



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MODULACION DE LA LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL CANAL ORAI1 POR  
COLESTEROL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ARLETTE BOHÓRQUEZ HERNÁNDEZ

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:

DR. LUIS PADILLA NORIEGA  
DEPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

KAREN MANOUTCHARIAN  
DEPTO. DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M.

Ciudad universitaria, CDMX. Enero, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 y hermanos

---

# Agradecimientos

---

A la universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de su comunidad, al Instituto de Fisiología Celular y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A las instituciones que auspiciaron esta investigación: CONACYT (127822), Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECITI 47/2015) y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA 47/2015). Arlette Bohórquez Hernández alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and recibió la beca 230945 de CONACYT.

Agradezco especialmente al Doctor Luis Vaca Domínguez por su apoyo y guía constante, por sus enseñanzas y por impulsarme a ser mejor estudiante y persona.

A los miembros del comité tutor: Dr. Luis Padilla Noriega, Dr. Karen Manoutcharyan por los excelentes comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A los miembros del jurado de examen de grado que con su retroalimentación enriquecieron este trabajo: Dr. Roberto Carlos Muñoz-Garay, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Karen Manoutcharyan Airapetian, Dra. Diana Escalante Alcalde y Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

A los integrantes del laboratorio 126Nte, particularmente a Alicia Sampieri García y Salustia Ángela Salgado Guzmán por el apoyo técnico brindado.

A mis amigos que se convirtieron en familia fuera de casa Ram, Karla, Carlos, Kevin, Andrea, Adolfo y Tania por siempre estar presente.

A las mujeres de mi vida que son mi ejemplo de fortaleza, amor y buen humor, Mary, Fide, Guadalupe, Teresa, Ángeles.

A mis padres Noel y Mary por su guía, consejos, apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos Noel y Ricardo, mis mejores amigos, por sus consejos, apoyo y amor.

A Luis por ser un pilar imprescindible en mi vida, por tus consejos, apoyo, paciencia, amor y todas las sonrisas.

**¡Gracias totales!!**

# INDICE

---

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 El calcio es un segundo mensajero “universal”.....	3
1.2 La entrada de calcio operada por vaciamiento (SOCE).....	4
1.2.1 STIM1.....	6
1.2.2 Orai 1.....	9
1.3 ¿Cómo se regulan respuestas distintas a la elevación de $Ca^{2+}$ intracelular?.....	10
1.4 Fisiología de los microdominios membranales, organizadoras de señales.....	11
2. Antecedentes.....	14
3. Hipótesis.....	16
4. Justificación.....	17
5. Objetivo general.....	17
5.1 Objetivos particulares.....	17
6. Metodología.....	18
6.1 Cultivo celular y transfecciones.....	18
6.2 Manipulación y cuantificación de colesterol.....	18
6.3 Mediciones de calcio.....	19
6.4 Internalización de Orai1.....	20
6.4.1 Microscopia confocal.....	20
6.4.2 Microscopia de iluminación de un solo plano ( <i>Single Plane Illumination Microscopy, SPIM</i> ).....	20
6.4.3 Determinación de la internalización de Orai1 mediante cuantificación de Orai1 presente en la membrana.....	21
6.5 Identificación de proteínas mediante <i>Western Blot</i> .....	21
6.6 Ensayos de medición de transferencia de energía ( <i>Förster resonance Energy Transfer, FRET</i> ).....	22
6.6.1 FRET en modalidad emisión sensibilizada.....	22

6.7 Determinación de la interacción entre Orai1 y Cav1 mediante coimmunoprecipitación (CoIP).....	23
6.8 Análisis de los efectos de bajos niveles de colesterol membranar en la dinámica de Orai1.....	23
6.8.1 Espectroscopia de correlación espacio-temporal (iMSD) .....	23
6.9 Análisis de datos.....	26
7. Resultados .....	26
7.1 Orai1 se internaliza cuando la concentración de colesterol membranar es baja.....	27
7.2 Interacción entre Orai1 y Cav1.....	35
7.3 Análisis de iMSD para Orai1 con SOCE no activado.....	38
7.4 Análisis de iMSD para Orai1 con SOCE activado.....	40
7.5 Internalización por clatrina.....	43
8. Discusión .....	45
9. Conclusión.....	49
10. Perspectivas .....	50
11. Referencias.....	50
12. Anexos.....	60
1.2 Anexo 1. Publicaciones obtenidas durante la estancia doctoral .....	60

# INDICE DE FIGURAS

---

Figura.1 Principales componentes de la SOCE. ....	6
Figura 2. Proteína multidominio STIM1 .....	7
Figura 3. El canal operado por vaciamiento Orai1 .....	10
Figura 4. Balsas lipídicas planas y caveolae .....	13
Figura 5. Espectroscopia de correlación espacio-temporal (iMSD) .....	25
Figura 6. La baja concentración de colesterol disminuye la SOCE .....	26
Figura 7. Microfotografía de células HEK293 expresando dsRED-Orai1.....	28
Figura 8. Cuantificación de viabilidad celular.....	29
Figura 9. Cuantificación de colesterol en células HEK293 .....	29
Figura 10. Mediciones de internalización de Orai1 en condiciones de colesterol membranal bajo usando microscopia confocal.....	30
Figura 11. Mediciones de internalización de Orai1 en condiciones de colesterol membranal bajo usando SPIM. ....	32
Figura 12. La concentración membranar de Orai1 endógeno disminuye en condiciones bajas de colesterol. ....	33
Figura 13. La sobreexpresión de Cav1 inhibe los efectos del bajo colesterol en la SOCE. .....	34
Figura 14. La concentración membranar de Orai1 no disminuye en condiciones de bajo colesterol membranar cuando Cav1-GFP se sobreexpresa.....	35
Figura 15. Medición de FRET entre Cagv1-GFP y mCherry-Orai1 en diferentes condiciones.....	36
Figura 16. Coinmunoprecipitación entre Cav1-GFP y Orai1 .....	37
Figura.17. La remoción de colesterol membranar y la sobreexpresión de Cav1 influye la difusión y el tamaño de agregado de Orai1. ....	39
Figura.18. La remoción de colesterol de la membrana plasmática no modifica la velocidad de difusión de Orai1 dentro del confinamiento .....	40
Figura.19. La velocidad de difusión de Orai1 fuera del confinamiento es modificada por la remoción de colesterol membranar.....	40
Figura.20. La remoción de colesterol membranar modifica la difusión y el tamaño de agregado de Orai1 en condiciones de SOCE activado.....	41
Figura.21. El tamaño de agregado de Orai1 es influenciado por las condiciones de colesterol membranar en condiciones de SOCE activado. ....	42
Figura.22. La velocidad de difusión de Orai1 dentro el confinamiento con SOCE activado es modificada por los niveles de colesterol de la membrana.....	42
Figura.23. Comparación de velocidad de difusión fuera de confinamiento .....	43
Figura.24. Orai1 se internaliza más en célula que sobreexpresan clatrina, comparado con células que solo sobreexpresan Orai1 .....	45



## Resumen

La entrada de calcio operada por vaciamiento (SOCE) es uno de los mecanismos más importantes para la movilización de calcio en la célula. La SOCE está mediada por dos proteínas principales: STIM1 que actúa como el sensor de calcio en el retículo endoplásmico (RE) y Orai1 responsable del influjo de calcio al vaciarse el RE. Existen muchos estudios que indican que SOCE está modulado por el contenido de colesterol de la membrana plasmática (PM). Sin embargo, una gran cantidad de preguntas siguen sin respuesta con respecto al mecanismo molecular preciso por el cual el colesterol modula SOCE.

En el presente estudio, descubrimos que la reducción de colesterol en la membrana plasmática induce la internalización de los canales Orai1, que puede prevenirse mediante la sobreexpresión de la caveolina 1 (Cav1). Además, Cav1 y Orai1 se asocian cuando se activa la SOCE tal como lo revelan los ensayos de transferencia de energía (FRET) y de coimmunoprecipitación. Los efectos de la reducción del colesterol no se limitan a incrementar la velocidad de internalización de Orai1, sino que también afecta el movimiento lateral de Orai1, cambiando de un modelo de difusión confinada (en condiciones basales de colesterol) a difusión lineal (en condiciones de bajo colesterol membranar). La sobreexpresión de Cav1 inhibió estas alteraciones manteniendo Orai1 en un movimiento confinado y parcialmente confinado, también demostramos que la activación SOCE inhibió las alteraciones a la difusión de Orai1.

Estos resultados no sólo destacan el complejo efecto de la regulación del colesterol en SOCE, sino que también indican un efecto regulador directo sobre la localización y compartimentación de Orai1 por este lípido en nuestro modelo experimental.

## **Abstract**

Store Operated Calcium Entry (SOCE) is one of the most important mechanisms for calcium mobilization into the cell. Two main proteins sustain SOCE: STIM1 that acts as the calcium sensor in the endoplasmic reticulum (ER) and Orai1 responsible for calcium influx upon depletion of ER. There are many studies indicating that SOCE is modulated by the cholesterol content of the plasma membrane (PM). However, a myriad of questions remains unanswered concerning the precise molecular mechanism by which cholesterol modulates SOCE.

In the present study we found that reducing PM cholesterol results in the internalization of Orai1 channels, which can be prevented by overexpressing caveolin 1 (Cav1). Furthermore, Cav1 and Orai1 associate upon SOCE activation as revealed by FRET and coimmunoprecipitation assays. The effects of reducing cholesterol were not limited to an increased rate of Orai1 internalization, but also, affects the lateral movement of Orai1, inducing movement in a linear pattern (unobstructed diffusion) opposite to basal cholesterol conditions where most of Orai1 channels moves in a confined space, as assessed by Fluorescence Correlation Spectroscopy, Cav1 overexpression inhibited these alterations maintaining Orai1 into a confined and partially confined movement, also we showed that SOCE activation inhibited the alterations to the diffusion of Orai1.

These results not only highlight the complex effect of cholesterol regulation on SOCE, but also indicate a direct regulatory effect on Orai1 localization and compartmentalization by this lipid.

## **1. Introducción**

El ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desempeña un importante papel en la regulación de diversas actividades celulares que van desde la proliferación celular, hasta la apoptosis; estas actividades requieren de diferentes mecanismos para generar señales de calcio [1,2]. Las células tienen acceso a dos fuentes de calcio: una externa y una interna que se encuentra almacenada dentro de organelos como el RE y la mitocondria; la concentración de calcio en estos organelos se encuentra entre 100 y 800  $\mu\text{M}$ . [1]. La concentración de calcio al exterior de la célula es 6 órdenes de magnitud mayor (1.8 mM) a la concentración de este ion en el citoplasma (~20 nM). Para mantener esta diferencia de concentración son necesarias diferentes estrategias que involucran proteínas amortiguadoras, transportadoras, contransportadoras, bombas y canales iónicos.

### **1.1 El calcio es un segundo mensajero “universal”**

Hace más de 100 años Ringer y colaboradores demostraron que es indispensable la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el líquido de perfusión para la contracción normal del corazón de rana [3]. En 1960, Ebashi y Lipman descubrieron en células musculares el sitio de almacenaje de  $\text{Ca}^{2+}$ , al cual denominaron retículo sarcoplásmico [4]. Después, se demostró la existencia de proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en una gran variedad de células, muchas de ellas con cambios en sus actividades en función de la concentración de este ión. Estas proteínas actúan como intermediarias entre el calcio y diversos fenómenos celulares. Estos hallazgos elucidaron la función del  $\text{Ca}^{2+}$  en la fisiología celular [5].

Hoy en día, sabemos que los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular modulan la mayoría de los procesos celulares, entre ellos la exocitosis, la activación de células del sistema inmune, muerte apoptótica, la división celular, expresión de genes, entre otros muchos procesos celulares [6–9].

En la mayoría de las células, la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular al citosol, es uno de los primeros pasos de señalización. Desde ahí puede difundir al núcleo o bien ser secuestrado en la mitocondria o en el retículo endoplásmico (RE). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de las células está regulada

por múltiples eventos que pueden ser divididos en procesos de elevación o remoción, dependiendo del efecto (aumento o disminución) que tiene sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los procesos de elevación de calcio incluyen canales localizados en la membrana plasmática que regulan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular. Los mecanismos de remoción de calcio son utilizados para disminuir  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio citosólico e incluyen ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática (Plasma Membrane Calcium ATPase, PMCA) y en la membrana del RE (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, SERCA), así como intercambiadores que usan gradientes de otros iones para proveer de energía al transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera de la célula [5,6] [10].

### **1.2 La entrada de calcio operada por vaciamiento (SOCE)**

Aunque muchos procesos celulares requieren la liberación de calcio desde las reservas intracelulares, la entrada de calcio desde el espacio extracelular es esencial para el mantenimiento de diversas respuestas fisiológicas. La entrada de calcio mediada por vaciamiento o SOCE por sus siglas en inglés *Store Operated Calcium Entry*, es un mecanismo único para la entrada de calcio pues involucra diversos canales y proteínas celulares trabajando de forma conjunta [11].

El concepto de SOCE fue introducido hace casi tres décadas [12,13]. Éste es uno de los mecanismos que contribuyen mayoritariamente al influjo de calcio y está regulado por el estado de llenado de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (esencialmente el RE) [13–16]. La SOCE no es solamente esencial para rellenar el RE, sino que contribuye de forma fundamental a la regulación fina de diversos procesos biológicos [17–19]. Entre otros ejemplos, en el sistema inmunológico donde la entrada de calcio por esta vía activa a calcineurina, una fosfatasa dependiente de calmodulina que defosforila al factor de transcripción NFAT provocando su translocación desde el citoplasma al núcleo aumentando la transcripción de los genes que codifican para la expresión de diversas citocinas, que incluyen interleucinas IL-2, IL-4 e interferón [20–23].

El  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en el RE se fuga continuamente hacia el citosol (debido al gradiente de concentración) y es llevado de regreso al RE mediante la actividad de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (SERCA), evitando de esta manera que el RE se vacíe y que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol aumente a niveles tóxicos. Cuando ocurre una estimulación mediada por agonistas se generan segundos mensajeros que inducen la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  y eventualmente se vacía de este ión el RE. La disminución de calcio dentro del lumen del RE se comunica a la membrana plasmática, donde residen los canales operados por liberación de calcio ("Calcium Release Activated Channels", CRAC) y comienza la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular [7,24–29].

La identidad de la SOCE se ha asociado a un grupo de canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  con diferentes propiedades biofísicas específicas [30–32]. Dentro de estos canales iónicos, los mejor caracterizados son los CRAC; la caracterización biofísica de estos canales revela una alta selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$ . En 2005 y 2006, respectivamente, las dos piezas claves de la SOCE, STIM1 y Orai1 (Fig.1), fueron identificados como suficientes para reconstituir corrientes de tipo CRAC [8,31,32].

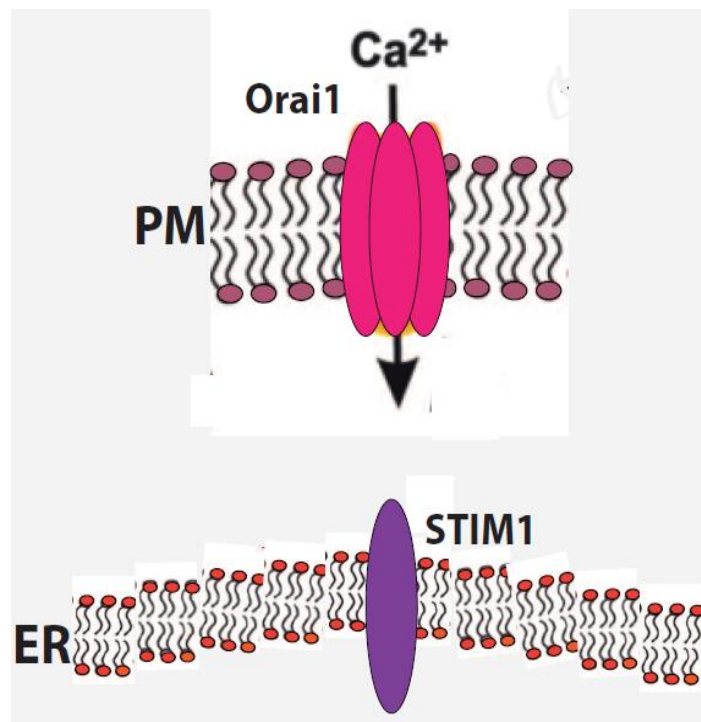
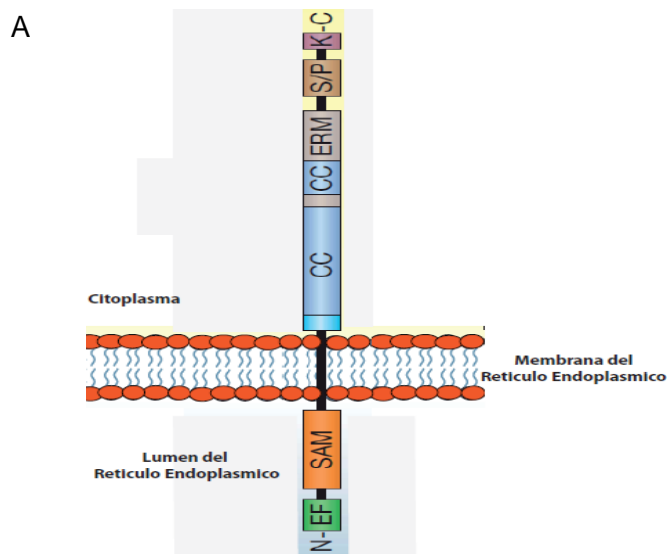


Figura.1 Principales componentes de la SOCE. El canal Orai1 (rosa) ubicado en la membrana plasmática, el sensor de calcio STIM1 (morado) que se localiza en la membrana del Retículo Endoplásmico.

### 1.2.1 STIM1

La señal que comunica el vaciamiento del RE a la membrana plasmática es un evento clave en la SOCE, diversos trabajos de investigación esclarecieron el mecanismo que comunica el vaciamiento de calcio del RE a la membrana fue esclarecido. La proteína de interacción estromal (“Stromal Interacting Molecule 1”, STIM1) ha sido identificada como el sensor responsable de la comunicación del vaciamiento del RE a la membrana plasmática [7,32,33]. La proteína STIM1 fue identificada por su habilidad para conferir adherencia de pre-linfocitos B a células del estroma, y por este motivo originalmente fue nombrada SIM (*Stromal Interacting Molecule*) [34], después se renombró como STIM1 aduciendo a su función de proteína estimuladora del flujo de calcio a través de la membrana plasmática [35].

STIM1 es una proteína transmembranal tipo I que se ancla a la membrana del RE mediante un único segmento transmembranal (Fig.2). Su participación en la SOCE fue descubierta mediante una estrategia de silenciamiento de 2000 genes en células S2 de *Drosophila*. Una vez silenciados estos genes, se evaluó el efecto de este silenciamiento en la SOCE [32].



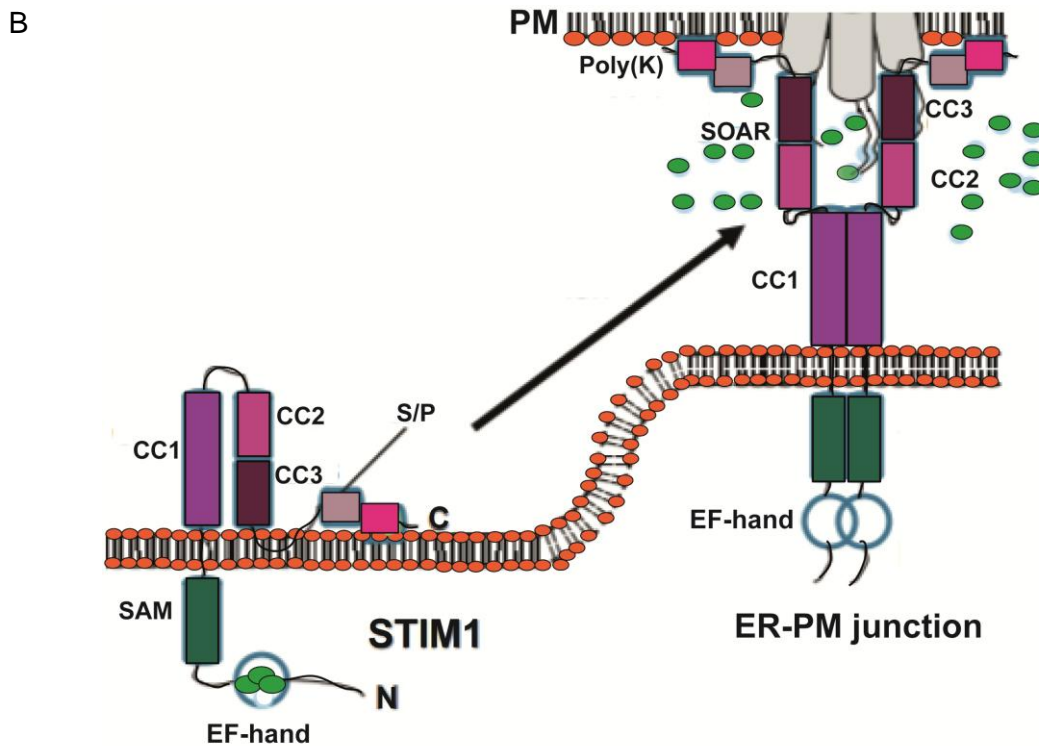


Figura 2. Proteína multidominio STIM1. A. Reside en lumen de retículo endoplasmico: mano EF (EF-hand), región de oligomerización (SAM), en citoplasma: región superenrollada (CC1-3) y que junto con ERM contiene la secuencia de activación de Orai1. B. La región superenrollada cambia de conformación y se une a Orai1 formando agregados de STIM1 y Orai1. Poly (k): región polibásica, SOAR: región de activación STIM-Orai, ER: endoplasmic reticulum, PM: membrana plasmática.

STIM tiene dos homólogos en mamíferos; STIM1 y STIM2 [27,36], ambas proteínas son de tipo I con un solo un segmento transmembranal, con el extremo amino en el lumen del RE y el extremo carboxilo en el citoplasma, poseen 54 % de identidad, tienen un peso molecular de 77 y 84 kDa respectivamente. El silenciamiento de STIM1 demostró que su ausencia es suficiente para abatir la entrada de calcio mediada por SOCE [37]. Se piensa que STIM2 juega un papel regulador de los niveles de calcio dentro del RE y que actúa en respuesta a cambios de concentración en un rango de 200  $\mu\text{M}$ , mientras que STIM1 activa la SOCE en respuesta a cambios más drásticos en la concentración de calcio, es decir, cuando la concentración de este ión disminuye 500  $\mu\text{M}$  [38].

STIM1 censa los cambios en concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de RE mediante su extremo amino terminal el cual está localizado en el lumen del RE. En este extremo se encuentra un dominio de unión a calcio similar al encontrado en otras proteínas que se asocian a calcio de manera selectiva, como la calmodulina. Este dominio ha recibido el nombre de mano EF, por su estructura cristalográfica, la cual recuerda a una mano con los dedos meñique, anular y medio doblados hacia la palma de la mano, mientras que el pulgar e índice se mantienen extendidos [39].

El  $\text{Ca}^{2+}$  se disocia de la mano EF de STIM1 cuando ocurre el vaciamiento del RE, es decir, cuando la concentración de este ión se encuentra por debajo de  $400 \mu\text{M}$ , esta disociación induce la formación de agregados de STIM1 mediante el dominio SAM, formando estructuras denominadas punctas cerca de la membrana plasmática. Estas estructuras se translocan hacia la membrana plasmática donde interactúan con una proteína membranal de cuatro segmentos transmembranales, conocida como Orai1. La formación del complejo STIM1 y Orai1 permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio extracelular para el llenado de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  [11]. Así, orai1 es el canal encargado de permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular mediante su activación a través de STIM1.

La proteína STIM1 posee distintos dominios con diferentes funciones, el amino terminal posee mano EF que es responsable de censar el vaciamiento de calcio del RE ( $[\text{Ca}^{2+}] < 300 \mu\text{M}$ ) y un dominio SAM (*Sterile Alpha Motif*) el cual parece estar relacionado con la oligomerización que ocurre después del vaciamiento del RE (formación de punctas). Estos dominios residen en el lumen de RE, la porción citoplásmica de STIM1 está compuesta por un dominio ERM (interacción con microfilamentos), el cual parece estar relacionado con la asociación de STIM1 a canales TRPC (*transient receptor potential canonical channel*) y un dominio rico en Ser/Pro, asociado a la interacción con la proteína EB1 (*End-binding 1*), una proteína de unión a microtúbulos. En estudios recientes se demostró que STIM1 se mueve a lo largo del RE hasta que este se vacía lo que induce su disociación



de EB1 y su translocación hacia la membrana plasmática donde se oligomeriza y reorganiza formando punctas [7,8,11,40].

La región citosólica de STIM1 consta de tres dominios de hélices super enrolladas (*coiled-coil*). La región comprendida entre las hélices 2 (CC2) y 3 (CC3) se conoce como SOAR (*STIM-Orai activating region*), que es el fragmento mínimo de STIM1 requerido para la activación de Orai1 [40–42]. La primera hélice (CC1) interactúa directamente con CC2 para evitar el despliegue de SOAR, por lo que se le conoce como región inhibitoria (HI) [35,42].

### 1.2.2 Orai 1

La proteína Orai1 también conocida como CRACM1 es uno de los primeros miembros de una familia de canales, que no se relacionan estructuralmente con otros canales de calcio [43], diversas investigaciones identifican a este canal como responsable de la entrada de calcio activada por vaciamiento. Fue descubierto mediante estudios genéticos funcionales usando RNA de interferencia en células S2 de *Drosophila* y mediante el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (“Severe Combined Immune Deficiency”, SCID) [28,31]. Estos pacientes presentan un defecto en la función de canales CRAC [8,44].

En mamíferos la familia de canales Orai consta de tres proteínas homologas miembros (Orai1-3) cada uno de los tres miembros tiene un amino terminal citosólico, cuatro segmentos transmembranales unidos por dos bucles extracelulares y otro bucle intracelular, el extremo carboxilo terminal es citosólico [33,45,46]. Los tres miembros de la familia forman canales altamente selectivos a calcio [47,48] pero con cinéticas de activación e inactivación distintas. Las proteínas de la familia Orai pueden formar heteromultímeros de Orai1 y Orai3 que forman canales activados por ácido araquidónico o por leucotrieno C4 [49,50], sin embargo los canales activados por el vaciamiento de calcio del RE son obligadamente homooligómeros de Orai1 [27].

Orai1 se localiza en la membrana plasmática y funciona como un canal selectivo a  $\text{Ca}^{2+}$ , tiene 4 segmentos transmembranales (TM1-4) con los extremos amino y

carboxilo terminal en el espacio intracelular, Figura 3. Recientemente se obtuvo la estructura cristalográfica del canal, demostrándose que es un hexámero [51,52].

Cuando ocurre el vaciamiento del RE, STIM1 y Orai1 forman agregados macromoleculares, los cuales son necesarios para inducir la activación del flujo de calcio al interior de la célula. Otros elementos de estos macrocomplejos moleculares incluyen a SERCA y la proteína de unión a microtúbulos distales (“Microtubule End Binding Protein”, EB1) , además de lípidos como el colesterol, entre otros [7,53,54].

La sobreexpresión de STIM1 y Orai1 permite que estas dos proteínas se acoplen cuando ocurre el vaciamiento del RE, lo cual resulta en corrientes con propiedades biofísicas y farmacológicas similares a corrientes CRAC endógenas [8].

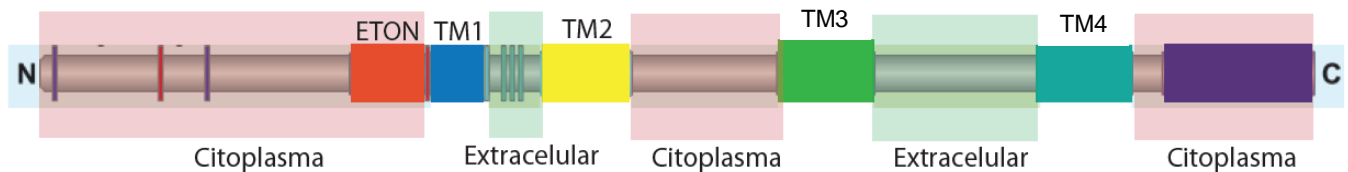


Figura 3. El canal operado por vaciamiento Orai1, posee cuatro cruces transmembranales (TM1-4), los extremos amino y carboxilo se encuentran en la región citoplásmica, el dominio ETON (extended TM1 N-terminal).

### 1.3 ¿Cómo se regulan respuestas distintas a la elevación de $Ca^{2+}$ intracelular?

Aún no se sabe con certeza cómo en procesos regulados por la elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular y esencialmente opuestos como la apoptosis y proliferación, la célula o tejido responde de manera específica. La diferencia en concentración de calcio puede ser clave para la discriminación de señales correspondientes a diferentes eventos celulares mediados por la elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular [5]. También se han descubierto cambios en la respuesta inducidos por proteínas que podrían estar influyendo en la manera en que estas proteínas interactúan y reconocen al

calcio. Estos cambios incluyen la asociación de estas proteínas en complejos macromoleculares o la interacción de proteínas efectoras con lípidos [45,55–57].

Actualmente es ampliamente aceptado que la especificidad y exactitud de la ejecución de muchos de los procesos regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  dependen de la precisión espacio/temporal de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de su localización [58], la cual puede estar restringida a microdominios membranales, como balsas lipídicas. Estas balsas contienen y agrupan canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y sus moduladores aislándolos del resto de la membrana plasmática y a la vez incrementando su densidad en microdominios de membrana, favoreciendo la interacción entre las proteínas ahí localizadas [30,57,59–62].

Así, los microdominios facilitan la comunicación celular proveyendo de un sitio adecuado para la agrupación de receptores y canales, además de acercar componentes celulares que previamente estaban aislados. La agrupación de los componentes de las rutas de flujo en estos dominios, permite la comunicación eficiente de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  con sus reguladores y efectores [57].

Estudios recientes demuestran que tanto Orai1, así como enzimas moduladas por calcio, como es el caso de la adenilato ciclasa 8 (AC8), se encuentran en balsas lipídicas y que la función de estas proteínas depende de su ubicación dentro de las mismas [7,30,55,57,59,63].

#### **1.4 Fisiología de los microdominios membranales, organizadoras de señales**

El concepto inicial de balsas lipídicas (*Lipid Raft Domain*, LRD) es el de pequeñas plataformas de naturaleza lipídica embebidas en la membrana plasmática, las cuales funcionan como centros organizadores de señales. Actualmente, estas regiones de la membrana plasmática son definidas como microdominios (10-200nm), que propician heterogeneidad lipídica en la membrana heterogéneos, altamente dinámicos, ricos en colesterol, PIP2 y esfingolípidos, bioquímicamente distintos al resto de la membrana. El enriquecimiento en estos lípidos le confiere al microdominio temperatura de transición diferente al del resto de la membrana y por lo tanto diferente nivel de organización entre lípidos incluyendo y excluyendo

proteínas de forma diferencial, estos dominios compartimentan procesos celulares como la SOCE.

La estabilidad de estos dominios es conferida por las interacciones proteína-proteína y/o lípido-proteína [64–67].

Se piensa que estas balsas están involucradas en diversos procesos celulares como la apoptosis, transducción de señales, infecciones virales, adhesión y migración celular, transmisión sináptica, organización de citoesqueleto y selección de proteínas en exocitosis y endocitosis [60,68]. Se sabe que muchas de estas funciones celulares son mediadas por señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que se ha propuesto que las balsas lipídicas regulan estos procesos facilitando el enriquecimiento de proteínas clave señalizadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  y controlando interacciones críticas entre las proteínas requeridas para generar, modular y regular señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  [7,69].

En estos dominios se ha encontrado que contienen proteínas de la SOCE como Orai1 y STIM1 [7,57,63]. Por otro lado nuestro grupo demostró que un mismo canal se acopla a mecanismos de activación diferentes, dependiendo de si se encuentra dentro o fuera de balsas lipídicas [70].

Las caveolas son un tipo de balsa membranal en forma de botella/omega (Fig. 4A), a diferencia de otros tipos de balsas membranales (Fig. 4B). Las caveolas tienen un tamaño aproximado de 50-100 nm, son ricas en colesterol y fosfolípidos (PtdSer y el fosfoinositido fosfatidilinositol (4,5)-difosfato [PtdIns(4,5) $P_2$ ]) [71]. Estas estructuras se presentan en distintos tipos celulares y se sabe que compartimentan numerosos procesos de señalización. Estos microdominios contienen en su estructura caveolina (Fig. 4C) de la cual existen tres isoformas (Cav 1-3) [60,72].

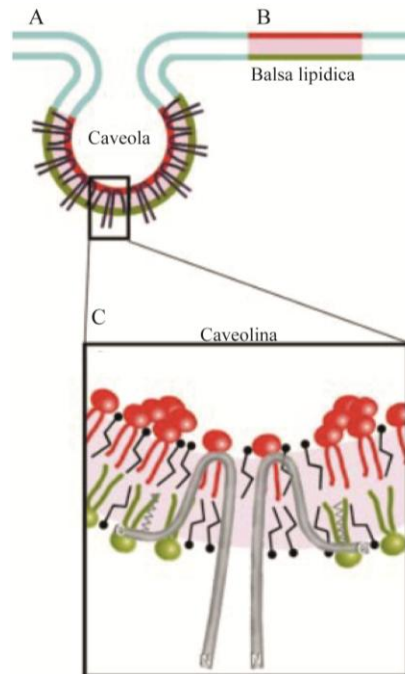


Figura 4. Balsas lipídicas planas y caveolae, la caveolina 1 principal componente de caveolae (gris). A. Caveola, B. balsa lipídica plana, C. aumento de una región de la caveola donde se muestra la caveolina 1. Modificado de Simons y col.

Las caveolinas delimitan la membrana plasmática brindando estabilidad a las invaginaciones y tiene un peso molecular aproximado de 21-24k Da (Fig.4). Poseen una región distintiva de andamiaje (dominios conservados de interacción a caveolina, 82-101 aa) que es esencial para la unión con diversas proteínas de señalización, también se sabe que las caveolinas, específicamente caveolina 1, unen y transportan colesterol [72,74,75].

Estas invaginaciones facilitan las interacciones entre proteínas, mediando la comunicación entre elementos membranales que de otra manera estarían separados. La relación entre las caveolas y la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  se sugirió hace más de 30 años; sin embargo, fue hasta hace poco tiempo que se obtuvieron las primeras evidencias directas de este fenómeno en células de músculo donde la sobreexpresión de caveolina aumento la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Mediante métodos inmunohistoquímicos se demostró la existencia de proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de estas estructuras [57]. La hipótesis es que las cavidades caveolares podrían facilitar la interacción de proteínas de la membrana

plasmática con proteínas de membranas internas como las de la membrana de RE [69].

Diversas publicaciones relacionan caveolina 1 (Cav1) con la SOCE [56,57,74,76], Cav1 se expresa ampliamente en diversos tejidos y tipos celulares. Contiene una región de andamiaje (82-101 aa) que regula la interacción con diversas proteínas de señalización, también tiene una región de anclaje a membrana. Las proteínas que se han asociado a Cav1 presentan modificaciones postraduccionales como isoprenilaciones y acilaciones como las flotilinas o la proteína Lyn [57,66,71]. Los heptámeros de Cav1 interactúan con proteínas denominadas cavininas (Cavin1-4) para formar caveolas, se predice que estas caveolas están formadas por entre 100 a 200 moléculas de Cav1. Existen agregados que contienen menor número de Cav1 (~15) que se ensamblan en la membrana para formar dominios planos más dinámicos que las caveolas [77].

Se han descrito otras regiones membranales de mayor tamaño que las balsas lipídicas, denominados “corrales” constituidos por “estacas y cercas” son definidos como regiones membranales de 40-500nm, estas regiones están formadas por membrana plasmática asociada a filamentos de actina (cercas) y proteínas transmembranales (estacas) ancladas al citoesqueleto [78].

## **2. Antecedentes**

Las balsas lipídicas modulan la SOCE de formas distintas, las cuales incluyen la formación de agregados de STIM1 en las uniones RE-MP (membrana plasmática) mediante microscopia de iluminación de onda evanescente (TIRF) [7,63,70]. En el 2011 se demostró que las balsas lipídicas son esenciales para la activación, pero no para el mantenimiento de la SOCE. Esto fue descubierto mediante la remoción de colesterol de la membrana usando  $\beta$ -metil ciclodextrina (M $\beta$ CD), alterando de esta manera la composición y estabilidad de las balsas lipídicas, este efecto se atribuye a la inhibición de la interacción entre STIM1 y Orai1, disminuyendo la SOCE. Estos autores relacionan la disminución de la SOCE con la falta de

interacción de STIM1 y Orai1 con los lípidos presentes en las balsas lipídicas [55,79–81]. En 2012 Gwozdz demostró en células HEK293, que la SOCE endógeno inducido usando tapsigargina (TG, fármaco que bloquea de manera selectiva a la SERCA, induciendo de esta forma el vaciamiento del RE) disminuye cuando se retira el colesterol de la membrana [80].

La disminución de la SOCE cuando se retira colesterol de la membrana usando M $\beta$ CD se atribuyó a un cambio de potencial de membrana, sin embargo no se tienen evidencias que demuestren que existe un cambio en el potencial de membrana [80].

Nuestro grupo ha demostrado mediante técnicas de microscopia como FRET y TIRF, que tanto el canal Orai1, como la adenilato ciclasa 8 dependiente de calcio se encuentran interactuando dentro de balsas lipídicas. Dicha interacción permite la modulación sincrónica de calcio y AMPc [7,63].

Hasta el momento no se sabe cómo la baja concentración de colesterol membranal (previa a la activación) se asocia a la disminución del SOCE, este abatimiento se ha relacionado con la presencia de los componentes de esta vía al interior de balsas lipídicas (cuyo componente principal es el colesterol). Sin embargo, no se ha descrito a qué se debe esta disminución, considerándose al momento, la relocalización celular del canal Orai1 (internalización), a una alteración en la conformación de estos canales o su interacción con lípidos, como el colesterol, como es el caso de algunos canales iónicos [82,83].

Se cuenta con antecedentes de estas dos posibilidades, por ejemplo el cambio en la actividad de canales iónicos al cambiar su localización celular, como es el caso de los TRPC, los cuales modifican su actividad si están dentro de microdominios o fuera de ellos [70,84].

En el 2015 Yeh and Parekh describieron dominios de interacción entre Cav1 y Orai1, así como una regulación directa de Cav1 a la SOCE mediante sitios de interacción específicos de Cav1 con el complejo STIM1-Orai1 incrementando su actividad. Estos autores sobreexpresaron Cav1 en células HEK293 y observaron

un aumento en la entrada de calcio mediada por SOCE [74]. Por otro lado se ha reportado que en células musculo liso de vía aérea la fracción de la membrana plasmática enriquecida de caveolae contiene diversas proteínas reguladoras de calcio como calmodulina y canales iónicos entre otras y que el silenciamiento de la expresión de Cav1 regula de forma negativa la SOCE [56,85].

Así mismo, se ha demostrado que varios componentes que regulan la SOCE interactúan en balsas lipídicas como el complejo Orai1-STIM1 [7,57,85]. Por otro lado se ha reportado que alterar las balsas (mediante la remoción de colesterol), resulta en la pérdida de asociación de varios de estos elementos reguladores de SOCE como la disminución de sobrelapamiento de la señal de Orai1 y balsas lipídicas [7,70]. Por otro lado, se ha reportado que el movimiento de Orai1 en la membrana ocurre de forma no browniana, es decir que no difunde libremente en la membrana plasmática sino que se mueve de forma anómala limitado por regiones membranales [86].

Al principio del doctorado, por medio de técnicas de microscopia confocal, demostré que el canal Orai1 sufre una relocalización, cambiando de la membrana al citoplasma, mediante endocitosis en respuesta a la reducción de colesterol membranal (tratamiento con M $\beta$ CD). Estos datos se presentarán en la sección de resultados y junto con los antecedentes presentados en la introducción me permiten postular las siguientes tres hipótesis de trabajo:

### **3. Hipótesis**

- 1) La disminución del colesterol membranal induce la internalización del canal Orai1.
- 2) La internalización del canal Orai1 desacopla a este último de STIM1, lo que impide que el vaciamiento de RE induzca la entrada de calcio (SOCE).
- 3) La disminución de colesterol membranal induce cambios en la velocidad de difusión de Orai1 en la membrana plasmática.



#### **4. Justificación**

La SOCE tiene una gran importancia en la mayoría de células eucariontes ya que asegura el oportuno llenado de los almacenes de calcio intracelular, el cual es necesario para mantener funcional a la célula. La SOCE disfuncional se ha relacionado con diferentes tipos de patologías humanas como inmunodeficiencia primaria, distrofia de Duchenne, neurofibromatosis, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, la inmunodeficiencia combinada severa (*SCID*), pancreatitis aguda y Alzheimer [18]. También se ha asociado con el desarrollo de afecciones como la hipertrofia cardíaca [44].

Por otro lado, el colesterol además de ser un componente esencial de membranas de la mayoría de los eucariontes, en donde se distribuye de manera ordenada, es hoy en día un grave problema de salud pública cuando sus niveles en suero sanguíneo son demasiado elevados [87]. Actualmente se estima que alrededor del 43% de la población estadounidense mayor de 20 años tiene una concentración igual o mayor a 200mg/dL (se consideran niveles de riesgo a partir de esta cifra) [88]. Una concentración alta de colesterol está asociada con enfermedades cardíacas como arterosclerosis, hipertensión, accidentes cerebrovasculares, etc. Se sabe que una baja concentración de colesterol abate la SOCE, sin embargo, se desconocen los mecanismos que ocasionan este decremento, así como los efectos de altas concentraciones de colesterol en la SOCE [55,80].

#### **5. Objetivo general**

Evaluar los efectos de la disminución de colesterol membranal en la movilidad en la membrana y localización del canal de calcio Orai1, su activador STIM1, así como su repercusión en la SOCE.

##### **5.1 Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto de la disminución de colesterol membranal en la función de la SOCE

- Disminuir los niveles de colesterol de la membrana celular y analizar el efecto en la movilidad en la membrana y localización de la proteína Orai1
- Evaluar el efecto de la disminución de colesterol membranaral en la interacción entre Orai1 y dominios membranales ricos en colesterol

## **6. Metodología**

### **6.1 Cultivo celular y transfecciones**

Se usaron células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 50 µg/ml de una mezcla de penicilina/estreptomicina y mantenidas a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Las transfecciones transitorias se hicieron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las células fueron sembradas al 80 % de confluencia. Se transfectaron los plásmidos mCherry/GFP-Orai1, que fue un generoso regalo de S. Muallem, c-Myc-Orai1, Cav1-GFP y Kaede fueron comprados en Addgene. La expresión de todos los genes estuvo bajo el promotor CMV (citomegalovirus).

### **6.2 Manipulación y cuantificación de colesterol**

Las células se lavaron dos veces usando solución Krebs-Ringer sin calcio (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, 11 mM glucosa y se ajusto el pH a 7.4 con NaOH). Para todos los experimentos la remoción de colesterol se hizo incubando las células durante 40 min en una solución 10mM de  $\beta$ -Methyl Cyclodextrin, M $\beta$ CD (Invitrogen) a temperatura ambiente (TA). Para los experimentos en donde se recargaron las células con colesterol, primero se trataron con M $\beta$ CD 10 mM durante 40 min TA, posteriormente se incubaron con 10 mM de M $\beta$ CD cargada con colesterol, 40 mg de colesterol/gr (Sigma-Aldrich) durante 40 min a TA. Los controles de cada grupo se incubaron solamente con el vehículo de M $\beta$ CD y M $\beta$ CD cargada con colesterol (solución Krebs-Ringer sin calcio), 40 min a TA.

Las células fueron lisadas usando una solución de Tritón 10 % y SDS 1 % y coctel inhibidor de proteasas (Roche) en PBS. La mitad del volumen se utilizó para cuantificar la concentración de proteína total usando el kit de BCA (Thermo), la otra mitad se usó para cuantificar el contenido de colesterol usando Amplex® Red cholesterol assay kit (Molecular Probes) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y analizadas en un lector de placas *Synergy Mx* (BioTek Instruments, Inc).

### **6.3 Mediciones de calcio**

Las células fueron sembradas en cubreobjetos redondos de 25 mm 24 h antes de la transfección. Las células fueron lavadas una vez con solución Krebs-Ringer libre de calcio, después se incubaron durante 30 min a 27 °C en una solución de FLUO4-AM 2 µM (Molecular Probes). Al finalizar esta incubación, las células se lavaron con solución Krebs-Ringer y se incubaron 15 min a TA. A partir de ese momento las células se mantuvieron en solución Krebs-Ringer libre de calcio y con EGTA agregado (500 µM) y en obscuridad.

Una vez que el experimento comenzó el retículo endoplásmico se vació usando tapsigargina (TG) a una concentración final de 5 µM (Fig.6A, primer pico), al minuto 7 se añadió una solución de calcio a una concentración final de 1.8 mM (Fig.6A, segundo pico). Las dinámicas de calcio se midieron en células individuales (alrededor de 20 por cubreobjetos) utilizando un microscopio Olympus® IX81 confocal invertido equipado con un objetivo 40x de inmersión en aceite, NA 1.30, un sistema de iluminación MT-20, filtro de excitación 484/25, y filtro de emisión 520nm/40 y una cámara EMCCD iXon-897 (Andor Technology South Windsor, CT, USA). Las imágenes adquiridas fueron analizadas usando el software del microscopio Olympus Cell<sup>^</sup>R.

## **6.4 Internalización de Orai1**

### **6.4.1 Microscopia confocal**

Los experimentos de internalización de Orai1-mCherry se hicieron usando un microscopio confocal Olympus® Fluoview FV10i, equipado con un objetivo 60x NA 1.35 de inmersión en aceite. Las imágenes fueron analizadas usando el software del microscopio, FV10ASW.

Las células se sembraron en cubreobjetos redondos de 25 mm y se transfectaron usando mCherry-Orai1; las mediciones se hicieron 48 h después de la transfección. Después de colocar la muestra en el microscopio, añadimos aglutinina de trigo (WGA) conjugada con Alexa Fluor 488 Fluor® (Thermo Fisher scientific) a una concentración final de 5 µg/ml, WGA se une de manera selectiva a residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico presentes en la membrana plasmática. Este compuesto fue usado como marcador de la membrana plasmática, no se internaliza cuando se disminuye el colesterol membranal o después de 60 min en condiciones basales.

Primero se adquirió toda la célula en rebanadas ópticas en el eje z, estas imágenes representan el grupo basal, después se colocó una solución de MβCD a una concentración final de 10 mM, se incubó 45 min a TA. Posteriormente la misma célula se adquirió en z, estas imágenes representan el grupo con bajo colesterol membranal (MβCD).

### **6.4.2 Microscopia de iluminación de un solo plano (*Single Plane Illumination Microscopy, SPIM*).**

Todas las mediciones fueron hechas usando microscopio Olympus® IX71 con una iluminación selectiva inclinada y una cámara Photometrics Evolve, las imágenes fueron adquiridas a una velocidad de 100 cuadros/s con un tamaño de pixel de 142 nm. Las células se sembraron en tiras de vidrio previo a la transfección con GFP-Orai1 para permitir las observaciones. Las células se incubaron con una solución de MβCD 10 mM, 40 min a TA o incubadas en Krebs-Ringer con calcio (1.8 mM) 40 min en TA. Se tomaron fotos en el mismo plano de z en periodos

determinados de tiempo a una velocidad de 100 cuadros/s. Las imágenes fueron analizadas usando *Image J*, se marcó una región de interés (ROI) delimitando el citoplasma y se midió la fluorescencia promedio de 3 puntos en el tiempo.

#### **6.4.3 Determinación de la internalización de Orai1 mediante cuantificación de Orai1 presente en la membrana**

Se utilizaron células HEK293 tratadas o no con M $\beta$ CD, a continuación, se marcaron las proteínas presentes en la membrana celular usando el kit de biotilación de Pierce, "*Cell surface protein isolation kit*", cat 89881, con algunas modificaciones al protocolo. Brevemente, las proteínas de membrana son marcadas con biotina, después las células son lisadas usando un detergente suave y las proteínas marcadas son aisladas usando avidina acoplada a perlas de agarosa. Las proteínas aisladas son eluidas usando solución Laemli con DTT.

Como paso previo al aislamiento de proteínas marcadas con biotina, la concentración de Orai1 en el lisado total de cada grupo se cuantificó mediante WB (normalización). Después de esta cuantificación, cantidades iguales de Orai1 contenida en lisados totales se incubó con la resina acoplada a avidina para aislar las proteínas marcadas previamente. Se identificó la concentración de Orai1 marcado por medio de WB utilizando un anticuerpo específico para Orai1 (Abcam, ab59330) o bien un anticuerpo anti GFP (Clontech, 632592).

#### **6.5 Identificación de proteínas mediante Western Blot**

Se usaron geles de acrilamida al 12 %, se corrieron a 75 V hasta que la muestra abandonaba el concentrador, después se subió a 90 V hasta que salió el frente de corrida. La transferencia se realizó utilizando membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda a 120 V durante 1 h y 20 min. Las membranas se bloquearon 30 min usando leche descremada al 10 % en TBS, después se incubaban con el anticuerpo primario ON en agitación a 4C°. Al día siguiente se realizaron 6 lavados de 10 min en agitación a 4C°, después de los lavados las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario disuelto en una solución de leche descremada al 0.5% en TBS durante 2 h a temperatura ambiente en agitación, seguida de 6 lavados de 10 min con TBS. Las membranas se revelaron usando C-

Digit Blot scanner (LI-COR) y se analizaron las bandas usando el software del analizador, Image Studio.

### ***6.6 Ensayos de medición de transferencia de energía (Förster resonance Energy Transfer, FRET)***

Las células se sembraron en cubreobjetos redondos de 25mm y se cotransfectaron con Cav1-GFP y mCherry-Orai1.

#### ***6.6.1 FRET en modalidad emisión sensibilizada***

Las imágenes se tomaron usando un microscopio invertido IX81 Olympus® equipado con un objetivo 60X 1.42 NA y un sistema de iluminación MT-20 y una cámara EMCCD iXon-897 (Andor Technology South Windsor, CT, USA).

Los experimentos de FRET consisten de imágenes en crudo en tres canales, canal D (GFP) con excitación a 470nm y recolectando la emisión a 520nm con un bandpass de 40nm, canal A (mCherry) con excitación a 520nm y emisión colectada a 605nm con un bandpass de 70nm y un canal de FRET que consiste de excitación en 470nm y emisión colectada en 605nm con bandpass de 70.

La eficiencia aparente de FRET ( $E_{app}$ ) fue calculada usando las imágenes sin tratar. Primero se calculó el sangrado espectral (SBT) para el donador y el aceptor, usando imágenes de células expresando el donador o el aceptor con los tres Canals D, A y F. El SBT fue calculado usando la relación de la señal de los canales F y D ( $F_d/D_d$ ) de células transfectadas solamente con Cav1-GFP, para células transfectadas con mCherry-Orai1 el SBT se calculó usando los canales F y A ( $F_a/A_a$ ).

Se calculó un FRET en bruto sustrayendo el SBT calculado al donador y aceptor al canal de FRET ( $F_{da}$ ) de células cotransfectadas. Estos valores de FRET se normalizaron (NFRET) usando la señal del canal del donador ( $D_{da}$ ) para eliminar variaciones dependientes del nivel de expresión. Finalmente,  $E_{app}$  se calculó usando la relación de NFRET entre NFRET mas el factor G. Usamos un valor de G de 1.0. Todas las imágenes fueron analizadas pixel por pixel utilizando Image J con instrucciones hechas expresamente para este análisis. Para eliminar artefactos provenientes de la sobreexpresión de proteínas, usamos solamente

imágenes que cumplieran con una relación de  $1.0 \pm 0.3$  entre la señal del donador y del aceptor (Dda/Ada)= $1.0 \pm 0$ .

### **6.7 Determinación de la interacción entre Orai1 y Cav1 mediante coinmunoprecipitación (CoIP)**

Se usaron células HEK293 cotransfectadas con GFP-Cav1 y c-Myc Orai1. Se utilizó el protocolo de Pankow et al [89] con algunas modificaciones. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS a temperatura ambiente, después se lisaron utilizando solución de lisis TNI frío con inhibidor de proteasas y 0.5 % de Igepal, 1.5 ml por cada 15 cm<sup>2</sup> de placa de cultivo, la reacción se incubó en agitación, 30 min a 4°C, las células se rasparon de la placa de cultivo y se sonicaron usando un sonicador de baño frío, a 55kHz durante 3 min. Las muestras se centrifugaron durante 40 min, a 4 °C y 18000 x g, el sobrenadante se incubó con el anticuerpo anti c-myc (Thermo Fisher Scientific MA1-21316), previamente acoplado a la resina, ON, en agitación a 4°C. La reacción se centrifugó durante 5 min, 500x g a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las perlas se lavaron 3 veces con 100ul de solución de lisis TNI, centrifugando 3 min a 500 x g, 4 °C, se retiró el sobrenadante y las perlas se congelaron ON a -80°C. Las proteínas se eluyeron usando solución de elución (0.2 M glicina, pH 2.3/0.5 % Igepal) en una proporción 4:10, respecto a las perlas, incubando 30 min a 37°C, 2 veces. Los volúmenes se juntaron y se les añadió Tris pH 8 en una proporción 1:1. Se identificaron las proteínas mediante WB utilizando el anticuerpo anti c-myc y el anticuerpo anti Cav1 (Abcam ,ab2910).

### **6.8 Análisis de los efectos de bajos niveles de colesterol membranar en la dinámica de Orai1**

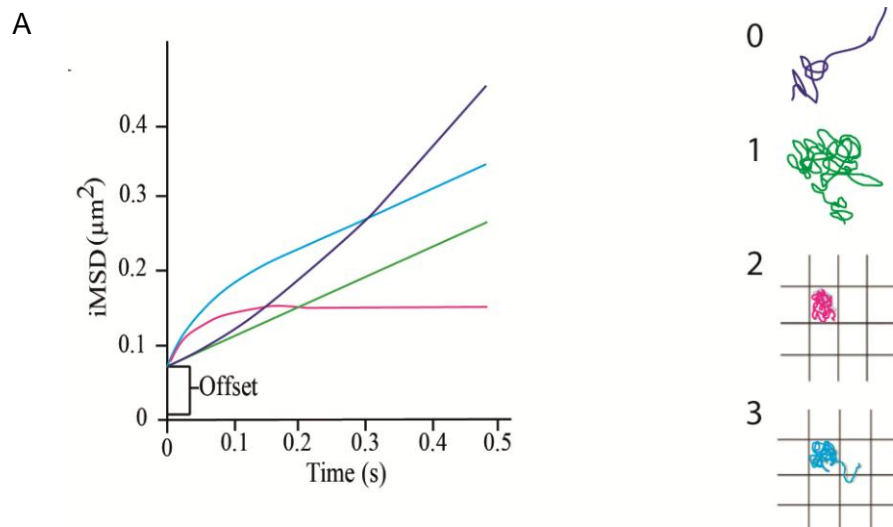
#### **6.8.1 Espectroscopia de correlación espacio-temporal (iMSD)**

Se hicieron análisis de *image mean square displacement* (iMSD) en células HEK293 transfectadas con Orai1-dsRed/GFP adquiriendo las imágenes en modo TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) en condiciones basales de colesterol (sin tratamiento con M $\beta$ CD) y en células con bajos niveles de colesterol (tratamiento con M $\beta$ CD) con SOCE activado (usando TG, 5 $\mu$ M) y sin activar. Previo a la adquisición de la secuencia de imágenes las células fueron tratadas para remover el colesterol membranar (M $\beta$ CD 10mM), en el caso de las células

con SOCE activado, las células se lavaron 2 veces con Krebs-Ringer sin calcio y se incubaron 5min con una solución conteniendo TG al 5  $\mu\text{M}$  en Krebs-Ringer sin calcio.

A continuación, se obtuvieron secuencias de imágenes de la membrana de células transfectadas con las proteínas fluorescentes aproximadamente 1500 cuadros, 50cuadros/s, tamaño de pixel: 1x0.18, 2x0.36.

En esta secuencia de imágenes la función de autocorrelación espacio-temporal de las fluctuaciones de fluorescencia en cada pixel y se calcula usando incrementos espaciales y temporales. El incremento mínimo está definido por el tamaño del pixel y el tiempo de adquisición entre cada imagen (*delay time*) [90–93]. La Figura 5 muestra ejemplos de las curvas obtenidas.





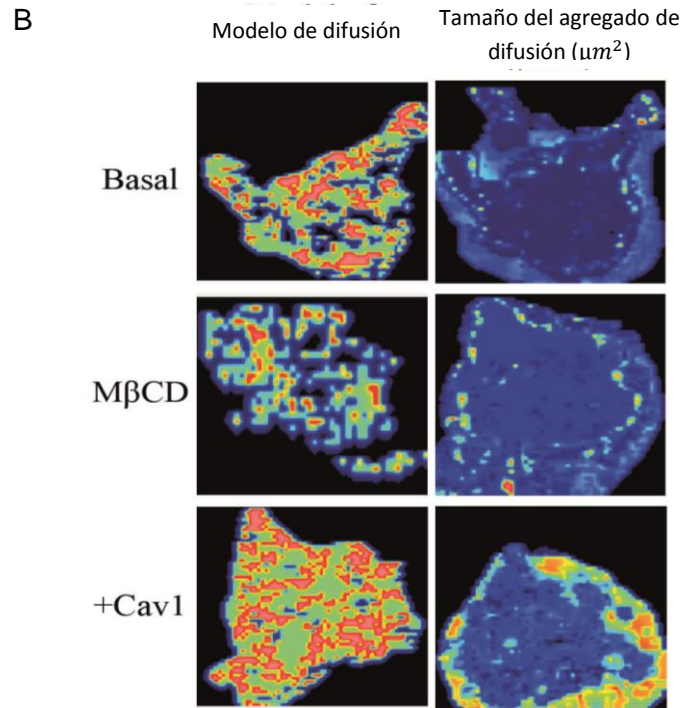


Figura 5. Espectroscopia de correlación espacio-temporal (iMSD) A. Ejemplos de curvas obtenidas mediante iMSD, B. Imagen representativa de distribución de los modelos de difusión y tamaño del agregado en la membrana de células sobreexpresando mCherry-Orai1. 0: movimiento dirigido, 1: movimiento al azar, 2: movimiento confinado, 3: movimiento dentro y fuera de confinamiento.

Nótese que el modelo 3 siempre será mejor que el modelo 1 y 2 ya que incluye a estos últimos. Así que se presenta el problema de ordenar y estimar que modelo es mejor con respecto del otro, para este propósito se usa el coeficiente de correlación del ajuste. Se comienza con el modelo de difusión, el cual se asume por default, si el modelo confinado arroja un mejor valor de correlación (el más alto) por lo menos 0.001, se acepta el modelo confinado de difusión, entonces el modelo completo (combinado) se prueba, este modelo es aceptado si el valor de la correlación es mejor por al menos 0.001 [93]. De este análisis se obtienen los siguientes parámetros:

- a) Modelo de difusión
- b) Tamaño del confinamiento
- c) Tamaño de la partícula

Estos valores fueron calculados utilizando el promedio de los distintos campos analizados por célula, según los mapas obtenidos (Fig. 5B).

### 6. 9 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados usando una prueba t de Student, de dos colas, no pareada (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. La significancia se representa de la siguiente manera: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  o \*  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados

Existen evidencias indicando que la SOCE disminuye en condiciones de bajo colesterol membranal, cuando la remoción de colesterol se hace previo a la activación de la SOCE [55,79,80]. Para confirmar estos resultados se realizaron mediciones de calcio usando células HEK293 en condiciones basales de colesterol (negro), con un tratamiento previo con 10mM M $\beta$ CD durante 45min (rojo) y con recuperación de colesterol usando M $\beta$ CD cargada con colesterol (azul) (Fig.6A).

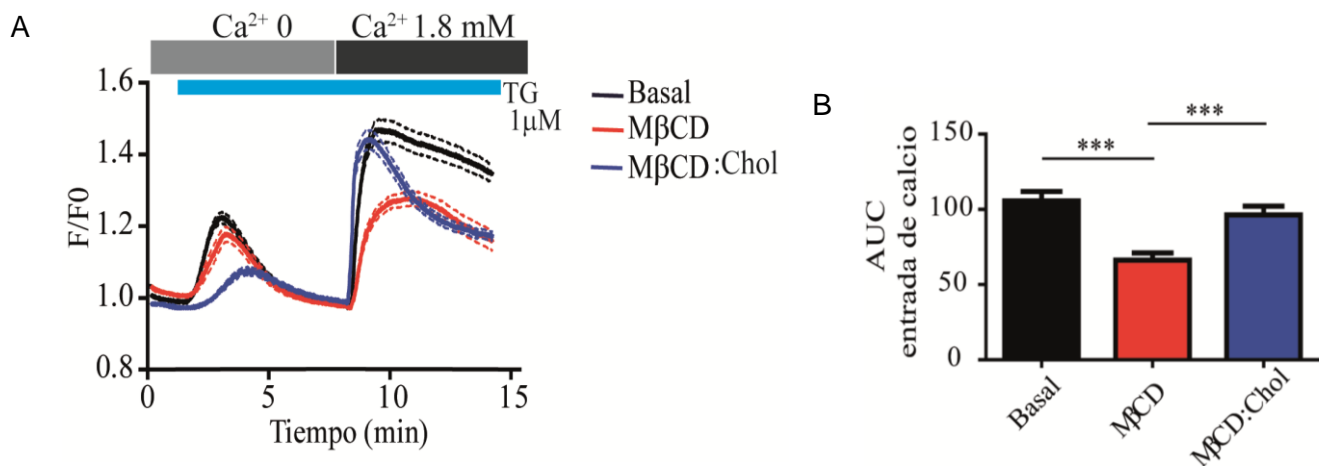


Figura 6. La baja concentración de colesterol disminuye la SOCE. A. Mediciones de SOCE. B. Área bajo la curva de la entrada de calcio inducida por TG. Negro: células en condiciones basales de colesterol, rojo: células tratadas con M $\beta$ CD, azul: células tratadas

con M $\beta$ CD cargada con colesterol.  $n \geq 20$  células en experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar. \*\*\* $p < 0.001$ .

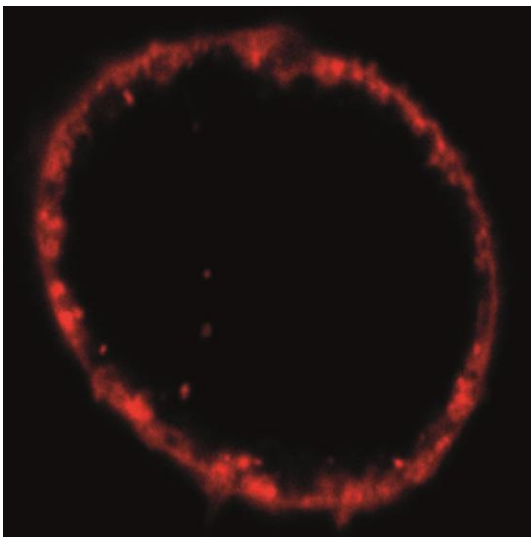
La disminución de colesterol reduce la entrada de calcio mediada por vaciamiento, como se puede observar en la figura 6B, mientras que la recarga de colesterol membranal recupera la SOCE.

### **7.1 Orai1 se internaliza cuando la concentración de colesterol membranal es baja**

Un posible mecanismo para explicar los efectos de la concentración de colesterol en la SOCE puede ser un bajo número de canales de calcio activados por SOCE presentes en la membrana plasmática. La internalización de estos canales puede ser inducida por la baja en colesterol de la membrana como se ha reportado para receptores de acetilcolina [94]; decidimos explorar esta posibilidad utilizando microscopia de fluorescencia.

El primer paso que tomé fue realizar mediciones de cambio de localización de Orai1 utilizando el microscopio confocal y células HEK293 transfectadas con dsRed-Orai1 (Fig.7), con una eficiencia de transfección del 80%. Observé un cambio en la localización de Orai1 al final de la incubación con M $\beta$ CD (Fig. 7B).

A



B

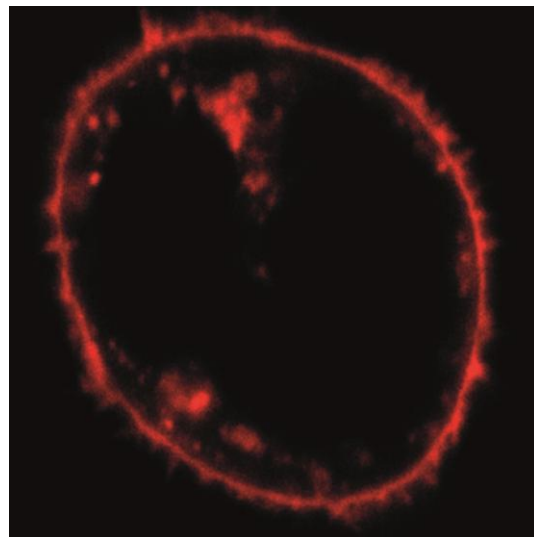
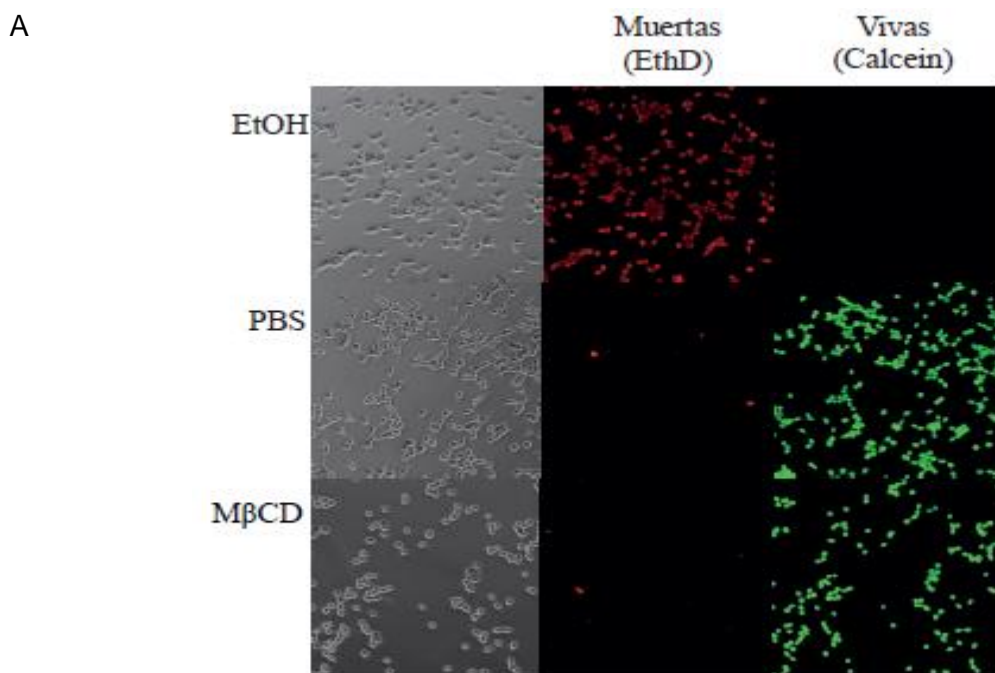


Figura 7. Microfotografía de células HEK293 expresando dsRED-Orai1. A. Localización de Orai1 antes del tratamiento con M $\beta$ CD B. Relocalización de Orai1 al citoplasma, después de 45 min de incubación con M $\beta$ CD.

Después de observar que Orai1 se internaliza (Fig.7) al disminuir el colesterol membranal, se corroboró que este efecto no fuera debido a muerte de la célula asociada al tratamiento, por lo que se midió viabilidad celular, los resultados de estas mediciones se presentan en la figura 8, las células vivas disminuyeron solamente 10% en comparación con las células incubadas con PBS (Fig. 8B).

Además de medir la viabilidad celular, también se midió la cantidad de colesterol que se remueve de la membrana plasmática con el tratamiento con 10 mM M $\beta$ CD (Fig.9), este tratamiento disminuye alrededor del 50% del colesterol, también se comparó el contenido de colesterol en células con recarga de colesterol con diferentes concentraciones de M $\beta$ CD cargada con colesterol (5, 10 y 15 mM), este tratamiento aumentó la concentración del colesterol celular.



B

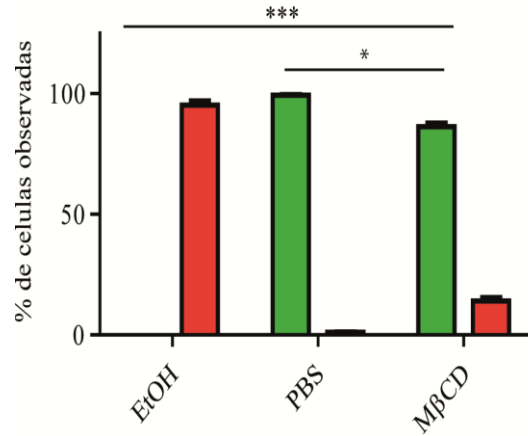


Figura 8. Cuantificación de viabilidad celular. A. de arriba abajo: EtOH, células tratadas con etanol, PBS, células tratadas con PBS, células tratadas 45min con una solución 10mM de MβCD B. porcentaje de células vivas o muertas. Células muertas (rojo), células vivas (verde). n≥5 experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar. p < 0.001 o p < 0.05.

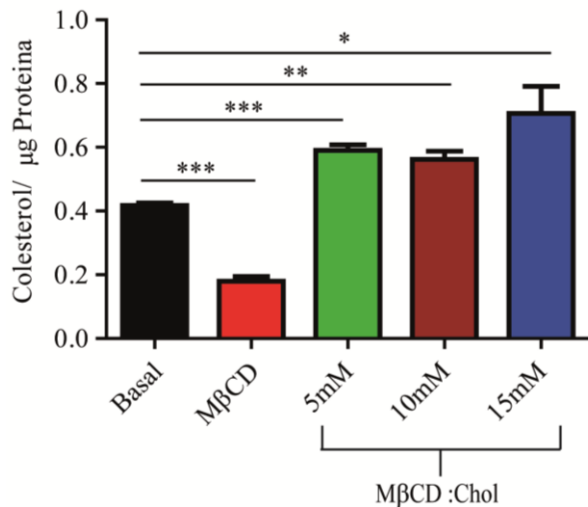
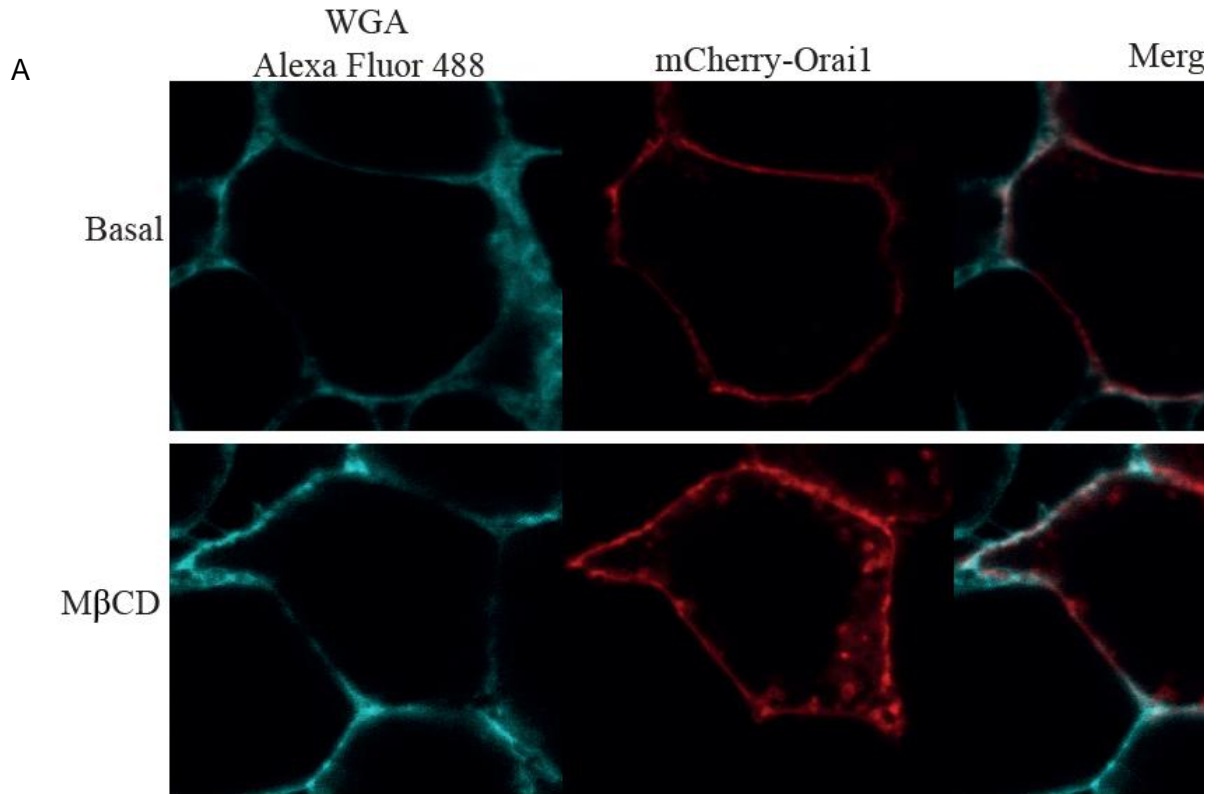


Figura 9. Cuantificación de colesterol en células HEK293 con colesterol basal (negro) y después del tratamiento durante 45min con 10mM MβCD (rojo). n=5 experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar. p < 0.001, \*\* p < 0.01 o \* p < 0.05.

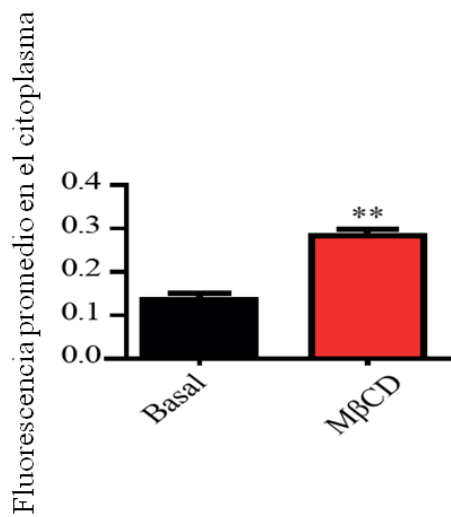
Una vez que se confirmó que los efectos de la disminución de colesterol en la relocalización de Orai1 no se debían a la muerte de las células, el siguiente paso fue confirmar que las mediciones de Orai1 relocalizado se hicieran solamente en el citoplasma de las células, para lo cual, usamos un marcador específico de membrana plasmática (Alexa fluor 488).

Este marcador se une solamente a la membrana plasmática y no se internaliza después del tratamiento con MβCD, de esta manera el ROI para medir la internalización de Orai1 se dibujó evitando las zonas marcadas como membrana

plasmática (Fig.10). Se confirmó la relocalización citosólica de la proteína dsRED-Orai1 a bajas concentraciones de colesterol membranar, lo que podría asociarse a la disminución de la SOCE en condiciones de bajo colesterol membranar.



B



C

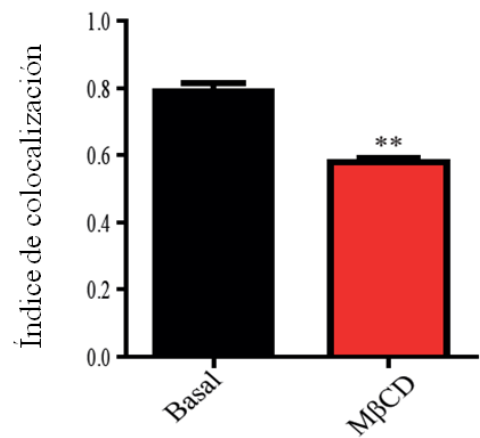


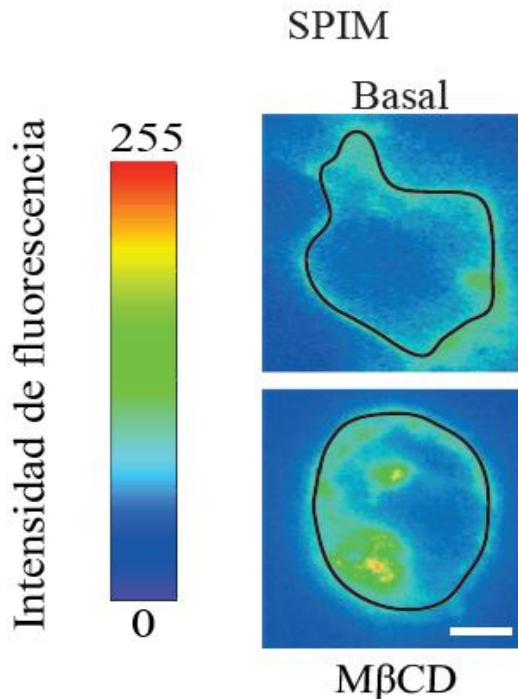
Figura 10. Mediciones de internalización de Orai1 en condiciones de colesterol membranar bajo usando microscopia confocal. A. Microfotografía de células HEK293 sobreexpresando dsRED-Orai1. Panel de arriba, células en condiciones basales de colesterol, paneles de abajo: células tratadas con 10mM M $\beta$ CD, 45min. De izquierda a derecha: células con marcador de membrana (azul), células sobreexpresando dsRed-Orai1 (rojo), merge de ambos canales. B. Mediciones de fluorescencia en citoplasma en células en condiciones basales (negro) y con bajo colesterol membranar (rojo). C. mediciones de colocalización entre Orai1 y marcador de membrana en células en condiciones basales (negro) y con bajo colesterol membranar (rojo). n $\geq$ 20 experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar. \*\* p < 0.01

Esta internalización se evaluó en células HEK293, utilizando técnicas de microscopia confocal. (Fig 10).

La fluorescencia en el citoplasma en el canal de dsRed-Orai1 es 2 veces mayor en las células con bajos niveles de colesterol membranar (Fig.10B) comparada con la fluorescencia en citoplasma de las células con niveles basales de colesterol membranar. Además, el índice de colocalización entre la señal del marcador de membrana (azul) y la señal de dsRed-Orai1 disminuyó significativamente comparado con células en condiciones basales.

Para asegurar que la señal de fluorescencia no tuviera interferencia de la señal proveniente de otros planos en z, se utilizó microscopía de iluminación en un solo plano (SPIM) para medir el cambio de fluorescencia en el citoplasma eliminando el ruido proveniente de otros planos (Fig.11).

A



B

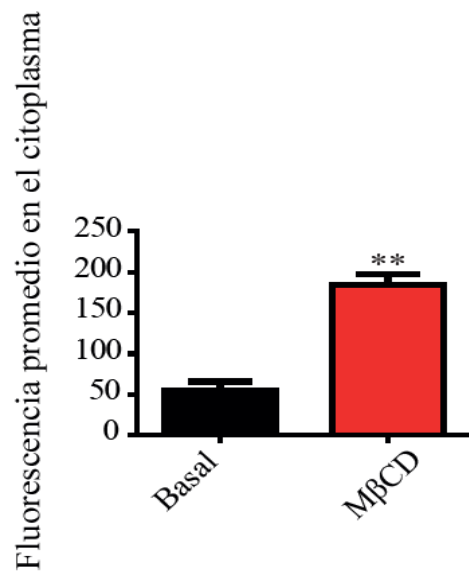


Figura 11. Mediciones de internalización de Orai1 en condiciones de colesterol membranar bajo usando SPIM. A. Microfotografía de células HEK293 sobreexpresando dsRED-Orai1. Panel de arriba, células en condiciones basales de colesterol, panel de abajo: células tratadas con 10mM MβCD, 45min. La imagen e presenta en escala de intensidad de fluorescencia. B. Mediciones de fluorescencia en citoplasma en células en condiciones basales (negro) y con bajo colesterol membranar (rojo).  $n \geq 20$  células. Barras de error: desviación estándar. \*\*  $p < 0.01$ .

La fluorescencia en el citoplasma de las células tratadas con MβCD fue 3 veces mayor que en las células en estado basal (Fig.11 A y B).

Para confirmar estos resultados se marcó las proteínas membranales en células con y sin tratamiento de MβCD y se midió la cantidad de Orai1 endógeno (Fig.12) presente en la membrana de cada grupo.



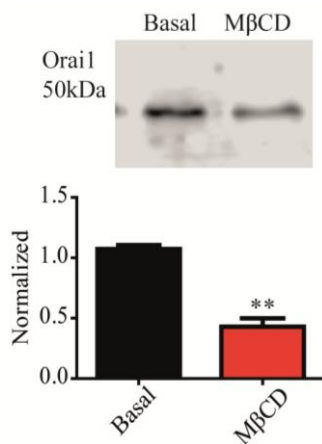
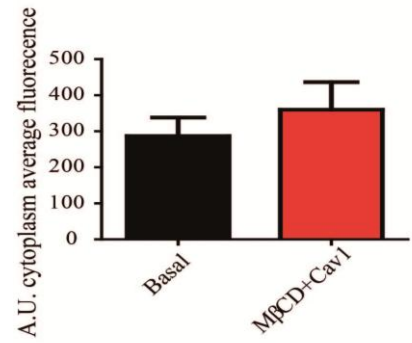
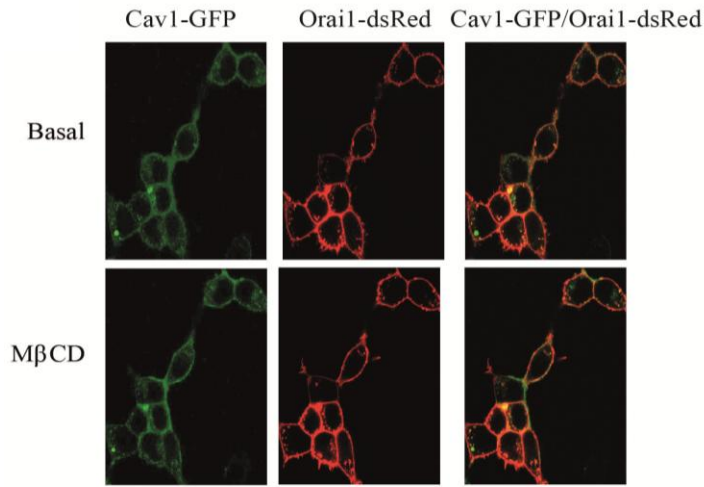


Figura 12. La concentración membranar de Orai1 endógeno disminuye en condiciones bajas de colesterol. Arriba: WB contra Orai1 en condiciones basales (izquierda) y con bajo colesterol (derecha). Abajo: cuantificación de la señal de Orai1 con respecto a la concentración en las células con concentración basal. Negro: señal de Orai1 en células con concentración basal de colesterol, rojo: señal de Orai1 en células con bajo colesterol membranar.  $n \geq 10$  ensayos independientes de biotilación para cada grupo. Barras de error: desviación estándar.  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  o  $p < 0.05$ .

Estos resultados confirmaron que en condiciones de bajo colesterol membranar Orai1 se internaliza, la concentración de Orai1 en la membrana de células con bajo colesterol membranar es la mitad de la concentración de Orai1 en la membrana de células en estado basal (Fig.12 abajo), estos resultados son consistentes con la baja en la entrada de calcio mediada por SOCE (Fig. 6). La concentración total de de Orai1 no fue medida.

Se realizaron transfecciones usando Caveolina-GFP y dsRed-Orai1 Fig.13A. No se observó aumento en la fluorescencia en el citoplasma debida a Orai1 cuando se disminuyó el colesterol membranar (Fig.13A-B). Estos resultados nos sugieren que la interacción de Orai1 con Cav1 es suficiente para eliminar el efecto de la reducción de colesterol membranar sobre Orai1 inhibiendo así su internalización (Fig. 13B), tampoco se observó la internalización de Cav1. Estos resultados también nos indican que la internalización de Orai1 en condiciones de bajo colesterol membranar no ocurre por la vía de caveolina.

A



C

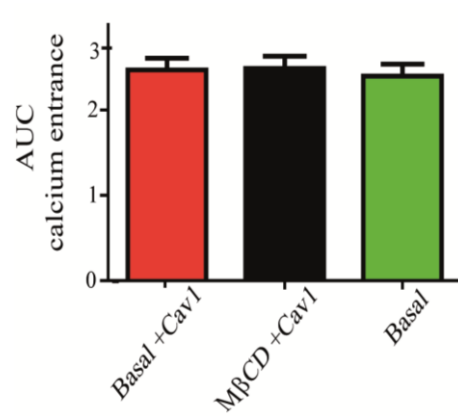
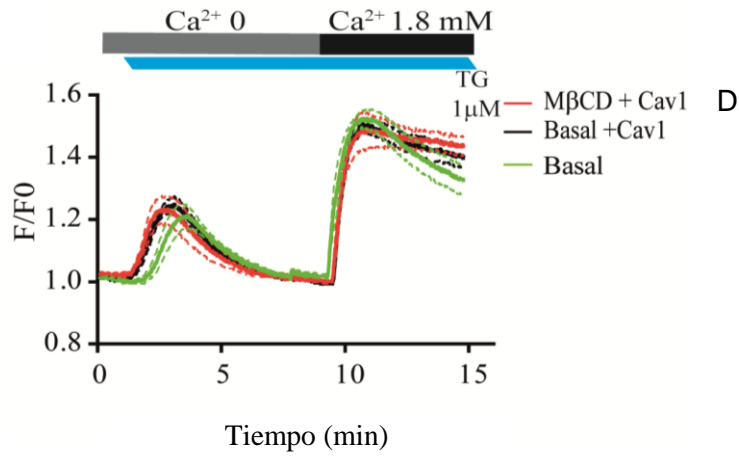


Figura 13. La sobreexpresión de Cav1 inhibe los efectos del bajo colesterol en la SOCE. A. Células HEK293 sobreexpresando dsRed-Orai1 y Cav1-GFP. B. Mediciones de fluorescencia en citoplasma en células en condiciones basales (negro) y con bajo colesterol membranar (rojo) C. Mediciones de SOCE. D. Área bajo la curva de la entrada de calcio inducida por TG. Negro: células en condiciones basales de colesterol, rojo: células tratadas con M $\beta$ CD. n $\geq$ 20 células en experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar.

Se realizaron mediciones de calcio en células que sobreexpresan Cav1-GFP, estas mediciones mostraron que el efecto sobre Orai1 de la reducción de colesterol se abate en estas condiciones (Fig.13 C y D).

Para confirmar los resultados obtenidos con microscopia confocal, se marcaron las proteínas membranales en células sobreexpresando mCherry-Orai1 y Cav1-GFP con y sin tratamiento de M $\beta$ CD y se midió la cantidad de Orai1 presente en la membrana de cada grupo (Fig.14); se encontró que la cantidad de Orai1 presente en la membrana no se afecta por la concentración de colesterol membranar cuando Cav1 se sobreexpresa.

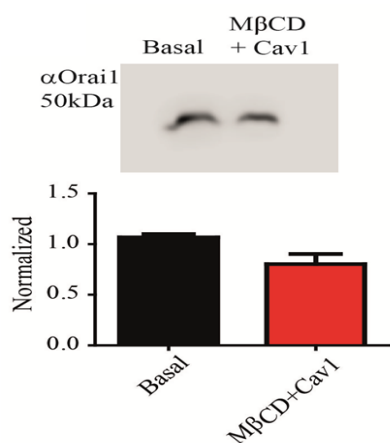
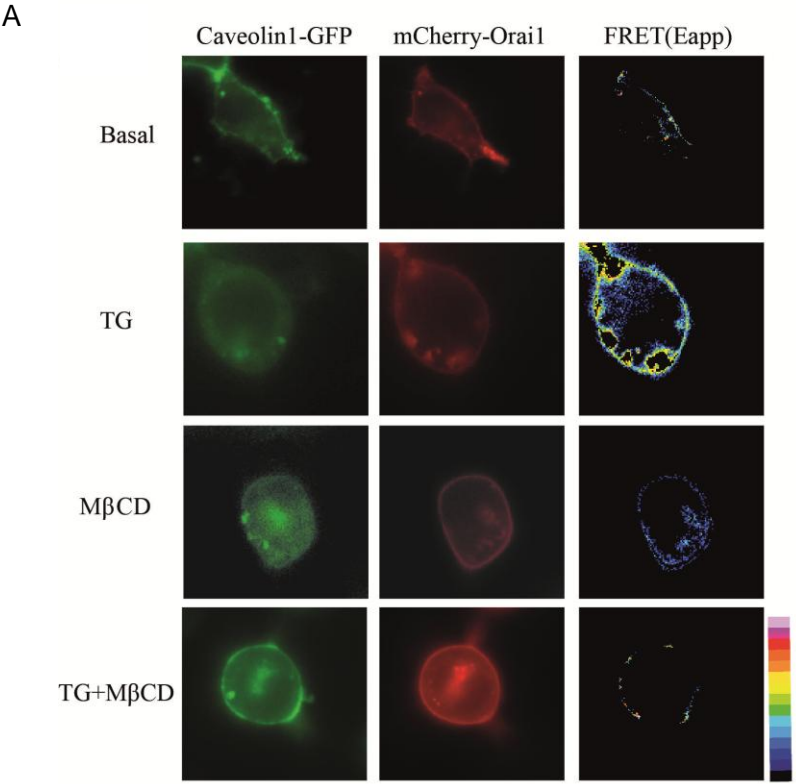


Figura 14. La concentración membranar de Orai1 no disminuye en condiciones de bajo colesterol membranar cuando Cav1-GFP se sobreexpresa. Arriba: WB contra Orai1 en condiciones basales (izquierda) y con bajo colesterol (derecha). Abajo: cuantificación de la señal de Orai1 con respecto a la concentración en las células con concentración basal. Negro: señal de Orai1 en células con concentración basal de colesterol, rojo: señal de Orai1 en células con bajo colesterol membranar. n $\geq$ 10 ensayos independientes de biotilación para cada grupo. Barras de error: desviación estándar.

## 7.2 Interacción entre Orai1 y Cav1

Después de que se midieron los efectos de la sobreexpresión de Cav1 en la SOCE y la internalización de Orai1, se decidió profundizar en la interacción entre

Orai1 y Cav1; para esto se realizó un análisis de FRET y posteriormente ensayos de coinmunoprecipitación entre Orai1 y Cav1.



B

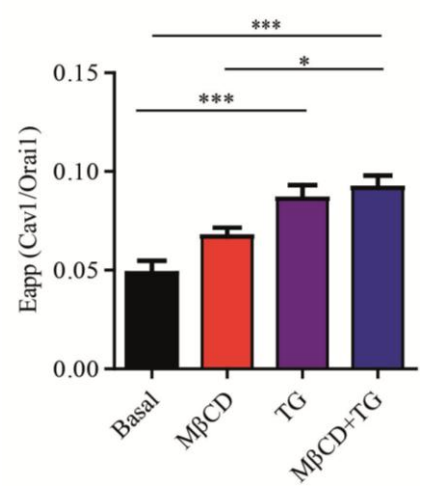


Figura 15. Medición de FRET entre Cav1-GFP y mCherry-Orai1 en diferentes condiciones. A. imágenes representativas de medición de señal de FRET mediante emisión sensibilizada entre mCherry-Orai1 y Cav1-GFP. De izquierda a derecha: Cav1-GFP, mCherry-Orai1 y eficiencia de FRET. B. Grafica de eficiencia de FRET en diferentes condiciones. De izquierda a derecha: Basal, MβCD, TG, and MβCD+TG. Las regiones oscuras en la señal de FRET representan pixeles eliminados debido a que no alcanzaban el límite inferior de señal impuesto en el análisis de datos. Este límite elimina pixeles con distribución desigual de fluoroforos para prevenir una sobreestimación de la señal de FRET (estos pixeles no se incluyeron en el análisis).  $n \geq 70$  células para cada condición. Barras de error: desviación estándar \*\*\* $p < 0.001$  o \* $p < 0.05$ .

La eficiencia de FRET en células con condiciones basales de colesterol no es diferente cuando se comparan con células con bajo contenido de colesterol membranaral (Fig.15B), esta eficiencia aumenta cuando la SOCE se activa usando TG. Para confirmar estos resultados utilizamos ensayos de coimmunoprecipitación (Fig. 16).

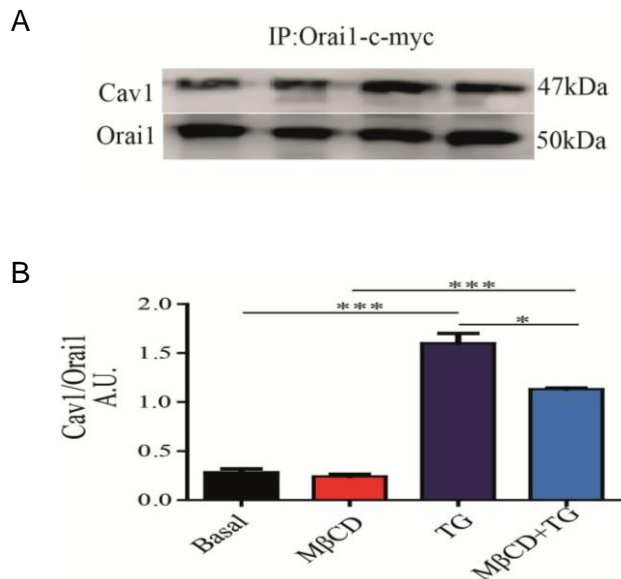


Figura 16. Coinmunoprecipitación entre Cav1-GFP y Orai1. A. Membranas de western blot representativas, los carriles de arriba y abajo presentan respectivamente a Cav1-GFP (47kDa) y Orai1 (50kDa) coinmunoprecipitados en diferentes condiciones de izquierda a derecha: Basal, M $\beta$ CD, TG y M $\beta$ CD+TG. B. Gráfica de la señal de Cav1 coinmunoprecipitada normalizada con la señal de Orai1 de la misma membrana en cada condición: Basal (negro), M $\beta$ CD (rojo), TG (azul oscuro), y M $\beta$ CD+TG (azul claro.). n $\geq$ 10 ensayos independientes. Barras de error: desviación estándar \*\*\*p < 0.001 o \*p < 0.05.

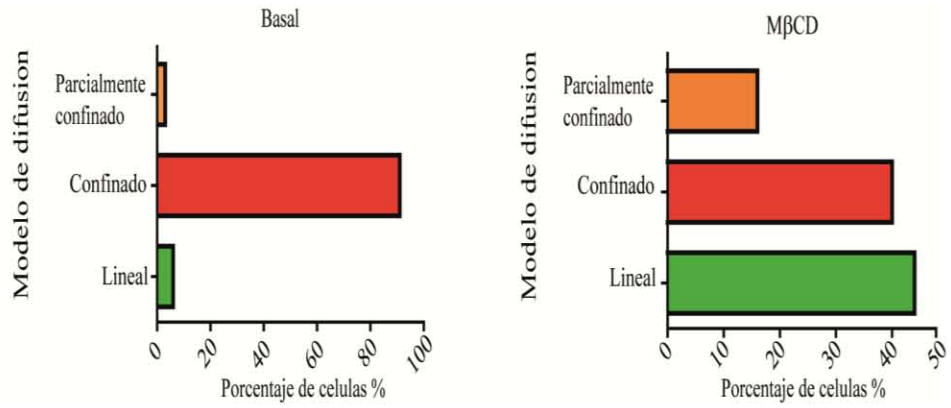
Los ensayos de coinmunoprecipitación presentaron la misma tendencia que los de FRET. La interacción entre Cav1 y Orai1 aumentó cuando la SOCE se activa usando TG (Fig.16B), esta interacción disminuyó ligeramente en células con SOCE activado en condiciones de bajo colesterol membranal.

### **7.3 Análisis de iMSD para Orai1 con SOCE no activado**

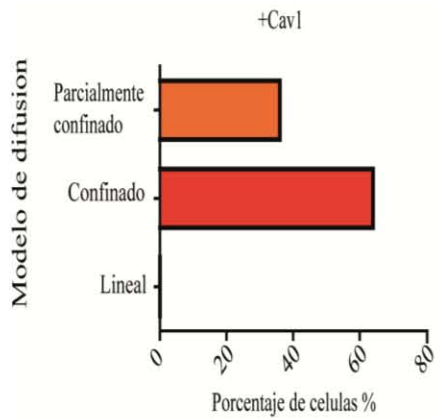
En estos ensayos se encontró que la proteína Orai1-GFP/ds-Red muestra un desplazamiento confinado, también se analizó el tamaño del confinamiento comparando entre células con condiciones basales de colesterol (controles) y con colesterol membranal disminuido (M $\beta$ CD).

Al efectuar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en el tamaño del mismo (Fig. 17A), sin embargo, al analizar los datos observe que después del tratamiento el desplazamiento de Orai1 pasa de ser confinado en células control (modelo 2) (Fig. 17B) a ser lineal o parcialmente confinado (modelo 1 o 3) en células M $\beta$ CD (Fig. 17C).

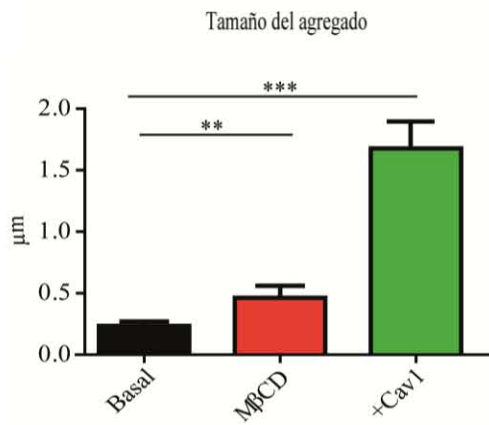
A



B



C



D

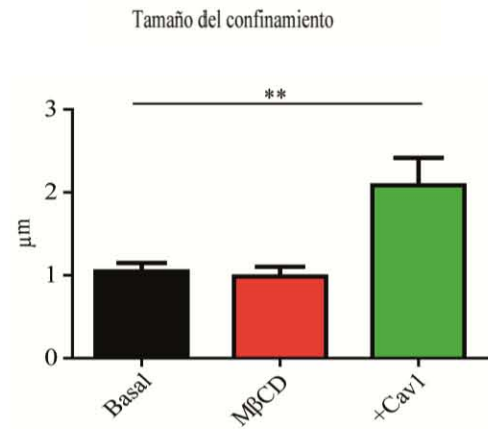


Figura.17. La remoción de colesterol membranar y la sobreexpresión de Cav1 influencia la difusión y el tamaño de agregado de Orai1. A. cambio de forma de difusión de Orai1 en

condiciones basales (izq.) comparado con difusión en condiciones de bajo colesterol membranar (der.). B: modelos de difusión de Orai1 cuando se sobreexpresa Cav1-GFP en condiciones basales de colesterol. Los modelos de difusión se presentan como porcentaje de células totales analizadas, parcialmente confinado (naranja), confinado (rojo), lineal (verde). C. Cambio en el tamaño de agregado de Orai1. D. Cambio en tamaño de confinamiento en las diferentes condiciones. Basal (negro), M $\beta$ CD (rojo), sobreexpresando Cav1 (verde)  $n \geq 50$  células, en 6 experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

Por otro lado, también se obtuvieron valores de tamaño de la partícula, comparando células control y M $\beta$ CD, se encontró que el tamaño de la partícula es mayor en células con bajos niveles de colesterol membranar Fig.17 B.

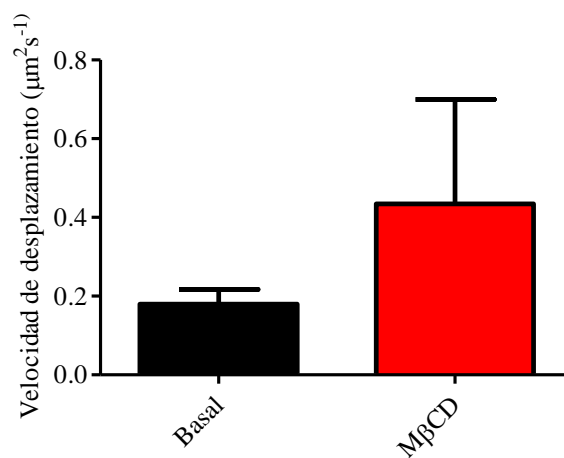


Figura.18. La remoción de colesterol de la membrana plasmática no modifica la velocidad de difusión de Orai1 dentro del confinamiento basal (negro) y M $\beta$ CD (rojo).  $n \geq 30$ . Barras de error: desviación estándar.

Analice la velocidad de desplazamiento de Orai1 dentro del confinamiento, (Fig. 18), comparando condiciones basales con condiciones de bajo colesterol membranar, no encontré diferencia en la velocidad de desplazamiento.

También analice la velocidad de desplazamiento fuera del confinamiento figura 19. La diferencia entre ambas es significativa según el análisis estadístico realizado.



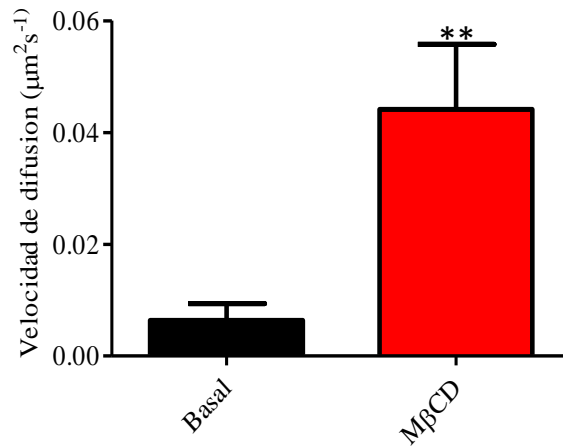
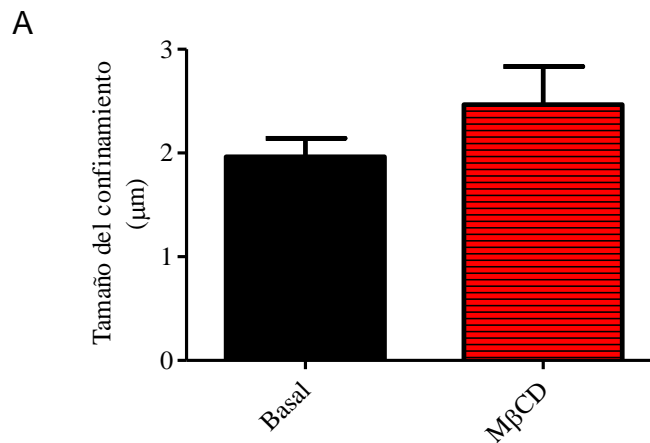


Figura.19. La velocidad de difusión de Orai1 fuera del confinamiento es modificada por la remoción de colesterol membranar. Basal (negro) y M $\beta$ CD (rojo).  $n \geq 39$ . Barras de error: desviación estándar\*\*\* $p < 0.001$ .

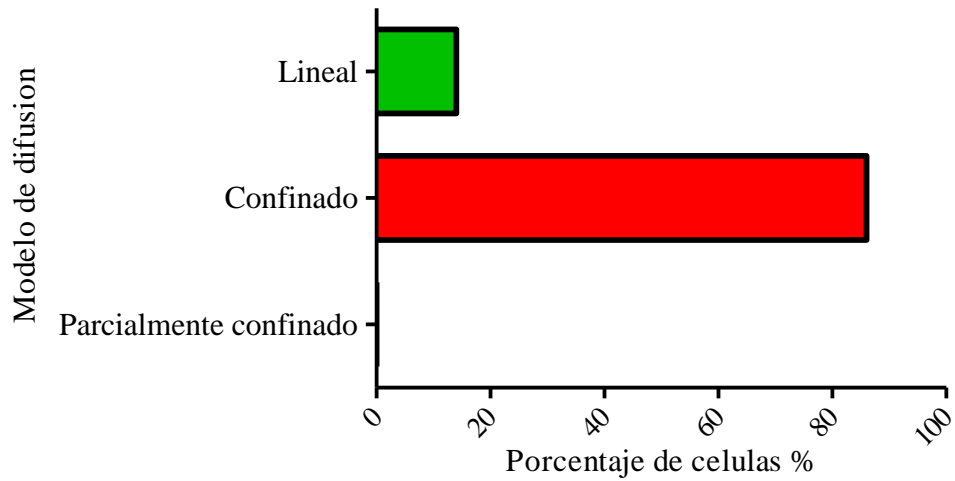
#### 7.4 Análisis de iMSD para Orai1 con SOCE activado

En estos ensayos se encontró que la proteína Orai1-GFP/ds-Red en condiciones de SOCE activado muestra un desplazamiento confinado.

También se analizó el tamaño del confinamiento comparando entre células controles y M $\beta$ CD. Al efectuar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en el tamaño del mismo (Fig. 20A), sin embargo, al analizar los datos se observó que después del tratamiento el desplazamiento de Orai1 pasa de ser confinado (modelo 2) (Fig.20B) a ser lineal o parcialmente confinado (modelo 1 o 3) (Fig.20C).



B



C

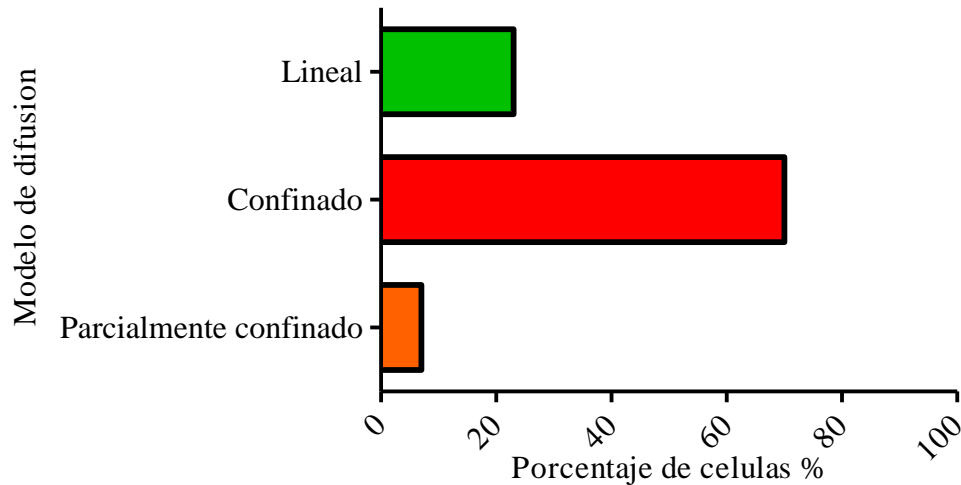
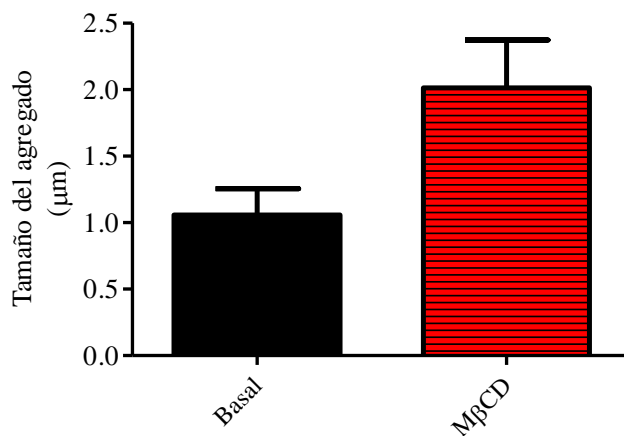


Figura.20. La remoción de colesterol membranal modifica la difusión y el tamaño de agregado de Orai1 en condiciones de SOCE activado. A. Cambio de tamaño de confinamiento. B. cambio de forma de difusión de Orai1 en condiciones basales C. comparado con difusión en condiciones de bajo colesterol membranal D. Los modelos de difusión se presentan como porcentaje de células totales analizadas, parcialmente confinado (naranja), confinado (rojo), lineal (verde). Basal (negro), M $\beta$ CD (rojo)  $n \geq 20$  células, en 6 experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar.

Por otro lado, también se obtuvieron valores de tamaño de la partícula,



comparando células control y M $\beta$ CD, se encontró que el tamaño de la partícula es mayor en células con bajos niveles de colesterol membranal Fig.21.

\*

Figura.21. El tamaño de agregado de Orai1 es influenciado por las condiciones de colesterol membranal en condiciones de SOCE activado. Basal (negro), M $\beta$ CD (rojo). n $\geq$ 15. Barras de error: desviación estándar. \*p < 0.05.

Además, se estimó la velocidad de difusión dentro del confinamiento Fig. 22 y se observan diferencias en la velocidad de difusión entre controles y M $\beta$ CD.

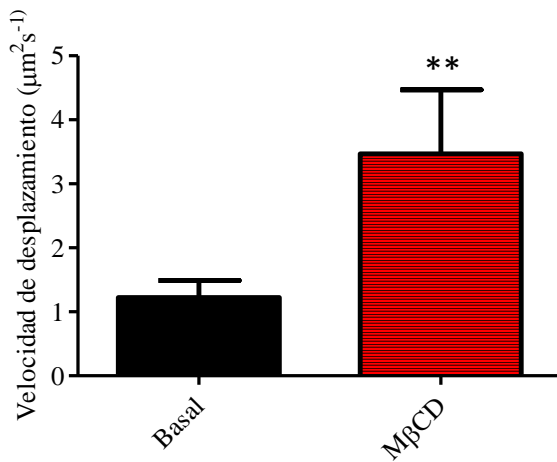


Figura.22. La velocidad de difusión de Orai1 dentro el confinamiento con SOCE activado es modificada por los niveles de colesterol de la membrana Basal (negro), M $\beta$ CD (rojo). n $\geq$ 40. Barras de error: desviación estándar\*\*p < 0.01.

Se analizó la velocidad de desplazamiento fuera del confinamiento (Fig. 23). La diferencia entre ambas no fue significativa según el análisis estadístico realizado.

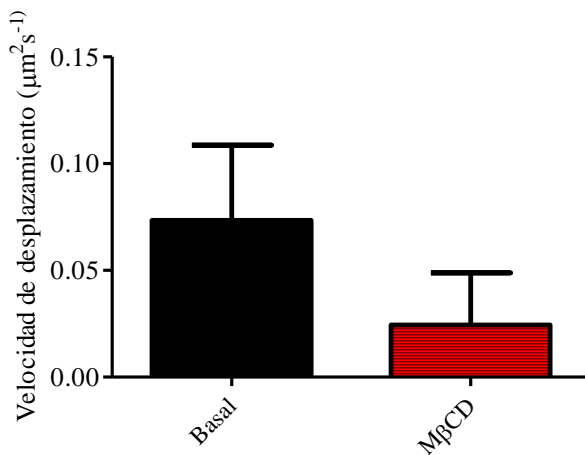


Figura.23. Comparación de velocidad de difusión fuera de confinamiento entre células control y M $\beta$ CD. Basal (negro), M $\beta$ CD (rojo). n $\geq$ 40. Barras de error: desviación estándar\*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01 o \*p < 0.05.

Los niveles de colesterol influyen en el número de confinamientos existentes donde Orai1 pasa de tener un modelo de difusión confinado a ser parcialmente confinado y de libre difusión en células control y células con niveles bajos de colesterol membranal (Fig.13A, B Fig.18A, B). Por otro lado, el tamaño del confinamiento se mantiene sin cambios.

En los grupos de células tratados con M $\beta$ CD con SOCE activado y sin activar, los agregados de Orai1 parecen ser de mayor tamaño en comparación a los agregados de células sin tratar (Fig.14 y 19).

Además, se observó que en las células con SOCE activado la velocidad de difusión no se ve afectada por los diferentes niveles de colesterol membranal.

### **7.5 Internalización por clatrina**

Además, se exploró si la internalización de Orai1 se llevaba a cabo por vía de clatrina, para lo cual, se usaron células sobreexpresando mCherry-Clatrina y EYFP-Orai1 (Fig. 24A). Se observó un aumento en la fluorescencia en el citoplasma debida a Orai1 en condiciones de bajo colesterol membranal (Fig. 24B). Además (Fig. 24A), no se observó aumento de fluorescencia en el citoplasma debida a mCherry-Clatrina.

A

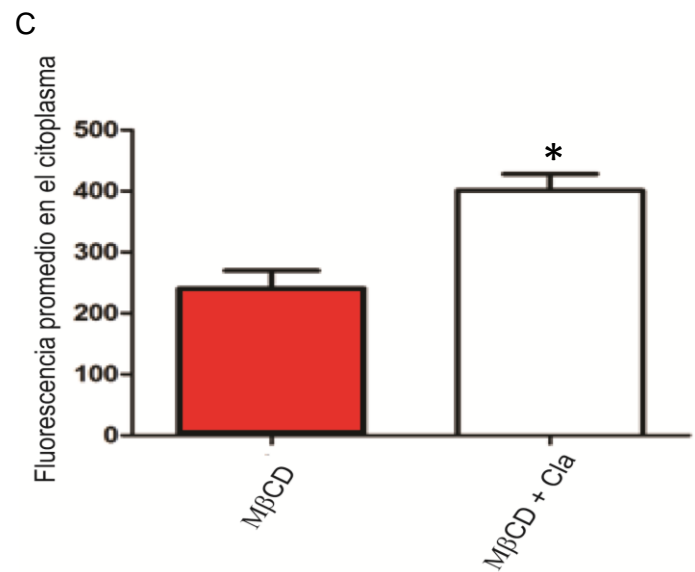
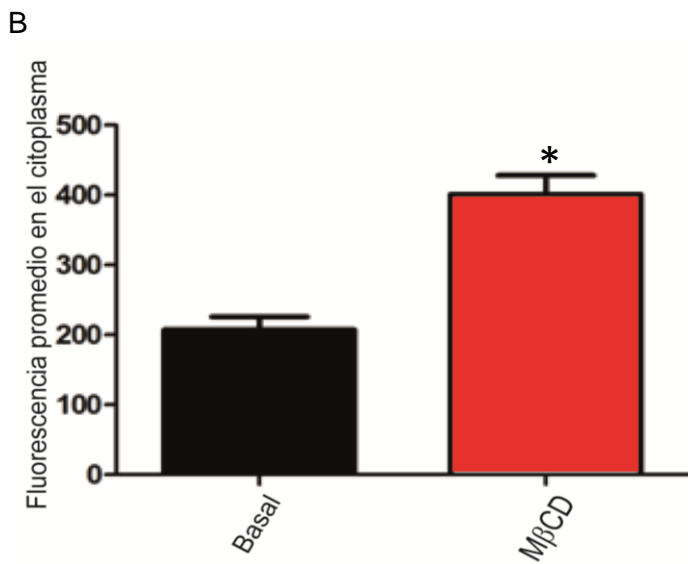
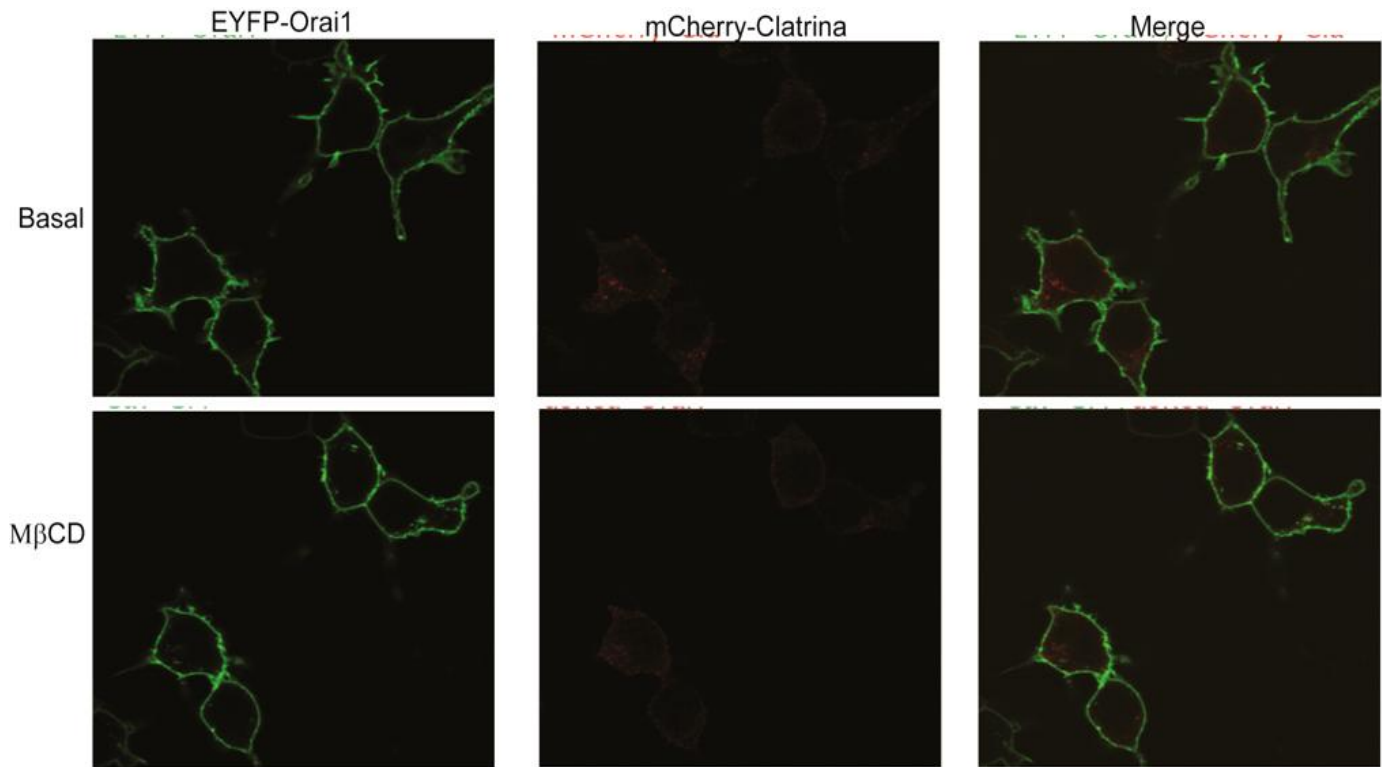


Figura. 24. Orai1 se internaliza más en célula que sobreexpresan clatrina, comparado con células que solo sobreexpresan Orai1. A. Microfotografía de células expresando Cav-GFP y dsRED-Orai1, antes (arriba) y después (abajo) de disminuir el colesterol membranar. B. Cambio de fluorescencia en citoplasma debida a dsRedOrai1 en condiciones de bajo colesterol membranar. C. Comparación de cambio de fluorescencia en citoplasma debida a dsRedOrai1 en células sobreexpresando clatrina vs células que

no sobreexpresan clatrina en condiciones de bajo colesterol membranal.  $n \geq 10$ . Barras de error: desviación estándar. \* $p < 0.05$ .

A continuación, se realizó un análisis comparando la internalización de Orai1 en células expresando únicamente Orai1 y células sobreexpresando Orai1 y clatrina (Fig. 24 C). Observe que la internalización de Orai1 en células sobreexpresando ambas proteínas es mayor que en las células sobreexpresando únicamente Orai1.

## 8. Discusión

La SOCE es un mecanismo complejo de regulación celular, involucra la interacción de una gran variedad de proteínas que regulan los niveles de calcio al interior de la célula, principalmente del RE. La regulación de la SOCE por los niveles de colesterol de la membrana plasmática se ha demostrado en diversas publicaciones [30,55,70,79–81,95]; sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes aún no han sido completamente dilucidados y existen resultados contradictorios. Diversos reportes indican que la SOCE es muy sensible a los niveles de colesterol presentes en la MP y que después de la remoción del colesterol la entrada de calcio disminuye [55,79–81,96] y datos del presente trabajo (Fig.6). La inhibición de la formación de la punta de Orai1 y STIM1 se ha señalado como la responsable de esta disminución [97]-[98].

Los efectos del colesterol membranal son variables y dependen del estado de activación de la SOCE, es decir, si la disminución de colesterol ocurre antes o después de la formación del complejo Orai1-STIM1. En general los trabajos realizados están de acuerdo en que la disminución de colesterol membranal previo a la formación de la punta (SOCE no activado) disminuye la SOCE [55,79,80], mientras que, sí la disminución de colesterol membrana ocurre después de la formación de la punta (SOCE activo), la SOCE aumenta [79,95]. Nuestro grupo identificó recientemente un sitio de unión a colesterol presente en la secuencia de STIM1, específicamente en la región de SOAR. Este dominio de unión a colesterol es responsable del aumento en la SOCE que se observa cuando el colesterol

membranal se disminuye después de la formación del complejo Orai1-STIM1 [79]. Además del estado de activación de la SOCE cuando ocurre la remoción del colesterol membranal, los niveles de expresión de los componentes de la SOCE (Orai1 y STIM1) juegan un papel importante en la respuesta de la SOCE a la reducción de colesterol membranal, la sobreexpresión de Orai1 y STIM1 podría encubrir el efecto de la disminución de colesterol membranal en la SOCE tal como lo demostró Gwozdz [80], este enmascaramiento podría explicar la existencia de los resultados contradictorios obtenidos por diferentes grupos.

En este trabajo nos enfocamos en estudiar los mecanismos moleculares responsables de la reducción de la SOCE cuando se disminuye el colesterol de la membrana plasmática antes de la activación de la SOCE, es decir, antes de la formación del complejo Orai1-STIM1, en células que expresan solamente estas proteínas de forma endógena.

Utilizamos una amplia variedad de estrategias experimentales para obtener evidencia que indica que el nivel de colesterol membranal influye en la localización celular y distribución y dinámica en la membrana plasmática en las condiciones que analizamos. En presencia de bajo contenido de colesterol membranal Orai1 se redistribuye de la membrana al citoplasma, este resultado va de acuerdo con la reducción de la SOCE que se observa cuando el colesterol membranal se disminuye antes de la activación de la SOCE. Sí el número de canales Orai1 disponibles para la entrada de calcio en la membrana disminuyen, entonces se espera que la SOCE decrezca. Esta reducción en la SOCE es exactamente lo que nuestro grupo y otros hemos observado cuando solamente existen Orai1 y STIM1 endógenos. Por otro lado, en experimentos donde se sobreexpresa la proteína Cav1 se previene tanto la internalización de Orai1 como la reducción de la SOCE cuando disminuimos el colesterol de la membrana.

Tomando en cuenta los resultados que obtuvimos, este estudio provee la primera explicación (hasta donde sabemos) del mecanismo responsable de la reducción de la SOCE cuando se disminuye el colesterol de la membrana plasmática, este mecanismo involucra la modulación de la localización de Orai1 y su organización

espacial en los dominios de la membrana plasmática, lo que influye muy probablemente en el número y dinámica de la formación de puntas.

Existen evidencias de que el contenido de colesterol de la membrana afecta a ciertos tipos de canales iónicos y de diferente forma cambiando su probabilidad de apertura, su estabilidad estructural, distribución en la membrana o bien induciendo su internalización [99–105]. Otro ejemplo es el caso de los receptores de acetilcolina donde, el contenido de colesterol de la MP modula la velocidad de internalización de los receptores de acetilcolina de forma dosis dependiente [94].

Nosotros encontramos que el bajo contenido de colesterol membranar induce la internalización de una proporción grande de canales Orai1, cambiando su localización de la membrana plasmática hacia el citoplasma (Fig.10, 11, 12). Esta internalización impide la interacción entre Orai1 y STIM1, lo que resulta en la reducción de la entrada de calcio mediada por vaciamiento (SOCE). Nosotros describimos esta internalización por primera vez en A. Bohórquez - Hernández *et al.* [106] como respuesta a niveles bajos de colesterol membranar, esta internalización fue confirmada ampliamente utilizando diversas técnicas como microscopia confocal (Fig.7, 10), biotilación de proteínas de membrana (Fig. 12) y SPIM (Fig.11).

Actualmente diversos reportes indican que diversos componentes de la SOCE se asocian con dominios membranales ricos en colesterol [30,55,70], particularmente caveolas, estos dominios se han relacionado con la regulación de la señalización por calcio [56,57,74,83,107,108]. A pesar de los numerosos estudios que existen sobre la relación entre las caveolae y Orai1 no existía evidencias de la interacción directa entre Orai1 y el principal componente de las caveolae, Cav1. Nosotros logramos establecer esta relación mediante FRET (Fig. 15) y coinmunoprecipitación (Fig. 16), además encontramos que esta relación depende del estado de activación de la SOCE, esta interacción es independiente de los niveles de colesterol presentes en la membrana plasmática y previene la internalización de los canales Orai1 (Fig. 13). La interacción entre Orai1 y Cav1 aumenta cuando la SOCE esta activada, este aumento en la interacción podría



indicar que los canales Orai1 son reclutados a caveolae, esta relocalización de Orai1 en caveolae puede explicar los efectos observados de la sobreexpresión de Cav1 en los patrones de difusión de Orai1 en la membrana plasmática (Fig. 17).

El nivel de colesterol membranar no solo afecta la localización de Orai1, también son alterados los patrones de difusión de Orai1 en la membrana también son alterados como consecuencia de niveles bajos de colesterol en la membrana. Este patrón pasa de ser mayormente confinado, en niveles basales de colesterol, a ser lineal (sin obstrucciones), en niveles bajos de colesterol, la sobreexpresión de Cav1 mantiene a Orai1 en movimiento dentro de un confinamiento aun en condiciones de bajo colesterol membranar.

El movimiento confinado de Orai1 cuando se sobreexpresa Cav1 es consistente con el aumento de asociación entre estas dos proteínas cuando se activa la SOCE como lo demuestran los resultados de FRET y ColP (Fig.15 y 16). Estos resultados sugieren fuertemente que el espacio confinado en el que se mueven los canales Orai1 son caveolae, más aun, nuestros resultados demuestran que Orai1 no puede ser internalizado cuando se encuentra secuestrado dentro de las caveolae (asociado con Cav1). Estos resultados sugieren que Orai1 puede estar presente en la membrana plasmática en al menos dos diferentes subpoblaciones:

1. Una población que se mueve dentro de dominios ricos en colesterol, diferentes a caveolae (no resistentes al tratamiento con M $\beta$ CD).
2. Una población que se mueve dentro de caveolae (resistentes al tratamiento con M $\beta$ CD).

La primera subpoblación cambia su patrón de difusión de confinado a lineal y parcialmente confinado cuando se remueve el colesterol de la membrana plasmática, la segunda subpoblación mantiene un patrón de difusión confinado (dentro de caveolae). La primera subpoblación de Orai1 es internalizada eventualmente cuando los niveles de colesterol membranar son bajos. Los resultados presentados en esta primera parte proveen de mayor detalle para el

entendimiento de las subpoblaciones de Orai1 propuestas por Baird *et al* [97], definiéndolas también por la naturaleza de los dominios a los que se asocian.

Por otro lado, la activación de la SOCE inhibe los efectos del bajo colesterol membranal en los patrones de difusión de Orai1 (Fig. 20, 22, 23) los cuales mantienen su movimiento dentro de un confinamiento en mayor proporción aun en condiciones de bajo colesterol membranal. El tamaño del agregado se incrementa, lo que sugiere que en ausencia de colesterol se facilita la interacción entre Orai1 y STIM1 (Fig. 21), estos resultados son consistentes con los obtenidos por nuestro grupo reportados en Pacheco *et al* [79], en donde los efectos de bajos niveles de colesterol membranal son anulados sí el complejo Orai1-STIM1 se ha formado previamente.

Resultados preliminares indican que la vía de internalización de Orai1 es dependiente de clatrina (Fig. 24). Sin embargo, son necesarios más experimentos para confirmar si la internalización de Orai1 en condiciones de bajo colesterol membranal es solamente dependiente de clatrina o se trata de una cooperación entre este mecanismo de internalización con algún otro.

## **9. Conclusión**

En este trabajo identificamos un mecanismo molecular que regula la respuesta de los canales Orai1 a bajos niveles de colesterol membranal y que es responsable de la disminución de la SOCE en estas condiciones. Este mecanismo consiste en la internalización de canales Orai1, así como el cambio de patrones de difusión de los canales que permanecen en la membrana. Estos cambios de localización de Orai1 inhiben su interacción con la proteína STIM1, previniendo la formación del complejo Orai1-STIM1 y en consecuencia la activación de la entrada de calcio mediada por vaciamiento a través de los canales Orai1.

Los resultados que se presentan en este trabajo corroboran los obtenidos por diversos grupos previamente y contribuyen con información que ayuda al esclarecimiento de la regulación de la SOCE mediada por colesterol.

## 10. Perspectivas

Este trabajo presenta nuevas interrogantes en relación a la regulación de la SOCE mediada por los niveles de colesterol membranal, más aun, como cada una de las proteínas que constituyen este mecanismo son reguladas por este lípido.

Una de las perspectivas más atractivas es encontrar el mecanismo mediante el cual Orai1 se internaliza, este mecanismo podría ser usado como blanco terapéutico en patologías en donde la sobreexpresión de Orai1 juega un papel determinante en la progresión como en el caso de algunos tipos de cáncer [17,109]. Otra de las perspectivas es explorar los efectos del aumento de los niveles de colesterol membranal en la SOCE, este punto no se ha explorado aun y presenta un campo de oportunidad por el paralelismo que presenta con la hipercolesterolemia humana. Estudiar esta posibilidad permitiría entender que tanto la SOCE participa en aterosclerosis y enfermedades coronarias que son responsables por un gran número de muertes al año [88], así como en su caso contribuir en el estudio o tratamiento de patologías relacionadas con altos niveles de colesterol, además de los mencionados. Se cuenta con evidencias que indican que en modelos *in vivo* la hipercolesterolemia induce cambios en las funciones de canales iónicos [100,103,110], por lo que resulta atractivo analizar las actividades de STIM y Orai1 en función del colesterol en membrana.

Además de las perspectivas de aplicación en la terapéutica, el efecto de los niveles de colesterol membranal en los otros miembros de la familia de Orai1 (Orai1 2 y 3) es un tema interesante para investigar.

## 11. Referencias

- [1] M.J. Berridge, Annual review prize lecture. Elementary and global aspects of calcium signalling, *J. Physiol.* 499 (1997) 291–306.
- [2] M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 11–21. doi:10.1038/35036035.

- [3] D.J. Miller, Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart., *J. Physiol.* 555 (2004) 585–587. doi:10.1113/jphysiol.2004.060731.
- [4] A. Takahashi, P. Camacho, J.D. Lechleiter, B. Herman, Measurement of intracellular calcium., *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1089–1125. doi:10.1016/S1385-299X(00)00003-9.
- [5] M.D. Bootman, T.J. Collins, C.M. Peppiatt, L.S. Prothero, L. MacKenzie, P. De Smet, M. Travers, S.C. Tovey, J.T. Seo, M.J. Berridge, F. Ciccolini, P. Lipp, Calcium signalling—an overview, *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 3–10. doi:http://dx.doi.org/10.1006/scdb.2000.0211.
- [6] M.E. Klejman, J. Gruszczynska-Biegala, A. Skibinska-Kijek, M.B. Wisniewska, K. Misztal, M. Blazejczyk, L. Bojarski, J. Kuznicki, Expression of STIM1 in brain and puncta-like co-localization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca<sup>2+</sup> store in neurons, *Neurochem. Int.* 54 (2009) 49–55. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018608001666.
- [7] L. Vaca, SOCIC: the store-operated calcium influx complex., *Cell Calcium.* 47 (2010) 199–209. http://europepmc.org/abstract/MED/20149454.
- [8] I. Derler, J. Madl, G. Schütz, C. Romanin, Structure, Regulation and Biophysics of ICRAC, STIM/Orai1 BT - Calcium Signaling, in: M.S. Islam (Ed.), Springer Netherlands, Dordrecht, 2012: pp. 383–410. doi:10.1007/978-94-007-2888-2\_16.
- [9] A.S. Borowiec, G. Bidaux, N. Pigat, V. Goffin, S. Bernichtein, T. Capiod, Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation, *Eur. J. Pharmacol.* 739 (2014) 19–25. doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.072.
- [10] M. Brini, E. Carafoli, The plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) 1–17. doi:10.1101/cshperspect.a004168.
- [11] J. Karlstad, Y. Sun, B. Singh, Ca<sup>2+</sup> Signaling: An Outlook on the Characterization of Ca<sup>2+</sup> Channels and Their Importance in Cellular Functions, in: M.S. Islam (Ed.), Calcium Signal. SE - 6, Springer Netherlands, 2012: pp. 143–157. doi:10.1007/978-94-007-2888-2\_6.
- [12] J. W. Putney, A model for receptor-regulated calcium entry, 1986. doi:10.1016/0143-4160(86)90026-6.
- [13] H. Takemura, J.W. Putney, Capacitative calcium entry in parotid acinar cells., *Biochem. J.* 258 (1989) 409–12. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1138377&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.
- [14] J.W. Putney, Capacitative calcium entry, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 381–382.

doi:10.1083/jcb.200503161.

- [15] a. B. Parekh, J.W. Putney Jr, Store-operated calcium channels, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 757–810. doi:10.1152/physrev.00057.2003.
- [16] P.B. Stathopoulos, M. Ikura, Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms, *Cell Calcium.* (2016) 1–5. doi:10.1016/j.ceca.2016.11.005.
- [17] J. Xie, H. Pan, J. Yao, Y. Zhou, W. Han, SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives, *Int. J. Cancer.* 138 (2016) 2067–2077. doi:10.1002/ijc.29840.
- [18] B. Targos, J. Barańska, P. Pomorski, Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells., *Acta Biochim. Pol.* 52 (2005) 397–409. <http://europepmc.org/abstract/MED/15933763>.
- [19] M. Maus, M. Cuk, B. Patel, J. Lian, M. Ouimet, U. Kaufmann, J. Yang, R. Horvath, H.T. Hornig-Do, Z.M. Chrzanowska-Lightowlers, K.J. Moore, A.M. Cuervo, S. Feske, Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Controls Induction of Lipolysis and the Transcriptional Reprogramming to Lipid Metabolism, *Cell Metab.* 25 (2017) 698–712. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.021.
- [20] S. Feske, J. Giltneane, R. Dolmetsch, L.M. Staudt, A. Rao, Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes, *Nat Immunol.* 2 (2001) 316–324. doi:Doi 10.1038/86318.
- [21] P.G. Hogan, L. Chen, J. Nardone, A. Rao, Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT, *Genes Dev.* 17 (2003) 2205–2232. doi:10.1101/gad.1102703.
- [22] J. Jing, L. He, A. Sun, A. Quintana, Y. Ding, G. Ma, P. Tan, X. Liang, X. Zheng, L. Chen, X. Shi, S.L. Zhang, L. Zhong, Y. Huang, M.-Q. Dong, C.L. Walker, P.G. Hogan, Y. Wang, Y. Zhou, Proteomic mapping of ER–PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca<sup>2+</sup> influx, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 1339–1347. doi:10.1038/ncb3234.
- [23] S. Sharma, A. Quintana, G.M. Findlay, M. Mettlen, B. Baust, M. Jain, R. Nilsson, A. Rao, P.G. Hogan, An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry., *Nature.* 499 (2013) 238–42. doi:10.1038/nature12229.
- [24] K. Groschner, C. Romanin, W.F. Graier, Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) pathways: Emerging signaling concepts in human (patho)physiology, 2013. doi:10.1007/978-3-7091-0962-5.
- [25] P.B. Stathopoulos, M. Ikura, Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms, *Cell Calcium.* (2016). doi:10.1016/j.ceca.2016.11.005.

- [26] A. Berna-Erro, P. Redondo, J. Rosado, Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry, in: M.S. Islam (Ed.), *Calcium Signal. SE - 15*, Springer Netherlands, 2012: pp. 349–382. doi:10.1007/978-94-007-2888-2\_15.
- [27] J.A. Rosado, R. Diez, T. Smani, I. Jardín, STIM and orai1 variants in store-operated calcium entry, *Front. Pharmacol.* 6 (2016) 1–9. doi:10.3389/fphar.2015.00325.
- [28] M. Prakriya, S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao, P.G. Hogan, Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel., *Nature.* 443 (2006) 230–233. doi:10.1038/nature05122.
- [29] R. Palty, Z. Fu, E.Y. Isacoff, Sequential Steps of CRAC Channel Activation, *CellReports.* 19 (2017) 1929–1939. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.025.
- [30] I. Jardin, G.M. Salido, J.A. Rosado, Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1, *Channels.* 2 (2008) 401–403. <http://www.landesbioscience.com/journals/channels/article/7055/>.
- [31] S. Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.-H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, A. Rao, A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, *Nature.* 441 (2006) 179–185. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04702>.
- [32] J. Roos, P.J. DiGregorio, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velisebi, K.A. Stauderman, STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 435–445. doi:10.1083/jcb.200502019.
- [33] I. Derler, I. Jardin, C. Romanin, The molecular mechanisms of STIM/Orai communications. A Review in the Theme: STIM and Orai Proteins in Calcium Signaling., *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2016) ajpcell.00007.2016. doi:10.1152/ajpcell.00007.2016.
- [34] K. Oritani, P.W. Kincade, Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells, *J. Cell Biol.* 134 (1996) 771–782. doi:10.1083/jcb.134.3.771.
- [35] M.D. Cahalan, STIMulating store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, *Nat. Publ. Gr.* 11 (2009) 669–677. doi:10.1038/ncb0609-669.
- [36] S.R. Collins, T. Meyer, Evolutionary origins of STIM1 and STIM2 within ancient Ca<sup>2+</sup> signaling systems, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 202–211. doi:10.1016/j.tcb.2011.01.002.
- [37] M. Prakriya, R.S. Lewis, Store-Operated Calcium Channels, *Physiol. Rev.* 95 (2015) 1383–1436. doi:10.1152/physrev.00020.2014.
- [38] P.B. Stathopoulos, G.Y. Li, M.J. Plevin, J.B. Ames, M. Ikura, Stored Ca<sup>2+</sup> depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1)

- via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca<sup>2+</sup> entry, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35855–35862. doi:10.1074/jbc.M608247200.
- [39] M. Yáñez, J. Gil-Longo, M. Campos-Toimil, Calcium Binding Proteins, in: M.S. Islam (Ed.), *Calcium Signal. SE - 19*, Springer Netherlands, 2012: pp. 461–482. doi:10.1007/978-94-007-2888-2\_19.
- [40] J.P. Yuan, W. Zeng, M.R. Dorwart, Y.J. Choi, P.F. Worley, S. Muallem, SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels., *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 337–343. <http://europepmc.org/abstract/MED/19182790>.
- [41] R. Palty, E.Y. Isacoff, Cooperative binding of stromal interaction molecule 1 (STIM1) to the N and C termini of calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1), *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 334–341. doi:10.1074/jbc.M115.685289.
- [42] F. Yu, L. Sun, S. Hubrack, S. Selvaraj, K. Machaca, Intramolecular shielding maintains the ER Ca<sup>2+</sup> sensor STIM1 in an inactive conformation., *J. Cell Sci.* 126 (2013) 2401–10. doi:10.1242/jcs.117200.
- [43] S. Feske, CRAC channelopathies, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 460 (2010) 417–435. doi:10.1007/s00424-009-0777-5.
- [44] S. Feske, CRAC channelopathies, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 460 (2010) 417–435. doi:10.1007/s00424-009-0777-5.
- [45] F. Yu, L. Sun, K. Machaca, Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 17401–17406. doi:10.1073/pnas.0904651106.
- [46] P.G. Hogan, The STIM1-ORAI1 microdomain, *Cell Calcium.* 58 (2015) 357–367. doi:10.1016/j.ceca.2015.07.001.
- [47] M. Muik, R. Schindl, M. Fahrner, C. Romanin, Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) current, structure, and function, *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 4163–4176. doi:10.1007/s00018-012-1072-8.
- [48] A. Lis, C. Peinelt, A. Beck, S. Parvez, M. Monteilh-Zoller, A. Fleig, R. Penner, CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels with Distinct Functional Properties, *Curr. Biol.* 17 (2007) 794–800. doi:10.1016/j.cub.2007.03.065.
- [49] X. Zhang, J.C. González-Cobos, R. Schindl, M. Muik, B. Ruhle, R.K. Motiani, J.M. Bisailon, W. Zhang, M. Fahrner, M. Barroso, K. Matrougui, C. Romanin, M. Trebak, Mechanisms of STIM1 activation of store-independent leukotriene C4-regulated Ca<sup>2+</sup> channels., *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 3715–23. doi:10.1128/MCB.00554-13.
- [50] X. Zhang, W. Zhang, J.C. Gonzalez-Cobos, I. Jardin, C. Romanin, K.

- Matrougui, M. Trebak, Complex role of STIM1 in the activation of store-independent Orai1/3 channels, *J. Gen. Physiol.* 143 (2014) 345–359. doi:10.1085/jgp.201311084.
- [51] M. Fahrner, I. Derler, I. Jardin, C. Romanin, The STIM1/Orai signaling machinery, *Channels*. 7 (2013) 330–343. doi:10.4161/chan.26742.
- [52] S. Maignan, J. Guilloteau, N. Fromage, B. Arnoux, J. Becquart, A. Ducruix, Crystal Structure of the Mammalian, 268 (2011) 291–293.
- [53] J.J. Lopez, L. Albarran, L.J. Gómez, T. Smani, G.M. Salido, J.A. Rosado, Molecular modulators of store-operated calcium entry, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 2037–2043. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.04.024.
- [54] A. Asanov, R. Sherry, A. Sampieri, L. Vaca, A relay mechanism between EB1 and APC facilitate STIM1 puncta assembly at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions, *Cell Calcium*. 54 (2013) 246–256. doi:10.1016/j.ceca.2013.06.008.
- [55] N. Dionisio, C. Galán, I. Jardín, G.M. Salido, J.A. Rosado, Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813 (2011) 431–437. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488911000188>.
- [56] V. Sathish, A.J. Abcejo, M.A. Thompson, G.C. Sieck, Y.S. Prakash, C.M. Pabelick, Caveolin-1 regulation of store-operated Ca(2+) influx in human airway smooth muscle., *Eur. Respir. J.* 40 (2012) 470–8. doi:10.1183/09031936.00090511.
- [57] B. Pani, B.B. Singh, Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling., *Cell Calcium*. 45 (2009) 625–633. <http://europepmc.org/abstract/MED/19324409>.
- [58] M.J. Berridge, Calcium microdomains: Organization and function, *Cell Calcium*. 40 (2006) 405–412. doi:10.1016/j.ceca.2006.09.002.
- [59] S. Fedida-Metula, B. Feldman, V. Koshelev, U. Levin-Gromiko, E. Voronov, D. Fishman, Lipid rafts couple store-operated Ca<sup>2+</sup> entry to constitutive activation of PKB/Akt in a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-, Src- and PP2A-mediated pathway and promote melanoma tumor growth, *Carcinogenesis*. 33 (2012) 740–750. doi:10.1093/carcin/bgs021.
- [60] L. Pelkmans, Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1746 (2005) 295–304. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.06.009.
- [61] J.A. Poveda, A.M. Giudici, M.L. Renart, M.L. Molina, E. Montoya, A. Fernández-Carvajal, G. Fernández-Ballester, J.A. Encinar, J.M. González-Ros, Lipid modulation of ion channels through specific binding sites, *Biochim.*



- Biophys. Acta - Biomembr. 1838 (2014) 1560–1567.  
doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.023.
- [62] S.L. Brownlow, A.G.S. Harper, M.T. Harper, S.O. Sage, A role for hTRPC1 and lipid raft domains in store-mediated calcium entry in human platelets, *Cell Calcium*. 35 (2004) 107–113. doi:10.1016/j.ceca.2003.08.002.
- [63] D. Willoughby, K.L. Everett, M.L. Halls, J. Pacheco, P. Skroblin, L. Vaca, E. Klussmann, D.M.F. Cooper, Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca<sup>2+</sup> and cAMP signaling., *Sci. Signal*. 5 (2012) ra29. doi:10.1126/scisignal.2002299.
- [64] K. Jacobson, O.G. Mouritsen, R.G.W. Anderson, Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics, *Nat Cell Biol*. 9 (2007) 7–14.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncb0107-7>.
- [65] D.A. Brown, E. London, Functions of lipid rafts in biological membranes., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 14 (1998) 111–136.  
doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.111.
- [66] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 1 (2000) 31–39. doi:10.1038/35036052.
- [67] K. Bacia, D. Scherfeld, N. Kahya, P. Schwille, Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes., *Biophys. J*. 87 (2004) 1034–1043. doi:10.1529/biophysj.104.040519.
- [68] A. El-Sayed, H. Harashima, Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis., *Mol. Ther*. 21 (2013) 1118–30. doi:10.1038/mt.2013.54.
- [69] H.L. Ong, I.S. Ambudkar, Role of Lipid Rafts in the Regulation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels, in: *Cholest. Regul. Ion Channels Recept.*, John Wiley & Sons, Inc., 2012: pp. 69–90. doi:10.1002/9781118342312.ch4.
- [70] S. Alicia, Z. Angélica, S. Carlos, S. Alfonso, L. Vaca, STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: Moving TRPC1 in and out of lipid rafts, *Cell Calcium*. 44 (2008) 479–491.  
doi:10.1016/j.ceca.2008.03.001.
- [71] O. Kovtun, V.A. Tillu, N. Ariotti, R.G. Parton, B.M. Collins, Cavin family proteins and the assembly of caveolae, *J. Cell Sci*. 128 (2015) 1269–1278.  
doi:10.1242/jcs.167866.
- [72] A. Ludwig, T.H. Nguyen, D. Leong, L.I. Ravi, T.B. Huan, S. Sandin, R.J. Sugrue, Caveolae provide a specialized membrane environment for respiratory syncytial virus assembly, *J. Cell Sci*. (2017) jcs.198853.  
doi:10.1242/jcs.198853.
- [73] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes., *Nature*. 387

(1997) 569–72. doi:10.1038/42408.

- [74] Y.-C. Yeh, A.B. Parekh, Distinct Structural Domains of Caveolin-1 Independently Regulate Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels and Ca<sup>2+</sup> Microdomain-Dependent Gene Expression, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 1341–1349. doi:10.1128/MCB.01068-14.
- [75] O. Kovtun, V.A. Tillu, N. Ariotti, R.G. Parton, B.M. Collins, Cavin family proteins and the assembly of caveolae, *J. Cell Sci.* 128 (2015) 1269–1278. doi:10.1242/jcs.167866.
- [76] Y.C. Yeh, M.J. Tang, A.B. Parekh, Caveolin-1 alters the pattern of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations and Ca<sup>2+</sup>-dependent gene expression by enhancing leukotriene receptor desensitization, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 17843–17853. doi:10.1074/jbc.M114.553453.
- [77] H.L. Ong, I.S. Ambudkar, Molecular determinants of TRPC1 regulation within ER-PM junctions, *Cell Calcium.* 58 (2015) 376–386. doi:10.1016/j.ceca.2015.03.008.
- [78] M. Goiko, J.R. De Bruyn, B. Heit, Short-Lived Cages Restrict Protein Diffusion in the Plasma Membrane, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13. doi:10.1038/srep34987.
- [79] J. Pacheco, L. Dominguez, A. Bohórquez-Hernández, A. Asanov, L. Vaca, A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1-Orai1 physical and functional interactions, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29634. doi:10.1038/srep29634.
- [80] T. Gwozdz, J. Dutko-Gwozdz, C. Schafer, V.M. Bolotina, Overexpression of Orai1 and STIM1 Proteins Alters Regulation of Store-operated Ca<sup>2+</sup> Entry by Endogenous Mediators., *J Biol Chem.* 287 (2012) 22865–22872.
- [81] Z.I. Krutetskaya, L.S. Milenina, A.A. Naumova, S.N. Butov, V.G. Antonov, A.D. Nozdrachev, Methyl- $\beta$ -cyclodextrin inhibits Ca<sup>2+</sup>-responses induced by glutoxim and molixan in macrophages, *Dokl. Biochem. Biophys.* 471 (2016) 390–392. doi:10.1134/S1607672916060041.
- [82] I. Levitan, D.K. Singh, A. Rosenhouse-Dantsker, Cholesterol binding to ion channels, *Front. Physiol.* 5 FEB (2014) 1–14. doi:10.3389/fphys.2014.00065.
- [83] H. Huo, X. Guo, S. Hong, M. Jiang, X. Liu, K. Liao, Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11561–11569. doi:10.1074/jbc.M211785200.
- [84] Y. Liao, N.W. Plummer, M.D. George, J. Abramowitz, M.X. Zhu, L. Birnbaumer, A role for Orai in TRPC-mediated Ca<sup>2+</sup> entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca<sup>2+</sup> entry., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 3202–3206. doi:10.1073/pnas.0813346106.

- [85] Y. Prakash, M. Thompson, Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle, *Am. J. ....* 55905 (2007) 1118–1126. doi:10.1152/ajplung.00136.2007.
- [86] S. Perni, J.L. Dynes, A. V. Yeromin, M.D. Cahalan, C. Franzini-Armstrong, Nanoscale patterning of STIM1 and Orai1 during store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E5533–E5542. doi:10.1073/pnas.1515606112.
- [87] G. Gimpl, K. Burger, F. Fahrenholz, Cholesterol as modulator of receptor function, *Biochemistry.* 36 (1997) 10959–10974. doi:10.1021/bi963138w.
- [88] A.S. Go, D. Mozaffarian, V.L. Roger, E.J. Benjamin, J.D. Berry, W.B. Borden, D.M. Bravata, S. Dai, E.S. Ford, C.S. Fox, S. Franco, H.J. Fullerton, C. Gillespie, S.M. Hailpern, J.A. Heit, V.J. Howard, M.D. Huffman, B.M. Kissela, S.J. Kittner, D.T. Lackland, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, D. Magid, G.M. Marcus, A. Marelli, D.B. Matchar, D.K. McGuire, E.R. Mohler, C.S. Moy, M.E. Mussolino, G. Nichol, N.P. Paynter, P.J. Schreiner, P.D. Sorlie, J. Stein, T.N. Turan, S.S. Virani, N.D. Wong, D. Woo, M.B. Turner, Heart disease and stroke statistics-2013 update: A Report from the American Heart Association, *Circulation.* 127 (2013). doi:10.1161/CIR.0b013e31828124ad.
- [89] S. Pankow, C. Bamberger, D. Calzolari, A. Bamberger, J.R. Yates, Characterization of membrane protein interactomes by Co-interacting Protein Identification Technology (CoPIT) , (2015). <http://dx.doi.org/10.1038/protex.2015.101>.
- [90] P.D.J. Moens, M.A. Digman, E. Gratton, Modes of diffusion of cholera toxin bound to GM1 on live cell membrane by image mean square displacement analysis, *Biophys. J.* 108 (2015) 1448–1458. doi:10.1016/j.bpj.2015.02.003.
- [91] C. Di Rienzo, E. Gratton, F. Beltram, F. Cardarelli, C. Di Rienzo, E. Gratton, F. Beltram, F. Cardarelli, C. Di Rienzo, E. Gratton, F. Beltram, F. Cardarelli, Fast spatiotemporal correlation spectroscopy to determine protein lateral diffusion laws in live cell membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 (2013) 12307–12312. doi:10.1073/pnas.1222097110.
- [92] C. Di Rienzo, V. Piazza, E. Gratton, F. Beltram, F. Cardarelli, Probing short-range protein Brownian motion in the cytoplasm of living cells, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–8. doi:10.1038/ncomms6891.
- [93] E. Gratton, Tutorials for Globals Software Globals for Images · SimFCS, (2015).
- [94] V. Borroni, F.J. Barrantes, Cholesterol modulates the rate and mechanism of acetylcholine receptor internalization, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17122–17132. doi:10.1074/jbc.M110.211870.
- [95] I. Derler, I. Jardin, P.B. Stathopoulos, M. Muik, M. Fahrner, V. Zayats, S.K.

- Pandey, M. Poteser, B. Lackner, M. Absolonova, R. Schindl, K. Groschner, R. Ettrich, M. Ikura, C. Romanin, Cholesterol modulates Orai1 channel function, *Sci. Signal.* 9 (2016) 1–11. doi:10.1126/scisignal.aad7808.
- [96] B. Pani, H.L. Ong, X. Liu, K. Rauser, I.S. Ambudkar, B.B. Singh, Lipid Rafts Determine Clustering of STIM1 in Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions and Regulation of Store-operated Ca(2+) Entry (SOCE), *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17333–17340. doi:10.1074/jbc.M800107200.
- [97] N. Calloway, T. Owens, K. Corwith, W. Rodgers, D. Holowka, B. Baird, Stimulated association of STIM1 and Orai1 is regulated by the balance of PtdIns(4,5)P(2) between distinct membrane pools, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 2602–2610. doi:10.1242/jcs.084178.
- [98] C. Galan, G.E. Woodard, N. Dionisio, G.M. Salido, J.A. Rosado, Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca2+ entry, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803 (2010) 1083–1093. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.006.
- [99] H. Tsujikawa, Y. Song, M. Watanabe, H. Masumiya, S. a Gupte, R. Ochi, T. Okada, Cholesterol depletion modulates basal L-type Ca2+ current and abolishes its -adrenergic enhancement in ventricular myocytes., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (2008) H285–H292. doi:10.1152/ajpheart.00824.2007.
- [100] V.G. Romanenko, Y. Fang, F. Byfield, A.J. Travis, C. a Vandenberg, G.H. Rothblat, I. Levitan, Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels., *Biophys. J.* 87 (2004) 3850–3861. doi:10.1529/biophysj.104.043273.
- [101] I. Levitan, a E. Christian, T.N. Tulenko, G.H. Rothblat, Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells., *J. Gen. Physiol.* 115 (2000) 405–416. doi:10.1085/jgp.115.4.405.
- [102] G. Picazo-Juárez, S. Romero-Suárez, A. Nieto-Posadas, I. Llorente, A. Jara-Oseguera, M. Briggs, T.J. McIntosh, S.A. Simon, E. Ladrón-de-Guevara, L.D. Islas, T. Rosenbaum, Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 24966–24976. doi:10.1074/jbc.M111.237537.
- [103] Y. Licon, D. Leandro, C. Romero-Mendez, A.A. Rodriguez-Menchaca, S. Sanchez-Armass, U. Meza, Inhibition of CaV2.3 channels by NK1 receptors is sensitive to membrane cholesterol but insensitive to caveolin-1., *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 467 (2015) 1699–709. doi:10.1007/s00424-014-1605-0.
- [104] I. Levitan, Cholesterol and Kir channels, *IUBMB Life.* 61 (2009) 781–790.

doi:10.1002/iub.192.

- [105] M. Jafurulla, B.D. Rao, S. Sreedevi, J.M. Ruyschaert, D.F. Covey, A. Chattopadhyay, Stereospecific requirement of cholesterol in the function of the serotonin<sub>1A</sub> receptor, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 158–163. doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.015.
- [106] A. Bohórquez-Hernández, E. Gratton, J. Pacheco, A. Asanov, L. Vaca, Cholesterol modulates the cellular localization of Orai1 channels and its disposition among membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* (2017). doi:10.1016/j.bbalip.2017.09.005.
- [107] P.C. Sundivakkam, A.M. Kwiatek, T.T. Sharma, R.D. Minshall, A.B. Malik, C. Tirupathi, Caveolin-1 scaffold domain interacts with TRPC1 and IP3R3 to regulate Ca<sup>2+</sup> store release-induced Ca<sup>2+</sup> entry in endothelial cells., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296 (2009) C403–C413. doi:10.1152/ajpcell.00470.2008.
- [108] G. Krishnan, N. Chatterjee, Detergent resistant membrane fractions are involved in calcium signaling in Müller glial cells of retina, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 1758–1766. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.024.
- [109] M. Hoth, CRAC channels, calcium, and cancer in light of the driver and passenger concept, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 1408–1417. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.12.009.
- [110] T. Hayashi, T. Su, Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins:, 2010. doi:10.1007/978-90-481-8622-8.

## 12. Anexos

### 1.2 Anexo 1. Publicaciones obtenidas durante la estancia doctoral