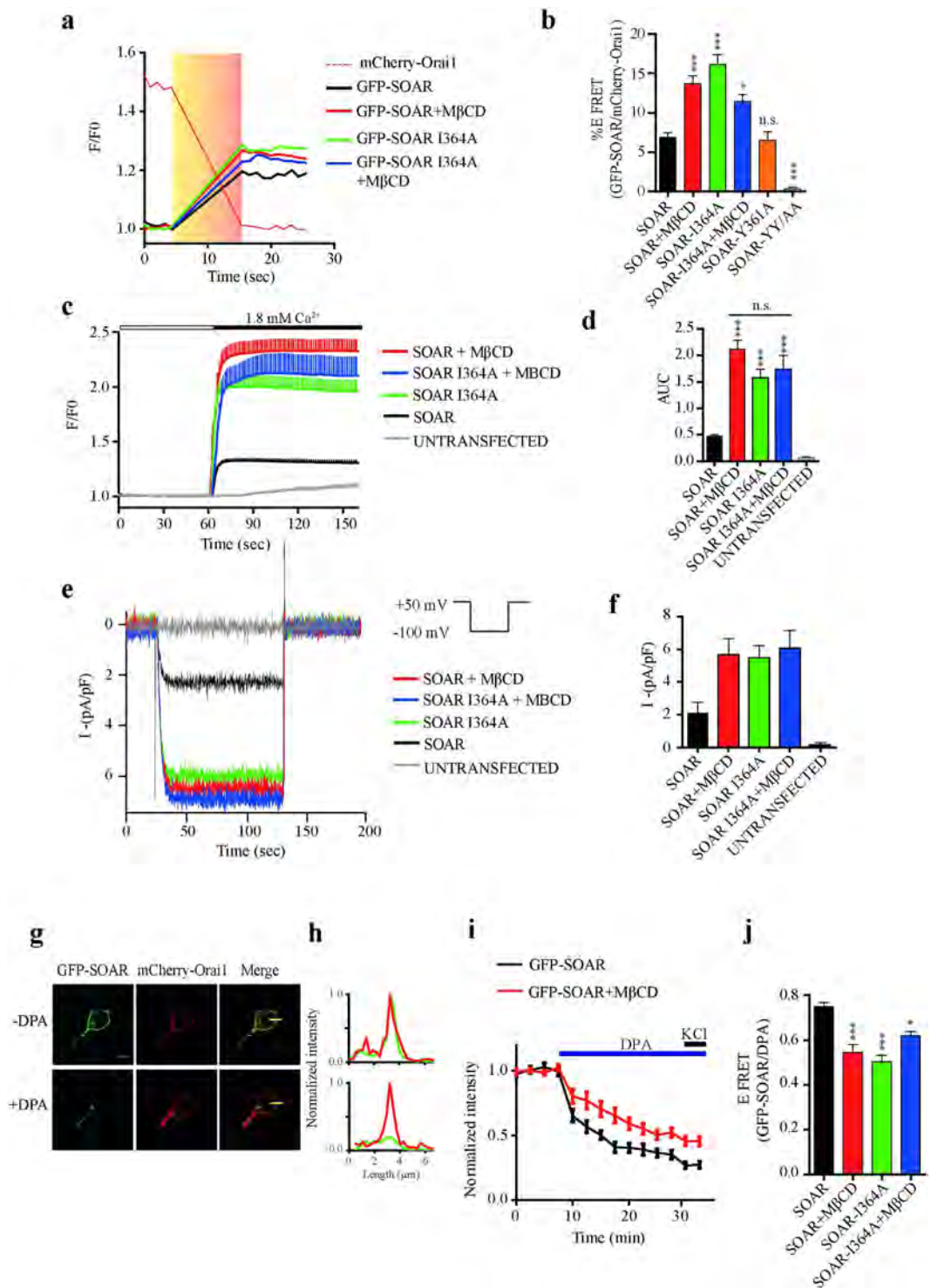


Figure 3. Cholesterol depletion enhances interaction with Orai1 but increases distance with the PM.

(a) Representative FRET experiments. Continuous black and red lines show fluorescence of GFP-SOAR without and with M β CD respectively. Green and blue lines show fluorescence of GFP-SOAR I364A without and with M β CD respectively. (b) Bar graphs summarize FRET efficiencies from SOAR (Black bar $n = 136$), SOAR plus M β CD (Red bar $n = 90$), SOAR I364A (Green bar $n = 34$), SOAR I364A plus M β CD (Blue bar $n = 27$), SOAR Y361A (Orange bar $n = 42$) and SOAR YY361/362AA (Gray bar $n = 35$). (c) Average cytosolic calcium measurements of cells expressing SOAR and Orai1 in the absence ($n = 49$) and presence of M β CD ($n = 28$) (Black and red trace respectively) and SOAR I364A without ($n = 40$) and with M β CD ($n = 11$) (Green and blue trace respectively). For clarity, error bars are shown only from above of the mean. (d) Quantification of the area under the curve of experiments in panel c. (e) Whole-cell patch-clamp recordings of cells transfected with mCherry-Orai1 and GFP-SOAR I364A and wild type. Black and red traces represent cells expressing SOAR and Orai1 with standard and poor cholesterol conditions respectively. Cells expressing Orai1 and SOAR I364A were untreated and treated with M β CD, green and blue line respectively. (f) Bar graph summarizes

current density from at least 15 cells from 3 independent transfections. (g) Example of GFP fluorescence before and after 20 μ M of DPA. (h) Fluorescence distribution of mCherry-Orai1 and GFP-SOAR obtained by images in g. Upper and lower graph shows before and after DPA addition respectively. (i) Time course of GFP quenching after DPA addition. Last two points show the stimulation with high potassium solution. Black line shows GFP-SOAR and red line GFP-SOAR with M β CD. Both were cotransfected with mCherry-Orai1. (j) Bar graphs show FRET efficiencies measured after addition of high potassium solution in experiments like shown in panel i. SOAR (Black bar n = 16), SOAR plus M β CD (Red bar n = 24), SOAR I364A (Green bar n = 24) and SOAR I364A plus M β CD (Blue bar n = 22). Bars represent mean \pm s.e.m. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ by one-way ANOVA with Bonferroni post-test analysis comparing with SOAR as control. n.s. not significant.

SOAR associates to the plasma membrane via cholesterol interactions. To explore in greater detail the molecular mechanisms responsible for protein-membrane interactions with SOAR, we carried out 400 ns molecular dynamics (MD) simulations of the SOAR fragment embedded in a single component POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) lipid bilayer and in a POPC:cholesterol (6:4 mol) lipid bilayer. The all atom simulations of the protein, solvent and phospholipid bilayer provide a very detailed atomistic picture of the specific protein-cholesterol interactions that determine the experimentally observed over-stabilization of the protein-membrane interaction in presence of cholesterol.

In the MD simulations without cholesterol, the SOAR fragment quickly drifts away from the hydrophobic POPC bilayer and none of the residues get deep inserted into the hydrophobic section of the bilayer (Fig. 4a). When the lipid bilayer contains cholesterol (6:4 mole), the SOAR fragment stabilizes paralleled to the bilayer and protrude into the phosphate group and interact tightly with the hydrophobic region of the lipid bilayer (Fig. 4a,d). The root mean square fluctuations (RMSF) reflect that mobility of the SOAR fragment is greatly reduced when the membrane contains cholesterol, compared to the mobility of each residue when the lipid bilayer does not contain cholesterol molecules (Fig. 4b).

The MD simulation results confirm that cholesterol in the lipid bilayer strongly influence the SOAR binding to the hydrophobic membrane. The residence time for cholesterol at each protein amino acid obtained by the MD simulations define two specific interactions between cholesterol molecules and the SOAR fragment: the hydrophobic region of I364 and Y361 forms the first strongest cholesterol-protein interaction and the second cholesterol-protein interaction was found among the cholesterol rings and a hydrophobic plane formed between L411 and A415 plus a polar interaction of the cholesterol hydroxyl and Y361 (Fig. 4c).

All the simulations recapitulate the experimental observations, indicating that cholesterol associates to STIM1 via I364 within the SOAR region. This interaction reduces the mobility of SOAR stabilizing this region paralleled to the plasma membrane, while enhancing the binding of STIM1 to Orai1 channel.

STIM1 I364A role in Orai1 activation. To determine if effects of I364 mutation could be observed using the full length STIM1, we proceeded to evaluate the role of this single point mutation in our experiments using the full length STIM1 molecule. First, endogenous cholesterol associated to immunoprecipitate assays showed that STIM1 I364A mutation produced a non-significant increase of cholesterol associated when cells were treated with TG (Fig. 5a). Then, we used the classical protocol to study calcium entry mediated by SOCE. In agreement to the effect observed with SOAR I364A (Fig. 3c), STIM1 I364A showed a large increment in cytoplasmic calcium compared to cells transfected with STIM1 WT (Fig. 5b). The area under the curve shows significant differences between STIM1 WT and the mutant STIM1 I364A (Fig. 5c).

These results were corroborated by whole-cell current in cells expressing STIM1 WT or STIM1 I364A. Expression of STIM1 I364A mutant resulted in increased currents in comparison to cells expressing STIM1 WT (Fig. 5d,e).

To evaluate the effect of cholesterol depletion with STIM1 I364A, we conducted calcium measurements in cells already stimulated with TG (once the STIM1-Orai1 complex has been assembled). Using this protocol, calcium influx through STIM1-Orai1 complex can be evaluated in cholesterol poor conditions without affecting STIM1 puncta formation. The results obtained with full length STIM1 I364A recapitulated the observations with SOAR I364A (Fig. 3). Calcium influx was similar in cells expressing STIM1 wild type after M β CD treatment compared to cells expressing STIM1 I364A without M β CD (Fig. 5f,g). Thus, these results indicate that I364 is an important amino acid implicated in cholesterol regulation over SOAR and in the full length STIM1.

Cholesterol regulation is coordinated by Orai1 and STIM1. It has been published recently that cholesterol depletion upregulates SOCE by a CB domain present on the N-terminal region of Orai1³². Giving such result, we explored the effect of the Orai1 Y80S (a mutant of Orai1 with the CB domain abrogated) in combination with the SOAR and STIM1 I364A mutants. First, cells expressing Orai1 Y80S and SOAR wild type in standard cholesterol levels showed a significantly increased calcium influx compared to cells expressing Orai1 and SOAR wild types. Interestingly, SOAR I364A co-expressed with Orai1 Y80S presented almost the same increment than SOAR wild type with Orai1 Y80S (Fig. 6a). In addition, cholesterol depletion does not increased the calcium response of both, SOAR and SOAR I364A in combination with Orai1 Y80S (Fig. 6b). Results are summarized in Fig. 6c as area under de curve, showing no significant differences between SOAR and SOAR I364A with Orai1 Y80S, with or without M β CD. These results were corroborated by whole-cell current measurements in which cells expressing Orai1 Y80S also showed an increased current density when was co-expressed with SOAR wild type or SOAR I364A (Fig. 6d). Cholesterol reduction does not modify the amount of current density when Orai Y80S was co-expressed with SOAR wild type or SOAR I364A (Fig. 6e). These results indicate that abrogating the cholesterol-binding domain (CB) from either Orai or STIM1 is sufficient to enhance calcium influx and Orai currents.

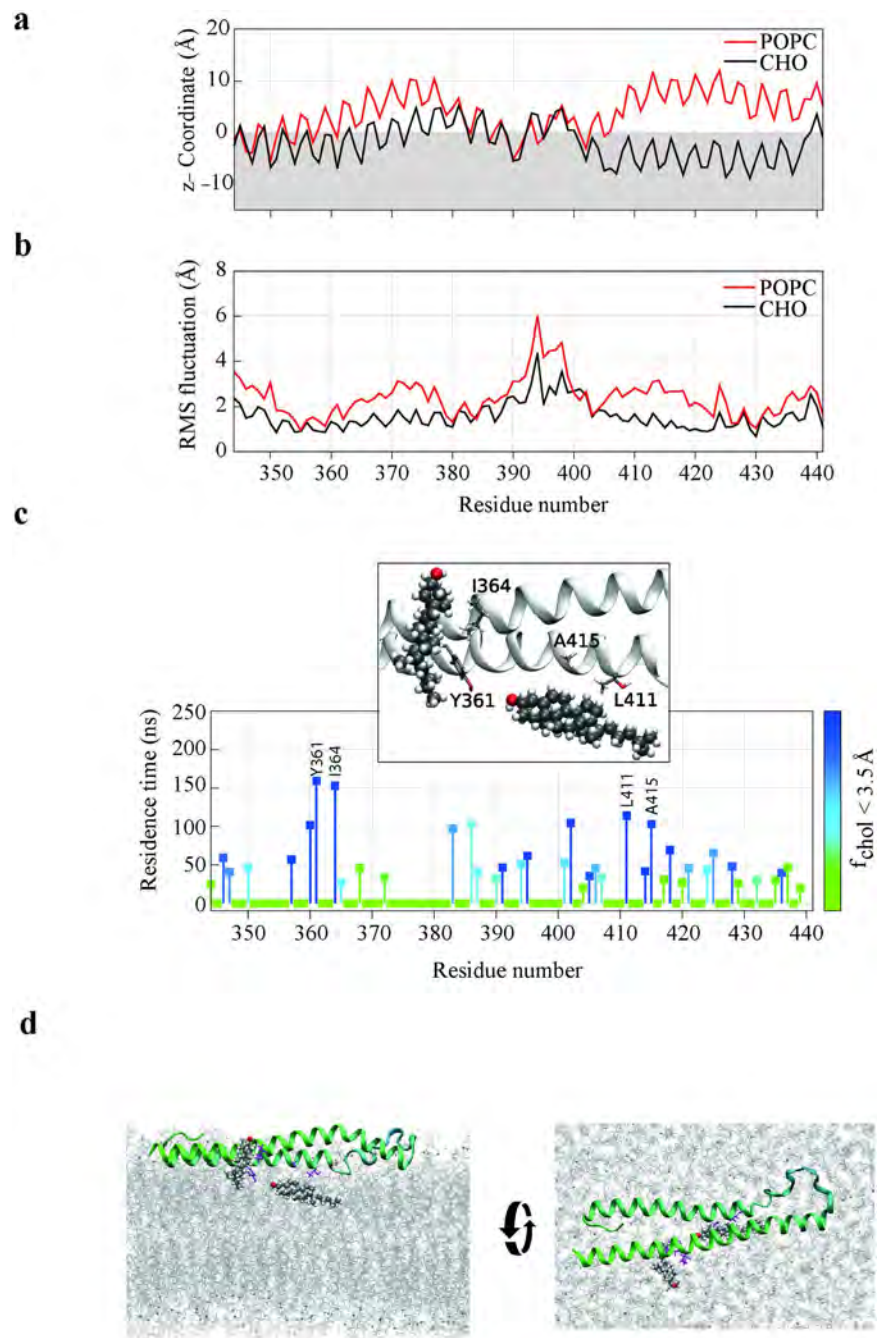


Figure 4. SOAR is positioned in a juxtamembranal plane to interact with cholesterol. (a) Lipid accessibility of each residue of the SOAR fragment derived from the MD simulation results. The lines depict the z-Coordinate insertion of each residue relative to the POPC head group region in a single component POPC lipid bilayer (Red line) and in a POPC:cholesterol (6:4 mole) lipid bilayer (Black line). (b) The Average root mean square fluctuations (RMSF) of each amino acid atoms as a function of residue number calculated from the SOAR fragment MD simulations in a single component POPC bilayer (Red line) and in a POPC:cholesterol (6:4 mol) bilayer (Black lines). (c) The residence time (ns) for cholesterol molecules at 3.5 Å of each amino acid obtained by the MD simulations of the SOAR fragment in presence of cholesterol. The color scale represents the fraction of time that any cholesterol molecule was found within 3.5 Å of each residue. The longer residence time is presented as dark blue, mine while light green represent shorter residence time. Inset, is presented the avidity of SOAR residues to interact with cholesterol. (d) MD snapshots of the SOAR fragment (green) structures interacting with the POPC bilayer (gray lines), and cholesterol molecules from the MD simulation of the SOAR fragment in presence of cholesterol.

Next we tested Orai1 Y80S in combination with the full-length STIM1 wild type or I364A mutant. The TG-evoked calcium entry of cells co-expressing Orai1 Y80S and STIM1 or STIM1 I364A was enhanced in

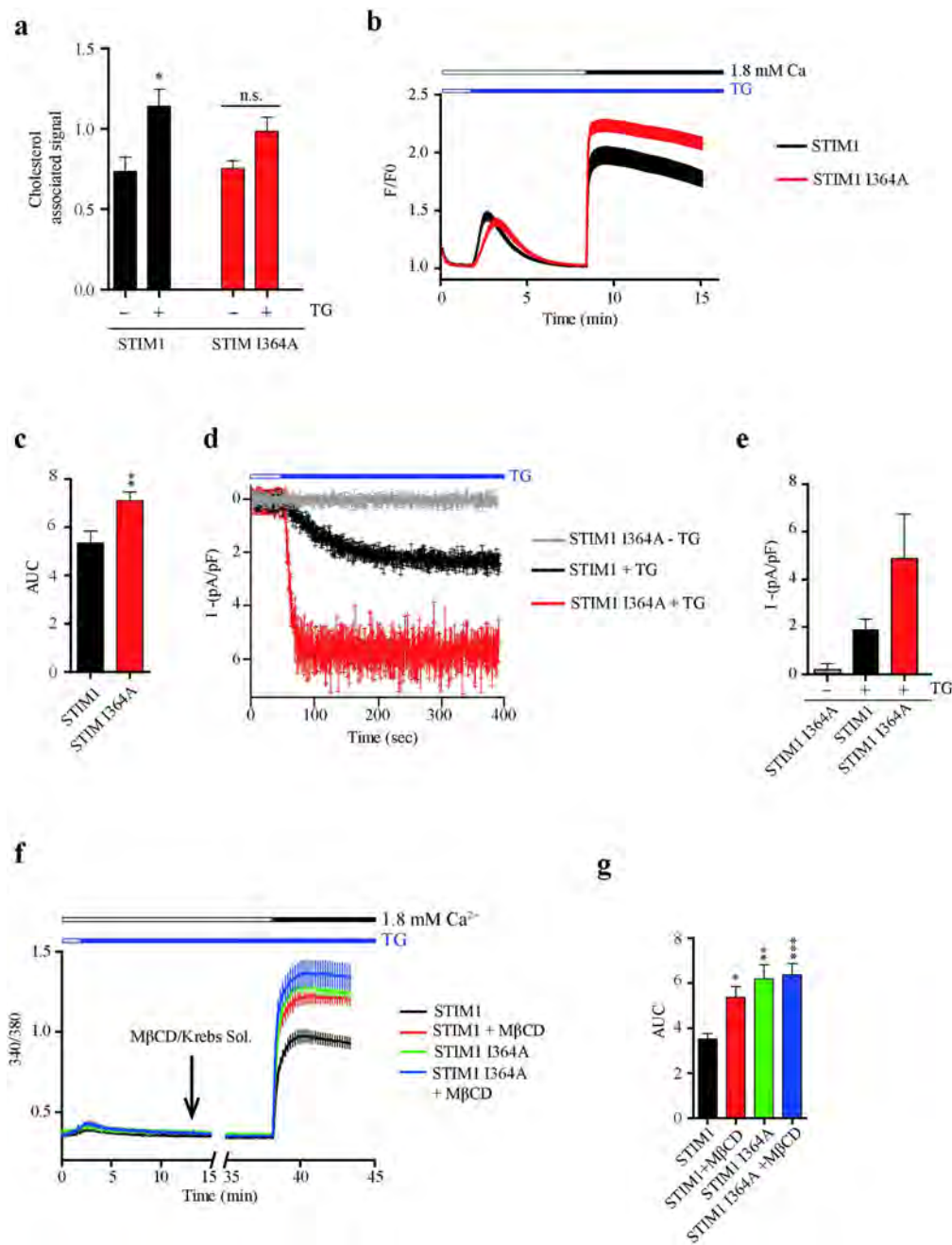


Figure 5. Isoleucine 364 mutant recapitulates cholesterol poor phenotype in STIM1. (a) Endogenous cholesterol associated to immunoprecipitates of STIM1 and STIM1 I364A. Bar graph show cholesterol signal normalized with CFP fluorescence in each immunoprecipitate. Data summarize results from at least 6 independent experiments. (b) Average calcium measurements of cells expressing Orai1 and STIM1 WT ($n = 38$ cells) or mutant I364A ($n = 49$ cells). Black and Red line respectively. TG ($1 \mu\text{M}$) was used to deplete the stores before add back calcium. (c) Summary graph bars of area under the curve (AUC) from calcium influx obtained from b. (d) Time courses for whole-cell inward current activation in cells overexpressing STIM1 and Orai1 (black trace) and cells overexpressing STIM1 I364A and Orai1 (Red trace). Upper blue rectangle shows the application of TG. Gray line depicts cells expressing STIM1 I364A and Orai1 without TG stimulus. (e) Bar graph summarizes current density of traces like in panel d. Data represent mean \pm standard deviation from at least 15 cells from 3 independent transfections. (f) Average population calcium measurements from at least 4 independent experiments with a long protocol. STIM1/Orai1 complex formation was triggered by store depletion with TG. STIM1/Orai1 complex was allowed to form for 11 min before the addition of M β CD or calcium-free Krebs solution as control. Extracellular calcium was added after 25 min of incubation with M β CD. (g) Bar graph summarizes calcium influx from experiments in f. All experiments were performed co-transfected with Orai1. Bars represent mean \pm s.e.m. ** $p < 0.01$ by two-tailed Student's t-test in panel c. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ by one-way ANOVA with Bonferroni post-test analysis in g comparing with STIM1 as control.

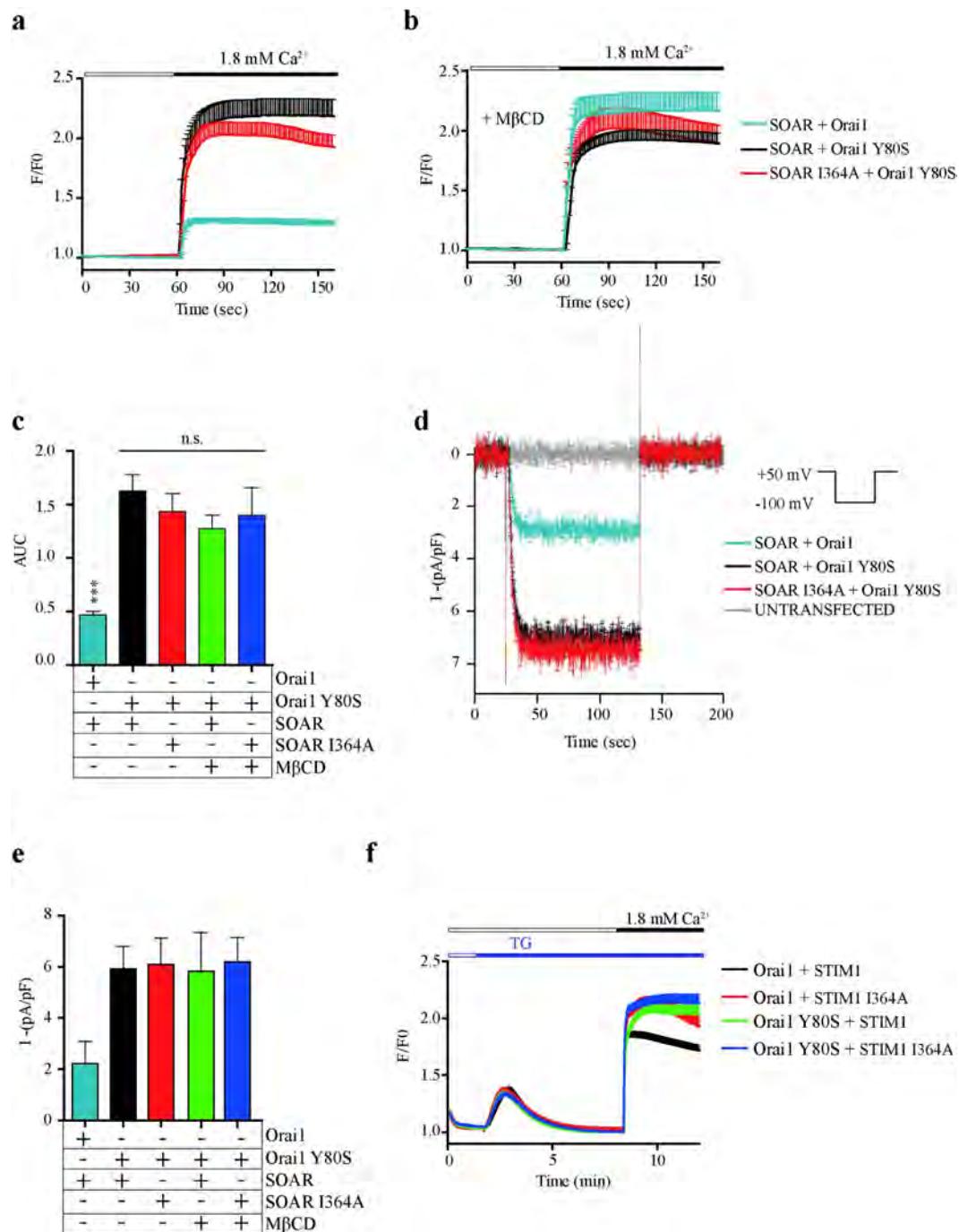


Figure 6. Cholesterol regulation of Orai1 is the same mechanism involved SOAR. (a) Average cytosolic calcium measurements of cells stimulated with 1.8 mM of extracellular calcium. Light blue line shows cells transfected with SOAR and Orai1 as control (n = 35). Black and red traces show cells transfected with SOAR and Orai1 Y80S (n = 27) and SOAR I364A with Orai1 Y80S (n = 24) respectively. For clarity, error bars are shown only from above of the mean. (b) Same conditions as in panel a plus M β CD treatment. Black and red traces show cells transfected with SOAR and Orai1 Y80S (n = 17) and SOAR I364A with Orai1 Y80S (n = 12) respectively. (c) Quantification of area under the curve (AUC) from panel a,b. (d) Whole-cell patch-clamp recordings of cells transfected with Orai1 and Orai1 Y80S in combination with SOAR I364A and wild type. Black and red traces represent cells expressing SOAR and SOAR I364A with Orai1 Y80S respectively. Gray trace shows untransfected cells. Light blue line shows cells transfected with SOAR and Orai1 as control. The protocol to obtain these traces is shown at top right. Data represent mean \pm standard deviation from at least 15 cells from 3 independent transfections. (e) Bar graph summarizes current density of traces like in panel d. (f) Average calcium measurements of cells expressing STIM1 WT and mutant I364A in combination with Orai1 WT or Y80S. Black and Red line show cells expressing Orai1 WT with STIM1 (n = 24) and STIM1 I364A (n = 17) respectively. Green and Blue line show cells expressing Orai1 Y80S with STIM1 (n = 16) or STIM1 I364A (n = 22) respectively. TG (1 μ M) was used to deplete the stores before add back calcium.

comparison with cells expressing STIM1 and Orai1 wild types. Calcium influx was increased at comparative levels to cells expressing Orai1 and STIM1 I364A (Fig. 6d).

All together, these results strongly suggest that the CB domain of both, Orai1 and STIM1 coordinate the same mechanism mediated by cholesterol. And abrogation of either CB domain alone is sufficient to mimic the effect of cholesterol removal from the PM.

Discussion

Several studies have shown that cholesterol modulates SOCE and influence STIM1 functionality^{18,19,33}. However, the present study provides the first evidence of the presence of a CB domain in STIM1, positioned within SOAR. Previous studies about functional regulation of SOCE by cholesterol remarked the strong effect of inhibition of thapsigargin-evoked calcium entry after removing cholesterol, all mediated by abolition of STIM1 puncta formation that prevented Orai1 activation^{18,20,22}. Notwithstanding, during the submission of this work, Romanin's group published the opposite effect on SOCE when cholesterol is removed. This effect is mediated by cholesterol interacting with the extended transmembrane Orai1 N-terminal domain (ETON)³². The present study and that published by Romanin's group indicate that cholesterol regulates both, STIM1 and Orai1 by interaction with two CB domains that act in a coordinated fashion, giving the same result: enhanced SOCE. Here we evaluated the role of cholesterol once the STIM1/Orai1 complex has been formed. Removing cholesterol under these conditions causes a massive increase in calcium entry. This increase is in agreement to the observations made by Galan *et al.*, who showed that depletion of cholesterol before TG addition inhibits calcium entry, but on the other hand, TG administration before removal of cholesterol enhances calcium influx²².

Exploring the molecular mechanism that promotes an increased calcium entry when removing cholesterol after the STIM1/Orai1 complex has been assembled, we found a single amino acid responsible for interacting with cholesterol within SOAR. SOAR association to cholesterol reduces the interaction between STIM1 and Orai1, functioning as a negative regulator of SOCE. This region interacts with cholesterol only after depletion of the ER when STIM1 unfolds to expose the SOAR domain. This region is not involved in the inhibition of STIM1 puncta observed when removing cholesterol prior to STIM1-Orai1 complex formation. Furthermore, STIM1 I364A mutant behaved similarly to wild type STIM1 when cholesterol was removed prior to SOCE activation with TG.

Our results suggest that STIM1 is actively interacting with cholesterol after calcium stores depletion via its CB domain. Immunoprecipitated STIM1 contains more endogenous cholesterol associated after calcium store depletion.

Peptide arrays pinpoint the sequence interacting with cholesterol, which maps inside SOAR. Although the CB consensus sequence L/V-X₍₁₋₅₎-Y-X₍₁₋₅₎-R/K results in a large number of potential cholesterol-binding regions, other criteria that increases the probability to identify a functional CB domain include the need for the region to be immersed in transmembrane or juxtamembranal regions. Also important to consider is the possibility that the protein containing a CB domain may have been identified as a constituent of cholesterol enriched domains. Finally, CB motifs fall in secondary structure of α -helices^{34,35}. STIM1 fulfills all these criteria. In spite of the fact that isoleucine is not part of traditional CB domains, our peptide array, molecular dynamics and functional studies indicate that this amino acid is essential for STIM1 cholesterol interaction. On the other hand tyrosine Y361, which is part of consensus CB domains, did not show any phenotype in cholesterol-depleted cells. Nevertheless, we do not discard that other residues within STIM1 may be involved in cholesterol interactions.

SOAR (or CAD) fragment has shown to be sufficient to promote clustering of Orai1 channels and activation of calcium influx³. Our studies indicate that the positioning of SOAR in closed proximity to the PM occurs via the interaction of I364 with cholesterol (Figs 3 and 4). Such positioning may be relevant for the concomitant interaction between SOAR and Orai1. Our measurements indicate that SOAR is located within 3.2 ± 0.17 nm from the PM, in agreement with a previous study reporting a distance of 4–6 nm to accommodate full-length STIM1 molecules in ER-PM junctions³⁶.

Our molecular dynamic simulations show that the whole cholesterol molecule interacts with SOAR, stabilizing the protein when cholesterol is present in the plasma membrane. Experimental results match the molecular dynamic simulations, indicating that the distance between SOAR and the PM increase in cholesterol-depleted conditions, which may facilitate the subsequent association to Orai1.

A perturbation on Orai1 structure induced by the lack of cholesterol (as concluded in the study by Romanin's group) may facilitate the association of SOAR to the channel³². In addition, the instability of SOAR in cholesterol depleted membranes could produce a better anchoring to the N-terminal of Orai1. On the light of these results it is necessarily to conduct further studies to solve the molecular role of cholesterol in STIM1 and Orai1 as well as the association order of STIM1-Orai1-cholesterol on first steps of activation of SOCE.

Heterogeneous lipid distribution in the PM and its implications on STIM1-Orai1 complex are recently emerging. PIP2-rich domains are recognized to facilitate slow Ca²⁺-dependent inactivation (SCDI) of Orai1 in a mechanism dependent of STIM1-SARAF interaction¹¹. In addition, there is strong evidence showing poor and enriched cholesterol microdomains on the PM^{37–40}.

SOCE complex established in microdomains enriched in cholesterol are especially important for functionality in immune cells⁴¹, where polarized distribution of STIM1 at the immunological synapse has been shown to be a primary event during NFAT activation^{42,43}. Cholesterol is very abundant at the immunological synapse^{44,45}. There are also reports showing a critical specific Ca²⁺ pattern to trigger NFAT nuclear translocation^{46,47}. We suggest that distinct cholesterol microdomains could be regulating Orai1 once activated by STIM1.

Methods

Cell culture and transfection. HEK293 cells were grown in DMEM supplemented with 10% (V/V) fetal bovine serum, 50 μ g/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. For imaging experiments, one day prior to transfection with the plasmid of choice, the

cells were plated onto 25 mm circular coverslips. Plasmids of EGFP-SOAR, EGFP-SOAR L/Q, YFP-STIM1 and mCherry-Orai1 were a generous gift from S. Muallem. STIM1-CFP and STIM1-YFP were a generous gift of M. Prakriya. Myc-Orai1 Y80S was a generous gift of Richard Lewis and YFP-Orai1 and Orai1-myc were purchased from Addgene. All mutations in STIM1 and SOAR were generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Cells were transiently transfected with lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 1 μ g of total cDNA for a 25 mm coverslip. Cells were analyzed 1 day after transfection.

Cholesterol treatments. For all experiments, except those from Fig. 5f cholesterol extraction was performed by using 7.5 mM of M β CD dissolved in Krebs solution (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucose and adjusted to 7.4 pH) for 1.5 hours. Prior to M β CD cell culture was rinsed twice with krebs to remove residues of serum. In Fig. 5f 10 mM of M β CD was used. For filipin treatments we incubated cells with Filipin III at 1 μ g/ml dissolved in calcium-free Krebs solution for 1 hour at 37 °C. Filipin III was used from a stock of 1 mg/ml dissolved in DMSO. To determine the cholesterol amounts of cells treated with 7.5 mM of M β CD and untreated cells. Cells were grown in 96 wells plates and analyzed in a Synergy Mx microplate reader. We used a standard Amplex[®] Red cholesterol assay kit (Molecular Probes) according to manufacturer's instructions. Amplex[®] Red was excited at 540 nm and emission was collected at 590 nm with a 30 nm bandpass. In the same way, cell viability was measured using Live/Dead[®] viability/cytotoxicity kit (Molecular Probes). Calcein (live cells) was excited at 494 nm and emission was collected at 517 nm using a 9 nm bandpass. Ethidium homodimer-1 (dead cells) was measured using 528 and 617 nm for excitation and emission, respectively with a 30 nm bandpass.

For experiments to evaluate the specificity of M β CD, cells were incubated for 1.5 hours with Krebs solution saturated with cholesterol. Krebs solution was prepared by using equimolar ratios of M β CD:Cholesterol at 7.5 mM. M β CD:Cholesterol complex was dissolved by vortexing and sonication for 5 min and filtered through a 0.2 μ m syringe filter to remove undissolved cholesterol crystals.

Co-immunoprecipitation. Cells grown in 60 mm dishes and transfected with SOAR and Orai1-myc were lysed using 300 μ l of PBS buffer containing 5% Triton X-100 and proteases inhibitor cocktail (Roche). The cells extracts were incubated for 2 hours at 4 °C and centrifuged at 13600 rpm for 20 minutes, then the supernatant was recovered. Immunoprecipitation was conducted incubating cell extracts with myc antibody (2.5 μ g) for 2 hours and then with 30% of volume with protein A/G Sepharose beads for 3 hours at 4 °C. Beads were washed four times with PBS buffer without Triton X-100. Proteins were eluted from the beads with Laemmli buffer at 90 °C for 5 min. For Western Blot analysis, proteins were resolved using 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane. The blot was stripped and re-tested when needed. The stripping solution containing glycine 0.2 M, SDS 0.1%, Tween 20 at 1% and pH adjusted to 2.2. The blot was incubated with stripping solution for 20 min at 80 °C and 5 min with fresh stripping solution before to testing again.

Peptide arrays. To screen important residues in cholesterol interact within SOAR we used a modified version of Ig-TIRFM (TIRF Labs, Inc., Cary, NC.) as previously described^{48,49}. Briefly, 30 length aminoacids covering from 350 to 380 of STIM1 were synthesized. All peptides were purchased from JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany). Peptide spots were printed manually by means of a TIRF MicroArrayer (TIRF Labs, Cary, NC.) on conventional microarray slides coated with poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MO.). Ig-TIRFM-1000 system in combination with an iXon electron-multiplying charge-coupled device (EMCCD) camera (Andor Technology, South Windsor, CT.) were used to monitor fluorescence of peptide arrays incubated with 10 μ M of Dehydroergosterol (DHE). Image analysis was conducted with Igor pro software (wavemetrics, Portland, OR.).

Calcium measurements. Calcium imaging was performed in 25 mm coverslip with cells transfected with the plasmid of choice indicated in the figure legends. Cells were loaded with Fluo4-AM (Molecular Probes) at 2 μ M final concentration in Krebs solution and incubated by 30 min at 25 °C. Calcium-free Krebs solution containing: 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucose, 500 μ M EGTA and adjusted to 7.4 pH. To deplete calcium stores 1 μ M of thapsigargin (TG) was used followed by addition of 1.8 mM of calcium. Fluorescent registration was conducted in a wide-field inverted IX81 Olympus[®] microscope equipped with 40 \times 1.30 NA objective, MT-20 illumination system, 484/25 excitation filter, 520 nm/40 bandpass emission filter with an EMCCD camera iXon-897 (Andor Technology South Windsor, CT, USA). Images were analyzed with Olympus Cell[^]R software.

Long protocol to estimate calcium entry after M β CD treatment was performed in 35 mm dishes with cells transfected with the plasmid of choice. Each dish containing cells was loaded with FURA-2 AM (Molecular Probes) at 2 μ M final concentration in Krebs solution and incubated by 30 min at 25 °C. Calcium-free Krebs solution (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucose, 1 mM EGTA and adjusted to 7.4 pH). 1 μ M of TG was used to empty the stores for 11 min, followed by addition of 10 mM of M β CD or calcium-free Krebs solution as control. M β CD was incubated for 25 min, followed by the addition of 1.8 mM of calcium. Fluorescence records were performed through an Aminco-Bowman luminescence spectrometer (Thermo Electron, Madison, WI). Dual excitation wavelength was selected at 340 nm and 380 nm and emission was collected at 510 nm. Fluorescence sampling was acquired each 10 seconds.

Cholesterol co-immunoprecipitation assay. To determine the presence of endogenous cholesterol in the protein of interest, we performed a cholesterol associated assay as previously described²⁵. The following modifications were conducted: transfected cells were lysed with a buffer containing: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,

50 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSF, 50 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium vanadate, 0.25% of sodium deoxycholate, 0.1% of Nonidet P40, 0.5% of Triton X-100, 0.1% of Digitonin, proteases inhibitor cocktail (Roche) and adjusted to 7.4 pH. Cell extracts were incubated with protein A/G Sepharose beads and GFP polyclonal antibody (Clontech) overnight at 4 °C. Beads were washed four times with the same lysis buffer. Protein was eluted from the beads with glycine 0.2 M at 2.5 pH. Then, elution was neutralized with a buffer containing Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM and EDTA 2 mM at 8.0 pH. Finally, we measured cholesterol concentration in the solution with immunoprecipitated protein using Amplex[®] Red cholesterol assay kit (Molecular Probes). Reactions were measured in a Synergy Mx microplate reader. Cholesterol concentration was normalized to YFP or CFP fluorescence intensity in the same reaction. YFP was measured at 510/9 nm and 535/9 nm bandpass for excitation and emission respectively. CFP was measured at 405/9 and 485/9 bandpass for excitation and emission respectively. Data analysis was conducted through the ratio of Amplex red cholesterol signal divided by YFP or CFP fluorescence in each sample.

Electrophysiology studies. HEK293 cells expressing the different constructs described in the figure legends were placed on coverslips coated with poly-lysine (Sigma). Cells were studied between 48–52 hours post-transfection. Coverslips were mounted on an open perfusion chamber (TIRF Labs).

The patch clamp amplifier used for whole-cell recordings was the EPC-9 (Heka Elektronik, Germany). The patch clamp pipettes were prepared from Corning 7052 glass and had a resistance of 1–5 M Ω when filled with the pipette solution (see below). An Ag/AgCl electrode was utilized to attain electric continuity and was connected to the bath solution (see below) via a KCl agar bridge. TG was applied using a multibarrel perfusion system driven by gravity.

The pipette solution contained: Cesium aspartate 120 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 2 mM and NaCl 8 mM. pH to 7.2 adjusted with CsOH. The bath solution contained: NaCl 120 mM, Tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) 10 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 2 mM, Glucose 30 mM and HEPES 10 mM. pH to 7.2 adjusted with NaOH. Osmolarity of both solutions was adjusted to 320 mosM with mannitol (Sigma).

For experiments using SOAR WT and mutant, cell membrane potential was maintained at +50 mV and a 100 second pulse to –100 mV was conducted to evaluate inward currents through Orai1 channels. For experiments using full length STIM1 and mutant, membrane potential was maintained at –100 mV throughout the experiment and whole-cell currents were invoked by 1 μ M TG application to the bath solution.

Confocal imaging. All FRET experiments were performed in an Olympus[®] FV1000 spectral confocal microscope. The FRET efficiency between mCherry-Orai1 (acceptor) and GFP-SOAR (donor) was monitored by collecting fluorescence increments of GFP before and after photobleaching of mCherry. Transfected cells were excited using a 488 laser line for GFP and a 543 for mCherry. Emission was collected at 500/530 and 555/655 for GFP and mCherry channels, respectively. Images were taken each second, 5 images prior to photobleaching pulse, which lasted 10 seconds at 80% power of 543-laser line in a region of interest (ROI). Finally 10 images were taken to monitor fluorescence levels of each fluorophore. To eliminate fluorescence variations overtime, fluorescence fluctuations in non-photobleaching areas were subtracted from uncorrected FRET data (5). FRET efficiency was calculated with the formula $E_{FRET} = 100(1 - D_{pre}/D_{post})$, where D_{pre} and D_{post} is GFP fluorescence intensity before and after the photobleaching protocol, respectively.

We measured distance between plasma membrane and GFP-SOAR as previously described⁵⁰, dipicrylamine (DPA) was used as a quencher acceptor of GFP. Cells were transfected with both, mCherry-Orai1 and GFP-SOAR. Donor fluorescent levels of GFP were acquired taking 4 images before the addition of 20 μ M of DPA and 10 images after DPA addition. The images were taken every 2.5 min. To increase the closeness of DPA to the inner layer of the plasma membrane the last 2 points of fluorescence intensity were measured following the addition of high K⁺ solution (NaCl 95 mM, KCl 40 mM, HEPES 17 mM and adjusted to 7.4 pH)³¹. Low laser power (<10%) was used to avoid photobleaching during these experiments.

FRET by DPA quenching was calculated by the formula $E = 1 - (I_{DA}/I_D)$, where I_D was fixed at 1.0 and I_{DA} was taking at the last point of the experiment, after addition of high K⁺ solution. Line scan was used to acquire GFP fluorescent signal, the maximum signal on mCherry-Orai1 was taking at the plasma membrane in coincidence with GFP signal. To estimate the distance (r) from GFP-SOAR to the plasma membrane, we used the formula $r = R_0 [(1/E) - 1]^{1/6}$, where R_0 has a value of 37 Å according to³¹.

MD simulation methods. All-atom simulations were carried out with the CHARMM36^{51,52} force field models for the protein, membrane and solvent environments. The initial coordinates of the monomeric peptide were generated using the available coordinates of the SOAR fragment from Homo sapiens (3TEQ)⁴, the protein orientation to the membrane was assigned using the OPM database⁵³ and embedded in the corresponding lipid bilayers and 0.15 KCl ion concentrations using the CHARMM-GUI membrane builder^{54,55}. The final composition for the SOAR-POPC simulation consists of the protein fragment, 299 POPC lipids, 13,123 water molecules, 41 K⁺ and 44 Cl⁻ atoms. For the 40% cholesterol simulations the system consists of 144 cholesterol molecules, 216 POPC lipids 14,383 water molecules, 43 K⁺ and 46 Cl⁻ atoms.

The system was energy minimized using steepest descent method and equilibrated at 310 K using NVT and NPT ensembles in which water, lipids, ions and the protein were constrained using a harmonic potential. At the final equilibration step all restraints were removed.

For the 400 ns production runs periodic boundary conditions were employed, the short-range electrostatic interactions were cut-off at 1.2 nm and the full electrostatics were treated using PME algorithm⁵⁶. Van der Waal interactions were evaluated using a cutoff switch from 10 to 12 nm. To control the temperature and pressure at 310 K and 1 atm the Nosé-Hoover thermostat with a coupling constant of 1.0 ps and the Parrinello-Rahman

barostat with a coupling constant of 1 ps and a compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ were employed using a semi-isotropic coupling for pressure control⁵⁷. The linear constraint solver (LINCS) method⁵⁸ was used to constrain all bond lengths, and a 2 fs integration step was used. The simulations were carried out using GROMACS (v5.0.5)⁵⁹ and the analyses were performed using python and the MDAnalysis libraries⁶⁰. All molecular images were created using VMD⁶¹.

Data analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons tests or by two-tailed Student's t-test (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc). Unless otherwise indicated data are presented as means \pm s.e.m. with significance set at *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ or * $p < 0.05$.

References

- Prakriya, M. & Lewis, R. S. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* **95**, 1383–1436, doi: 10.1152/physrev.00020.2014 (2015).
- Yuan, J. P. *et al.* SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature cell biology* **11**, 337–343, doi: 10.1038/ncb1842 (2009).
- Park, C. Y. *et al.* STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* **136**, 876–890, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.014 (2009).
- Yang, X., Jin, H., Cai, X., Li, S. & Shen, Y. Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5657–5662, doi: 10.1073/pnas.1118947109 (2012).
- McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M. & Prakriya, M. The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *The Journal of physiology* **591**, 2833–2850, doi: 10.1113/jphysiol.2012.250456 (2013).
- Muik, M. *et al.* STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *The EMBO journal* **30**, 1678–1689, doi: 10.1038/emboj.2011.79 (2011).
- Orci, L. *et al.* From the Cover: STIM1-induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19358–19362, doi: 10.1073/pnas.0911280106 (2009).
- Carrasco, S. & Meyer, T. STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annual review of biochemistry* **80**, 973–1000, doi: 10.1146/annurev-biochem-061609-165311 (2011).
- Cao, X. *et al.* The ER/PM microdomain, PI(4,5)P(2) and the regulation of STIM1-Orai1 channel function. *Cell calcium* **58**, 342–348, doi: 10.1016/j.ceca.2015.03.003 (2015).
- Sharma, S. *et al.* An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca^{2+} entry. *Nature* **499**, 238–242, doi: 10.1038/nature12229 (2013).
- Maleth, J., Choi, S., Muallem, S. & Ahuja, M. Translocation between PI(4,5)P2-poor and PI(4,5)P2-rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating. *Nature communications* **5**, 5843, doi: 10.1038/ncomms6843 (2014).
- Jing, J. *et al.* Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca influx. *Nature cell biology*, doi: 10.1038/ncb3234 (2015).
- Quintana, A. *et al.* TMEM110 regulates the maintenance and remodeling of mammalian ER-plasma membrane junctions competent for STIM-ORAI signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi: 10.1073/pnas.1521924112 (2015).
- Calloway, N. *et al.* Stimulated association of STIM1 and Orai1 is regulated by the balance of PtdIns(4,5)P(2) between distinct membrane pools. *Journal of cell science* **124**, 2602–2610, doi: 10.1242/jcs.084178 (2011).
- Stefan, C. J., Manford, A. G. & Emr, S. D. ER-PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication. *Current opinion in cell biology* **25**, 434–442, doi: 10.1016/j.ccb.2013.02.020 (2013).
- Pike, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research* **47**, 1597–1598, doi: 10.1194/jlr.E600002-JLR200 (2006).
- Brown, D. A. & London, E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *The Journal of membrane biology* **164**, 103–114 (1998).
- Pani, B. *et al.* Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). *The Journal of biological chemistry* **283**, 17333–17340, doi: 10.1074/jbc.M800107200 (2008).
- Alicia, S., Angelica, Z., Carlos, S., Alfonso, S. & Vaca, L. STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell calcium* **44**, 479–491, doi: 10.1016/j.ceca.2008.03.001 (2008).
- Gwozdz, T., Dutko-Gwozdz, J., Schafer, C. & Bolotina, V. M. Overexpression of Orai1 and STIM1 proteins alters regulation of store-operated Ca^{2+} entry by endogenous mediators. *The Journal of biological chemistry* **287**, 22865–22872, doi: 10.1074/jbc.M112.356626 (2012).
- Jardin, I., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1. *Channels* **2**, 401–403 (2008).
- Galan, C., Woodard, G. E., Dionisio, N., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca^{2+} entry. *Biochimica et biophysica acta* **1803**, 1083–1093, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.006 (2010).
- Levitan, I., Singh, D. K. & Rosenhouse-Dantsker, A. Cholesterol binding to ion channels. *Frontiers in physiology* **5**, 65, doi: 10.3389/fphys.2014.00065 (2014).
- Li, H. & Papadopoulos, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* **139**, 4991–4997, doi: 10.1210/endo.139.12.6390 (1998).
- Zheng, H. *et al.* Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize mu-opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC cell biology* **13**, 6, doi: 10.1186/1471-2121-13-6 (2012).
- Calloway, N., Holowka, D. & Baird, B. A basic sequence in STIM1 promotes Ca^{2+} influx by interacting with the C-terminal acidic coiled coil of Orai1. *Biochemistry* **49**, 1067–1071, doi: 10.1021/bi901936q (2010).
- Korzeniowski, M. K., Manjarres, I. M., Varnai, P. & Balla, T. Activation of STIM1-Orai1 involves an intramolecular switching mechanism. *Science signaling* **3**, ra82, doi: 10.1126/scisignal.2001122 (2010).
- Epand, R. M. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 1576–1582, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.03.016 (2008).
- McIntosh, A. L. *et al.* Fluorescence techniques using dehydroergosterol to study cholesterol trafficking. *Lipids* **43**, 1185–1208, doi: 10.1007/s11745-008-3194-1 (2008).
- Stathopoulos, P. B. *et al.* STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nature communications* **4**, 2963, doi: 10.1038/ncomms3963 (2013).
- Wang, D., Zhang, Z., Chanda, B. & Jackson, M. B. Improved probes for hybrid voltage sensor imaging. *Biophysical journal* **99**, 2355–2365, doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.037 (2010).
- Derler, I. *et al.* Cholesterol modulates Orai1 channel function. *Science signaling* **9**, ra10, doi: 10.1126/scisignal.aad7808 (2016).

33. Pani, B. *et al.* Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20087–20092, doi: 10.1073/pnas.0905002106 (2009).
34. Epanand, R. M. Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Progress in lipid research* **45**, 279–294, doi: 10.1016/j.plipres.2006.02.001 (2006).
35. Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Structure and Function in Health and Disease. *Subcell Biochem* **51**, 1–631, doi: 10.1007/978-90-481-8622-8 (2010).
36. Varnai, P., Toth, B., Toth, D. J., Hunyady, L. & Balla, T. Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *The Journal of biological chemistry* **282**, 29678–29690, doi: 10.1074/jbc.M704339200 (2007).
37. Sato, S. B. *et al.* Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. *The Journal of biological chemistry* **279**, 23790–23796, doi: 10.1074/jbc.M313568200 (2004).
38. Eggeling, C. *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159–1162, doi: 10.1038/nature07596 (2009).
39. Forstner, G. G., Tanaka, K. & Isselbacher, K. J. Lipid composition of the isolated rat intestinal microvillus membrane. *The Biochemical journal* **109**, 51–59 (1968).
40. Kawai, K., Fujita, M. & Nakao, M. Lipid components of two different regions of an intestinal epithelial cell membrane of mouse. *Biochimica et biophysica acta* **369**, 222–233 (1974).
41. Owen, D. M. *et al.* High plasma membrane lipid order imaged at the immunological synapse periphery in live T cells. *Molecular membrane biology* **27**, 178–189, doi: 10.3109/09687688.2010.495353 (2010).
42. Quintana, A. *et al.* Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *The EMBO journal* **30**, 3895–3912, doi: 10.1038/emboj.2011.289 (2011).
43. Lioudyno, M. I. *et al.* Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2011–2016, doi: 10.1073/pnas.0706122105 (2008).
44. Rentero, C. *et al.* Functional implications of plasma membrane condensation for T cell activation. *Plos one* **3**, e2262, doi: 10.1371/journal.pone.0002262 (2008).
45. Marwali, M. R., MacLeod, M. A., Muzia, D. N. & Takei, F. Lipid rafts mediate association of LFA-1 and CD3 and formation of the immunological synapse of CTL. *Journal of immunology* **173**, 2960–2967 (2004).
46. Kar, P. & Parekh, A. B. Distinct spatial Ca²⁺ signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Molecular cell* **58**, 232–243, doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.027 (2015).
47. Kar, P., Nelson, C. & Parekh, A. B. Selective activation of the transcription factor NFAT1 by calcium microdomains near Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *The Journal of biological chemistry* **286**, 14795–14803, doi: 10.1074/jbc.M111.220582 (2011).
48. Luz-Madrigal, A., Asanov, A., Camacho-Zarco, A. R., Sampieri, A. & Vaca, L. A cholesterol recognition amino acid consensus domain in GP64 fusion protein facilitates anchoring of baculovirus to mammalian cells. *Journal of virology* **87**, 11894–11907, doi: 10.1128/JVI.01356-13 (2013).
49. Asanov, A., Zepeda, A. & Vaca, L. A platform for combined DNA and protein microarrays based on total internal reflection fluorescence. *Sensors* **12**, 1800–1815, doi: 10.3390/s120201800 (2012).
50. De-la-Rosa, V., Rangel-Yescas, G. E., Ladrón-de-Guevara, E., Rosenbaum, T. & Islas, L. D. Coarse architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel determined by fluorescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* **288**, 29506–29517, doi: 10.1074/jbc.M113.479618 (2013).
51. Klauda, J. B. *et al.* Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *The journal of physical chemistry. B* **114**, 7830–7843, doi: 10.1021/jp101759q (2010).
52. MacKerell, A. D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry. B* **102**, 3586–3616, doi: 10.1021/jp973084f (1998).
53. Lomize, M. A., Lomize, A. L., Pogozheva, I. D. & Mosberg, H. I. OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* **22**, 623–625, doi: 10.1093/bioinformatics/btk023 (2006).
54. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of computational chemistry* **29**, 1859–1865, doi: 10.1002/jcc.20945 (2008).
55. Wu, E. L. *et al.* CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *Journal of computational chemistry* **35**, 1997–2004, doi: 10.1002/jcc.23702 (2014).
56. Essmann, U. *et al.* A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J Chem Phys* **103**, 8577–8593, doi: 10.1063/1.470117 (1995).
57. Evans, D. J. & Holian, B. L. The Nose-Hoover Thermostat. *J Chem Phys* **83**, 4069–4074, doi: 10.1063/1.449071 (1985).
58. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry* **18**, 1463–1472, doi: 10.1002/(Sici)1096-987x(199709)18:12<1463::Aid-Jcc4>3.0.Co;2-H (1997).
59. Pronk, S. *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**, 845–854, doi: 10.1093/bioinformatics/btt055 (2013).
60. Michaud-Agrawal, N., Denning, E. J., Woolf, T. B. & Beckstein, O. Software News and Updates MDAAnalysis: A Toolkit for the Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *Journal of computational chemistry* **32**, 2319–2327, doi: 10.1002/jcc.21787 (2011).
61. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph Model* **14**, 33–38, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5 (1996).

Acknowledgements

Jonathan Enrique Pacheco Romero is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 372743 from CONACYT. We would like to thank Alicia Sampieri for the technical assistance. We thank Dr. Leon Islas for dipicrylamine synthesis. This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) and CONACYT 127822 to LV. All the required computational resources and the simulations have been performed at Mixtli of DGTIC, UNAM. We appreciate the donation of myc-Orai1 Y80S plasmid from Dr. Richard Lewis.

Author Contributions

J.P. and L.V. conceived the study, designed the experiments and wrote the manuscript. J.P. conducted FRET experiments, calcium imaging experiments, made the mutants and co-immunoprecipitations. L.D. performed and analyzed molecular dynamics and wrote the paper. A.B.-H. performed calcium-imaging experiments and measured cell viability. A.A. and L.V. performed peptide array analysis and electrophysiological experiments.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: Alexander Asanov is the CEO of TIRF Labs.

How to cite this article: Pacheco, J. *et al.* A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1-Orai1 physical and functional interactions. *Sci. Rep.* **6**, 29634; doi: 10.1038/srep29634 (2016).



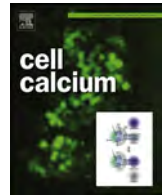
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Cell Calcium

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca



Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels

Alexander Asanov^a, Alicia Sampieri^b, Claudia Moreno^c, Jonathan Pacheco^b, Alfonso Salgado^d, Ryan Sherry^e, Luis Vaca^{b,*}

^a TIRF Labs, 106 Grendon Place, Cary, NC 27519, USA

^b Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

^c Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, 1705 NE Pacific St, Seattle, WA 98195, USA

^d Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México, DF 04510, Mexico

^e BitLevel Controls, 416 Market Street, Suite 205, Lewisburg, PA 17837, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2014

Received in revised form 19 October 2014

Accepted 21 October 2014

Available online xxx

Keywords:

STIM1

TRPC

Store-operated channels

Single channel recording

Single molecule detection

ABSTRACT

Depletion of intracellular calcium ion stores initiates a rapid cascade of events culminating with the activation of the so-called Store-Operated Channels (SOC) at the plasma membrane. Calcium influx via SOC is essential in the initiation of calcium-dependent intracellular signaling and for the refilling of internal calcium stores, ensuring the regeneration of the signaling cascade. In spite of the significance of this evolutionary conserved mechanism, the molecular identity of SOC has been the center of a heated controversy spanning over the last 20 years. Initial studies positioned some members of the transient receptor potential canonical (TRPC) channel superfamily of channels (with the more robust evidence pointing to TRPC1) as a putative SOC. Recent evidence indicates that Stromal Interacting Molecule 1 (STIM1) activates some members from the TRPC family of channels. However, the exact subunit composition of TRPC channels remains undetermined to this date. To identify the subunit composition of STIM1-activated TRPC channels, we developed novel method, which combines single channel electrophysiological measurements based on the patch clamp technique with single molecule fluorescence imaging. We termed this method Single ion Channel Single Molecule Detection technique (SC-SMD). Using SC-SMD method, we have obtained direct evidence of the subunit composition of TRPC channels activated by STIM1. Furthermore, our electrophysiological-imaging SC-SMD method provides evidence at the molecular level of the mechanism by which STIM1 and calmodulin antagonize to modulate TRPC channel activity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Calcium influx is a key process responsible for initiating a wide variety of cellular functions. In the phenomenon known as Store-Operated Calcium Entry (SOCE) [1], the influx of calcium is triggered by the release of calcium from intracellular calcium storage compartments (essentially, the Endoplasmic Reticulum (ER)) [1]. The

channel at the plasma membrane involved in SOCE is known as Store-Operated Channel (SOC). Given the significance of this highly conserved mechanism, there has been an intense search for the molecular identity of SOC, which started over twenty years ago [1].

The initial identification of a novel family of cationic channels, named Transient Receptor Potential (TRP) channels, demonstrating also that some of them were activated by store depletion, positioned some members from this superfamily of channels as potential SOC [2]. However, experimental evidence accumulated over the years has shown conflicting results regarding the mode of activation of TRP channels and their putative role in SOCE (for a review see [3,4]).

Linkage mapping by genome-wide SNP array screening from 23 patients suffering hereditary severe combined immune deficiency syndrome, identified a novel family of channels, named Orai, as responsible for deficient SOCE in T lymphocytes from these

Abbreviations: TRPC, transient receptor potential canonical channel family; SOC, store-operated channel; SOCE, store-operated calcium entry; SOAR, STIM Orai activating region; STIM1, stromal interacting molecule 1; PO, open probability; STIM1-CT, STIM1 cytoplasmic region; SMFI, single molecule fluorescence imaging; SC-SMD, single ion channel single molecule detection; CaM, calmodulin.

* Corresponding author. Tel.: +525 56225654.

E-mail address: lvaca@ifc.unam.mx (L. Vaca).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.011>

0143-4160/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: A. Asanov, et al., Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels, *Cell Calcium* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.011>

Direct Binding Between Orai1 and AC8 Mediates Dynamic Interplay Between Ca²⁺ and cAMP Signaling

Debbie Willoughby,¹ Katy L. Everett,¹ Michelle L. Halls,^{1*} Jonathan Pacheco,² Philipp Skroblin,^{3,4} Luis Vaca,² Enno Klussmann,⁴ Dermot M. F. Cooper^{1†}

The interplay between calcium ion (Ca²⁺) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling underlies crucial aspects of cell homeostasis. The membrane-bound Ca²⁺-regulated adenylyl cyclases (ACs) are pivotal points of this integration. These enzymes display high selectivity for Ca²⁺ entry arising from the activation of store-operated Ca²⁺ (SOC) channels, and they have been proposed to functionally colocalize with SOC channels to reinforce crosstalk between the two signaling pathways. Using a multidisciplinary approach, we have identified a direct interaction between the amino termini of Ca²⁺-stimulated AC8 and Orai1, the pore component of SOC channels. High-resolution biosensors targeted to the AC8 and Orai1 microdomains revealed that this protein-protein interaction is responsible for coordinating subcellular changes in both Ca²⁺ and cAMP. The demonstration that Orai1 functions as an integral component of a highly organized signaling complex to coordinate Ca²⁺ and cAMP signals underscores how SOC channels can be recruited to maximize the efficiency of the interplay between these two ubiquitous signaling pathways.

INTRODUCTION

Signaling via Ca²⁺ in nonexcitable cells is typically initiated by the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)-mediated release of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ stores in response to G protein (heterotrimeric guanine triphosphate-binding protein)-coupled receptor stimulation of phospholipase C. Subsequent depletion of these stores triggers the entry of Ca²⁺ through store-operated Ca²⁺ (SOC) entry (SOCE) channels. SOCE, attributed to the activation of SOC channels within the plasma membrane, plays a critical role in the control of a number of cellular functions (1). Orai1, a 33-kD protein with four transmembrane domains found in numerous cell types, has been identified as the pore-forming subunit of SOC channels [including the well-characterized Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channel] (2–4). Clinically, mutations of the human *Orai1* gene have been linked to severe immunodeficiency and various myopathies (5). The highly Ca²⁺-selective SOC channels, formed by a tetrameric assembly of Orai1 subunits (6–8), are activated by the ER Ca²⁺ sensor, stromal interaction molecule 1 (STIM1) (9, 10), upon ER Ca²⁺ store depletion and clustering of STIM1 at junctions between the ER and the plasma membrane (11, 12).

Of the nine membrane-bound adenylyl cyclases (ACs), the enzymes that convert adenosine triphosphate to cyclic adenosine monophosphate (cAMP), four isoforms respond to submicromolar Ca²⁺ concentrations in vitro (13). These Ca²⁺-sensitive ACs are found in various tissues and modulate such processes as cardiac rhythmicity, pulsatile hormone release, and hippocampal memory formation (14–16). AC1 and AC8 are stimulated through an interaction with Ca²⁺-calmodulin (CaM) (17–21), whereas AC5 and AC6 are directly inhibited by Ca²⁺ (22, 23). In cells, Ca²⁺-sensitive

ACs show a marked selectivity for SOCE over other modes of increasing cytosolic Ca²⁺ (24, 25), even in excitable cells, and they reside in cholesterol- and sphingolipid-enriched domains of the plasma membrane known as lipid rafts, unlike their Ca²⁺-insensitive congeners (1, 26).

The role of Orai1 and STIM1 in mediating the selective regulation of ACs has been demonstrated in cultured human embryonic kidney (HEK) 293, pancreatic, and colonic cell lines, where their overexpression potentiates the Ca²⁺-dependent stimulation or inhibition of AC8 and AC6, respectively (27). STIM1-dependent Ca²⁺ store depletion has also been linked to AC activation, independently of any change in cytosolic Ca²⁺ (28). Data obtained with a genetically encoded Ca²⁺ sensor fused to AC8 (GCaMP2-AC8) indicated that the Ca²⁺-stimulable AC8 resides in a discrete Ca²⁺ microdomain that experiences rapid fluctuations in Ca²⁺ during SOCE, but is shielded from other modes of Ca²⁺ increase (such as Ca²⁺ release from the ER or ionomycin-mediated Ca²⁺ entry) (29). These findings support the existence of a proposed functional colocalization between AC8, Orai1, and STIM1 in the plasma membrane (25, 27).

Here, we used a multidisciplinary approach involving fluorescence resonance energy transfer (FRET), glutathione *S*-transferase (GST) pulldown, coimmunoprecipitation, and peptide array analyses to identify a direct protein-protein interaction between AC8 and Orai1. We used live-cell imaging with high-resolution AC-targeted Ca²⁺ and cAMP biosensors, together with small interfering RNA (siRNA) knockdown of Orai1, to demonstrate a role for Orai1 in generating dynamic changes in Ca²⁺ concentration within the AC8 microdomain to stimulate cAMP production. Comparisons were made with an N-terminally truncated form of AC8, 8M1, which was unable to bind Orai1 directly. Our data suggest that SOC channels can function as integral components of highly organized signaling complexes to facilitate the efficient and dynamic regulation of Ca²⁺-dependent cAMP signaling events.

RESULTS

FRET reveals an association between AC8 and Orai1

We used FRET to assess direct, or indirect, interactions between fluorescently tagged AC8 and Orai1 constructs in plasma membrane regions

¹Department of Pharmacology, University of Cambridge, Cambridge CB2 1PD, UK. ²Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico 04510, Distrito Federal, México. ³Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, 13125 Berlin, Germany. ⁴Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, 13125 Berlin, Germany.

*Present address: Drug Discovery Biology, Monash Institute of Pharmaceutical Sciences and Department of Pharmacology, Monash University, Parkville, Victoria 3052, Australia.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: dmfc2@cam.ac.uk

Adenylyl cyclase AC8 directly controls its micro-environment by recruiting the actin cytoskeleton in a cholesterol-rich milieu

Laura J. Ayling¹, Stephen J. Briddon², Michelle L. Halls¹, Gerald R. V. Hammond¹, Luis Vaca³, Jonathan Pacheco³, Stephen J. Hill² and Dermot M. F. Cooper^{1,*}

¹Department of Pharmacology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1PD, UK

²Institute of Cell Signalling, School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, Queens Medical Centre, Nottingham, NG7 2UH, UK

³Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México

*Author for correspondence (dmfc2@cam.ac.uk)

Accepted 26 September 2011

Journal of Cell Science 125, 1–18

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.091090

Summary

The central and pervasive influence of cAMP on cellular functions underscores the value of stringent control of the organization of adenylyl cyclases (ACs) in the plasma membrane. Biochemical data suggest that ACs reside in membrane rafts and could compartmentalize intermediary scaffolding proteins and associated regulatory elements. However, little is known about the organization or regulation of the dynamic behaviour of ACs in a cellular context. The present study examines these issues, using confocal image analysis of various AC8 constructs, combined with fluorescence recovery after photobleaching and fluorescence correlation spectroscopy. These studies reveal that AC8, through its N-terminus, enhances the cortical actin signal at the plasma membrane; an interaction that was confirmed by GST pull-down and immunoprecipitation experiments. AC8 also associates dynamically with lipid rafts; the direct association of AC8 with sterols was confirmed in Förster resonance energy transfer experiments. Disruption of the actin cytoskeleton and lipid rafts indicates that AC8 tracks along the cytoskeleton in a cholesterol-enriched domain, and the cAMP that it produces contributes to sculpting the actin cytoskeleton. Thus, an adenylyl cyclase is shown not just to act as a scaffold, but also to actively orchestrate its own micro-environment, by associating with the cytoskeleton and controlling the association by producing cAMP, to yield a highly organized signalling hub.

Key words: Adenylyl cyclase, cAMP, Cytoskeleton, Cholesterol, FRAP, Rafts

Introduction

The numerous cellular effects modulated by the ubiquitous second messenger cAMP, underscores the need for stringent control of its spatial and temporal reach. Substantial evidence has established that cAMP ‘microdomains’ exist, which facilitate discrimination in signal propagation (Bacskai et al., 1993; Buxton and Brunton, 1983; Iancu et al., 2008; Jurevicius and Fischmeister, 1996; Rich et al., 2000; Zaccolo and Pozzan, 2002). These microdomains are partially achieved by scaffolded phosphodiesterases (PDEs), which, by degrading cAMP at specific locations, limit its intracellular diffusion (Lynch et al., 2007; Nikolaev et al., 2006; Willoughby et al., 2006). However, simple limitations on the diffusion of cAMP only partially explain the discrete responses to this second messenger. Organization of the immediate downstream targets of cAMP, namely protein kinase A (PKA), exchange protein activated by cAMP (EPAC) and cyclic nucleotide-gated (CNG) channels, offers an additional level of control. However, recent studies on the binding by adenylyl cyclases (ACs) of various regulatory proteins such as PKA, A-kinase anchoring proteins (AKAPs) (Bauman et al., 2006; Efendiev et al., 2010; Willoughby et al., 2010b), protein phosphatase 2A (PP2A) (Crossthwaite et al., 2006), snapin (Chou et al., 2004) and phosphodiesterases (PDEs) (Halls and Cooper, 2010) indicate that ACs can to a large extent

dictate their micro-environmental milieu. Consequently, the placement and compartmentalization of ACs might provide a primary level of organization of cAMP signalling cascades.

Considerable evidence suggests that ACs exploit the heterogeneity of plasma membranes (PM), represented by the existence of so-called ‘lipid rafts’. ACs that are regulated by Ca²⁺ are targeted to these domains, whereas Ca²⁺-insensitive ACs are excluded (Cooper and Crossthwaite, 2006). The concept of ‘membrane rafts’ has evolved considerably over the last decade. These were initially envisaged as rather static regions enriched in closely packed sphingolipids (Schroeder et al., 1995) and sterols, such as cholesterol, with a role in membrane phase behaviour (Brown and London, 2000), trafficking (Gruenberg, 2001) sorting (Hansen et al., 2000) and organization of signalling complexes (Brown and London, 1998; Head et al., 2006). Membrane rafts are increasingly understood to be small (10–200 nm), well dispersed, dynamic and detergent-resistant structures that provide a platform for the establishment of microdomains, which can be quite transient (Hancock and Parton, 2005; Lingwood et al., 2008).

An additional major contributor to membrane component organization is the actin cytoskeleton, which acts as a physical barrier by forming a highly reticulated network of filaments beneath the PM. Transient corrals are formed by the association

Advances in Experimental Medicine and Biology 898

Juan A. Rosado *Editor*

Calcium Entry Pathways in Non-excitabile Cells

 Springer

Juan A. Rosado
Editor

Calcium Entry Pathways in Non-excitable Cells

 Springer

Chapter 15

Microdomains Associated to Lipid Rafts

Jonathan Pacheco, Josué O. Ramírez-Jarquín, and Luis Vaca

Abstract Store Operated Ca^{2+} Entry (SOCE), the main Ca^{2+} influx mechanism in non-excitable cells, is implicated in the immune response and has been reported to be affected in several pathologies including cancer. The basic molecular constituents of SOCE are Orai, the pore forming unit, and STIM, a multidomain protein with at least two principal functions: one is to sense the Ca^{2+} content inside the lumen of the endoplasmic reticulum(ER) and the second is to activate Orai channels upon depletion of the ER. The link between Ca^{2+} depletion inside the ER and Ca^{2+} influx from extracellular media is through a direct association of STIM and Orai, but for this to occur, both molecules have to interact and form clusters where ER and plasma membrane (PM) are intimately apposed. In recent years a great number of components have been identified as participants in SOCE regulation, including regions of plasma membrane enriched in cholesterol and sphingolipids, the so called lipid rafts, which recruit a complex platform of specialized microdomains, which cells use to regulate spatiotemporal Ca^{2+} signals.

Keywords Lipid rafts • SOCE • TRPC channels • STIM1 • Orai1 • ER/PM junction

Abbreviations

AC8	Adenylyl cyclase 8
APC	Adenomatous polyposis coli
ARC channels	Arachidonic acid gated channels
ASM	Airway smooth muscle
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
$\text{Ca}_v1.2$	Voltage gated Ca^{2+} channel 1.2
Cav-1	Caveolin 1
CNS	Central nervous system

J. Pacheco • J.O. Ramírez-Jarquín • L. Vaca (✉)
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico
e-mail: lvaca@ifc.unam.mx

Review Article

A Microscopic View of the Store-Operated Calcium Entry-Pathway

Jonathan Pacheco and Luis Vaca

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico, DF 04510, Mexico

Correspondence should be addressed to Luis Vaca; lvaca@ifc.unam.mx

Received 30 August 2013; Accepted 24 September 2013

Academic Editors: S. Bruzzone and M. Estrada

Copyright © 2013 J. Pacheco and L. Vaca. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Orai and STIM are the basic components of a highly complex and regulated mechanism for Ca^{2+} entry into the cell, known as store-operated calcium entry (SOCE). The activation of plasma membrane G-protein-coupled receptors associated with the phospholipase C cascade results in the rapid and massive production of inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3). This second messenger triggers the massive efflux of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum and into the cytosol, resulting in the oligomerization of the stromal interacting molecule (STIM1), a sensor of ER Ca^{2+} . STIM1 oligomers (the so-called puncta) activate Orai channels at the plasma membrane, triggering the influx of Ca^{2+} into the cytosol. Several microscopy techniques have been implemented to study SOCE, resulting in stunning images of protein complexes assembling in real time. However, little attention has been paid to the findings about this complex mechanism from the imaging point of view, some of which appear to produce contradictory results. In the present review we gathered all the information about SOCE obtained with imaging techniques and contrast these findings with those obtained with alternative methods.

1. Introduction

Calcium (Ca^{2+}) is a key and ubiquitous second messenger, controlling a wide variety of cellular functions from cell proliferation to apoptosis [1]. Hence, Ca^{2+} signaling has to be highly regulated both in time and space [2]. To accomplish this task, cells rely on numerous pumps and channels, comprising the machinery to generate and regulate spatial-temporal Ca^{2+} signals [3].

There are two principal Ca^{2+} sources in the cell: (i) the extracellular medium and (ii) the intracellular stores, most notably the endoplasmic reticulum (ER), which plays a central role in Ca^{2+} homeostasis, not only as the major intracellular store, but also as the controller of the cytosolic entry of Ca^{2+} across the plasma membrane (PM). The modulation of calcium entry from the ER begins when phospholipase C (PLC) is activated by G-protein-coupled receptors on the cell surface, leading to the generation of the second messenger inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3), which releases Ca^{2+} from the ER after binding the IP_3 receptor (IP_3R) located at the ER membrane [4, 5]. IP_3R activation results in the massive efflux

of Ca^{2+} from the ER and into the cytosol. This decrease of ER- Ca^{2+} content triggers the influx of extracellular Ca^{2+} via plasma membrane Ca^{2+} channels in a process known as store operated calcium entry (SOCE) [4].

The importance of SOCE in the immune system has been well established, where it plays a pivotal role in B- and T-cell activation, by triggering antigen recognition through activation of the transcription factor, NFAT [6, 7]. The molecular identities of the proteins involved in the SOCE were discovered recently in 2005, through a strategy of large-scale RNAi-based screening. dSTIM was initially identified in *Drosophila* as well as its human homologue STIM1 [8]. One year later Orai was identified almost simultaneously by a wide-genome screen strategy and by linkage analysis with single nucleotide polymorphism arrays in patients with a form of hereditary severe combined immune deficiency (SCID) [9, 10].

In the last seven years there have been major advances in our understanding of SOCE at the molecular level. The mechanism of gating and regulation of the Orai channel has been almost elucidated; inter- and intra-molecular dynamic