



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LA INACTIVACIÓN HETERÓLOGA DEPENDIENTE DE CALCIO DE Orai1 POR
CANALES TRPV1 CERCANOS, MODULA LA MIGRACIÓN CELULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

CARLOS ERNESTO BASTIÁN EUGENIO

TUTOR PRINCIPAL

DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ
Facultad de Medicina, UNAM

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Noviembre, 2022



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.

Bastian Eugenio Carlos Ernesto
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 20 de junio del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**La inactivación heteróloga dependiente de calcio de Orai1 por canales TRPV1 cercanos, modula la migración celular**", dirigida por el Dr. **Vaca Domínguez Luis Alfonso**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Escobar Pérez Leonila Irma Laura (FM)
VOCAL	López González Ignacio (Bt)
VOCAL	Martínez Torres Ataúlfo (INB)
VOCAL	Cifuentes Navarro Freddy Roberto (IIBo)
SECRETARIO	Gómora Martínez Juan Carlos (IFC)

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **30 (Doctorado)** días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 27 de junio de 2022
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Dra. Alicia Sampieri García por su apoyo técnico como Técnico Académico del laboratorio.

Al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA), en especial al M. en C. José Pablo Ocelotl Oviedo por el apoyo técnico brindado para los experimentos de microscopía de súper-resolución.

Al M.C. Rodolfo Paredes y Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología del IFC, por el apoyo brindado para algunos experimentos de microscopía.

Al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo y la Unidad de Cómputo por su apoyo con el soporte técnico y mantenimiento de los sistemas de cómputo.

Al Ing. Aurey Galván Lobato y el Ing. Manuel Ortíz Benavides del Taller de Mantenimiento Electrónico, Eléctrico y Mecánico por mantener en buen estado el funcionamiento de los equipos de laboratorio.

A la Unidad de Biología Molecular, por el apoyo técnico y permitirnos el uso de algunas de las herramientas en dicha unidad.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por el apoyo brindado en la parte administrativa.

Al CONACYT por brindarme una beca durante mi maestría y doctorado (277682), (CVU 486558).

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP), por el apoyo brindado para la realización de una estancia en el extranjero.

A los miembros del Jurado de Examen de grado, Dra. Laura Escobar, Dr. Ignacio López, Dr. Ataulfo Martínez, Dr. Fredy Cifuentes y Dr. Juan Carlos Gómora, por todas las críticas, observaciones y recomendaciones para mejorar este trabajo escrito.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA), por los apoyos PAPIIT IN206323 y AV200320, que auspiciaron este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mis padres Braulio y Gisela, que siempre me han alentado y siempre confiaron en mí.

A mi hermana Laura, que siempre ha estado presente.

A todos mis abuelos.

A Gabriela, por ser parte fundamental en mi vida.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Ciencias, la Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular. Es un orgullo pertenecer a esta comunidad.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas y todos sus profesores, gracias por enseñarme tanto.

A mi tutor, Dr. Luis Vaca, gracias por permitirme ser parte de su laboratorio, por animarme a culminar este trabajo y por todos los consejos y recomendaciones, he aprendido mucho de usted, de verdad muchas gracias.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. León Islas Suárez y el Dr. Arturo Hernández Cruz, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron enormemente este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio 126 Norte, a los que ya no están y los que continúan. Todos me dejaron alguna lección. Jonathan, Josué, Emma, Jesús, Margarita y Daniel.

A Alicia y Doña Salus, por el club del tamal, en especial a Doña Salus por brindarme su cariño durante todo el tiempo que estuve ahí.

A mis amigos en el lab, ahora mis amigos de los sábados, Adolfo, Arlette, Karla y Kevin, gracias por las risas y el apoyo durante el tiempo que estuvimos juntos. Sin ustedes no hubiera sido divertido.

A mis amigos del IFC, por las retas de fut y la ayuda con reactivos. En especial a Dany, Gabriel, Pily, Martha, Josué, JD y Erik.

A mis amigos de Cancerología, Julio y Luisra, gracias por confiar en que si terminaría esto.

A todos los que estuvieron en alguna parte de este trayecto, gracias Don Juan, Doña Lola por recibirme al llegar a la Ciudad de México. A Joseph por ayudarme en el LNMA. A Danilo y José por darme mi primer trabajo. Y a tantos más que ya no me queda espacio para agradecer.

A mis padres, gracias por su amor incondicional.

A mi hermana Laura, gracias por todo el cariño y apoyo.

A mi familia, en especial a mis abuelos, nunca olvidaré mis raíces totonacas.

A Gaby, gracias por formar parte fundamental de mi vida y por alentarme a culminar esta etapa, gracias por todo tu amor y paciencia. Lo logramos.

¡Paxkatkatsini!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	3
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	4
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Señalización de Ca ²⁺ intracelular	9
1.2. Microdominios y nanodominios de Ca ²⁺	10
1.3. Canales de calcio.....	11
1.4. Entrada de calcio activada por las reservas (SOCE).....	12
1.5. Canales Orai1	14
1.5.1. Inactivación dependiente de calcio del canal Orai1	14
1.6. Algunas herramientas para el estudio de la SOCE.....	17
1.6.1. Indicadores de calcio	17
1.6.2. Microscopía de super-resolución	19
1.7. Astrocitos	21
1.7.1. Migración celular en astrocitos	23
2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos particulares	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Reactivos	27
5.2. Plásmidos	27
5.3. Cultivo celular y transfección	28
5.4. Detección de proteínas (Western blot).....	29
5.5. Electrofisiología	29
5.6. Microscopía confocal.....	31
5.7. Imagenología de calcio	31
5.8. Microscopía de super-resolución	32
5.9. Mediciones de FRET.....	33
5.10. Ensayo de co-inmunoprecipitación.....	34
5.11. Dominios anquirina fusionados a la GFP	35

5.12.	Microarreglos de péptidos con TIRF	36
5.13.	Ensayo de cicatrización o cierre de la herida.....	37
6.	RESULTADOS	39
6.1.	Desarrollo y caracterización del sensor Orai1-GCaMP3.....	39
6.2.	Orai1-GCaMP3 detecta incrementos locales de Ca ²	41
6.3.	La activación del canal TRPV1 induce la CDI del canal Orai1	42
6.4.	Orai1 se encuentra próximo a TRPV1, pero no a P2X ₄	44
6.5.	Orai1 se asocia con TRPV1, pero no con P2X ₄	46
6.6.	El C-terminal de Orai1 y los dominios de anquirina de TRPV1 son los responsables de su asociación.....	47
6.7.	La CDI de Orai1 inducida por la activación de TRPV1 modula la migración celular de astrocitos corticales.....	50
7.	DISCUSIÓN	53
8.	CONCLUSIONES	58
9.	PERSPECTIVAS	58
10.	LITERATURA CITADA.....	59
11.	ANEXOS.....	72
	Anexo 1. Publicaciones derivadas del trabajo doctoral	72
	Anexo 2. Otras publicaciones realizadas durante la estancia doctoral	97

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Señalización de calcio intracelular	9
Figura 2. Principales componentes de la entrada de Ca^{2+} activada por las reservas (SOCE)	12
Figura 3. Mecanismo de activación de la entrada activada por las reservas	13
Figura 4. Inactivación rápida y lenta dependiente de Ca^{2+}	16
Figura 5. Indicadores de calcio codificados genéticamente de una sola proteína fluorescente	18
Figura 6. Microscopía de super-resolución aplicada al estudio de la SOCE	20
Figura 7. Perfil de expresión de canales de calcio en astrocitos	22
Figura 8. Construcción de la proteína de fusión Orai1-GCaMP3	28
Figura 9. Protocolo de patch clamp de activación secuencial.....	30
Figura 10. Desarrollo y pruebas del sensor Orai1-GCaMP3	40
Figura 11. Orai1-GCaMP3 detecta los incrementos de Ca^{2+} de TRPV1, pero no los de P2X ₄	41
Figura 12. El sensor Lck-GCaMP5 detecta incrementos de Ca^{2+} inducidos por CTP	42
Figura 13. Mediciones de patch perforado en células control HEK-293 expresando Orai1 (WT)-GFP y Stim1-DsRed.....	42
Figura 14. La activación de TRPV1 induce una fuerte CDI en Orai1.....	43
Figura 15. La mutante Y80W de Orai1 es insensible a la CDI de Orai1 inducida por TRPV1.....	44
Figura 16 . Microscopía de super-resolución revela que TRPV1 y Orai1 se mueven cerca uno del otro en la membrana plasmática	45
Figura 17. Canales unitarios Orai1-GCaMP3 detectan los incrementos de Ca^{2+} de TRPV1, pero no los de P2X ₄	46
Figura 18. TRPV1 se encuentra cercano a Orai1.....	47
Figura 19. El primer dominio anquirina de TRPV1 se asocia al C-terminal de Orai1 para favorecer la agrupación de TRPV1-Orai1	48
Figura 20. La delección del dominio ANK1 aumenta la distancia entre Orai1 y TRPV1.....	49
Figura 21. La delección de ANK1 no afecta la entrada de Ca^{2+} por TRPV1 y disminuye su efecto sobre la CDI de Orai1	50
Figura 22. El Ca^{2+} que entra por TRPV1 induce CDI en Orai1 en astrocitos corticales	51
Figura 23. La inducción de la CDI de Orai1 por TPV1 modula la cicatrización de la herida en astrocitos.	52
Figura 24. Mecanismo propuesto para el efecto de la inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} en la migración celular.	57
Tabla 1. Resumen de propiedades de los mecanismos de inactivación de calcio.....	16
Tabla 2.Principales funciones de los astrocitos en el cerebro.....	21
Tabla 3. Comparación de diferentes ensayos de migración in vitro.....	24
Tabla 4. Principales reactivos utilizados durante el desarrollo de este trabajo	27

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aa: Aminoácidos.

ANK: Dominio anquirina (Ankyrin domain).

ANOVA: Análisis de la variancia (Analysis of variance).

AUC: Área bajo la curva (area under the curve).

Ca²⁺: Ion calcio.

Cap: Capsaicina.

CDI: Inactivación dependiente de calcio (Calcium-dependent inactivation).

CFP: Proteína cian fluorescente (Cyan fluorescent protein).

Co-IP: Co-inmunoprecipitación.

C-terminal: Carboxilo terminal.

CRAC: Canales de Ca²⁺ activados por la liberación de Ca²⁺.

CTP: Citidin trifosfato.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

ER: Retículo endoplásmico.

E_{FRET}: Eficiencia de FRET.

FCDI: Inactivación rápida dependiente de calcio (Fast calcium-dependent inactivation).

FF-SRM: Microscopía de super-resolución por fluctuación de la fluorescencia

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster (Förster resonance Energy transfer).

GECI: Indicador de calcio codificado genéticamente (Genetically encoded Ca²⁺ indicator).

GFP: Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein).

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G (G-protein-coupled receptors).

HEK-293: Línea celular derivada de riñón de embrión humano (Human embryonic kidney).

IP₃: Inositol 1,4,5-trisfosfato.

IP₃R: Receptor de IP₃

MP: Membrana plasmática

MSR: Microscopía de super-resolución

N-terminal: Amino terminal.

OG3: Orai1-GCaMP3

PALM: Microscopía de localización fotoactivada (Photoactivated Localization Microscopy)

PCC: Coeficiente de correlación de Pearson (Pearson's correlation coefficient).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

R-GECO: Indicador de calcio rojo fluorescente codificado genéticamente para imagenología óptica.

ROI: Región de interés (Region of interest).

ROC: Canales activados por receptor (Receptor operated channels).

SCDI: Inactivación lenta dependiente de calcio (Slow calcium-dependent inactivation).

SARAF: Factor regulador asociado a SOCE (SOCE-associated regulatory factor).

SIM: Microscopía de iluminación estructurada (Structured Illumination Microscopy)

siRNA: Ácido ribonucleico de interferencia pequeño (Small interference RNA).

SOAR: Región de activación STIM-Orai1 (STIM-Orai activating region).

SOCE: Entrada de calcio activada por las reservas (Store-operated calcium entry).

SOC: Canales de calcio activados por las reservas (Store operated channels).

SRRF: Super resolución por fluctuación radial (Super resolution radial fluctuation).

STED: Microscopía de agotamiento de la emisión (STimulated Emission Depletion microscopy)

STORM: Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)

SWA: Ensayo de cierre o cicatrización de la herida (Scratch-wound assay).

TG: Tapsigargina.

Thr: Trombina.

TIRF: Fluorescencia de reflexión interna total (Total internal reflection fluorescence).

TIRFM: Microscopía usando iluminación TIRF (Microscopy TIRF).

TRPV1: Receptor (canal) de potencial transitorio vaniloide subtipo 1.

VOC: Canales activados por voltaje (Voltage Operated Channels).

WT: Tipo silvestre (Wild type).

YFP: Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein).

RESUMEN

El ion Ca^{2+} es uno de los segundos mensajeros más importantes para diversos procesos celulares. La entrada de Ca^{2+} activada por las reservas (SOCE) es el principal mecanismo para la movilización de este ion en células no excitables. Los componentes esenciales de la SOCE son el sensor de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (ER), STIM1 y el canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PM) Orai1. La actividad de Orai1 está regulada por varios mecanismos, uno de los más importantes es por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa que mantiene la homeostasis intracelular de Ca^{2+} previniendo la entrada excesiva de Ca^{2+} . Este mecanismo es llamado inactivación dependiente de Ca^{2+} (CDI). La CDI consiste en la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} (SCDI) y la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} (FCDI), las cuales tienen diferentes cinéticas y sitios de acción. La FCDI transcurre dentro de ~10 a 100 milisegundos después de la activación del canal y es controlada por la unión de Ca^{2+} a un sitio localizado a ~8 nanómetros del poro del canal.

Hasta donde conocemos, todos los estudios llevados a cabo a la fecha para explorar la CDI en Orai1 han sido conducidos por el aumento intracelular de Ca^{2+} de manera artificial por medio de la pipeta de “patch-clamp”, lo que refleja la CDI inducida por Ca^{2+} que entra a través del poro del canal (inactivación homóloga dependiente de Ca^{2+}). Menos estudiadas están las fuentes fisiológicas de Ca^{2+} , tales como otros canales.

En el presente estudio hemos explorado otras fuentes de Ca^{2+} provenientes de diferentes canales. Encontramos que el Ca^{2+} entrante a través de los canales TRPV1 induce una fuerte CDI en Orai1, mientras que el Ca^{2+} que entra por medio de los canales P2X₄ no la induce. Estudios de microscopía de super resolución, co-inmunoprecipitación (co-IP) y FRET (Transferencia de energía por resonancia de Förster) indican que Orai1 y TRPV1 están asociados y se mueven juntos en la PM, mientras que Orai1 y P2X₄ no se encuentran asociados. Estos resultados indican que existe una asociación entre los canales Orai1 y TRPV1, lo cual resulta en un elevado microambiente (nanodominio) de Ca^{2+} cuando los canales TRPV1 son activados, lo cual intensifica la CDI en Orai1. Debido a que Orai1 y P2X₄ no se encuentran cercanos uno de otro, el Ca^{2+} que entra por P2X₄ no afecta la CDI en Orai1, a pesar del hecho de que el Ca^{2+} entrante a través de P2X₄ contribuye al incremento de la concentración citosólica Ca^{2+} .

Los análisis de delección de segmentos y arreglos peptídicos mostraron que el primer dominio anquirina (ANK1) en TRPV1 es requerido para la asociación de este canal al dominio N-terminal de Orai1. Este dominio ANK1 mantiene ambos canales cerca y favorece la CDI en Orai1. La supresión de este dominio reduce significativamente la CDI en Orai1 promovida por el Ca^{2+} que entra a través de TRPV1.

Nuestros resultados tienen importantes implicaciones fisiológicas en la modulación de la entrada de Ca^{2+} en células donde TRPV1 y Orai1 coexisten, tales como los astrocitos. Mostramos que TRPV1 es un modulador importante de la actividad del canal Orai1 en astrocitos corticales por medio del control de la CDI en este canal, reduciendo la cantidad de Ca^{2+} que entra a la célula cuando TRPV1 y Orai1 son simultánea o secuencialmente activados. Esta modulación heteróloga del CDI desempeña un papel en el control de la migración celular y en el cierre de la herida en cultivo de astrocitos.

ABSTRACT

Calcium ion (Ca^{2+}) is a second messenger important in numerous cellular processes. Store operated calcium entry (SOCE) is the main mechanism for calcium mobilization in non-excitabile cells. The essential components of SOCE are the endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} sensor STIM1 and the plasma membrane (PM) channel Orai1. Orai1 activity is regulated by several mechanisms, one of the most important is through a negative feedback mechanism that maintains intracellular Ca^{2+} homeostasis and prevents excessive Ca^{2+} influx. Such mechanism is known as Ca^{2+} -dependent inactivation (CDI). CDI consists of slow CDI (SCDI) and fast CDI (FCDI), which have distinct kinetics and sites of action. FCDI takes place within ~10 to 100 milliseconds after channel activation and is controlled by Ca^{2+} binding to a site located ~8 nanometers from the channel pore.

To our knowledge, all the studies carried out to this date to explore CDI in Orai1 have been conducted by artificially increasing intracellular Ca^{2+} via the patch clamp pipette, which reflects CDI induced by Ca^{2+} entering through the Orai1 channel pore (homologous CDI). Less studied are the physiological sources of Ca^{2+} , such as other channels.

In the present study we have explored other sources of Ca^{2+} arising from different channels. We have found that Ca^{2+} entering the cell through TRPV1 channels induce strong CDI in Orai1, while Ca^{2+} entering through P2X₄ purinergic channels does not. Super resolution, co-immunoprecipitation (co-IP) and Förster resonance energy transfer (FRET) studies indicate that Orai1 and TRPV1 are associated and move in close proximity to each other at the PM, while P2X₄ and Orai1 do not. These results indicate that a close association between TRPV1 and Orai1 results in an elevated Ca^{2+} microenvironment (nanodomain) when TRPV1 channels are activated, which enhances CDI in Orai1. Because P2X₄ and Orai1 are not found in proximity, Ca^{2+} entering P2X₄ channels do not affect CDI in Orai1, in spite the fact that Ca^{2+} entering through P2X₄ contributes to increments in cytosolic Ca^{2+} concentrations. Deletion analysis and peptide arrays show that the first ankyrin domain (ANK1) in TRPV1 is required for the association of this channel to the N-terminal domain from Orai1. This ANK1 domain maintains both channels close and favors CDI in Orai1. Deleting this domain significantly reduces CDI in Orai1 elicited by Ca^{2+} entering through the TRPV1.

Our results have important physiological implications in the modulation of Ca^{2+} influx in cells where TRPV1 and Orai1 channels coexist, as within astrocytes. We show that TRPV1 is an important modulator of Orai1 channel activity in cortical astrocytes by controlling CDI in this channel and thus reducing the amount of Ca^{2+} entering to the cell when TRPV1 and Orai1 are simultaneously or sequentially activated. This heterologous modulation of CDI plays a role in controlling cell migration and wound healing in astrocytes culture.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Señalización de Ca^{2+} intracelular

El ion calcio (Ca^{2+}) es uno de los agentes de señalización celular más universales y versátiles en los seres vivos. Cambios en la concentración intracelular de este ion son responsables de controlar una gran variedad de procesos biológicos fundamentales, tales como la transcripción, el ciclo celular, la migración celular, la muerte celular programada, entre muchos otros¹⁻³. ¿Pero cómo es que una señal que parece tan simple, como la elevación de Ca^{2+} logra regular tantos diversos procesos? Esta increíble versatilidad se logra mediante patrones espacio-temporales, de velocidad y de amplitud; por esta razón, la señalización de Ca^{2+} debe de ser regulada de manera flexible, pero con alta precisión al mismo tiempo. Estas dos características se logran gracias a la existencia de una sofisticada maquinaria molecular que regula con precisión las señales de Ca^{2+} . Esta maquinaria está compuesta por transportadores de Ca^{2+} (canales de Ca^{2+} , bombas de Ca^{2+} , intercambiadores), proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} y proteínas sensoras de Ca^{2+} ⁴⁻⁶. A este conjunto de proteínas Berridge hace ya 20 años le dio el nombre de “herramientas de trabajo de Ca^{2+} ” (*Ca^{2+} toolkit* en inglés) y alrededor de este término se ha desarrollado nuestro entendimiento de la señalización de este ion (Fig. 1)¹.

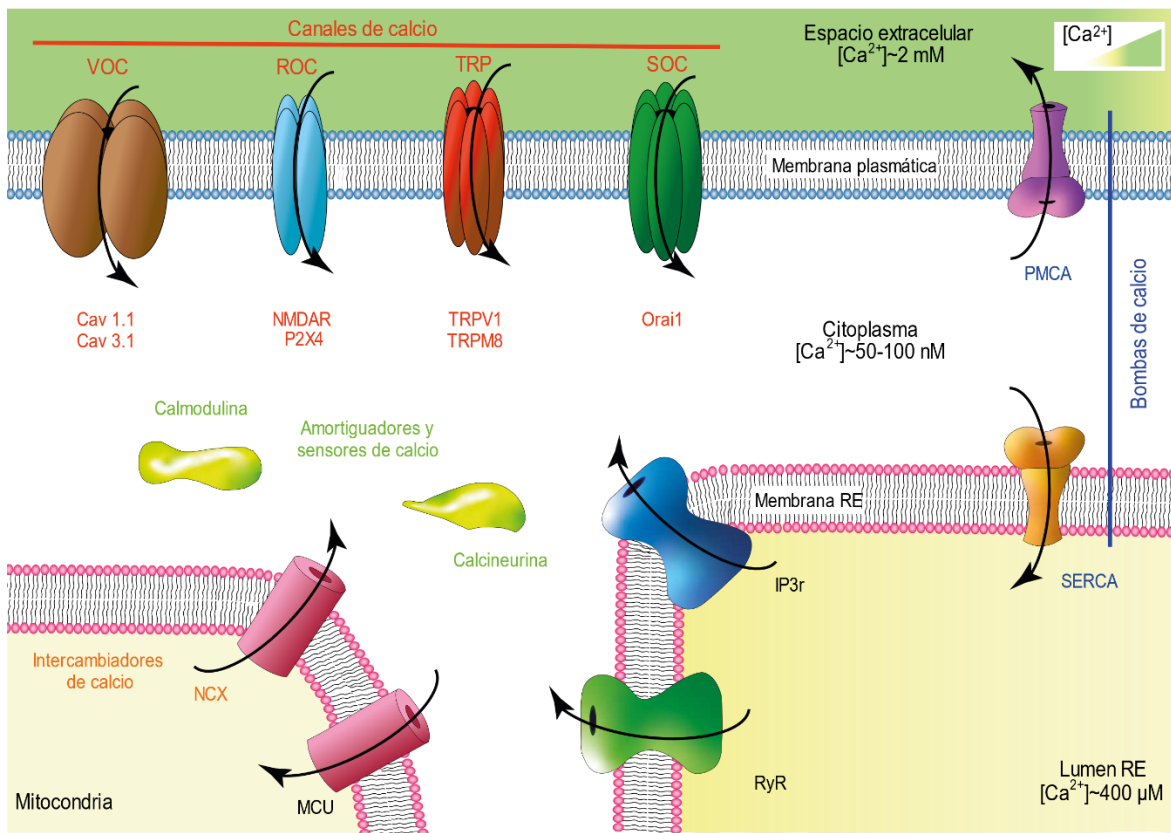


Figura 1. Señalización de calcio intracelular. Los principales componentes de la señalización de Ca^{2+} son: (1) los canales de calcio divididos en activados por voltaje (VOC), activados por receptor (ROC) y activados por la reserva (SOC) y los TRP; (2) las bombas de Ca^{2+} , (3) los amortiguadores de Ca^{2+} y (4) los intercambiadores de Ca^{2+} . Las principales fuentes de Ca^{2+} son el medio extracelular, el RE y la mitocondria.

La esencia de la señalización basada en Ca^{2+} , en cualquier organismo eucarionte, es que la concentración de Ca^{2+} intracelular ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$) en condiciones basales es extremadamente baja, aproximadamente $\sim 100 \text{ nM}^3$ (Fig. 1), sin embargo, después de un estímulo esta concentración puede aumentar hasta alcanzar una concentración de alrededor de $1 \mu\text{M}^5$. Este aumento se logra mediante la entrada de Ca^{2+} extracelular ($\sim 1\text{-}2 \text{ mM}$) a través de los canales de la membrana plasmática y por la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares (retículo endoplásmico, $\sim 100\text{-}800 \mu\text{M}$), aunque cabe aclarar que el incremento en la concentración de este ion se da únicamente en las localizaciones celulares donde es requerido.

Los aumentos de Ca^{2+} generan señales que pueden ser de amplitud y duración variable, además de que pueden estar restringidas a un pequeño dominio o a toda la célula. La mayoría de las señales de Ca^{2+} se dan como breves transitorios, que a menudo se organizan en oscilaciones regulares. La frecuencia de estas oscilaciones repetitivas es modulada y codifica información para controlar distintos procesos celulares^{1,4,7}. La organización espacial del Ca^{2+} en distintos microdominios y/o nanodominios, es una manera de mejorar la versatilidad de este sistema de señalización, permitiendo a las células regular diferentes procesos dentro de regiones localizadas de la célula^{8,9}.

1.2. Microdominios y nanodominios de Ca^{2+}

La compartimentación en microdominios y nanodominios es un importante mecanismo para el control de la señalización de Ca^{2+} . A pesar de que los términos de microdominio y nanodominio de Ca^{2+} son ampliamente usados, sus definiciones no son muy precisas y han sufrido cambios a través del tiempo⁹⁻¹¹. Originalmente el término microdominio fue usado para describir altas concentraciones de Ca^{2+} encontradas en las proximidades de un canal de Ca^{2+} . A pesar del nombre, estos microdominios tienen realmente dimensiones espaciales en el rango de nanómetros (“micro” en “microdominios” significa “pequeño” y proviene del griego). Más recientemente, los términos microdominio y nanodominio han sido ampliamente utilizados para distinguir acoplamiento moleculares estrechos y lejanos. Su definición es confusa, ya que el límite para separar ambos dominios se da entre 50 a 150 nm. De manera general podemos definir un microdominio de Ca^{2+} como aquellas regiones celulares con una concentración elevada de Ca^{2+} que se extiende por arriba de los 100 nm. En cuanto a los nanodominios de Ca^{2+} estos pueden ser definidos como las regiones de concentración elevada de Ca^{2+} menores a 100 nm^{10,12}.

Varios reportes han apoyado la existencia de los micro y nanodominios y son consistentes con cálculos teóricos de la concentración de Ca^{2+} esperada en el poro de un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática, esto con la ayuda del gran poder amortiguador del citosol.

La distinción entre las señales de corto alcance (micro y nanodominios) de las señales globales de calcio, incrementan la capacidad informativa de la señalización intracelular. Los microdominios y nanodominios, regulan diversos procesos tales como la transmisión sináptica¹³, la plasticidad neuronal¹⁴, el acoplamiento cardiaco de contracción y excitación¹⁵,

secreción de insulina¹⁶, entre otros¹⁷⁻¹⁹. En contraste los incrementos globales de calcio regulan también procesos sumamente importantes tales como la proliferación, diferenciación o la apoptosis^{20,21}.

Para regular el tipo de señal de calcio (global o local), la célula hace uso del “kit” de herramientas, en especial de las bombas, intercambiadores y canales de Ca^{2+} . En este escrito me enfocaré en el papel de los canales de Ca^{2+} en la homeostasis de este ion.

1.3. Canales de calcio

El control del movimiento del Ca^{2+} a través de las membranas representa el núcleo del sistema de señalización de esta molécula. El transporte de Ca^{2+} se da principalmente por medio de los canales de Ca^{2+} .

Los canales de Ca^{2+} son esencialmente proteínas transmembranales que tienen un poro acuoso con un filtro de selectividad y mecanismos de apertura y cierre que le permiten la difusión dirigida de calcio por medio de un gradiente electroquímico. Estos canales de Ca^{2+} son de manera global divididos en canales de la membrana plasmática y en canales intracelulares, todos estos a su vez son divididos en varias familias dependiendo de su mecanismo de apertura y cierre, su selectividad y su función.

Los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática se dividen de manera muy general en canales activados por voltaje (*VOC*, por sus siglas en inglés), canales activados por receptor (*ROC*), canales TRP (*Transient receptor potential*) y canales activados por las reservas (*SOC*) (Fig. 1).

Como su nombre indica, los VOC son regulados por cambios en el voltaje que existen en la membrana plasmática. En general estos canales se encuentran cerrados cuando la membrana esta hiperpolarizada, pero estos se abren durante una despolarización. El gran número de VOC ha sido dividido en tres grandes familias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 ²².

Los canales de calcio activados por receptores son canales iónicos multiméricos cuya apertura es regulada por agonistas externos tales como neurotransmisores y hormonas. Estos tienen dos importantes funciones de señalización. Primero, su apertura y selectividad iónica (a Na^+ , K^+ , Cl^- y/o Ca^{2+}) altera el potencial de membrana, siendo esenciales para el control de células excitables tales como neuronas y células musculares. Además, su permeabilidad a Ca^{2+} representa un importante mecanismo para la regulación de este segundo mensajero. Existen tres principales grupos de ROC, los receptores con *loops* de cisteínas (como los receptores de acetilcolina tipo nicotínico y los receptores GABA), los receptores de glutamato (receptores AMPA y NMDA) y los receptores sensibles a ATP (receptores P2, como los P2Y_2 y los P2X_4), en esta clasificación generalizada, se podría incluir a la familia de los canales TRP, que además de tener agonistas que permiten su apertura, también están regulados por otro tipo de estímulos como el movimiento y la temperatura, como ejemplos de este tipo de canales están el canal TRPV1 y el TRPM8²³.

Los canales de Ca^{2+} activados por la reserva (SOC) son aquellos en los que sus mecanismos de apertura se dan en respuesta al vaciamiento de las reservas de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). Este mecanismo de apertura de canales se da como una manera de

asegurar una constante recaptura de Ca^{2+} por parte de las pozas internas (RE y mitocondria), ya que gran parte del Ca^{2+} usado en la señalización es liberado desde la reserva de Ca^{2+} del RE^{22,24}.

1.4. Entrada de calcio activada por las reservas (SOCE)

Orai1 junto con STIM1 son las proteínas que forman la base molecular de la entrada de calcio activada por las reservas (SOCE por sus siglas en inglés) (Fig. 2), la cual fue propuesta por Putney en 1986. La importancia de esta entrada de calcio ha sido ampliamente demostrada en muchos tipos celulares (principalmente en células no excitables) y también se sabe que es una de las principales vías de calcio presentes en casi todos los metazoarios. Fisiológicamente la SOCE es un mecanismo de entrada de calcio relevante en diversos procesos, tales como la maduración de linfocitos T y B, la liberación de histamina y serotonina en células cebadas, la exocitosis de gránulos líticas de células T citotóxicas, proliferación, entre muchos otros²⁵⁻²⁷.

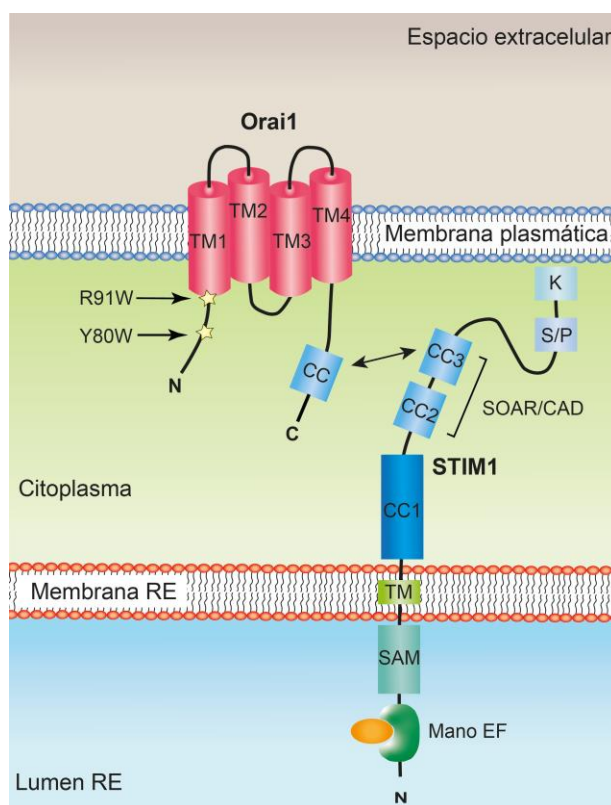


Figura 2. Principales componentes de la entrada de Ca^{2+} activada por las reservas (SOCE). La SOCE tiene como principales dos componentes principales al sensor de Ca^{2+} del RE, STIM1 y el canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática Orai1. TM: Dominio transmembranal; CC: Doble espiral; SAM: Motivo alfa estéril; K: región rica en lisina; S/P, región rica en serina y prolina; SOAR/CAD: región de activación STIM1-Orai1/ Dominio de activación de CRAC.

De manera fisiológica la SOCE es activada por estímulos que liberan calcio del retículo endoplásmico. La activación de la SOCE se da a través de una compleja coreografía entre Orai1 y STIM1 (Fig. 3), esta activación generalmente involucra la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (como por ejemplo el receptor de ácido muscarínico y los receptores activados por proteasas) que activan a la fosfolipasa C específica para fosfoinosítidos (PLC) que resulta en la producción de inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3) el cual a su vez activa a los

receptores de IP_3 (IP_3R) en el RE, la apertura de estos canales receptores permite el vaciamiento del RE por la liberación del Ca^{2+} hacia el citosol. La disminución de Ca^{2+} en el RE es detectada por la *mano-EF* de STIM1, lo que provoca un cambio conformacional de esta proteína, produciendo su oligomerización y su translocación vía microtúbulos y acumulación en las cercanías de la MP. Al mismo tiempo, Orai1 se acumula en sitios de la membrana plasmática directamente opuestos a STIM1, donde finalmente STIM1 se une a Orai1 y permite su apertura formando estructuras parecidas a “puntos” (*puncta* en latín) que se pueden observar con microscopía confocal. Estos puntos periféricos corresponden a nivel estructural a regiones especializadas de retículo endoplásmico liso posicionadas a ~10-20 nm de la membrana plasmática, estas estructuras son conocidas como uniones retículo endoplásmico-membrana plasmática (ER-PM), donde se genera la entrada de calcio. De manera experimental para lograr toda esta coreografía molecular se utiliza frecuentemente un inhibidor de la ATPasa del retículo sarco-endoplásmico (SERCA) llamado tapsigargina (TG), que independientemente de los GPCRs y de IP_3 vacía el retículo endoplásmico a través de un mecanismo de fuga desconocido^{25,28,29}.

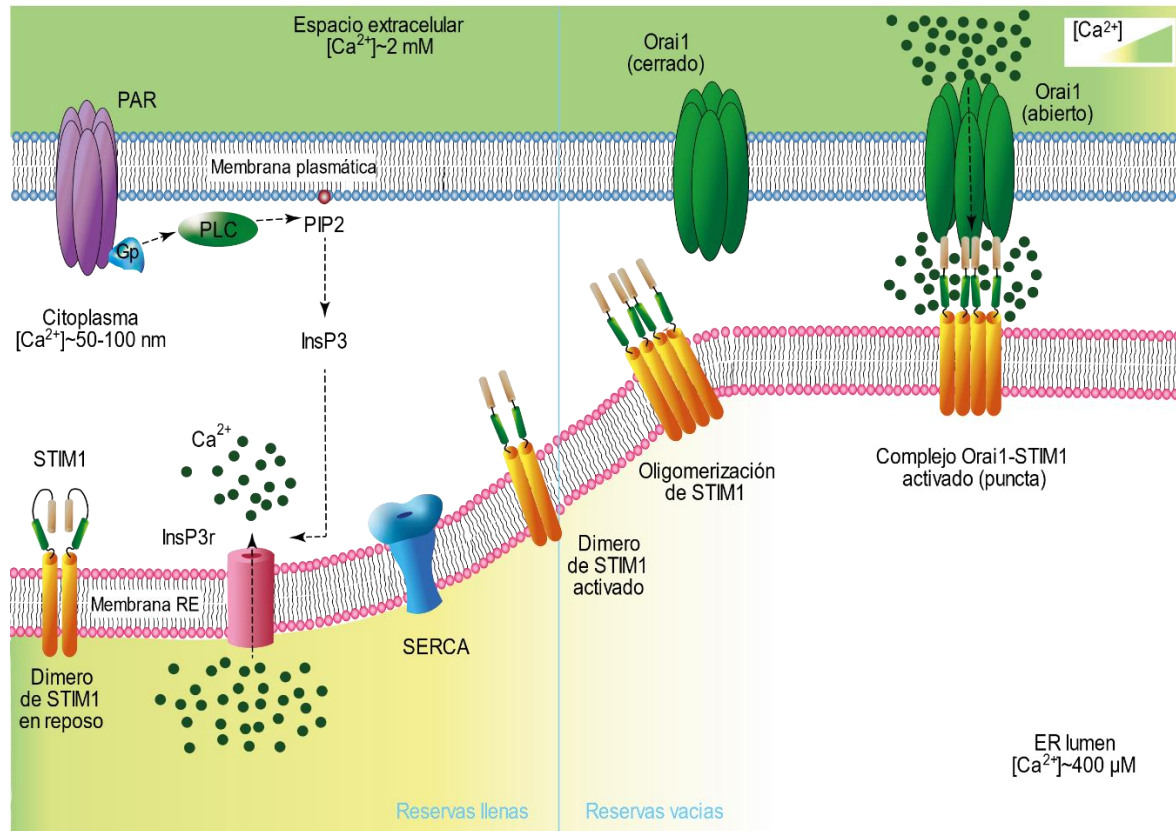


Figura 3. Mecanismo de activación de la entrada activa por las reservas. Para una descripción detallada por favor referirse al texto. PAR: Receptor activado por proteasas; Gp: Proteína G; PLC: Fosfolipasa C.

La SOCE tiene 3 características principales, la primera es su activación exclusiva por el vaciamiento del retículo endoplásmico, la segunda es la alta selectividad por el calcio sobre

otros cationes monovalentes y en tercer lugar la inactivación dependiente de Ca^{2+} (CDI por sus siglas en inglés)²⁵⁻²⁷, esta última característica será detallada más adelante.

1.5. Canales Orai1

Uno de los dos componentes principales de la SOCE es el canal Orai1, este fue identificado en el 2006, cuando se encontró un polimorfismo de un solo nucleótido (R91W, Fig. 2) dentro del canal Orai1 en una familia que presentaba una forma hereditaria de inmunodeficiencia combinada grave (SCID, severe combined immunodeficiency), lo cual hace que existan defectos en la SOCE de los linfocitos T y por lo tanto problemas en su maduración³⁰.

De acuerdo a la estructura cristalográfica del canal dOrai (obtenido de *Drosophila melanogaster*) la estequiometría funcional de los canales Orai1 es de hexámeros³¹. Sin embargo, otros tipos de evidencias experimentales apuntan a una conformación tetramérica³²⁻³⁴. Existe todavía una amplia discusión sobre este tema.

La estructura cristalográfica de dOrai (73% de homología con Orai1) revela un ensamble hexamérico de subunidades. Estas subunidades están acomodadas de manera simétrica como trímeros de dímeros alrededor de un eje central del canal para formar el poro. Cada subunidad está compuesta por cuatro dominios transmembranales (dominios TM, Fig. 2) de α -hélices (M1-M4) y una extensión del dominio M4 que se encuentra inmersa dentro del citosol. La vista de la estructura del canal desde el lado extracelular es de tres anillos concéntricos de los dominios TM. El anillo más interno está compuesto de dominios M1 y forma la vía de conducción del canal. El anillo intermedio, está compuesto de los dominios M2 y M3 y brinda rigidez e integridad estructural. El anillo concéntrico más externo está compuesto por el dominio M4 y su extensión, es el más periférico y móvil.

Los residuos N-terminal (74-90) de Orai1 están altamente conservados y son esenciales para la activación. En esta parte se encuentra el dominio N terminal de unión a calmodulina (aa. 68-91) y mutaciones en este dominio disminuyen la CDI. Otros residuos del C-terminal (268-291) son importantes para la unión de STIM1 y también se ha observado que esta región muy probablemente regule la CDI^{35,36}.

1.5.1. Inactivación dependiente de calcio del canal Orai1

La inactivación dependiente de Ca^{2+} es un mecanismo de retroalimentación negativa que mantiene la homeostasis intracelular de Ca^{2+} y que previene la entrada excesiva de este ion al citoplasma ya que una elevación exacerbada de Ca^{2+} dentro del citoplasma, puede modificar y destruir el delicado balance que ejerce el calcio en la regulación de diversos procesos e incluso puede llevar a la muerte celular^{35,37-39}. Este mecanismo fue primero descrito en canales de calcio modulados por voltaje^{40,41}.

Las altas concentraciones de Ca^{2+} intracelular inhiben la función de Orai1 de dos maneras distintas, la primera es la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} (FCDI, por sus siglas en inglés) que ocurre en el rango de los milisegundos⁴²⁻⁴⁴ y la segunda es la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} (SCDI, por sus siglas en inglés) que se da en las decenas de segundos

después de la activación de Orai1^{44,45}. Es importante resaltar que ninguna de las dos formas de la CDI parecen involucrar un desacople funcional ni físico de Orai1 y STIM1³⁹ (Tabla 1). La FCDI de Orai1 puede ser observada durante registros de electrofisiología de célula completa al aplicar rampas de voltaje a potenciales negativos desde un potencial de mantenimiento de 0 mV después de la completa activación de la SOCE por el vaciamiento del retículo. La rampa de voltaje negativa da como resultado un incremento instantáneo en la corriente a través de los canales Orai1 abiertos, pero la corriente se inactiva desde su pico al estado basal con un curso temporal bi-exponencial, con constantes temporales de 10 ms y 100 ms (Fig. 4a). La evidencia de que este tipo de inactivación en este canal depende de calcio, viene de pruebas realizadas con diferentes amortiguadores de calcio intracelulares y extracelulares en la cinética de esta entrada de Ca²⁺. El amortiguador de Ca²⁺ rápido BAPTA con la pipeta del patch, reduce de manera más rápida la inactivación en comparación del amortiguador de calcio lento EGTA^{42,46,47}. Se observó también que la FCDI es completamente abolida cuando esta corriente está compuesta únicamente de cationes monovalentes, por la ausencia de cationes divalentes (Fig. 4a, línea roja), mientras que el incremento de la concentración de calcio extracelular resulta en un incremento y aceleración de la inactivación^{35,44}. Los diferentes efectos de EGTA o BAPTA en la FCDI condujeron a la propuesta de que este mecanismo es llevado a cabo por el flujo de Ca²⁺ que entra a través del canal mismo y que esto probablemente está mediado por la unión de Ca²⁺ a sitios en la proximidad del poro del canal (aproximadamente a 8 nm)^{42,43,48}.

El mecanismo exacto de la FCDI de Orai1 no está completamente entendido aun; sin embargo, se ha reportado que diferentes regiones de Orai1 tienen un papel relevante en este mecanismo, incluyendo el bucle citosólico entre las regiones transmembranales 2 y 3 (aa 137-173)⁴⁹ y el dominio de unión a calmodulina de Orai1 (aa 68-91)³⁷, cuya identificación dio apoyo al modelo de la calmodulina como sensor para la FCDI; la interacción física entre Orai1 y calmodulina fue después confirmada por una estructura cristalizada del dominio de unión a calmodulina de Orai1. Los residuos con papel más relevantes fueron identificados como el W76 y Y80^{31,50}. Otros estudios mostraron que estos residuos podrían estar involucrados en transiciones conformacionales dentro del poro de Orai1, que llevan a la FCDI. Es interesante notar que se observó que la mutación del aminoácido Y80 a W80 prevenía completamente la FCDI (Fig. 2)^{46,51}. Estudios más recientes sobre la calmodulina en la FCDI se han enfocado en la interacción con STIM1⁵². También ha sido reportado que los primeros 63 aa del N-terminal de Orai1 pueden estar involucrados con la FCDI^{53,54}. Por otro lado, se ha observado que la FCDI además parece ser dependiente de la estequiometría de STIM1:Orai1, ya que incrementos en el cociente de expresión de STIM1:Orai1 potencian la FCDI, y la disminución de este cociente abole la FCDI^{35,55}. También se ha reportado que corrientes mediadas por SOAR de STIM1 (Fig. 2) no exhiben a la FCDI, lo que indica que esta porción de STIM1 es relevante para la FCDI³⁷. Sin embargo, como se comentó previamente, la manera en cómo todas estas regiones y componentes moleculares interactúan para lograr la FCDI es aún poco conocido.

Tipo	Tiempo	Distancia	Sensibilidad	Mecanismos propuestos
Rápida	Bi-exponencial ~10-100 ms	<10 nm del poro	Sensible a BAPTA, pero no a EGTA	Interacción de aminoácidos de STIM1 y Orai1, calmodulina.
Lenta	~70 segundos	>100 nm	Bloqueada por EGTA	Mitocondria, SARAF

Tabla 1. Resumen de propiedades de los mecanismos de inactivación de calcio. Modificado de ⁴⁸.

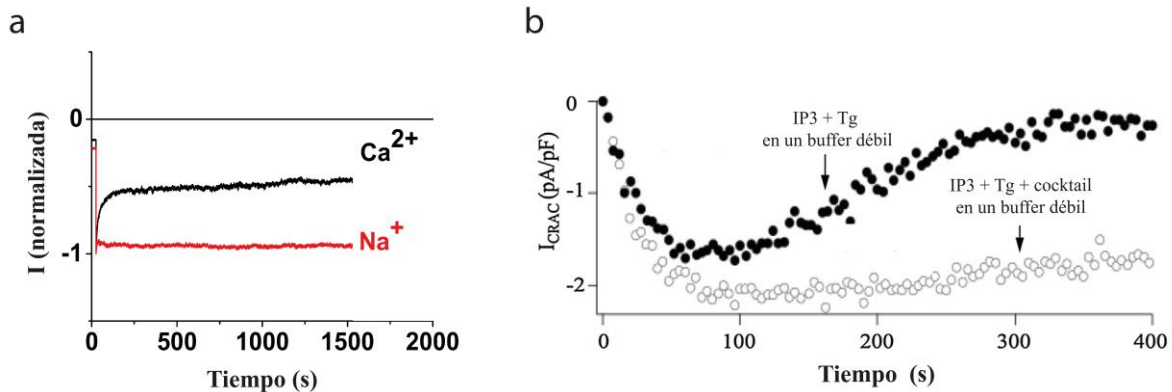


Figura 4. Inactivación rápida y lenta dependiente de Ca²⁺. a) La FCDI puede ser vista después de la hiperpolarización del potencial de membrana a 100mV desde un potencial de mantenimiento de 0 mV. Se puede observar la FCDI en una solución con Ca²⁺ (línea negra) comparada con una solución libre de divalentes, donde se pierde la inactivación (línea roja). Experimentos realizados en linfocitos T. b) SCDI, se da en las decenas de segundos. Para las células cebadas RBL dializadas con IP₃ en un buffer débil (EGTA) y tapsigargina el decaimiento completo se da a los 400 segundos. Sin embargo, la SCDI es prevenida cuando se asegura que la mitocondria está en un estado energizado por la inclusión de un coctel mitocondrial. Modificado de ^{48,56}.

A pesar de haber sido caracterizada hace más de dos décadas, al igual que la FCDI, el mecanismo subyacente de la SCDI también permanece aún poco entendido. La característica que define la SCDI es que se desarrolla gradualmente en el orden de las decenas de segundos, y se ha observado que depende de los incrementos globales de la concentración de Ca²⁺ citosólico⁴⁵, pero a diferencia de la FCDI, esta es sensible a EGTA, ya que altas concentraciones de este quelante (≥ 10 mM) suprimen la SCDI⁴⁸. La inactivación de la SOCE mediada por la SCDI se asemeja a la desactivación del canal por la restauración del Ca²⁺ del RE. Sin embargo, la CDI no es sensible a la tapsigargina (TG). También en contraste con la FCDI, se ha observado que la SCDI está dirigida por el aumento de calcio global con el paso crítico dependiente de Ca²⁺ localizado al menos a 100 nm del poro del canal^{39,48}.

Se ha propuesto que la mitocondria tiene un papel en la SCDI, de acuerdo con este modelo, la mitocondria es capaz de absorber el calcio cuando aumentan la concentración de Ca²⁺ citosólico que proviene de Orai1, lo que reduce la cantidad de Ca²⁺ disponible para la SERCA y los mecanismos de inactivación, lo que evita el reabastecimiento de las reservas de calcio del RE y atenúa la velocidad y alcance de la FCDI, lo que da como resultado un incremento en el tamaño y duración de la SOCE⁵⁷.

Un estudio reciente proporcionó evidencia de que la calmodulina tiene un papel en la SCDI a través de su interacción con la región SOAR de STIM1, esta interacción es dependiente de Ca^{2+} e induce la SCDI⁴⁴.

En otro estudio se encontró de manera fortuita un regulador clave de la SCDI, la proteína SARAF (SOCE-associated regulatory factor). La sobreexpresión de SARAF en HEK-293 junto con la co-expresión de STIM1 y Orai1 disminuye la SOCE en aproximadamente 83% después de 300 s de haber alcanzado su pico. La disminución de la expresión de SARAF previene casi de manera completa la disminución de la SOCE. Se observó que SARAF migra a las uniones MP-RE después del vaciamiento del RE. El modelo que se propuso es que SARAF disocia STIM1 de Orai1 después de que la SERCA ya ha llenado las reservas de calcio del RE. Sin embargo, queda la interrogante de cómo es que SARAF detecta el calcio, ya que esta proteína no tiene ningún dominio conocido que se una a calcio, por lo que se cree que existen proteínas que le ayudan con esta función. Otra alternativa del funcionamiento de SARAF es que esta proteína sirve para dirigir las puntas de Orai1-STIM1 a sitios de unión MP-RE donde la SCDI se está desarrollando. Sin embargo existen otros mecanismos que tratan de explicar el papel de SARAF en la SCDI^{39,44,48}.

1.6. Algunas herramientas para el estudio de la SOCE

1.6.1. Indicadores de calcio

Para el estudio de la dinámica de Ca^{2+} intracelular se han implementado distintos tipos de metodologías, entre las que destacan la electrofisiología y la imagenología con indicadores fluorescentes de Ca^{2+} .

Existen diversas técnicas de imagenología de fluorescencia para la visualización de dinámicas de Ca^{2+} en células, tejidos y organismos. Siendo el marcaje con indicadores inorgánicos o químicos de Ca^{2+} uno de los más ampliamente utilizados, ejemplos de estos son el Fura-2 o Fluo-4.

Con indicadores apropiados, la imagenología de las dinámicas de calcio intracelular puede ser usada para medir actividad sináptica neuronal o transitorios de Ca^{2+} en astrocitos^{58,59}. Sin embargo, estas moléculas tienen varios inconvenientes que impiden su aplicación en una diversa gama de preguntas, por ejemplo, esta clase de indicadores no pueden ser dirigidos con facilidad a tipos celulares, poblaciones o localizaciones celulares en específico; también el cargado de estos también es altamente invasivo y puede ser perjudicial para el tejido, por lo que son incompatibles con mediciones *in vivo* crónicas y repetidas⁵⁹.

Los indicadores de Ca^{2+} codificados genéticamente (GECI, por sus siglas en inglés) están basados en proteínas fluorescentes quiméricas y resuelven muchas de las limitaciones antes planteadas, brindando una alternativa al uso de indicadores inorgánicos. Los GECI pueden ser dirigidos a células, poblaciones o compartimentos celulares específicos a diferencia de los indicadores inorgánicos. El direccionamiento de GECI a tejidos y organismos intactos (usando transgénesis o construcciones virales) es mínimamente invasiva y por lo tanto compatible con mediciones repetitivas *in vivo* a largo plazo⁵⁸.

Desde la aparición de los primeros GECI, varias estrategias han sido desarrolladas para generar herramientas más útiles para la imagenología de calcio. Entre los diversos tipos de GECI descritos a la fecha incluyen reporteros basados en la acuaporina⁶⁰; indicadores basados en la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET), como D3cpV y TN-XXL; y sensores intensiométricos basados en cambios de la intensidad de fluorescencia de una sola proteína fluorescente, como el sensor GCaMP3. Estos dos últimos tipos de sistemas son los utilizados principalmente en la actualidad⁶¹.

Los GECI basados en una sola proteína fluorescente consisten típicamente de una proteína fluorescente permutada (GFP o sus variantes) unida a un elemento de unión a calcio (por ejemplo, calmodulina o troponina C). Actualmente, la creciente familia de GCaMP es la más utilizada en este tipo de GECI. En la pasada década, generaciones sucesivas de estos indicadores de calcio con alta afinidad han logrado mejorar progresivamente el cociente ruido-señal, el rango dinámico y la cinética de sus predecesores⁶¹⁻⁶³.

Los GCaMPs han sido exitosamente expresados y utilizados para detectar transitorios de calcio en una amplia variedad de células y tejidos, incluyendo células HEK, miotubos de ratón, neuronas quimiosensibles de *C. elegans*, neuronas de lóbulo de la antena de moscas, neuronas de la corteza sensorial del ratón, neuronas motoras de pez cebra, entre otras⁶².

GCaMP3 consiste en la fusión de una EGFP circularmente permutada, flanqueada en un lado por una calmodulina (CaM) y por el otro lado por el péptido M13 (péptido de unión a Ca^{2+} /CaM derivado de la cinasa de la cadena ligera de la miosina de músculo esquelético). Este GECI basa su funcionamiento en los cambios conformacionales que se dan por la asociación de la calmodulina con el Ca^{2+} , los cuales llevan a su vez a un cambio conformacional en la GFP permutada, causando un aumento en la intensidad de su fluorescencia (Fig. 5a)^{58,64,65}.

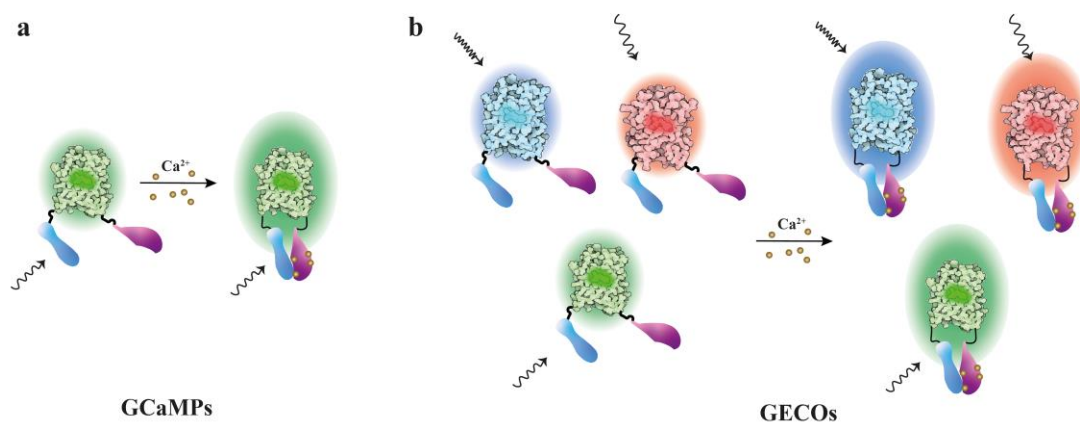


Figura 5. Indicadores de calcio codificados genéticamente de una sola proteína fluorescente. a) GCaMPs y b) GECOs. La unión de Ca^{2+} promueve un reacomodo conformacional intramolecular que cambia la intensidad de fluorescencia. Los colores denotan el rango de la fluorescencia de emisión de cada proteína fluorescente. La afinidad al Ca^{2+} por los motivos de unión a Ca^{2+} derivados de la calmodulina.

GCaMP3 ha sido utilizado para la detección de actividad en poblaciones neuronales en la corteza motora y el hipocampo. Estudios de imagenología a largo plazo de GCaMP3 han revelado cambios de circuitos relacionados con el aprendizaje *in vivo*, este GECI también ha sido utilizado para probar la excitación dendrítica en la capa de dendritas *in vivo* y recientemente ha sido utilizado para medir señales de Ca^{2+} en regiones cercanas a la membrana en procesos de astrocitos⁶⁶.

Por medio de mutagénesis aleatoria de GCaMP3 acompañada de una detección (screening) de alto rendimiento, se crearon proteínas fluorescentes que expandieron la paleta de colores disponible en ese momento, lo que permitió el desarrollo de indicadores intensiométricos con longitudes de onda en el espectro rojo y el azul. Las mejores variantes fueron llamadas GECOs (indicadores de Ca^{2+} genéticamente codificados para la imagenología óptica, por sus siglas en inglés) (Fig. 5b). Esta familia de indicadores codificados genéticamente se compone de G-GECO (GECO verde), R-GECO (GECO rojo) y B-GECO (GECO azul)^{64,67}.

Sin embargo, el uso en general de estos sensores sigue limitado prácticamente al estudio de las dinámicas globales de Ca^{2+} (en todo el citosol). Estudios recientes han aprovechado la capacidad de esta herramienta para dirigirse a regiones celulares en específico lo que ha permitido el estudio de microdominios o nanodominios de calcio en distintos tipos celulares¹⁰. En este trabajo hacemos uso de estas herramientas para el estudio de nanodominios como se mostrará más adelante.

1.6.2. Microscopía de super-resolución

No existe un consenso en la definición de la microscopía de super-resolución (MSR), en este trabajo la definimos como todas aquellas técnicas de microscopía que sobrepasen los límites de difracción clásicos de la resolución óptica (~200 nm en el eje lateral y ~800 nm en el eje axial)^{68,69}. Estas técnicas conservan las ventajas de la microscopía de fluorescencia (monitoreo en tiempo real, marcaje específico, etc.^{70,71}) pero están continuamente empujando la resolución hacia escalas nanométricas, por lo que la MSR permite el estudio de células con mayor detalle, a menudo obteniendo con algunas de estas técnicas, información a escala molecular^{72,73}.

Existen varias maneras para realizar técnicas que sobrepasen el límite de resolución óptica y diversos métodos han sido desarrollados. En la actualidad una gran variedad de sistemas de MSR están comercialmente disponibles o son auto ensamblados, lo que tiene como consecuencia que muchos investigadores estén interesados en utilizar estas técnicas en sus experimentos para obtener más información. Dentro de las principales metodologías de MSR podemos mencionar a la microscopía de iluminación estructurada (SIM y sus variantes), la microscopía de localización de molécula única (SMLM, como PALM y STORM), microscopía de agotamiento de la emisión (STED) y la microscopía de super-resolución basada en fluctuaciones de la fluorescencia (FF-SRM), de esta última ahondaré con más detalle posteriormente. Todas estas técnicas de MSR han sido utilizadas para estudiar con mayor detalle las interacciones de los componentes de la SOCE. Usando SIM un estudio

reciente identificó a la septina-7 como un modulador de los canales Orai⁷⁴ y la asociación entre estas dos proteínas⁷⁵ y en otro estudio usando esta misma técnica demostraron que STIM1 se asocia con EB1⁷⁶ (Fig. 6, círculo rojo).

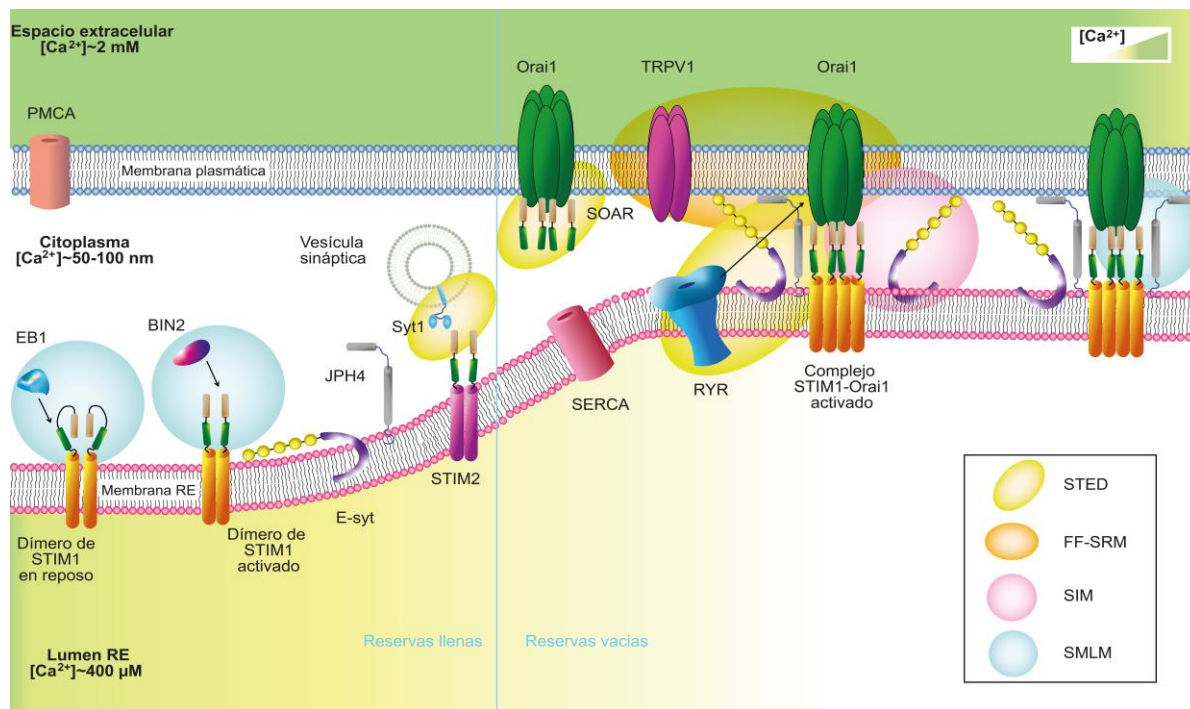


Figura 6. Microscopía de super-resolución aplicada al estudio de la SOCE. Las elipses amarillas representan estudios realizados con microscopía de agotamiento de la emisión; las elipses naranjas muestran estudios representativos de microscopía de super-resolución basada en fluctuaciones de la fluorescencia; los círculos rojos son ejemplos de investigaciones realizadas con microscopía de iluminación estructurada y los círculos azules son estudios representativos de estudios de microscopía de super-resolución de molécula única.

Por otro lado, usando STORM, se demostró la asociación espaciotemporal entre STIM1 y EB1 a una escala nanométrica⁷⁷. STORM también demostró el papel de la junctofilina-4 en las puntas Orai1-STIM1⁷⁸, además de que datos de STORM brindan apoyo a la asociación entre STIM1 y BIN2⁷⁹ (Fig. 6, círculos azules).

En cuanto a la microscopía STED, esta demostró el entrecruzamiento de monómeros de Orai1 son inducidos por STIM1 para formar un canal funcional⁸⁰ y otro estudio demostró la asociación entre STIM2 y syt⁷⁸¹ (Fig. 6, elipses amarillas).

Por la relevancia para este trabajo, aquí abordaré con más detalle la microscopía basada en las fluctuaciones de la fluorescencia, esta técnica se basa en que cuando un fluoróforo es excitado con luz continua, su emisión varía aleatoriamente a través del tiempo. Esto se debe a las transiciones entre los estados no fluorescentes o a sus interacciones con el ambiente que rodea el fluoróforo. Una vez que se capturan estas oscilaciones en decenas, cientos o miles de imágenes, se aplican algoritmos para determinar las correlaciones temporales en estas oscilaciones y así discernir la presencia y localización de los fluoróforos a una resolución mejorada⁷⁰. FF-SRM es un campo emergente que es compatible con la imagenología *in vivo* y que permite sobrepasar el límite de difracción. Existen varios algoritmos usados para la

realización de esta técnica, entre los que destacan SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging), MUSICAL (MUltiple Signal Classification ALgorithm), 3B (Bayesian analysis of Blinking and Bleaching) y SRRF (Super-Resolution Radial Fluctuations). FF-SRM ha sido también usada para estudiar la SOCE, por ejemplo, SOFI mostró la organización a nivel nanométrico de la SOCE en células vivas⁸². En este trabajo hicimos uso del algoritmo de SRRF, que nos permitió el análisis de Orai1 a una escala nanométrica.

1.7. Astrocitos

Los astrocitos (del griego *astron* - estrella y *cyte* - célula), son un tipo de célula glial propio del sistema nervioso central. Identificados en 1858 por Rudolph Virchow, son el tipo celular más abundante en el cerebro. Estas células fueron posteriormente teñidas y observadas por Camilo Golgi lo que permitió establecer su morfología estrellada, aunque técnicas recientes han revelado una forma más parecida a una esponja. Su nombre les fue otorgado por Lenhossek en 1891^{83,84}. Su complejidad morfológica correlaciona con la gran cantidad de funciones que estas células ejecutan en el sistema nervioso central, que incluye la homeostasis, dando soporte metabólico y neurotrófico, promoviendo la sinaptogénesis; la recaptura y reciclaje de neurotransmisores; la modulación de la plasticidad, la densidad de la sinapsis, entre muchas otras funciones (Ver Tabla 1).

Desarrollo		
Guía para el crecimiento neurítico	Formación de puentes de Tenascina-C y proteoglicanos, expresión de moléculas de adhesión celular (N-cadherina)	85
Sinaptogénesis	Liberación de trombospondina, remodelación de la matriz extracelular	86
Homeostasis		
Iónica	Acuaporinas, transportadores de K ⁺	87
pH	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺ , transportadores de NaHCO ₃ , transportadores de ácido monocarboxílico, ATPasa de protones, P2Y ₁	88
Recaptura de neurotransmisores	Transportadores de Glutamato, GABA y glicina	89
Modulación sináptica		
Precusores de neurotransmisores	Producción de glicina	90
Liberación de gliotransmisores	Glutamato, GABA, purinas y D-serina	89
Memoria a largo plazo	Producción de lactato	91
Regulación de la liberación sináptica	Liberación de purinas	92
Metabolismo		
Regulación del flujo sanguíneo	Almacenamiento de glicógeno, producción de lactato	93
	Liberación de prostaglandinas, óxido nítrico y ácido araquidónico	94

Tabla 2. Principales funciones de los astrocitos en el cerebro.

A pesar de que los astrocitos no son excitables eléctricamente, poseen conductas oscilatorias de calcio muy dinámicas que les permiten regular la liberación de gliotransmisores (glutamato, la D-serina y ATP), lo cual modula la función de las neuronas y glía que los rodea, por esta

razón los astrocitos han sido considerados como un componente más de la sinapsis en el modelo de “sinapsis tripartita”^{95,96}, cabe aclarar que la idea de que los aumentos de la concentración Ca^{2+} en astrocitos como liberadoras de transmisores es controversial, y permanece en debate, pero es innegable que existe evidencia que apoya este modelo (véase la revisión de Bazargani de 2016)⁹⁷.

Aunque los astrocitos expresan canales dependientes de voltaje, incluyendo algunos de sodio, potasio e incluso de calcio, estas células no tienen la capacidad de disparar potenciales de acción como lo hacen las neuronas. Sin embargo, los astrocitos son células altamente activas que se comunican constantemente con su entorno, para esto han desarrollado una forma de “excitabilidad” basada en variaciones en la concentración de calcio intracelular, lo cual les permite comunicarse con otros astrocitos y otras células gliales mediante ondas de calcio intracelulares y con las neuronas mediante la liberación dependiente de calcio de gliotransmisores^{83,96}. Existen varios mecanismos que disparan la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos, entre los que destacan los canales de Ca^{2+} , y como se puede observar en la figura 7 este tipo celular expresa una gran diversidad de canales de Ca^{2+} .

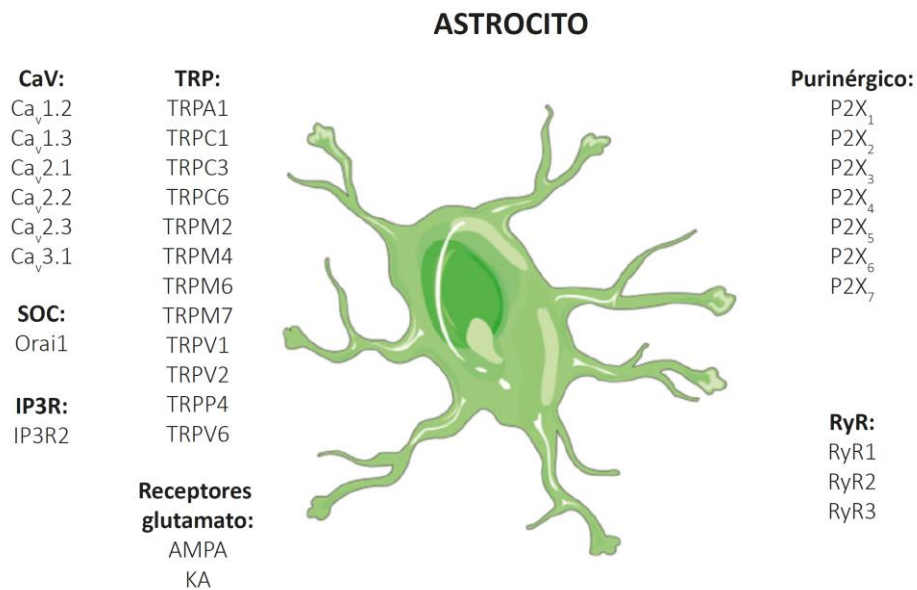


Figura 7. Perfil de expresión de canales de calcio en astrocitos. Es importante destacar algunos puntos: 1) El patrón de expresión de RyR en astrocitos es contradictorio, pero hay reportes de que se expresan todos los subtipos. 2) El receptor IP₃R2 es expresado en células gliales especialmente en astrocitos. 3) La evidencia que apoya la expresión de VOC en astrocitos es contradictoria, pero parece ser que su expresión es específica de la especie, dependiente de la región del cerebro y de la etapa del desarrollo; la función de estos canales en estas células es la liberación de gliotransmisores. Modificado de ⁹⁸

Sin embargo, la principal vía de entrada de Ca^{2+} o una de las mejor caracterizadas es la activación de GPCRs que disparan la cascada de señalización de IP₃ que resulta en la elevación robusta de Ca^{2+} intracelular, principalmente por la activación de IP₃R⁹⁹. Los astrocitos

expresan una gran variedad de GPCRs, incluyendo receptores a glutamato, purinas, serotonina, acetilcolina, dopamina y trombina^{98,100}. La liberación de calcio a través de IP₃R2 es indispensable para el inicio de las ondas de Ca²⁺ en el astrocito⁸³.

En los astrocitos, la liberación de calcio desde el RE a través de los IP₃R2 conlleva a la activación de la SOCE⁸³. La SOCE está ubicuamente expresada en la astrogliia. La estimulación de astrocitos *in vitro* o *in situ* con agonistas metabotrópicos (tales como el ATP, noradrenalina, histamina, trombina o endotelina) dispara una respuesta de Ca²⁺ intracelular bifásica con una fase de estabilidad casi completamente dependiente del Ca²⁺ extracelular; esta dependencia refleja la expresión y funcionalidad de la SOCE¹⁰¹⁻¹⁰³; además está bien documentado que la SOCE puede ser inducida en astrocitos en el sistema nervioso central¹⁰⁴. De manera similar, diversos estudios han demostrado que el vaciamiento de las reservas de Ca²⁺ del RE de los astrocitos con bloqueadores de la SERCA disparan la SOCE,^{105,106}.

La SOCE en los astrocitos esta principalmente localizada cerca de los sitios de relleno de Ca²⁺ del RE (muy próximo a la SERCA) lo que promueve la restauración de las reservas de Ca²⁺ de este organelo¹⁰⁷. Se ha observado que, en astrocitos hipocampales, la SOCE activada por trombina regula la señalización de Ca²⁺, la liberación de gliotransmisores y la inhibición tónica mediada por astrocitos de las neuronas piramidales CA1¹⁰⁸. En astrocitos corticales, STIM1 en combinación con Orai1 y Orai3 modulan la SOCE^{105,109}. Además la relevancia de la SOCE que se da por la activación del receptor activado por proteasa (PAR) con trombina ha sido demostrada por nuestro grupo¹⁰⁵ y otros más^{100,108,110}. También se ha demostrado que la trombina en astrocitos modula la astrogliosis¹⁰⁰, la migración¹¹¹⁻¹¹⁵, la proliferación celular¹¹⁴, apoptosis¹¹², autofagia¹¹⁶ y liberación de gliotransmisores¹⁰⁸.

1.7.1. Migración celular en astrocitos

La migración celular es un proceso central durante el desarrollo, la homeostasis y las enfermedades. Es un fenómeno celular fundamental que constituye la base de la morfogénesis, la respuesta inmune y la cicatrización de las heridas^{117,118,119}. Se sabe que los astrocitos llevan a cabo este proceso celular cuando están desempeñando acciones morfológicas normales y en la formación de cicatrices por razones patológicas. Durante el desarrollo, los astrocitos recién diferenciados migran para poder alcanzar su destino final, mientras que los astrocitos en el tejido adulto se encuentran quiescentes bajo condiciones fisiológicas normales¹²⁰. Sin embargo, cuando ocurren eventos en respuesta al daño cerebral esto involucra la participación de células gliales y, particularmente de los astrocitos. Durante las primeras etapas de una lesión, los axones dañados son expuestos a moléculas inhibitorias que promueven una ligera capacidad regenerativa en el proceso neuronal, pero adicionalmente, los astrocitos sufren cambios morfológicos y moleculares por medio de un proceso llamada gliosis reactiva o astrogliosis, si este proceso es beneficioso o perjudicial es aún controversial, pero es claro que es un proceso crítico en la respuesta de protección inmediata al daño en el sistema nervioso central^{117,120}. Este proceso es disparado por diferentes moléculas derivadas del torrente sanguíneo, las células inflamatorias o liberadas de las células dañadas, tales como la adenosina

trifosfato (ATP)¹²¹, la endotelina-1¹²², el factor de necrosis tumoral (TNF)¹²³, y como habíamos comentado anteriormente la trombina¹⁰⁰. Por lo que después de daño severo, se da una importante hipertrofia del cuerpo y proceso de los astrocitos, lo que lleva a la migración de estas células al sitio dañado donde incrementan su proliferación¹²⁰.

Para el estudio de este proceso celular se han desarrollado diversos ensayos, entre los que desatacan, el ensayo de la cicatrización de la herida (SWA), la cámara de Boyden, los sistemas basados en microfluidos y el ensayo ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing), cada uno con ventajas y desventajas (ver Tabla 3). Debido a la relevancia para este trabajo se comentará con más detalle el ensayo de cicatrización de la herida.

	Ensayo de cicatrización de la herida	Cámara de Boyden	Sistema basado en microfluidos	ECIS
<i>Tipo celular disponibles para su análisis</i>	Células adherentes, monocapa es requerida.	Células adherentes	Células adherentes	Células adherentes, monocapa es requerida.
<i>Tipo de muestras</i>	Población o célula individual	Población	Primariamente células individuales	Población o célula individual
<i>Posibilidad de rastrear células individuales</i>	Si	No	Si	Si
<i>Gradientes</i>	No	Si	Si	Posible
<i>Tamaño de muestra en un ensayo</i>	Una condición por plato de cultivo	Hasta 96 condiciones diferentes	Una condición por cámara de ensayo	Hasta 96 condiciones diferentes
<i>Complejidad del experimento</i>	Extremadamente fácil	Cámaras disponibles comercialmente, fácil.		Placas comerciales, fácil
<i>Tiempo de incubación antes del ensayo</i>	1-2 días	Ninguno	Ninguno	1-2 días
<i>Tiempo del ensayo</i>	Dependiente del tipo celular (promedio 14 horas)	Dependiente del tipo celular (promedio 6 horas)	Dependiente del tipo celular (promedio 4 horas)	Dependiente del tipo celular (promedio 10 horas)
<i>Colección de datos y análisis</i>	Conteo celular con microscopio, y procesamiento de imágenes con hardware y software	Conteo celular con microscopio, y procesamiento de imágenes con hardware y software	Rastreo celular individual con microscopio, y procesamiento de imágenes con hardware y software	Dispositivos especialmente diseñados y por detección por medio de software
<i>Costo del equipo</i>	Sin costo extra, barato.	Cámaras y filtros de membranas comerciales, poco caro.	Instalaciones son requeridas, muy caro.	Instrumentos comerciales, caro

Tabla 3. Comparación de diferentes ensayos de migración in vitro. Modificado de ¹²⁴.

El ensayo de cicatrización de la herida es un método sencillo y económico para el estudio de la migración *in vitro*. Este método se basa en observar que bajo la creación de un espacio

artificial, también llamada herida, en una monocapa de células confluentes, las células en las orillas del recién creado espacio se mueven hacia el espacio vacío para cerrar la herida hasta que los contactos célula-célula son establecidos nuevamente. Este tipo de ensayos consiste en tres pasos: 1) El daño a la monocapa; 2) El monitoreo del proceso de cicatrización a intervalos regulares; y 3) la adquisición y evaluación de datos para determinar la velocidad de la migración celular^{124,125}.

Una de las principales ventajas de este método es que este imita hasta cierto punto la migración de las células *in vivo*¹²⁴. Otra de las ventajas es su idoneidad para el estudio de la regulación de la migración celular por la interacción celular con la matriz extracelular y las interacciones célula-célula. Adicionalmente, el ensayo de cicatrización de la herida es compatible con la microscopía incluyendo el seguimiento en tiempo real, lo que permite el análisis de eventos de señalización intracelular durante la migración celular. Y finalmente es probablemente el métodos de estudio de la migración celular *in vitro* más simple y barato que se puede realizar en laboratorios donde se realice cultivo celular^{124,125}.

Sin embargo, también existen algunas desventajas y limitaciones de este método, por ejemplo, para llevarse a cabo estos ensayos son necesarios tiempos relativamente más largos en comparación de otros métodos, también son necesarias grandes cantidades de células y químicos, lo que limita su uso en células especializadas como células troncales o en experimentos donde se utilicen reactivos caros. Aunque a pesar de estas limitaciones este método, este es una gran opción para evaluar la migración celular^{117,124,125}.

Este método ha sido ampliamente usado para estudiar la migración en astrocitos^{126,127,128,129} y se ha observado que este linaje celular lleva a cabo una lenta y polarizada migración en dirección perpendicular a la herida. Las células no se mueven individualmente sino que migran como una fila hacia el otro extremo de la herida y la migración se detiene cuando los dos extremos de la herida se unen¹³⁰.

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El estudio de la inactivación dependiente de calcio en el canal Orai1 ha sido intensa durante los últimos años, llegándose a conocer de manera parcial los mecanismos estructurales y mecanísticos de cómo se lleva a cabo este proceso³¹⁻³⁵. Sin embargo, este tipo de estudios se han enfocado principalmente en el Ca^{2+} proveniente del propio canal o el Ca^{2+} agregado mediante la pipeta de registro (inactivación homóloga dependiente de Ca^{2+}). No obstante, dentro de la célula existen otras fuentes de Ca^{2+} que podrían contribuir a la CDI, como por ejemplo otros canales de la membrana celular, canales intracelulares, intercambiadores o incluso bombas. Es reconocido que elevaciones de calcio específicas en una pequeña región (microdominios y nanodominios) regulan distintos procesos celulares de manera específica^{11,12,38}, existen algunos reportes donde se observa que elevaciones de Ca^{2+} dadas por diferentes tipos de canales de calcio regulan el comportamiento de otros canales^{131,132}. Nosotros decidimos investigar si canales cercanos a Orai1 pueden regular la inactivación dependiente de Ca^{2+} de este canal (inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+}). Además, debido a la relevancia que tiene la SOCE en un gran número de procesos y tipos celulares, proponemos que la regulación de la inactivación dependiente de Ca^{2+} de Orai1 por parte de otros canales de Ca^{2+} cercanos regula procesos celulares tales como la migración celular.

3. HIPÓTESIS

El Ca^{2+} que entra al citosol a través de canales TRPV1 cercanos a Orai1 incrementan su inactivación rápida dependiente de calcio, modulando por medio de este mecanismo la migración celular.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar si fuentes de Ca^{2+} cercanas a Orai1 son capaces de modular la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} de este canal y de esta manera regular la migración celular.

4.2. Objetivos particulares

- Construcción de un sensor de Ca^{2+} capaz de detectar de manera específica Ca^{2+} cercano al poro del canal Orai1 (Orai1-GCaMP3).
- Caracterizar la correcta localización y funcionamiento del sensor Orai1-GCaMP3.
- Evaluar nanodominios cercanos al poro del canal Orai1 con Orai1-GCaMP3.
- Evaluar la regulación de la inactivación rápida dependiente de calcio de Orai1 por distintas fuentes de Ca^{2+} (canales TRPV1 y P2X₄).
- Determinar la distancia entre los pares de canales Orai1-TRPV1 y Orai1-P2X₄.
- Determinar la interacción entre los canales Orai1 y TRPV1.
- Identificar los dominios de interacción entre los canales Orai1 y TRPV1.
- Determinar el papel de la inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} de Orai1 por parte de TRPV1 sobre la migración celular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Fura 2-AM (acetoxymethyl ester), fue comprado a Molecular Probes (Oregon, EUA), todas las enzimas de restricción fueron compradas a New England Biolabs (Massachusetts, EUA), la T4 DNA ligasa fue comprada a Promega (Wisconsin, EUA), tpsigargina fue comprada a Calbiochem (Massachusetts, EUA), la sal de citidin trifosfato (CTP) fue adquirida de Affymetrix (California, EUA), la capsaicina y capsazepina fueron adquirida a Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Todos los demás reactivos no mencionados específicamente fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Missouri, EUA)

	Fuente	Número de catálogo
Reactivos		
<i>Fura2-AM</i>	Molecular Probes	F1221
<i>DNA ligasa</i>	Promega	M180a
<i>Tpsigargina</i>	Calbiochem	586005
<i>Citidin trifosfato</i>	Affymetrix	14121
<i>Capsaicina</i>	Sigma-Aldrich	M2028
<i>Capsazepina</i>	Sigma-Aldrich	C191
<i>DMEM</i>	Gibco	D5030
<i>Suero fetal bovino</i>	Thermo Fisher	26140
<i>Penicilina-estreptomocina</i>	Gibco	15140122
<i>Lipofectamina 2000</i>	Invitrogen	11668019
<i>Opti-MEM</i>	Thermo Fisher	31985062
Coctel inhibidor de proteasas	Roche	11697498001
Poli-L-lisina	Sigma-Aldrich	P4707
Tripsina	Sigma-Aldrich	t-4665
Anticuerpos		
Orai1	Abcam	ab59330
VR1	Santa Cruz Biotechnology	sc-398417
c-myc	Invitrogen	MA1-21316
P2X4	Abcam	ab134559
GFP	Clontech	632376

Tabla 4. Principales reactivos utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

5.2. Plásmidos

Los plásmidos de Orai1-GFP, GCaMP3, STIM1-DsRed, H2B-mCherry y Lck-GCaMP5 fueron adquiridos a Addgene (Massachusetts, EUA), R-GECO fue donado amablemente por el Dr. Takeharu Nagai de la Universidad de Hokkaido en Japón, los plásmidos de TRPV1-CFP y TRPV1-YFP fueron donados amablemente por el Dr. León Islas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y el plásmido CFP-P2X₄ fue donado gentilmente por el Dr. Jorge Arreola de la Universidad Autónoma de San Luis.

Mediante técnicas de DNA recombinante se realizó la construcción de la proteína de fusión Orai1-GCaMP3 (OG3), esto a través de PCRs y digestiones con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Fig. 8) y la ligación con una T4 DNA ligasa. La construcción fue corroborada por secuenciación y por medio de un western-blot.

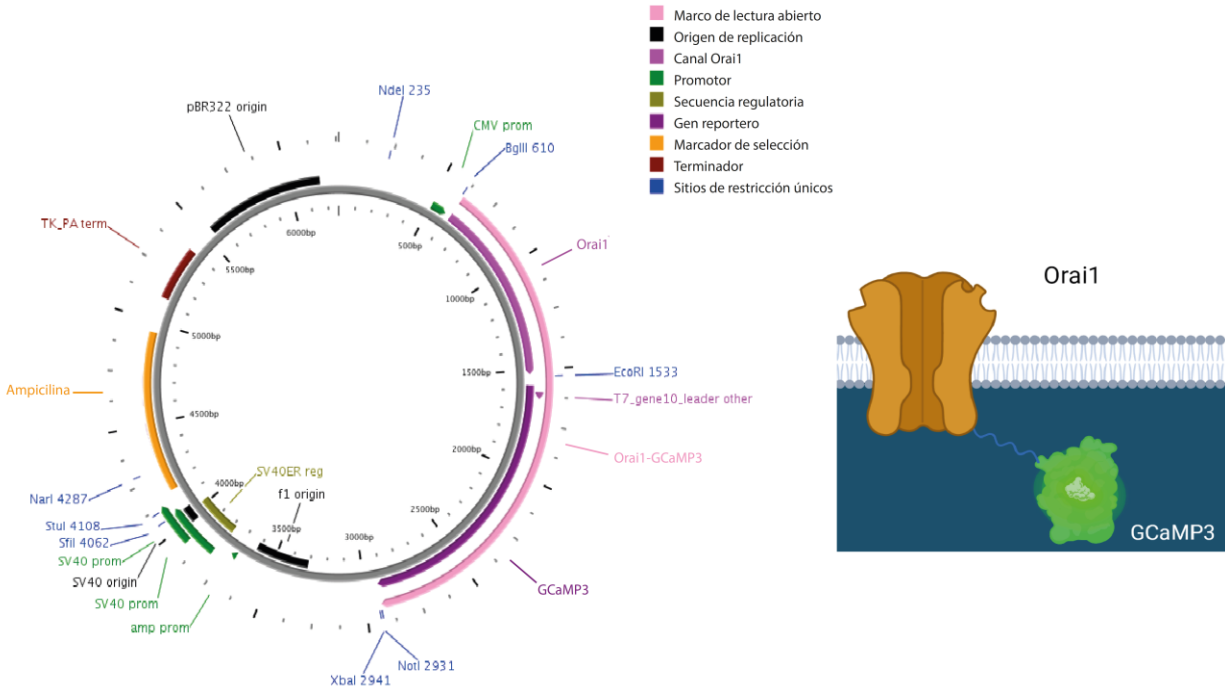


Figura 8. Construcción de la proteína de fusión Orai1-GCaMP3. Mapa del plásmido y representación gráfica de la proteína de fusión Orai1-GCaMP3. Imágenes creadas usando PlasMapper y Biorender, editadas con Adobe Illustrator.

5.3. Cultivo celular y transfección

La línea celular HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293, por sus siglas en inglés) adquirida a ATCC (Virginia, EUA) fue usada en este estudio como modelo celular. Estas células fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s Medium) (Gibco, Massachusetts, EUA), con 10% SFB (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) y 50 I.U./mL de antibiótico penicilina- 50 µg/mL estreptomina (Gibco, Massachusetts, EUA). Se mantuvieron a 37 °C, con 5% de CO₂ y una humedad relativa de ~85% en una incubadora. Estas células fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Massachusetts, EUA) de acuerdo con el protocolo estándar, el cual para cajas de 35 mm consiste brevemente en el sembrado de células en estas cajas hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente entre el 85 y 90% durante el día de la transfección. Una hora antes de la transfección, se les cambiaba el medio de crecimiento DMEM por medio de transfección Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). La mezcla de transfección para una caja de 35 mm fue de 5 µL de Lipofectamina 2000 y 500 ng de cada plásmido de interés, esta mezcla fue agregada para obtener un volumen final de 1 ml en la caja de 35 mm. Se dejó la mezcla de transfección durante 24 horas y se hizo un cambio a medio DMEM. Las células fueron utilizadas para los experimentos 24 o 48 horas después de la transfección. Para transfecciones de cajas con volúmenes más grandes se escalaron los reactivos conservando las proporciones.

5.4. Detección de proteínas (Western blot)

Los extractos de proteínas obtenidos de células HEK-293 transfectadas con Orail-GCaMP3 o con Orail-GFP o extractos protéicos obtenidos de astrocitos, fueron realizados como se describe anteriormente, de manera breve: Las células se lavaron con PBS frío y se homogenizaron con buffer de lisis RIPA (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 Mm, Triton x-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, DSS 1% y 2 mg/mL de inhibidores de proteasa -Complete de Roche-). Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE (acrilamida 10%), posteriormente se transfirieron a membranas de nylon (Biorad, California, EUA) por medio de una cámara de transferencia húmeda (Biorad, California, EUA) durante 1 hora a 110 v. Después de la transferencia, se bloqueó la membrana con leche libre de grasa al 5% en TBS con 0.5% de Tween durante 2 horas, posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo primario Orail (Abcam, Massachusetts, EUA) o el anticuerpo VR1 (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) durante toda la noche de acuerdo con las concentraciones indicadas por los proveedores. Transcurrido ese tiempo se lavaron las membranas con TBS+Tween 2% (TTBS) durante 1 hora y media. Posteriormente se incubó la membrana con un anticuerpo secundario contra conejo o ratón conjugado con la peroxidasa del rábano picante (HRP) (Millipore, Massachusetts, EUA) durante dos horas con agitación a temperatura ambiente.

Para retirar el exceso de anticuerpo secundario se lavaron las membranas con TTBS por hora y media. Se sometieron a las membranas a una reacción química de la HRP para producir quimioluminiscencia (Inmobilon Western, Millipore, Massachusetts, EUA), cuya señal fue detectada por medio de un escáner c-Digit (Li-COR, Nebraska, EUA) o por medio de una placa fotográfica y digitalizados y analizados posteriormente usando el software ImageJ.

5.5. Electrofisiología

Células HEK-293 expresando las diferentes construcciones descritas en los pies de figura de las figuras 13 a 16 fueron colocadas en cubreobjetos cubiertos con poli-(L)lisina (Sigma, Missouri, EUA). Las células fueron estudiadas entre 24-48 horas post-transfección. Los cubreobjetos fueron montados en una cámara de perfusión (TIRF labs, Carolina del Norte, EUA). El amplificador de patch clamp utilizado para los registros de célula completa fue el EPC-10 (Heka Electroniks, Lambrecht, Alemania). Las pipetas para el patch clamp fueron preparadas de vidrios Corning 7052 y tenían una resistencia de 1-5 M Ω cuando fueron llenadas con la solución de pipeta. Un electrodo de Ag/AgCl fue utilizado para obtener continuidad eléctrica y fue conectado a la solución de baño por medio de un puente de KCl-agar. La tapsigargina (Calbiochem, Massachusetts, EUA) fue aplicada usando un sistema de perfusión multibarril guiado por gravedad (TIRF Labs, N.C., EUA).

Para los estudios de corrientes de célula completa se utilizó patch clamp en su versión perforada, La anfotericina B fue disuelta en 50 μ L de DMSO para obtener una solución de stock de 60 mg/mL y fue almacenada a -20 °C hasta su uso. La solución stock de anfotericina fue disuelta para obtener una concentración final de 0.24 mg/mL en una jeringa que contenía

la solución de la pipeta, compuesta de la siguiente manera: aspartato de cesio 120 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 2 mM y NaCl 8 mM. El pH fue ajustado a 7.2 con CsOH. La solución del baño contenía: NaCl 120 mM, cloruro de tetrilamonio (TEA-Cl) 10 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 2 mM, glucosa 30 mM y HEPES 10 mM. El pH fue ajustado a 7.2 con NaOH. La osmolaridad de ambas soluciones fue ajustada a 310 mOsm con manitol (Sigma, Missouri, EUA).

Para determinar la corriente de inactivación de Orai1, la célula fue primero estimulada con 1 μM de capsaicina o 10 μM de citidin trifosfato (CTP) por aproximadamente un minuto. La solución fue removida y lavada por un minuto con solución de lavado antes de la estimulación con 1 μM de tapsigargina (Fig. 9). La inactivación relativa fue obtenida después de obtener la densidad de corriente relativa para la mutante no activable de Orai1 Y80S (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2741279/>).

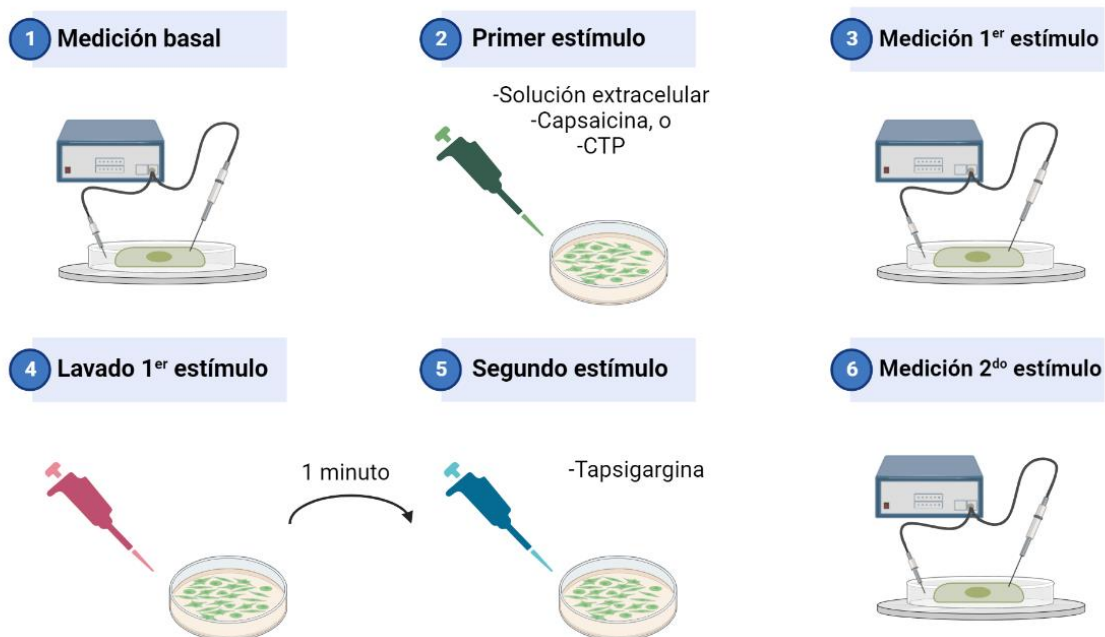


Figura 9. Protocolo de patch clamp de activación secuencial. Cubreobjetos con poblaciones celulares confluentes con los distintos tipos de transfección indicadas en las figuras 13 a la 16, se realizó un protocolo de patch clamp en su versión perforada para obtener mediciones basales de la FCDI de Orai1 en cada una de estas poblaciones celulares. Después se agregó un primer estímulo, tras lo cual se realizó una nueva medición de la FCDI de Orai1. Posteriormente, el primer estímulo fue lavado durante 1 minuto tras lo cual se agregó un segundo estímulo y finalmente se midió el efecto de ese segundo estímulo en la FCDI de Orai1. Imagen creada con Biorender.

La densidad de corriente fue obtenida después de dividir la corriente de cada célula por la capacitancia de la célula (medida directamente desde la lectura de salida del amplificador) El amplificador suministró la densidad de corriente en tiempo real calculada por medio del software Patchmaster y de la electrónica EPC10 (Heka Electronics, Lambrecht, Alemania). Para el estudio de cursos temporales de las corrientes de activación de célula completa de Orai1, la tapsigargina fue aplicada mientras el potencial de membrana fue fijado a -100 mV. Todas las corrientes de célula completa ilustradas en la figura 11 representan la media ± la

desviación estándar de al menos 30 células independientes obtenidas de 4 días y transfecciones diferentes.

Las corrientes de célula completa de Orai1 fueron importadas a Igor pro v. 7 (Wavemetrics, Oregon, EUA) para su análisis y graficado. Las figuras finales fueron creadas con Adobe Illustrator (Adobe Systems, California, EUA).

5.6. Microscopía confocal

Células HEK-293 fueron transfectadas con Orai1-GCaMP3, o las combinaciones Orai1-GCaMP3 más H2B-mCherry, Orai1-GCaMP3 más STIM1-DsRed y Orai1-GFP más STIM1-DsRed en cubreobjetos de 25 mm sembrados en cajas de 35 mm.

Las células fueron observadas al microscopio en solución de Krebs-Ringer (119mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucosa, 1 mM EGTA y ajustada a 7.4 de pH). Tapsigargina (TG) 1 μM fue usada para vaciar el Ca²⁺ del retículo endoplásmico. La adquisición de imágenes para los experimentos de colocalización fue llevada a cabo 12 minutos después del vaciamiento del retículo. GFP, GCaMP3, DsRed y mCherry fueron excitados a 488, 488, 494 y 594 nm, respectivamente. La fluorescencia de emisión fue recolectada a 500-540 nm para GFP y GCaMP3, y 605-650 para DsRed y mCherry. Todas las imágenes fueron capturadas a temperatura ambiente con un objetivo 60x de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.40, todo controlado por el software Fluoview (Olympus, Tokio, Japón) en un microscopio confocal FV10i (Olympus, Tokio Japón). El coeficiente de correlación de Pearson fue calculado con el software Fluoview (Olympus, Tokio, Japón)

5.7. Imagenología de calcio

Para medir los incrementos de Ca²⁺ en poblaciones celulares, se transfectaron células HEK-293 con Orai1-GCaMP3 o con Orai1-GFP (como control) más STIM1-DsRed y 24 horas después se cargaron los dos tipos de transfección y un grupo de células sin transfectar, con el indicador Fura-2-AM (Molecular Probes, Oregón, EUA) a una concentración final de 2μM, Fura-2 fue incubado por 30 minutos a 25 °C. Con las células cargadas, se realizó el protocolo clásico de re- adición de Ca²⁺ ^{133,134}, brevemente: las células cargadas con Fura-2 se colocaron en una solución Krebs libre de calcio (119mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucosa, 1 mM EGTA y ajustada a 7.4 de pH), después las células fueron lavadas con la misma solución y fueron expuestas a 1μM de tapsigargina para inducir el vaciamiento de Ca²⁺ del RE y la activación de Orai1, finalmente para observar la entrada de Ca²⁺ a través de Orai1 se agregó calcio al medio extracelular hasta alcanzar una concentración de 1.8 mM. Las mediciones de calcio poblacionales se realizaron a través de un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman (Thermo Electron, Massachusetts, EUA). La excitación dual de la longitud de onda fue de 340 y 380 nm y la emisión fue colectada a 510 nm. El muestreo de la fluorescencia fue llevado a cabo cada 10 segundos durante 1000 segundos.

Para las cinéticas de Ca^{2+} para medir nanodominios de Ca^{2+} por medio de microscopía de epifluorescencia se transfectaron células con los plásmidos indicados en cada figura usando cubreobjetos de 25 mm en cajas de 35 mm. Las células expresando Orail-GCaMP3 fueron expuestas a TG (1 μM) para inducir el vaciamiento del RE y la activación de Orail. Capsaicina (4 μM) fue utilizada para activar de manera selectiva a los canales TRPV1 y citidin trifosfato (CTP, 150 μM) fue utilizado para abrir los canales P2X₄ de manera selectiva. Las dinámicas de calcio fueron medidas individualmente (al menos 30 células por cubreobjeto por condición), utilizando un microscopio invertido de campo amplio IX-81 de Olympus (Japón) con un objetivo 60X 1.42 NA de inmersión en aceite, con un sistema de iluminación MT-20, filtros de excitación de 484/25, 550/40, filtros de emisión 520/40, 550/25 y 605/40, usando una cámara EMCCD iXon-897 (Oxford Instruments, Massachusetts, EUA). El muestreo se realizó cada segundo por 300 segundos. Los experimentos fueron analizados con ImageJ (NIH, Maryland, EUA) y graficados y analizados con GraphPad Prism (California, EUA).

5.8. Microscopía de super-resolución

Todas las mediciones de imágenes de super-resolución fueron llevadas a cabo en un microscopio invertido Olympus IX-81 configurado para microscopía de reflexión interna total de la fluorescencia (TIRF, por sus siglas en inglés) (cellTIRF Illuminator, Olympus, Tokio, Japón). El ángulo de excitación fue determinado de tal manera que la onda evanescente tuviera una penetración de al menos ~100 nm (Xcellence software v1.2; Olympus Imaging Solution GMBH). Las muestras fueron iluminadas continuamente usando las fuentes de excitación dependiendo del fluoróforo usado. Azul (TRPV1-CFP y CFP-P2X₄) y verde (Orail-GCaMP3 y Orail-YFP) fueron excitados con láser de estado sólido bombeados ópticamente por diodos de 405 nm y 491 nm respectivamente. El poder máximo del láser estuvo entre 20 a 25 mW, dependiendo de la línea de láser usada. La selección del rayo y modulación de la intensidad del láser fueron controlados por medio del software Xcellence v1.2. Un cubo de laser multibanda fue usado para discriminar las fuentes de luz usadas (LF 405/488/635 A-OMF, Bright Line; Semrock). La fluorescencia fue colectada usando un objetivo de inmersión en aceite Olympus UApo N 100x con apertura numérica de 1.49 con lentes de extra-magnificación 1.6x. Todas las secuencias de imágenes fueron grabadas en un chip (512x512) de una cámara EMCCD (Andor, Ixon 888) a 100 nm por píxel.

Las imágenes de sub-difracción fueron derivadas del análisis SRRF (Super Resolution Radial Fluctuation)¹³⁵. Para cada reconstrucción de super-resolución miles de imágenes en TIRF fueron adquiridas dentro del campo evanescente. Las imágenes fueron colectadas estroboscópicamente, alternando entre las líneas de láser, cada uno con una exposición temporal de 1-5 ms y a 100 Hz. Cada serie de imágenes fue analizada con los plugins NanoJ-core y NanoJ-SRRF de Fiji (ImageJ, NIH, Maryland, EUA)¹³⁶, considerando bloques temporales de 300 imágenes. Los siguientes parámetros fueron considerados: radio del anillo 0.5, magnificación de la radialidad 5, ejes en el anillo 10; todos los demás parámetros se dejaron con las opciones predeterminadas. Los mapas de radialidad fueron corregidos usando

tablas de desviaciones calculadas obtenidas con la herramienta de desviación estimada, considerando un promedio de 300 imágenes. Los mapas de radialidad corregidos fueron finalmente integradas en una imagen de super-resolución por medio de un cálculo de acumulación en el orden de segundos de las autocorrelaciones de las radialidades temporales (para imágenes de super-resolución en células fijas) o por medio del producto de la media pareada de la radialidad temporal (para imágenes de super-resolución para células vivas). Para obtener distancias entre Orail y TRPV1 o entre Orail y P2X₄ durante los experimentos usamos el método de correlación de rastreo de la imagen. Para este propósito, células HEK-293 fueron transfectadas con una combinación de Orail-YFP y TRPV1 o la combinación Orail-YFP y CFP-P2X₄, respectivamente. La señal de los fluoroforos individuales fue rastreada durante los experimentos alternando las longitudes de onda, como se describió previamente. Bloques temporales de 300 imágenes fueron analizados. Con la correlación de rastreo de la imagen se realizó un análisis de colocación de partículas únicas a lo largo de toda su trayectoria, esto basado en la correlación cruzada de las imágenes locales. La precisión de la correlación está limitada al SRRF, el cual en nuestro caso está entre ~40 y 60 nm. Todos estos análisis fueron programados con MATLAB (The MathWorks, Massachusetts, EUA) usando los algoritmos originales descritos por Dupont y colaboradores¹³⁷. A diferencia del estudio original, el cual rastrea partículas en un espacio de tres dimensiones (3D), nosotros realizamos solo un rastreo en dos dimensiones (2D) de las partículas dentro de la profundidad de la onda evanescente producida por el TIRF (100 nm) lo que provee una alta precisión para la determinación de la localización espacial en 2D de las partículas cuando se compara con la microscopía confocal, la cual en el mejor de los escenarios tiene una resolución en *z* (profundidad) de alrededor de ~800 nm^{138,139}.

5.9. Mediciones de FRET

Para estos experimentos se sembraron células sobre cubreobjetos de 25 mm y se co-transfectaron con TRPV1-CFP y Orail-YFP. Realizamos mediciones de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) usando el método de fotoblanqueo del aceptor, utilizando a TRPV1-CFP como donador y a Orail-YFP como aceptor, como previamente se ha descrito¹⁴⁰.

Las imágenes para el fotoblanqueamiento del aceptor fueron adquiridas con un microscopio confocal invertido FV1000 de (Olympus, Japón). El fotoblanqueamiento del aceptor fue llevado a cabo exponiendo la región de interés (ROI, *region of interest*) seleccionada al laser a 50% de su intensidad máxima (la ROI está indicada por un recuadro amarillo en la figura 15) a una longitud de onda de 492 nm. Esta longitud de onda no afecta al donador puesto que la excitación de GFP más allá de los 480 nm es despreciable. El protocolo de fotoblanqueamiento consistió en la excitación continua a 492 nm por un lapso de 4 minutos, durante este tiempo, la fluorescencia de emisión de CFP y YFP fueron monitoreados usando el microscopio confocal. La excitación del fotoblanqueamiento fue alternada con la

adquisición de imagen de CFP (460 nm), y YFP (520 nm). Para la adquisición de imágenes se utilizó un objetivo 100x con una apertura numérica de 1.45 (Olympus, Tokio, Japón). La eficiencia de FRET, la cual indica el porcentaje de fotones excitados que contribuyen al FRET, fue calculada midiendo la intensidad de fluorescencia en un ROI, antes y después del fotoblanqueamiento del aceptor (Orai1-YFP), también medimos la fluorescencia del aceptor y del donador en una ROI diferente, es decir una región donde el protocolo de fotoblanqueamiento no fue aplicado, esto es indicado por un círculo amarillo en la figura 15. Esta ROI fue usada para corregir el fotoblanqueamiento que puede ocurrir durante la adquisición que no está relacionado al protocolo de fotoblanqueamiento. La eficiencia de FRET fue calculada con la fórmula $E_{\text{FRET}} = (D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}) / D_{\text{post}}$, donde D_{pre} y D_{post} , son la fluorescencia de YFP antes y después del protocolo de fotoblanqueamiento, respectivamente. El valor de E_{FRET} calculado del área que no estuvo sujeta al protocolo de fotoblanqueamiento fue considerado como la línea basal. Estos valores de línea basal fueron indistinguibles del valor de FRET obtenido entre Orai1-YFP y CFP-P2X₄.

5.10. Ensayo de co-inmunoprecipitación

Se siguió el protocolo de Pankow, et al¹⁴¹ con ligeras modificaciones. De manera breve, se cultivaron células HEK-293 en cajas de cultivo de 100 mm de superficie y se transfectaron con los plásmidos c-myc-Orai1 con TRPV1-YFP o con CFP- P2X₄. Las cajas con las células transfectadas fueron lavadas dos veces con PBS frío, después las células fueron lisadas con el buffer de lisis TNI (0.5% Igepal CA-630, 50 mM Tris [pH 7.5], 250 mM NaCl, 1 mM EDTA y una pastilla de Complete ULTRA EDTA-free Protease Inhibitor cocktail) durante 30 minutos con agitación a 4 °C. Posteriormente el lisado fue sometido a ultrasonidos por medio de un sonicador de baño (55 KHz, 5 minutos). Las muestras fueron centrifugadas por 40 minutos (4 °C, 18,000 x g) y el sobrenadante fue incubado toda la noche con las perlas de resina de sefarosa acopladas al anticuerpo c-myc de Invitrogen (Massachusetts, EUA). Los complejos proteínas-perlas fueron recuperados mediante la centrifugación de las perlas (4 °C, 500 x g). Las proteínas unidas fueron eluidas, incubando dos veces con el buffer de elución (0.2 M glicina, pH 2.3/ 0.5% Igepal CA-630) durante 30 minutos a 37 °C, el buffer de elución fue neutralizado con Tris-HCl pH 8.0. Las proteínas fueron analizadas usando western blot usando anticuerpos específicos para c-myc (Invitrogen, Massachusetts, EUA) para Orai1 endógeno y c-my-Orai1 (~50 KDa), VR1 (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) para TRPV1-YFP (~125 kDa) y P2X₄ (Abcam, Massachusetts, EUA) para CFP-P2X₄, todos los anticuerpos fueron utilizados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para Orai1 y TRPV1 endógeno de los astrocitos usamos el siguiente protocolo. Células de entre 5 y 7 cajas Petri de 100 mm con cultivos primarios en monocapa de astrocitos fueron lavados y despegados mecánicamente. Todas las células de las cajas de cultivo fueron concentradas y lisadas en buffer de lisis TNI durante 30 minutos con agitación a 4 °C y posteriormente fueron sonicadas usando un sonicador de baño (55 kHz, 5 minutos). Las

muestras fueron centrifugadas durante 40 minutos (4 °C, 500 x g). Las proteínas fueron analizadas por western blot usando los anticuerpos específicos descritos arriba.

5.11. Dominios anquirina fusionados a la GFP

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA) para generar péptidos que correspondieran a la secuencia de aminoácidos para los seis dominios de anquirina (ANK) del canal TRPV1 de rata (Genbank NM_031982). Los dominios anquirina fueron tomados de ¹⁴². Los oligonucleótidos fueron clonados en el plásmido pDrive después de su amplificación por PCR y clonadas en marco de lectura en el 5' de la GFP. Los péptidos resultantes fueron:

ANK1 110..152 (42 aa)

RLYDRRSIFDAVAQSNQCQELESLLPFLQRSKKRLTDSEFKDPE

ANK2 153..199 (46 aa)

TGKTCLLKAMLNLHNGQNDTIALLLDVARKTDSLKQFVNASYTDSYY

ANK3 200..246 (46 aa)

KGQTALHIAIERNMTLVTLLEVENGADVQAAANGDFFKKTGKGRPGFY

ANK4 247..282 (35 aa)

FGELPLSLAACTNQLAIVKFLQNSWQPADISARDS

ANK5 283..331 (48 aa)

VGNTVLHALVEVADNTVDNTKFVTSMYNEILILGAKLHPTLKLEEITNR

ANK6 332..358 (26 aa)

KGLTPLALAASSGKIGVLAYILQREIH

Todas seguidas por la secuencia de la EGFP. Todas las proteínas de fusión fueron completamente secuenciadas antes de usarse. Para los estudios de Co-IP el plásmido pcDNA3.1 fue usado, conteniendo cada una de las secuencias de nucleótidos para los seis dominios anquirina individualmente fusionados a la GFP. Estos plásmidos fueron transfectados en células HEK-293 combinadas con el plásmido Orai1. Para los estudios de microarreglos de péptidos, los plásmidos mencionados anteriormente fueron transfectados en células HEK-293 mantenidas en frascos de 500 mL para producir las proteínas de fusión. Las células fueron cosechadas y sonicadas para romper la membrana celular. Los sobrenadantes fueron inmunoprecipitados usando el anticuerpo comercial α -GFP (Clontech, California, EUA). Las alícuotas de los seis dominios anquirina fusionados a la GFP fueron utilizados para los estudios de microarreglos peptídicos con TIRFM como previamente se describieron¹⁴³.

Brevemente, el vidrio de sílice fue recubierto con 0.01 mg/mL de poli-L-lisina. El péptido Orail- COOH-DsRed fue puesto en “spots” sobre la platina del microarreglo usando una solución del péptido de 500 ng en 50 μ L. Aproximadamente 2 μ L fueron depositados de manera manual en cada uno de los “spots” usando una micropipeta. Los “spots” se dejaron secando durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de iniciar el experimento en el microarreglo de TIRFM. Las platinas del microarreglo fueron montadas en la cámara cerrada del sistema LG-TIRFM (TIRF Labs, N.C., EUA).

Una estrategia de PCR similar fue llevada a cabo para producir las proteínas de fusión entre el amino terminal de Orail y GFP (NH₂-GFP), el carboxilo terminal de Orail y GFP (COOH-GFP) y el carboxilo terminal de Orail fusionado a la proteína roja fluorescente DsRed (Takara Bio, California, EUA). La producción y purificación de las proteínas fusionadas se hizo de la misma manera que lo descrito arriba. El dominio Orail-COOH contiene los últimos 38 aminoácidos (200-237) con la secuencia:

HKTD RQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHYA
(Genbank: AAH13386.1)

Esta secuencia fue seguida por la proteína GFP o la DsRed.

El amino terminal de Orail contiene los primeros 54 aminoácidos de esta proteína (aminoácidos 1-54):

MSLNEHSMQALSWRKLYLSRAK LKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPP
(Genbank: AAH13386.1)

La secuencia fue seguida por la proteína GFP. La mutante con la delección de la anquirina 1 de TRPV1 (TRPV1- Δ ANK1) fue producida por la amplificación con PCR del cDNA de TRPV1 usando oligonucleótidos que tenían su inicio después del nucleótido 536 (aminoácido 153).

5.12. Microarreglos de péptidos con TIRF

Para los estudios de microarreglos de péptidos usando los dominios anquirina fusionados a GFP utilizamos un sistema específicamente desarrollado para este propósito basado en TIRFM¹⁴³. En nuestro laboratorio hemos documentado ampliamente este sistema¹⁴⁴.

El sistema consiste en la purificación de los péptidos, en este caso los péptidos fueron el dominio ANK1 (anquirina 1 de TRPV1) o el dominio terminal de Orail-COOH-DsRed, estos péptidos fueron impresos usando una micropipeta en microarreglos de vidrio convencionales que previamente habían sido cubiertos con 0.01 mg/mL de poli-L-lisina. La cámara del microarreglo cerrada fue bañada con una solución que contenía los dominios ANK fusionados a la GFP a una concentración final de 1 μ M. Después de tres minutos de incubación, la cámara

fue bañada con solución salina y la señal de fluorescencia fue colectada por un minuto. La excitación se realizó en modo de TIRFM usando el sistema LG-TIRFM (TIRFM basado en una luz guiada) (TIRF Labs, N.C., EUA). La excitación fue alternada entre 405 nm (excitación de la GFP) y 594 nm (excitación de la DsRed). La emisión de la DsRed para evaluar la cantidad de Orail-COOH-DsRed depositada en cada uno de los pozos. Los pozos de los microarreglos que contenían menos del 80% de la fluorescencia promedio de DsRed fueron descartados por insuficiente cantidad de Orail-COOH-DsRed había sido depositada en el pozo. Las emisiones de GFP (D505/540m) y DsRed (ET620/60m) fueron colectadas usando un filtro de emisión de una sola banda de alta calidad de Chroma (Chroma Technology Corporation, VT, EUA). Para mayores referencias de esta metodología por favor dirijase a la siguiente referencia ¹⁴⁴.

5.13. Ensayo de cicatrización o cierre de la herida

Los cultivos primarios de astrocitos corticales fueron aislados de cerebros de rata¹⁰⁵. Todos los procedimientos para el mantenimiento de las ratas y el aislamiento de los astrocitos fueron aprobados por el Comité Interno de Cuidado Animal del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo número LVD102(66)-16). Los cultivos de astrocitos corticales fueron obtenidos de ratas neonatas Wistar de uno o dos días de nacido^{145,146}. El procedimiento de manera breve fue el siguiente: La corteza cerebral de 6 a 8 neonatos fue separada de las meninges y fue puesta en solución Krebs (119mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucosa, 1 mM EGTA y ajustada a 7.4 de pH) y cortada hasta obtener trozos pequeños. El tejido fue disociado con una solución Krebs que contenía tripsina 4800 U/mL, (T-4665, Sigma, EUA) durante 10 minutos. Después las células fueron disociadas mecánicamente pasándolas a través de una membrana de nylon de 80 µM y posteriormente fueron resuspendidas en medio de cultivo BME (Basal Medium Eagle, Gibco, Massachusetts, EUA), suplementado con con 10% SFB (Thermo Fisher Scientific, Missouri, EUA), 2 mM de glutamina (Gibco, Massachusetts, EUA) y 50 I.U./mL de antibiótico penicilina- 50 µg/mL estreptomycin (Gibco, Massachusetts, EUA). Los astrocitos disociados fueron sembrados en cajas Petri de 35 mm e incubados a 37 °C con humedad, 5% de CO₂ y después de 2 o 3 semanas en cultivo, los astrocitos fueron usados.

Los astrocitos fueron transfectados con las construcciones descritas en cada uno de los pies de figura usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Massachusetts, EUA). Para los experimentos de RNA de interferencia, los astrocitos fueron cultivados hasta tener una confluencia de ~80% en cajas de 35 mm y fueron transfectados con un juego de tres oligonucleótidos de “Stealth” siRNAs para Orail (RSS357633, RSS357634, RSS357635) comprados a Invitrogen. Un “Stealth” siRNA “scramble” fue usado como control negativo (Invitrogen, Massachusetts, EUA). La transfección con los siRNA fue realizada en los astrocitos primarios con Lipofectamina 2000 y Opti-MEM de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Massachusetts, EUA).

Para el ensayo de cicatrización de la herida seguimos el siguiente protocolo: Cámaras con fondo de vidrio (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) fueron recubiertas con 0.01 mg/mL de poli-L-lisina (Sigma, EUA). Astroцитos corticales confluentes fueron sembrados sobre las cámaras. Una vez confluentes de nuevo, los astroцитos fueron desprovistos de suero durante toda la noche para disminuir su proliferación celular. Una herida sencilla fue realizada con una punta de pipeta de 1 mL en la monocapa del cultivo de astroцитos, después las células fueron lavadas gentilmente tres veces con medio libre de suero. El área de la herida fue marcada con un marcador para su posterior identificación y posicionamiento en el microscopio. Las imágenes de las células fueron realizadas con un objetivo de baja magnificación 10x de un microscopio IX81 (Olympus, Tokio, Japón). Una cámara para microscopio de baja resolución de 5 MP USB (Zoowaysoon) conectada al puerto c del microscopio fue usada para adquirir imágenes individuales del área del cierre de la herida en el tiempo 0 (pre-herida), inmediatamente después el cierre de la herida, 5, 10, 15, 20 y 25 horas después de hacerse la herida. Después de cada adquisición las células fueron regresadas a la incubadora a 37 °C con 5% de CO₂.

6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo y caracterización del sensor Orai1-GCaMP3

Con el objetivo de poder identificar cambios en la concentración de Ca^{2+} cerca del poro del canal Orai1, diseñamos una proteína de fusión que consiste en el canal Orai1 al que se le fusionó en el carboxilo terminal la proteína GCaMP3 (Orai1-GCaMP3, mapa en Fig. 8). Durante los experimentos llevados a cabo en este trabajo, utilizamos el indicador de calcio rojo fluorescente R-GECO para medir simultáneamente los cambios en el calcio global en el citosol y comparamos estos con los cambios de concentración locales reportados por Orai1-GCaMP3 (OG3), los cuales esperábamos reportaran únicamente los cambios de concentración de Ca^{2+} cerca del poro de Orai1.

Una vez realizada la construcción del sensor Orai1-GCaMP3, decidimos determinar si la proteína de fusión tenía el mismo comportamiento que su contraparte silvestre, empezando con la identificación de la expresión de la proteína de fusión por medio de western blot (Fig. 10b), donde en las células transfectadas con OG3 observamos dos bandas que corresponden a Orai1 silvestre y a nuestro sensor expresado, lo mismo que se observó en nuestro control que se transfectó con Orai1-GFP. Posteriormente se realizó microscopía confocal y como se esperaba se encontró que Orai1-GCaMP3 se expresaba principalmente en la MP, esto de manera similar al canal solo o la construcción Orai1-GFP usados como controles (Fig. 10a).

Para determinar la funcionalidad de nuestro sensor se realizó como primera aproximación el protocolo clásico de re-adición de Ca^{2+} , y como esperábamos las células que sobre-expresaban Orai1-GCaMP3 u Orai1-GFP mostraron una SOCE potenciada (Fig. 10c, d) indicando que la funcionalidad de Orai1 es indistinguible de la de Orai1-GFP, esto es demostrado claramente con la medición del área bajo la curva (AUC) de la entrada de Ca^{2+} , pero también es evidente con los incrementos en el pico de fluorescencia de Fura-2 de los mismos datos (Orai1-GCaMP3 -línea verde-, y Orai1-GFP -línea azul-, Fig. 10c).

La siguiente aproximación para probar la funcionalidad de nuestro sensor, fue ver su capacidad de crear puntos fluorescentes de manera regular, y nuevamente, como esperábamos, encontramos que Orai1-GCaMP3 era capaz de crear estas estructuras junto con STIM1 cuando los depósitos de Ca^{2+} interno son vaciados con TG (Fig. 10e), esto fue cuantificado por medio del índice de co-localización de Pearson entre STIM1 y Orai1 que es equiparable al índice de co-localización de nuestro control Orai1-GFP (Fig. 10f, g). Juntos todos estos resultados nos indican que la función de Orai1 no se alteró por la fusión del indicador de calcio GCaMP3.

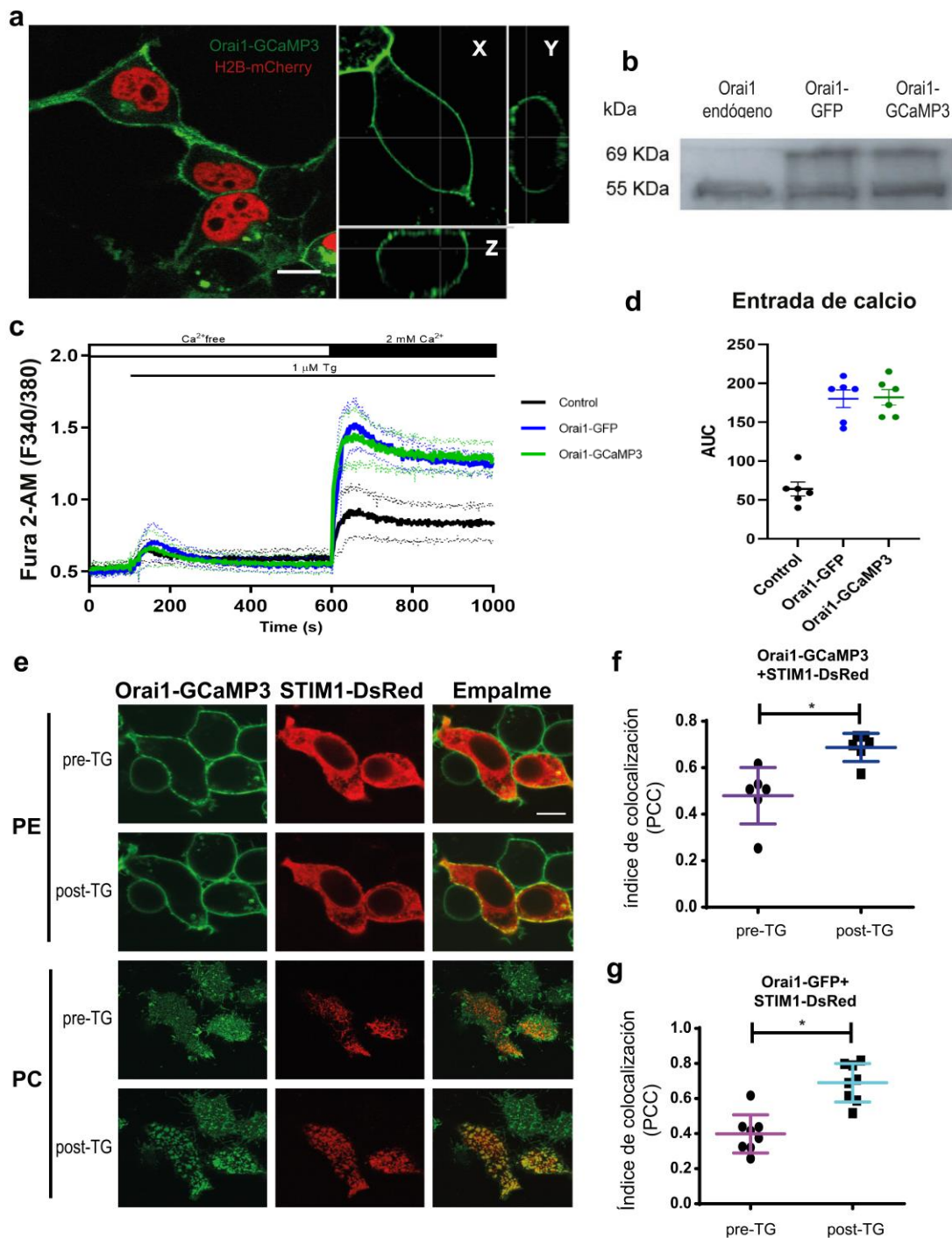


Figura 10. Desarrollo y pruebas del sensor Orai1-GCaMP3. **a.** Imágenes confocales representativas obtenidas con Orai1-GCaMP3 (verde) y la histona 2B-mCherry como marcador nuclear (rojo) expresadas en células HEK-293. Los paneles de la izquierda son las proyecciones en 3D (ejes X, Y y Z) para ilustrar la localización de Orai1-GCaMP3 en la MP. Barra de escala de 5 μm. **b.** Análisis de western blot de células HEK-293 expresando Orai1-GCaMP3 y Orai1-GFP. Notar que la banda de 55 KDa corresponde a Orai1 endógeno y la banda de 79 KDa corresponde a Orai1-GCaMP3 y Orai1-GFP. **c.** Mediciones de Ca²⁺ de poblaciones celulares, usando HEK-293 que expresaban Orai1-GFP+STIM1-DsRed (azul) u Orai1-GCaMP3+STIM1-DsRed (verde) o midiendo la SOCE endógena (negro). **d.** Área bajo la curva (AUC) de la fluorescencia obtenida después de la adición de 2mM de Ca²⁺ (entrada de calcio) con Orai1 endógeno (negro), Orai1-GFP (azul) y Orai1-GCaMP3 (verde). **e.** Imágenes confocales representativas de la formación de puntos fluorescentes después de la aplicación de tapsigargina en células expresando Orai1-GCaMP3 (verde) y STIM1-DsRed (rojo). Las imágenes muestran un plano ecuatorial y uno cortical. Escala de 5 μm. **f.** Índice de co-localización (coeficiente de Pearson) para Orai1-GCaMP3+STIM1-DsRed antes y después de la tapsigargina. **g.** Índice de co-localización (coeficiente de Pearson) para Orai1-GFP+STIM1-DsRed antes y después de la tapsigargina. Todos los datos muestran la media ± la desviación estándar. * p < 0.01. La significancia estadística fue de < 0.05. La estadística se llevó a cabo por una prueba t de Student en GraphPad Prism.

6.2. Orai1-GCaMP3 detecta incrementos locales de Ca^{2+}

Una vez corroborada la funcionalidad de nuestro sensor, decidimos examinar la capacidad de Orai1-GCaMP3 para detectar los incrementos en la concentración de Ca^{2+} cuando otros canales que permean calcio son activados; para esto exploramos varios canales y encontramos que OG3 detecta el Ca^{2+} que proviene del canal TRPV1 (Fig. 11a, b) pero no el Ca^{2+} proveniente del receptor purinérgico P2X₄ (Fig. 11c, d). Como control en ambas condiciones se utilizó el indicador R-GECO como sensor de Ca^{2+} citosólico, y se puede observar que tanto la activación de TRPV1 como de P2X₄ promovieron un aumento en la señal de este indicador de Ca^{2+} , comportamiento que no se replicaba en nuestro sensor que nos permitió diferenciar ambas entradas de Ca^{2+} . Como control adicional se utilizó el sensor de Ca^{2+} Lck-GCaMP5, el cual es un GECl diseñado para expresarse en la membrana plasmática y que detecta el calcio en esta región celular⁶⁶, de manera interesante encontramos que este indicador de Ca^{2+} detectó incrementos de Ca^{2+} inducidos por la activación de los canales P2X₄ a diferencia del sensor Orai1-GCaMP3 (Fig. 12a, b). Juntos estos resultados sugieren que, a pesar de que ambas proteínas de fusión (Lck-GCaMP5 y Orai1-GCaMP3) están localizadas en la membrana plasmática, ambas se encuentran contenidas dentro de diferentes microdominios lo cual les confiere una diferente sensibilidad a los incrementos de Ca^{2+} de distintos tipos de fuentes.

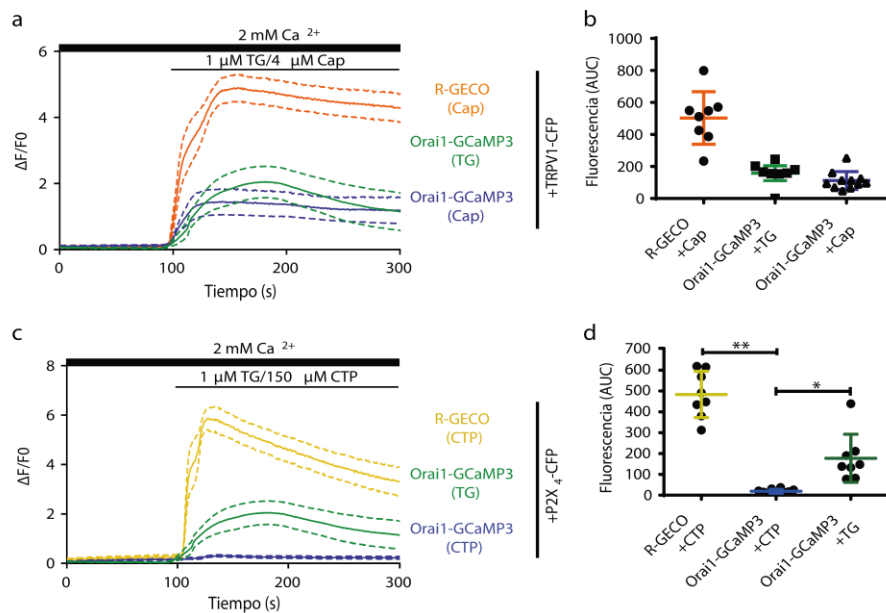


Figura 11. Orai1-GCaMP3 detecta los incrementos de Ca^{2+} de TRPV1, pero no los de P2X₄. **a.** Incrementos de Ca^{2+} reportados por R-GECO cuando las células fueron expuestas a capsaicina, Orai1-GCaMP3 con capsaicina y Orai1-GCaMP3 con tapsigargina. **b.** Área bajo la curva (AUC) de la fluorescencia R-GECO con capsaicina (naranja), Orai1-GCaMP3 con capsaicina (azul) y Orai1-GCaMP3 con tapsigargina (verde). **c.** Incrementos de Ca^{2+} reportados por R-GECO cuando las células fueron expuestas a CTP, Orai1-GCaMP3 con CTP y Orai1-GCaMP3 con tapsigargina. **d.** Área bajo la curva (AUC) de la fluorescencia R-GECO con CTP (amarillo), Orai1-GCaMP3 con CTP (azul) y Orai1-GCaMP3 con tapsigargina (verde). Nótese que Orai1-GCaMP3 no detecta los incrementos de Ca^{2+} mientras R-GECO reporta grandes incrementos. Se muestra la media \pm el error estándar. ****** $p < 0.01$, ***** $p < 0.05$. La significancia estadística fue $p < 0.05$. Se uso ANOVA de una cola.

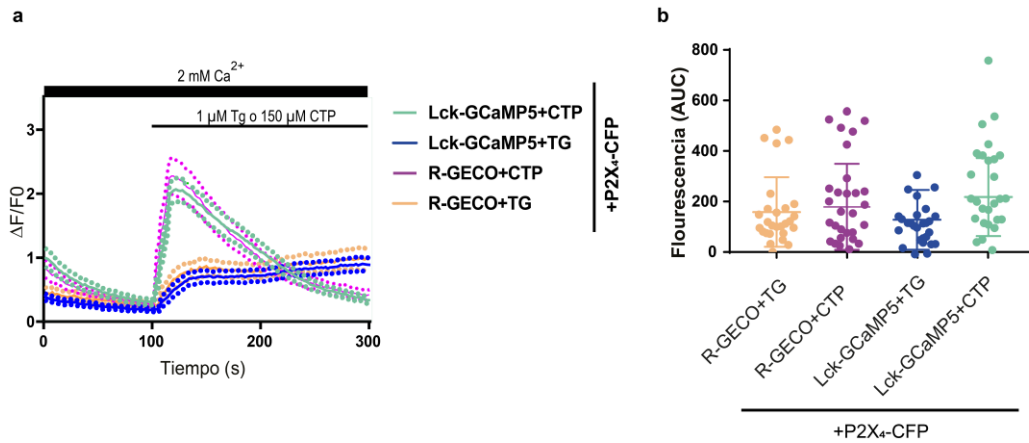


Figura 12. El sensor Lck-GCaMP5 detecta incrementos de Ca^{2+} inducidos por CTP. **a.** Mediciones de calcio de poblaciones celulares usando el indicador de calcio dirigido a la MP Lck-GCaMP5 (verde y azul) y el sensor de calcio citosólico R-GECO (magenta y naranja). Lck-GCaMP5 es un GCaMP5 que es dirigido a la membrana plasmática al estar fusionado con los primeros 26 aa de Lck, una tirosinacinas de la familia Src que contiene dos dominios de palmitoilación y un dominio de miristoilación. **b.** Área bajo la curva de las diferentes condiciones mostradas en a. En todos los casos se muestra la media \pm la desviación estándar.

6.3. La activación del canal TRPV1 induce la CDI del canal Orai1

Decidimos caracterizar a mayor detalle las interacciones entre Orai1-TRPV1 y Orai1-P2X₄ en un intento de identificar los posibles mecanismos moleculares responsables de la detección de Ca^{2+} diferencial de OG3 cuando TRPV1 y P2X₄ son activados.

Si Orai1-GCaMP3 puede detectar los incrementos de Ca^{+} después de la activación de TRPV1, pero no los de P2X₄, entonces el calcio que se acumula en la cercanía de Orai1 debería tener un efecto en la CDI de Orai1. Para probar esta hipótesis, desarrollamos un protocolo de patch clamp de activación secuencial para inducir primero la activación de los canales TRPV1 o P2X₄ (con sus agonistas específicos capsaicina y CTP respectivamente) seguido por la activación de los canales Orai1 con TG y se midieron las corrientes de célula completa en la modalidad de patch clamp perforado (Fig. 9). Los controles del experimento consistieron en la perfusión con solución extracelular que nos proporcionó la actividad basal de Orai1 y un control para la CDI del mismo canal (Fig. 13a, b).

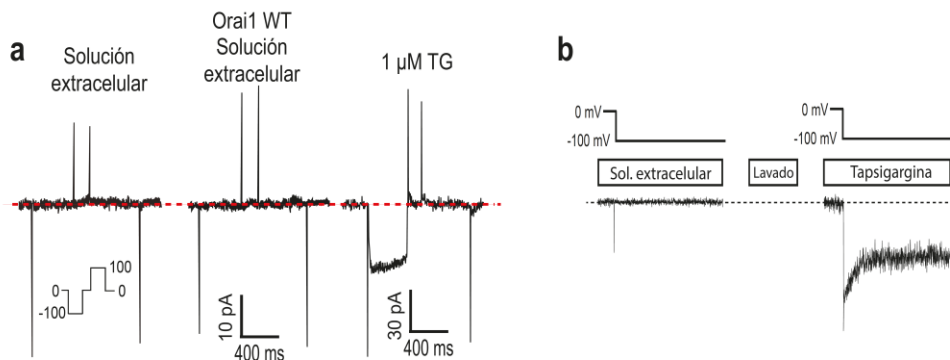


Figura 13. Mediciones de patch perforado en células control HEK-293 expresando Orai1 (WT)-GFP y Stim1-DsRed. **a.** El protocolo secuencial consistió en la aplicación de la solución extracelular seguida por una segunda aplicación de solución extracelular control (SE) y finalmente tapsigargina. La aplicación de SE fue reemplazada por capsaicina o CTP en los siguientes experimentos. **b.** Acercamiento de los dos últimos pasos del protocolo secuencial en este control. Este control es usado como comparación con la activación Orai1 cuando se abren los canales TRPV1 con capsaicina y P2X₄ con CTP en los experimentos posteriores.

La activación de TRPV1 con capsaicina (Cap) seguida por la activación de Orai1 con TG resultó en una fuerte CDI (Fig. 14a, b). Este fenómeno no fue observado cuando activamos P2X₄ con citidin trifosfato (CTP) seguido por la activación de Orai1 con TG (Fig. 14c, d).

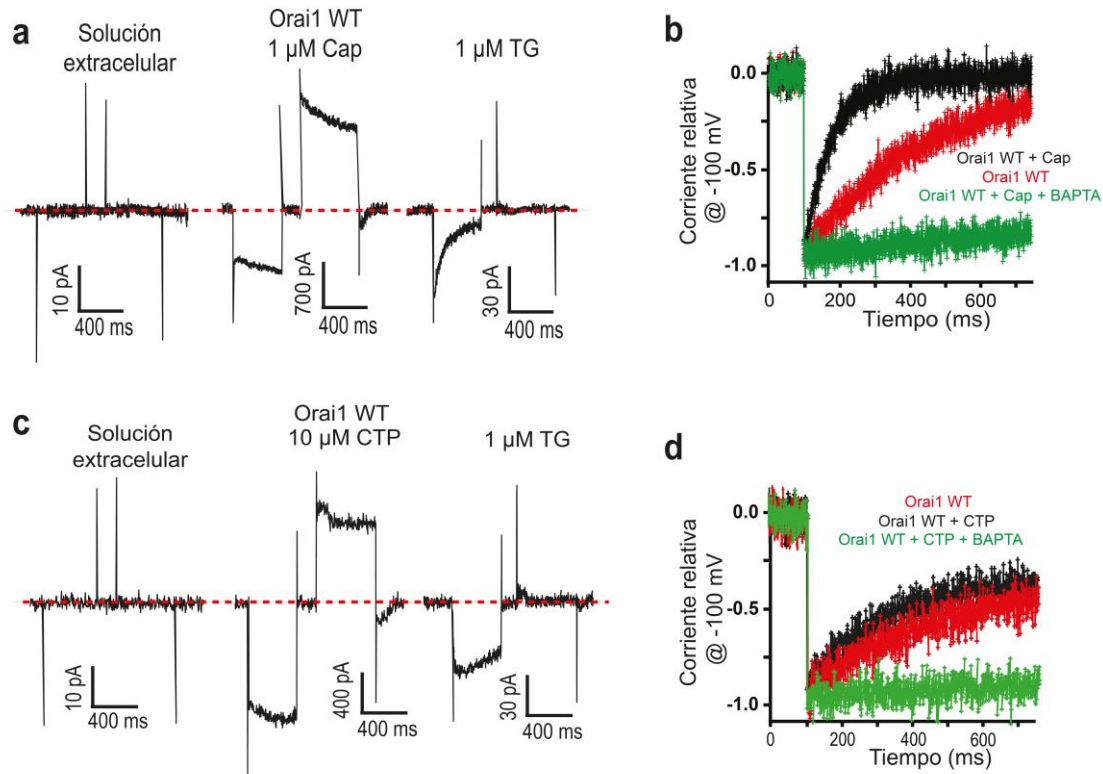


Figura 14. La activación de TRPV1 induce una fuerte CDI en Orai1. **a.** Mediciones de patch perforado usando el protocolo secuencial de pre-estimulación con capsaicina en células transfectadas con Orai1 y TRPV1. El panel de en medio muestra la corriente provocada por TRPV1. El panel de la derecha muestra la subsecuente activación de Orai1 con tapsigargina y su subsecuente inactivación. **b.** Corriente relativa que ilustra la activación aplicando rampas de voltaje de 0 a -100 mV para células expresando Orai1 y TRPV1 pre-estimuladas con capsaicina (negro), Orai1 solo con tapsigargina (rojo) y células pre-estimuladas con capsaicina incubadas con BAPTA-AM (verde). **c.** Mediciones de patch perforado usando el protocolo secuencial de pre-estimulación con CTP en células transfectadas con Orai1 y P2X₄. El panel de en medio muestra la corriente provocada por P2X₄. El panel de la derecha muestra la subsecuente activación de Orai1 con tapsigargina. **d.** Corriente relativa que ilustra la activación aplicando rampas de voltaje de 0 a -100 mV para células expresando Orai1 y TRPV1 pre-estimuladas con CTP (negro), Orai1 solo con tapsigargina (rojo) y células pre-estimuladas con capsaicina incubadas con BAPTA-AM (verde). Todos los experimentos muestran la media \pm la desviación estándar de al menos 20 células.

Para demostrar que la rápida caída de la corriente de Orai1 era resultado de la CDI, llevamos a cabo experimentos con una mutante insensible a la CDI (Orai1-Y80W)⁵¹. La activación de TRPV1 seguida de la activación de Orai1-Y80W no indujo un aumento en la CDI (Fig. 15a, b). Además, como otro control usamos el quelante rápido de calcio BAPTA dentro de la célula (BAPTA-AM) y confirmamos que la rápida reducción de la corriente de Orai1 después de la activación de TRPV1 era resultado de la CDI (Fig. 14b, d). La CDI observada en Orai1 después de la activación de TRPV1 fue evidente en todos los voltajes explorados (Fig. 15c).

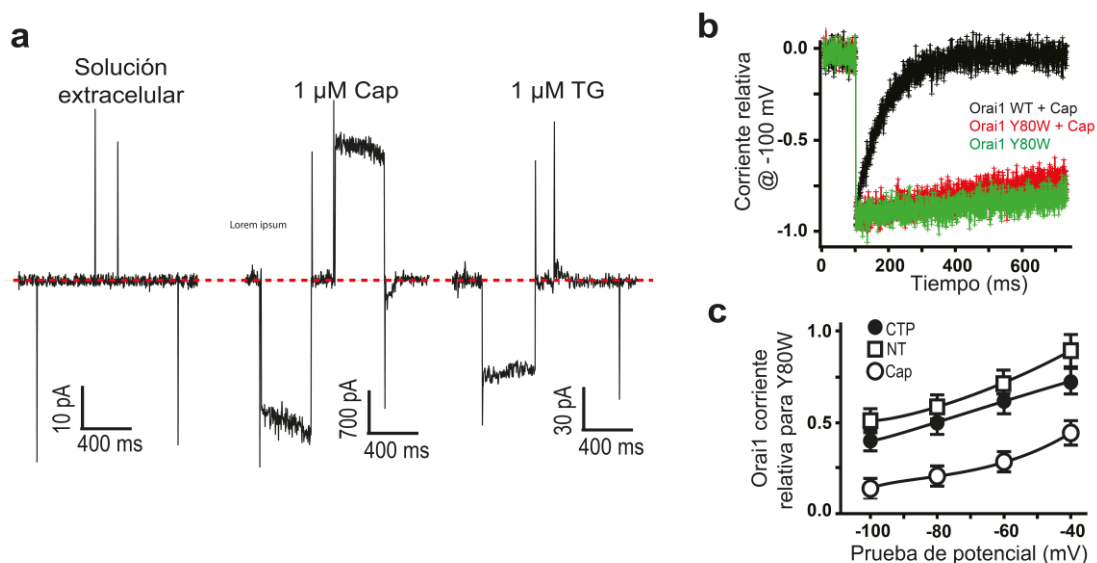


Figura 15. La mutante Y80W de Orai1 es insensible a la CDI de Orai1 inducida por TRPV1. **a.** Mediciones de patch perforado usando el protocolo secuencial en células expresando la mutante natural resistente a la CDI Orai1-Y80W y TRPV1. **b.** Corriente relativa que ilustra la activación para células expresando Orai1 tipo silvestre (WT) con pre-estimulación con capsaicina (negro) y células expresando Orai1 Y80W con pre-estimulación (rojo) o sin pre-estimulación (verde). **c.** Corrientes relativas de la mutante Y80W de Orai1 a diferentes voltajes. Las células pre-estimuladas con CTP (círculo negro), con capsaicina (círculo blanco) o células no expuestas a capsaicina, solamente tapsigargina (NT, cuadros blancos). Todos los experimentos muestran la media \pm la desviación estándar de al menos 20 células.

6.4. Orai1 se encuentra próximo a TRPV1, pero no a P2X4

Si el Ca^{2+} que entra por TRPV1 es capaz de inducir una fuerte CDI de Orai1, pero el calcio que entra a través de P2X4 no induce este mecanismo, esto nos sugiere fuertemente que TRPV1 y Orai1 se encuentran cerca uno del otro.

Para explorar a nivel de canal único, como el calcio que entra a través de TRPV1 es detectado por nuestra proteína de fusión Orai-GCaMP3, llevamos a cabo estudios de microscopía de super-resolución usando un método de fluctuación (SRRF), nuestros experimentos de super-resolución mostraron canales Orai1, TRPV1 y P2X4 individuales moviéndose libremente en la MP de células vivas (Fig. 16a). La medición de la distancia entre canales individuales Orai1 y TRPV1 fue significativamente menor que la distancia entre los canales Orai1 y P2X4 (Fig. 16b) Las distancias promedio en el transcurso del tiempo obtenidas de cientos de canales individuales mostraron que la distancia entre Orai1 y P2X4 era al menos unas 4 veces más grande comparada a la distancia entre Orai1 y TRPV1, además pudimos observar que estas distancias no se ven afectadas por la apertura de los canales (Fig. 16c).

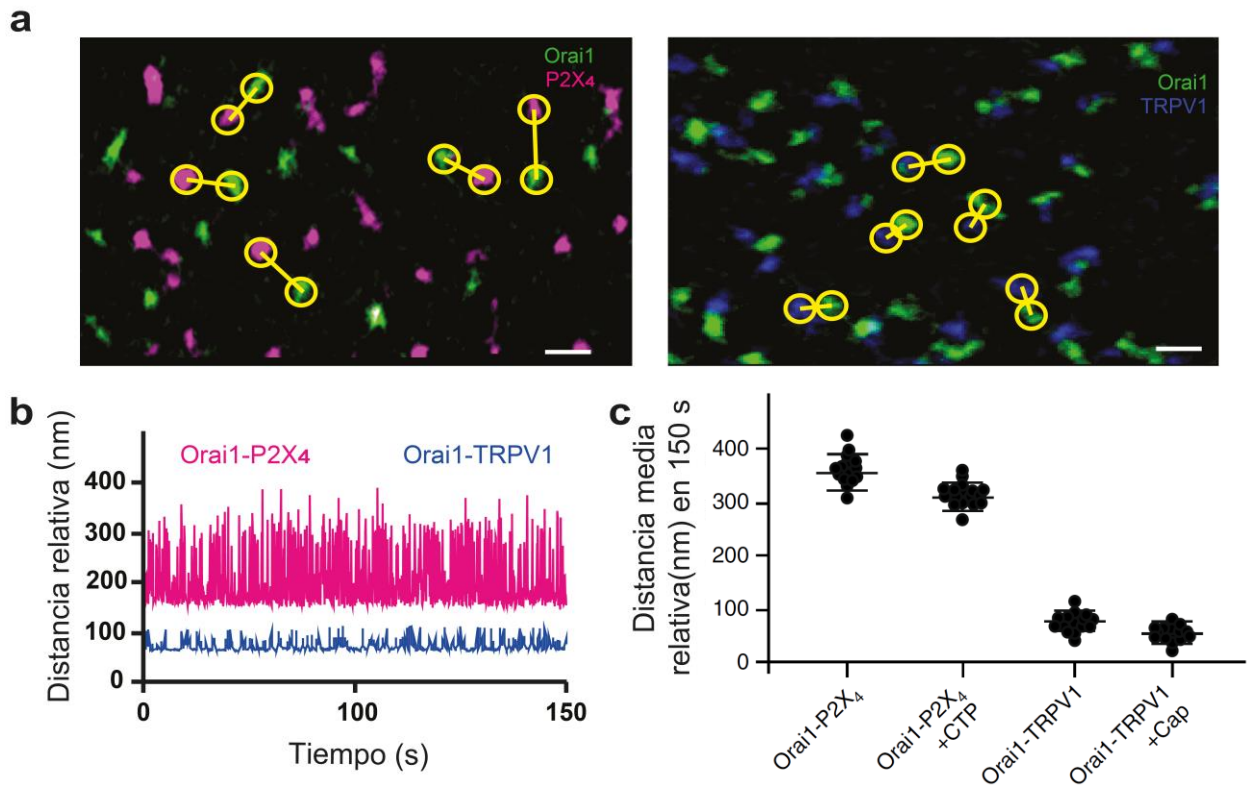


Figura 16 . Microscopía de super-resolución revela que TRPV1 y Orai1 se mueven cerca uno del otro en la membrana plasmática.
a. Imágenes de super-resolución de células expresando Orai1 (verde) y P2X₄ (magenta) u Orai1 (verde) y TRPV1 (azul). Escala de 60 nm. **b.** Distancia relativa a través del tiempo para pares de canales en células expresando Orai1-P2X₄ y Orai1-TRPV1. **c.** Distancia relativa de cientos de canales antes y después de su respectivo estímulo.

Con ayuda de la microscopía de super-resolución, pudimos detectar incrementos de Ca²⁺ en canales individuales con Orai1-GCaMP3, estos experimentos mostraron que esta proteína de fusión era capaz de detectar incrementos de Ca²⁺ cuando se activaban los canales TRPV1, pero no cuando se activaban los canales P2X₄ (Fig. 17a, b). Este comportamiento de OG3 para detectar de manera diferencial el Ca²⁺ que entra al activar TRPV1 o P2X₄ fue también observado cuando realizamos mediciones de los cambios promedios en la fluorescencia de docenas (campo de visión completo) de canales individuales de Orai1-GCaMP3 (Fig. 17c, d).

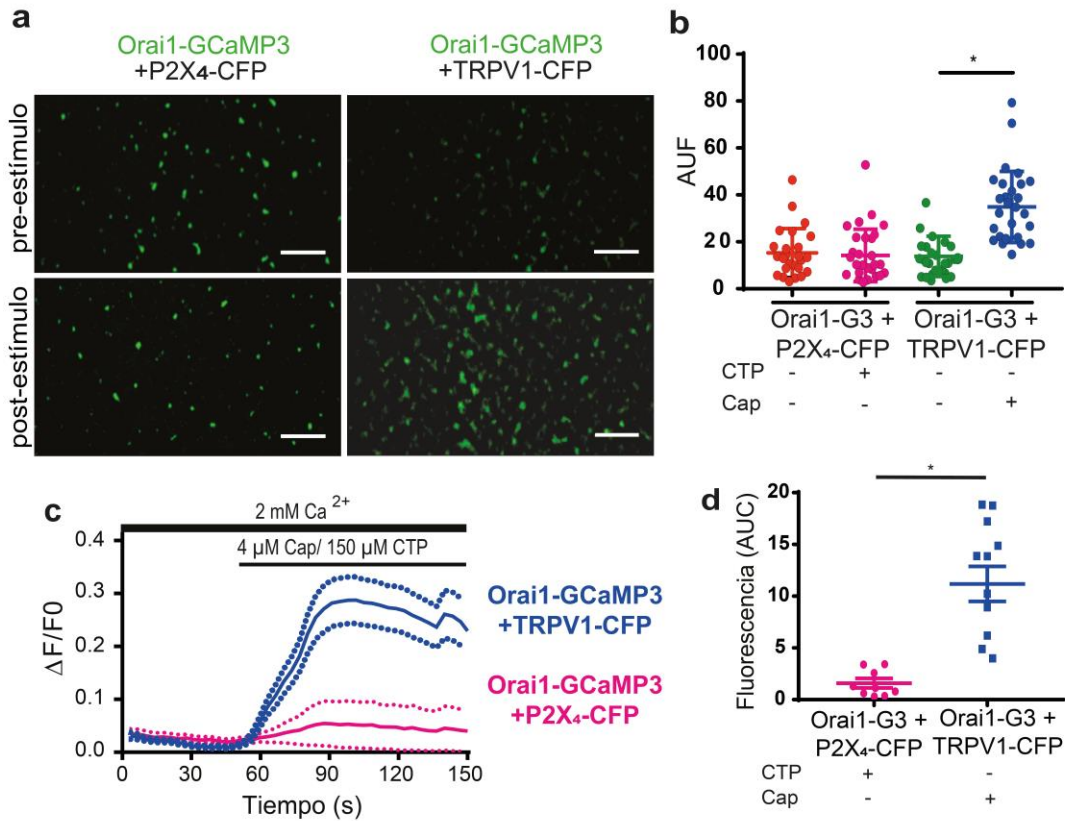


Figura 17. Canales unitarios Orai1-GCaMP3 detectan los incrementos de Ca²⁺ de TRPV1, pero no los de P2X₄. **a.** Imágenes de super-resolución de canal único de células expresando Orai1-GCaMP3 (verde) + P2X₄-CFP (paneles de la izquierda) o TRPV1-CF (paneles de la derecha) antes y después de la estimulación con CTP o capsaicina. Nótese el incremento en la fluorescencia de canales unitarios Orai1-GCaMP3 después de la estimulación con capsaicina, pero no con CTP. Barra de escala de 200 nm. **b.** Intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (AUF) reportadas por el sensor Orai1-GCaMP3 bajo los distintos tipos de estimulación. Notar que las células que expresan TRPV1-CFP expuestas a capsaicina tuvieron un incremento en la fluorescencia (trazos azules). La estimulación con capsaicina en células sin TRPV1 (trazos rojos y magentas) o las células expresando TRPV1, pero sin exposición a capsaicina (trazos verdes) no tuvo un incremento en la fluorescencia de OG3. **c.** Mediciones de fluorescencia de campos de visión enteros (con decenas de canales individuales) a través del tiempo de células expresando el sensor Orai1-GCaMP3 y TRPV1 (línea azul) o P2X₄ (línea magenta) estimulando con sus agonistas respectivos. Las líneas muestran la media ± la desviación estándar (punteado). La fluorescencia del sensor Orai1-GCaMP3 incremento únicamente después de la estimulación con capsaicina en células que expresaban TRPV1 **d.** Área bajo la curva (AUC) para las condiciones de **c** **p*<0.01. La significancia fue *p*<0.05. Se utilizó la prueba de *t* de Student.

6.5. Orai1 se asocia con TRPV1, pero no con P2X₄

Los experimentos de super-resolución nos mostraron que los canales TRPV1 se encontraban más cercanos a Orai1 en comparación de los canales P2X₄, esto nos hizo preguntarnos si los canales TRPV1 y Orai1 podrían estar interactuando. Para responder esta hipótesis como primer acercamiento realizamos microscopía de FRET por fotoblanqueamiento del aceptor. Como esperábamos nuestros experimentos mostraron que Orai1-YFP (donador) y TRPV1-CFP (aceptor) tienen FRET (Fig. 18a, c). Sin embargo, Orai1-YFP y P2X₄-CFP no tenían ninguna eficiencia de FRET (Fig. 18b, c). Estos resultados nos indican que Orai1 y TRPV1 permanecen a una distancia de 10 nm o menos uno del otro y que Orai1 y P2X₄ tenían una distancia mayor a esta.

Para confirmar estos resultados realizamos experimentos de co-inmunoprecipitación, y usando a Orai1 como cebo, los resultados de estos experimentos presentaron las mismas tendencias que los ensayos de FRET, ya que únicamente encontramos co-inmunoprecipitación entre Orai1 y TRPV1, pero no entre Orai1 y P2X₄ (Fig. 18d).

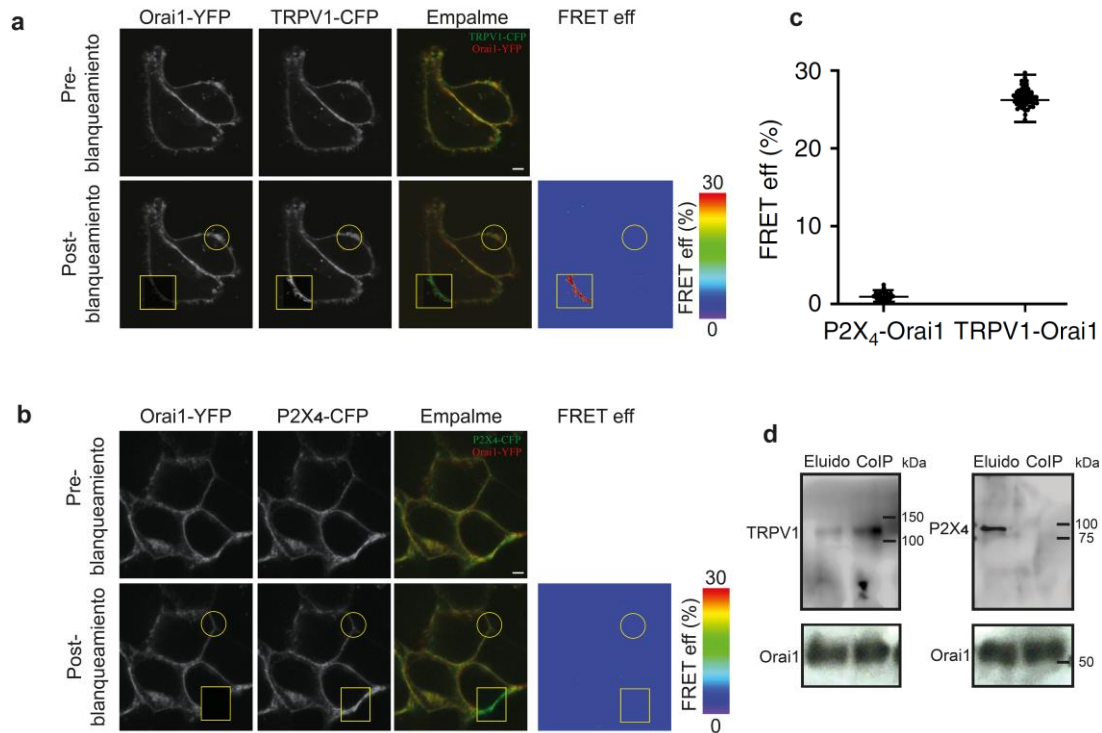


Figura 18. TRPV1 se encuentra cercano a Orai1. **a.** Imágenes confocales representativas de la expresión de Orai1-YFP y TRPV1-CFP antes y después del fotoblanqueamiento. El cuadrado muestra el área fotoblanqueada y el círculo un área control. Se usaron ambas áreas para calcular la eficiencia del FRET. El panel de la derecha muestra la eficiencia de FRET en pseudocolor. Escala de 1 μ M. **b.** Imágenes confocales representativas de la expresión de Orai1-YFP y CFP-P2X₄. Los parámetros son iguales al inciso anterior. **c.** Porcentaje de eficiencia de FRET obtenido de al menos 45 células para cada pareja de fluoróforos. Los datos muestran la media \pm la desviación estándar. **d.** Análisis de co-inmunoprecipitación de células expresando c-myc-Orai1 y TRPV1-YFP o P2X₄-CFP. El total indica las proteínas que no fueron retenidas en la columna de afinidad. Los blots son ejemplos de tres experimentos independientes.

6.6. El C-terminal de Orai1 y los dominios de anquirina de TRPV1 son los responsables de su asociación

Con el objetivo de identificar las estructuras moleculares responsables de la asociación entre los canales Orai1 y TRPV1, llevamos a cabo un amplio tamizaje usando microarreglos peptídicos con una plataforma que anteriormente se desarrolló y probó en el laboratorio¹⁴⁴. Estudios previos han resaltado el papel de los dominios anquirina de TRPV1 en la asociación con proteínas reguladoras y de andamiaje¹⁴⁷. Para evaluar el papel de cada uno de los dominios de anquirina de TRPV1 produjimos proteínas de fusión de cada uno de los dominios con la proteína verde fluorescente (GFP) y llevamos a cabo estudios de co-inmunoprecipitación usando nuevamente a Orai1 como cebo. Nuestros análisis de co-inmunoprecipitación

revelaron que los primeros cuatro dominios de anquirina se asocian a Orai1. Sin embargo, fue el primer dominio de anquirina (ANK1) el que mostró la interacción más fuerte (Fig. 19a). Para determinar qué secuencia de Orai1 era la responsable de la asociación con ANK1 de TRPV1, realizamos proteínas de fusión entre el amino terminal de Orai1 con GFP (Orai1-NH₂-GFP) y el carboxilo terminal de Orai1 con GFP (Orai1-COOH-GFP). Los estudios de microarreglos de péptidos usando como cebo a ANK1, dejaron ver que la interacción más fuerte se da entre el dominio ANK1 y Orai1-COOH-GFP (Fig. 19b). Para corroborar nuestros resultados, decidimos hacer estudios de microarreglos usando a Orai1-COOH como cebo, para asegurarnos que la cantidad de Orai1-COOH depositada en cada pozo era la misma, produjimos una proteína de fusión del C-terminal de Orai1 unida a la proteína roja fluorescente DsRed (Orai1-COOH-DsRed), usando esta construcción podíamos simultáneamente determinar la cantidad de Orai1-COOH depositada en cada pozo del microarreglo (usando el canal de fluorescencia rojo) y la unión de los 6 dominios de ANK fusionados a GFP (usando el canal de fluorescencia verde). Tal como esperábamos, observamos resultados similares a la co-IP, Orai1-COOH-DsRed interactuó con los primeros 4 dominios de anquirina de TRPV1, pero con una interacción más fuerte con ANK1 (Fig. 19c). Debajo de las tiras del microarreglo de los seis dominios de anquirina se muestran ejemplos del Orai1-COOH-DsRed depositado en cada condición (Fig. 19c, panel inferior).

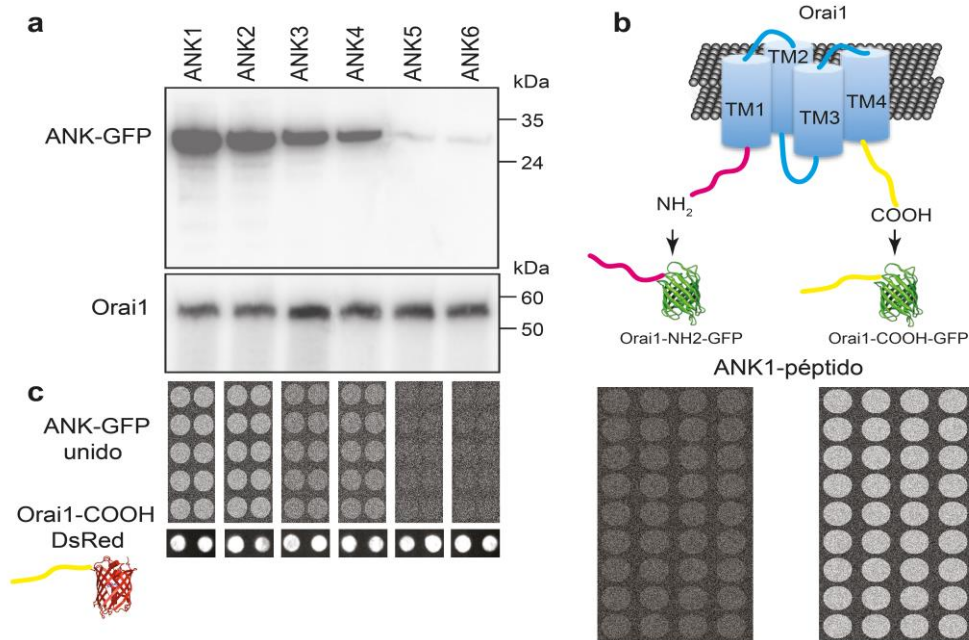


Figura 19. El primer dominio anquirina de TRPV1 se asocia al C-terminal de Orai1 para favorecer la agrupación de TRPV1-Orai1.

a. Análisis de co-inmunoprecipitación de células expresando c-myc-Orai1 y los 6 dominios anquirina unidos a GFP (ANK1-ANK6). **b.** Esquema que muestra la fusión de los N y C-terminales de Orai1 a GFP. El panel inferior muestra los resultados de los microarreglos de péptidos usando ANK1 como señuelo. Únicamente el C-terminal de Orai1 fue capturado por el dominio anquirina-1 **c.** Microarreglo de péptidos usando los 6 dominios anquirina individualmente fusionados a GFP. Se usó como cebo a Orai1 C-terminal. Nótese que el C-terminal de Orai1 retuvo a los primeros dos dominios de anquirina, de manera menos eficiente a ANK3 y ANK4 y no retuvo a ANK5 y ANK6.

Para explorar el papel de los dominios de anquirina de la proteína TRPV1 completa, produjimos deleciones individuales de los primeros tres dominios, desafortunadamente, solo la deleción del primer dominio produjo canales que alcanzaron la MP, la deleción de más allá del primer dominio de anquirina resultó en canales que se retuvieron en los compartimentos intracelulares. A pesar de esto, se logró estudiar el papel del primer dominio de anquirina de TRPV1 en la CDI de Orai1 usando la mutante TRPV1- Δ ANK1 que carece del primer dominio de anquirina.

Nuestro análisis de imágenes de super-resolución mostró que la distancia relativa entre TRPV1- Δ ANK1 y Orai1 es mayor que la distancia entre TRPV1 tipo silvestre (TRPV1-WT) y Orai1 (Fig. 20a-c). De manera muy interesante, OG3 solo detectó de manera parcial los cambios en la concentración de Ca^{2+} cuando TRPV1- Δ ANK1 era activado con capsaicina en comparación con TRPV1-WT (Fig. 20d).

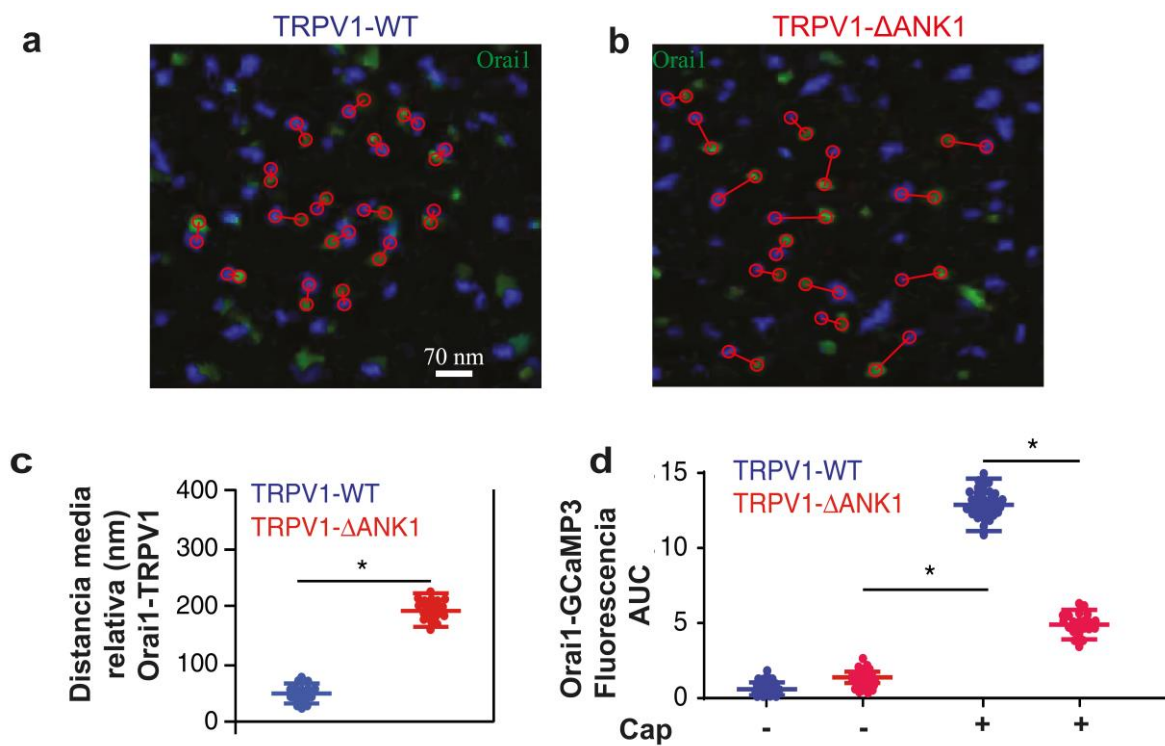


Figura 20. La deleción del dominio ANK1 aumenta la distancia entre Orai1 y TRPV1. **a.** Imágenes de microscopía de super-resolución de células expresando TRPV1 tipo silvestre (TRPV1-WT, azul) más Orai1 (verde) o TRPV1- Δ ANK1 (panel derecho, **b**). Los círculos rojos muestran las distancia entre los pares de canales mas cercanos y la linea conecta los pares. **c.** Distancia media relativa obtenida de cientos de canales individuales de Orai1 con TRPV1-WT (azul) o TRPV1- Δ ANK1 (rojo). Los datos muestran la media \pm la desviación estándar. **d.** Los incrementos de la fluorescencia reportados por el sensor Orai1-GCaMP3 con o sin la estimulación de capsaicina. Nótese que la fluorescencia Orai1-GCaMP3 incrementa solo la mitad después de la aplicación de la capsaicina en células que expresan TRPV1- Δ ANK1 en comparación a células estimuladas con capsaicina y que expresan TRPV1-WT. Esto indica que la deleción del primer dominio de anquirina de TRPV1 resultó en el alejamiento de TRPV1 y Orai1-GCaMP3, por lo que este reporta menos del calcio que entra por el canal TRPV1. * $p < 0.01$. La significancia estadística fue de $p < 0.05$. La estadística fue realizada con una ANOVA con prueba de Tukey *post-hoc*.

La activación de TRPV1 y TRPV1- Δ ANK1 con capsaicina resultó en un incremento robusto en el calcio intracelular reportado por R-GECO que se encuentra soluble en el citosol (Fig. 21a). Con esto descartamos la posibilidad de que la reducción del Ca^{2+} detectado por OG3 que entra por TRPV1- Δ ANK1 (Fig. 20d) sea el resultado de una reducción del calcio que entra por TRPV1 debido a la delección del dominio ANK1.

La activación de TRPV1- Δ ANK1 usando nuestro protocolo de patch-clamp de activación secuencial mostró una reducción en la CDI del canal Orai1 (Fig. 21b, flechas verdes) comparada a la fuerte CDI producida por el Ca^{2+} de TRPV1-WT en Orai1 (Fig. 14a).

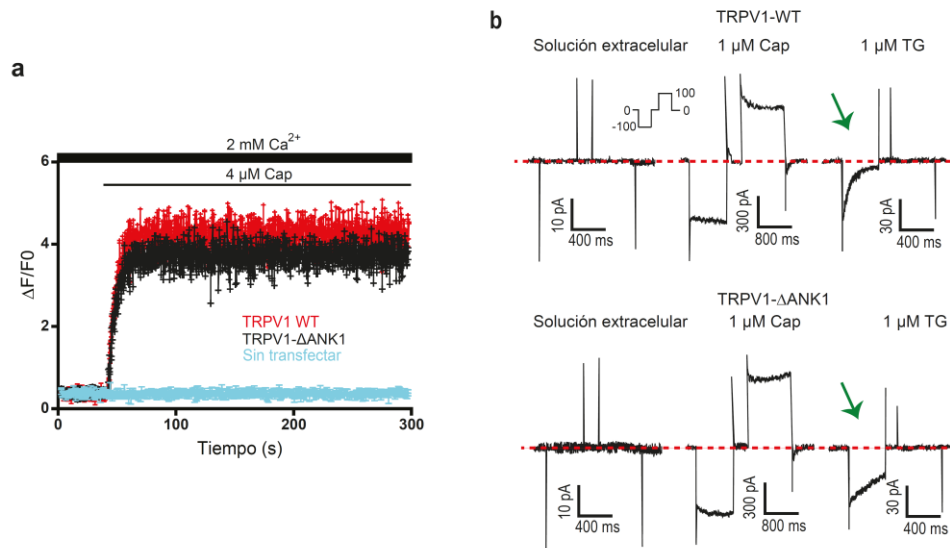


Figura 21. La delección de ANK1 no afecta la entrada de Ca^{2+} por TRPV1 y disminuye su efecto sobre la CDI de Orai1. **a.** Mediciones de Ca^{2+} usando el sensor de Ca^{2+} citosólico R-GECO en células HEK-293 transfectadas con TRPV1-WT (trazos rojos) o TRPV1- Δ ANK1 (trazos negros) y R-GECO. Las células sin tranfectar no respondieron a capsaicina (trazos color cyan). Nótese que no hubo cambios significativos en las entradas de calcio de TRPV1-WT y TRPV1- Δ ANK1. En todos los casos los datos muestran la media \pm la desviación estándar de al menos 5 transfecciones independientes. **b.** Medición de corrientes con patch perforado usando el protocolo secuencial de pre-estimulación con capsaicina usado en la figura 12 en células transfectadas con Orai1 y TRPV1- Δ ANK1 o TRPV1-WT. Nótese la reducción en el efecto sobre la CDI de Orai1 (flechas verdes) de TRPV1- Δ ANK1.

6.7. La CDI de Orai1 inducida por la activación de TRPV1 modula la migración celular de astrocitos corticales.

Para facilitar el estudio de las interacciones entre TRPV1 y Orai1, y para la identificación de los dominios proteicos involucrados en esta asociación, llevamos a cabo todos los experimentos descritos hasta este punto en células HEK-293. Sin embargo, con el objetivo de evaluar el efecto de la CDI inducida por TRPV1 en los canales Orai1 en un modelo fisiológico, implementamos un ensayo de cicatrización de la herida (SWA) usando un cultivo primario de astrocitos corticales. Previamente nuestro laboratorio demostró que la entrada de Ca^{2+} activada por trombina (Thr) es principalmente compuesta por los canales Orai1¹⁰⁵. Además, como previamente se mencionó, se ha demostrado que la trombina tiene un papel relevante en la migración y curación de heridas en astrocitos^{115,148–150}.

Para llevar a cabo los experimentos de SWA primero validamos que nuestro sensor Orai1-GCaMP3 se comportara en los astrocitos de manera similar a lo observado en HEK-293. En efecto, los cultivos primarios de astrocitos que expresaban nuestro sensor respondían a la estimulación de TRPV1 con capsaicina, pero no a la activación de los receptores purinérgicos P2X₄ activados con CTP (Fig. 22). También, como esperábamos, los astrocitos respondieron de manera normal a CTP con un incremento robusto al medir el Ca²⁺ intracelular con el indicador de Ca²⁺ citosólico R-GECO (Fig. 22a, trazo magenta). OG3 también detectó los incrementos de calcio inducidos por TG. Todos estos resultados recapitulan lo observado en las células HEK-293 (Fig. 11).

Utilizando nuestro protocolo de patch-clamp secuencial, observamos que la capsaicina induce una robusta CDI de Orai1 en astrocitos corticales pero que la estimulación con CTP no induce CDI (Fig. 22b). Además observamos que el uso de BAPTA hizo que se perdiera el efecto del Ca²⁺ proveniente de TRPV1 en la CDI de Orai1 (Fig. 22c). Finalmente, observamos también que la transfección del primer dominio de anquirina (ANK1-GFP) en los astrocitos reduce la potencia de la CDI obtenida con la pre-estimulación con capsaicina (Fig. 22d).

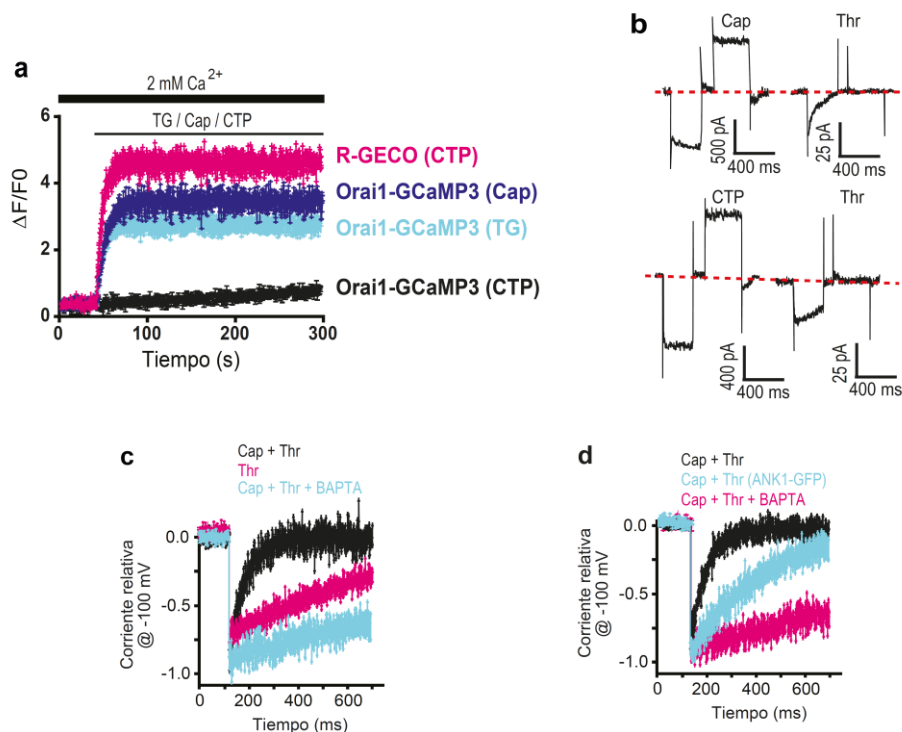


Figura 22. El Ca²⁺ que entra por TRPV1 induce CDI en Orai1 en astrocitos corticales. a. Mediciones de Ca²⁺ obtenidas en cultivos primarios de astrocitos corticales transfectados con Orai1-GCaMP3. TRPV1 y P2X₄ endógenos fueron usados. OG3 detecta los incrementos de Ca²⁺ evocados por capsaicina (500 nM, azul) y taspigargina (1 μM, cian), pero no por CTP (negro). CTP estimuló incrementos de Ca²⁺ en el citosol que fueron reportados por R-GECO (magenta). Los datos muestran la media ± la desviación estándar de al menos 10 mediciones independientes obtenidas de 5 cultivos diferentes. b. La estimulación con capsaicina (500 nM) antes de la activación de Orai1 con trombina indujo una potente CDI. La estimulación con CTP indujo fuertes corrientes de P2X₄, sin embargo no tuvo efecto en la CDI de Orai1 (activada por trombina). c. Medición de corrientes con patch perforado evocadas por una rampa de voltaje desde 0 a -100 mV en respuesta a capsaicina seguida por trombina (trazos negros), trombina solamente (trazos magenta) y capsaicina más trombina en células incubadas con BAPTA-AM (cian). La incubación con BAPTA reduce enormemente la CDI en células estimuladas con capsaicina más trombina. La capsaicina fue incubada por tres minutos y después

las células fueron lavadas con PBS fresco por tres minutos antes de la estimulación con trombina. **d.** Medición de corrientes con patch perforado evocadas por una rampa de voltaje desde 0 a -100 mV en respuesta a capsaicina más trombina en astrocitos usando el TRPV1 endógeno (trazos negros), astrocitos expresando el dominio ANK1-GFP (trazos cian) y células incubadas con BAPTA-AM (trazos magenta). Nótese que la transfección con ANK1-GFP disminuyó el efecto del calcio entrante por TRPV1 en la CDI de Orai1.

Usando el modelo de SWA, encontramos que el Orai1 endógeno participa en la migración celular y curación de la herida inducida por trombina de los astrocitos corticales, esto es corroborado con la transfección de los astrocitos con un siRNA para Orai1, el cual previno los efectos de la trombina en la cicatrización de la herida (Fig. 23c).

La estimulación con capsaicina antes de la activación de Orai1 con trombina reduce significativamente la cicatrización de la herida (Fig. 23a, b trazo negro), este efecto no fue observado con el antagonista sintético de la capsaicina, capsazepina (Fig. 23c, trazo cian). Observamos también que la expresión de ANK1-GFP en los astrocitos corticales previene parcialmente el efecto de la capsaicina en la cicatrización de la herida (Fig. 23a, b, trazo azul).

Todos estos resultados sugieren fuertemente que la activación de canales TRPV1 endógenos en los astrocitos corticales modula la actividad de los canales Orai1 endógenos induciendo su CDI y por lo tanto reduciendo la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales. La CDI de Orai1 potenciada reduce la migración celular y la cicatrización de la herida en astrocitos.

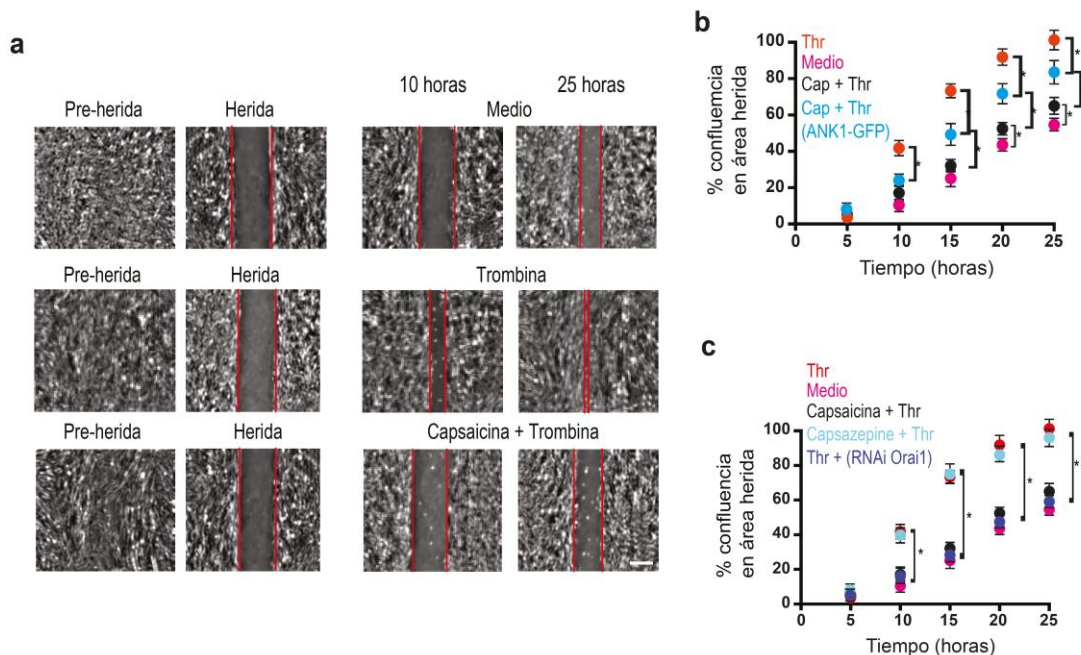


Figura 23. La inducción de la CDI de Orai1 por TPV1 modula la cicatrización de la herida en astrocitos. **a.** Ensayo de la cicatrización de la herida en astrocitos corticales. Imágenes representativas de los cultivos celulares alrededor del área donde se efectuó la herida son mostradas por 10 y 25 horas después de la realización de la herida. La etiqueta medio representa células que fueron mantenidas en DMEM. Trombina indica células tratadas con trombina (5 U mL^{-1}) por tres minutos. Los cultivos celulares fueron expuestos a capsaicina (500 nM) por tres minutos y después fueron incubados con trombina (5 U mL^{-1}) por tres minutos. **b.** Porcentaje de confluencia en el área de cicatrización bajo las diferentes condiciones usadas en **a.** Las células también fueron transfectadas con ANK1-GFP (puntos azules) **c.** Porcentaje de confluencia celular de controles usados en estos experimentos. Nótese que el antagonista de capsaicina (capsazepina) no tuvo efecto en la cicatrización de la herida inducida por trombina. Los astrocitos transfectados con un siRNA para Orai1 previnieron el efecto de la cicatrización de la herida inducida por trombina. Los datos en **b** y **c** muestran la media \pm la desviación estándar de al menos 6 células de 3 diferentes transfecciones. * muestra valores de $p < 0.01$. La significancia estadística es de $p < 0.05$ de acuerdo con ANOVA.

7. DISCUSIÓN

La inactivación dependiente de Ca^{2+} es un proceso de retroalimentación negativa que previene la entrada excesiva del calcio por medio de los canales Orai1, lo que evita efectos citotóxicos en la célula. La CDI de Orai1 es un regulador clave y una de las características más importantes de la SOCE. Comparando el conocimiento que se tiene de la activación de esta entrada de calcio con el conocimiento que se tiene de los mecanismos inherentes a la CDI, estos últimos mecanismos son mucho menos conocidos y permanecen aún poco claros.

En nuestro estudio, hemos identificado los determinantes moleculares de la asociación entre los canales Orai1 y TRPV1, esta asociación favorece la inactivación dependiente de Ca^{2+} de Orai1 por el Ca^{2+} que entra a través de los canales TRPV1. Mediante el uso de estudios de microscopía de super-resolución en células vivas, fuimos capaces de observar que ambos canales se mueven asociados en la MP, esta interacción física resulta clave para la modulación fisiológica de la actividad del canal, ya que TRPV1 contribuye a la CDI de Orai1. Este comportamiento no fue observado con otro canal que no está asociado a Orai1, el receptor purinérgico P2X₄, aun cuando la activación del canal resultó en un incremento robusto en el calcio citosólico lo cual fue reportado por nuestro sensor que estaba soluble en el citosol, R-GECO (Figs. 11 y 12).

Hasta ahora la CDI había sido estudiada usando mediciones electrofisiológicas de corriente de célula completa causadas por los canales Orai1^{51,151,152}. Para inducir la CDI bajo estas circunstancias, las condiciones de calcio extracelular e intracelular son controladas artificialmente. Hasta donde hemos podido investigar, este es el primer reporte donde se muestra que una fuente fisiológica de Ca^{2+} distinta al propio canal (la activación de los canales TRPV1) puede inducir CDI en Orai1 tanto en un sistema de expresión heteróloga (células HEK-293) como en células que expresan naturalmente estos canales (astrocitos corticales).

Mostramos que la inducción de la inactivación dependiente de calcio de Orai1 es el resultado de la estrecha cercanía entre los canales Orai1 y TRPV1 en la membrana plasmática, fenómeno que no fue observado con la activación de un canal diferente que no se encuentra cerca de Orai1 (P2X₄). Estas observaciones son apoyadas por nuestros estudios de super-resolución, donde se observa que los canales Orai1 y TRPV1 se mueven cerca uno del otro, pero esto no se observa con los canales Orai1 y P2X₄. El uso de nuestro sensor de calcio local Orai1-GCaMP3 en los estudios de super-resolución nos permitió detectar incrementos de Ca^{2+} en canales Orai1 individuales cuando se activan los canales TRPV1 mientras están difundidos libremente en la MP. Nuestro sensor OG3 no detectó los incrementos en la concentración de calcio después de la activación de P2X₄. Estos resultados indican que Orai1 y TRPV1 se mueven cerca uno del otro, manteniendo un microambiente donde el Ca^{2+} que entra por medio de TRPV1 se acumula cerca de Orai1 y esto promueve la inactivación dependiente de Ca^{2+} de Orai1. El uso de fusiones entre Orai1 y un GECI también ha sido usado por otro grupo de investigación que demostró que estas fusiones (Orai1-GECO, Orai1-GCaMP6) reportan de manera selectiva y directa la actividad del canal Orai1¹⁵³. Otros canales de calcio también han sido estudiados con una aproximación similar, por ejemplo los canales P2X₂¹⁵⁴, Ca_v2.2¹⁵⁵,

TRPC4¹⁵⁶ y TRPV4¹⁵⁷, donde en cada uno de estos trabajos se demostró que este tipo de construcciones son capaces de medir nanodominios de calcio cerca del poro de cada uno de estos canales, lo cual podría apoyar la idea de que Orai1 y TRPV1 están formando un nanodominio.

Los análisis de super-resolución mostraron una distancia al menos 4 veces mayor entre P2X₄ y Orai1 comparada con la distancia entre TRPV1 y Orai1 (Fig. 16c). La distancia promedio entre los canales TRPV1 y Orai1 obtenida de los experimentos de super-resolución fue alrededor de ~60 nm. Esta distancia contrasta con lo que observamos con nuestros estudios de FRET, ya que las distancias que son determinadas típicamente con esta técnica son debajo de 10 nm. La discrepancia entre estos dos resultados puede ser explicada por los límites de resolución que se pueden lograr por ambos métodos. Mientras el FRET detecta distancias entre proteínas menores a 10 nm (100 Å), nuestro método de super-resolución, aun cuando sobrepasa los límites de difracción de la luz, está aún lejos de la resolución del FRET. Por ejemplo, se ha observado que en el STED (stimulated emission depletion), otra técnica de super-resolución, la resolución de las imágenes que se logran cuando se usan tinciones orgánicas es de 20 nm, pero que cuando se usan proteínas fluorescentes es de 50-70 nm¹⁵⁸. Otra explicación es que una distancia de separación mayor de 10 nm no puede ser medida por FRET, pero esta ausencia de la señal de FRET no puede ser interpretada como la ausencia de interacción molecular¹⁵⁹. Por esta razón se realizó un abordaje bioquímico para corroborar lo encontrado a través de estas técnicas de microscopía.

La asociación entre los canales Orai1 y TRPV1 también fue evaluada con estudios de CoIP, aunque todos los estudios de CoIP obtenidos durante este trabajo están en concordancia con los resultados de super-resolución y FRET, observamos y resaltamos que el peso molecular obtenido de Orai1 (~50 kDa) difiere del peso molecular predicho de esta proteína (~33 kDa), por lo que debemos tomar estos estudios con precaución, aunque también debemos aclarar que hay muchos otros reportes que han mostrado discrepancias similares en el peso molecular de Orai1¹⁶⁰⁻¹⁶⁷. La explicación dada para este peso molecular observado es que esto se debe a modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación, la fosforilación o alguna de otro tipo^{32,164,168,169}.

Identificamos en este estudio que el primer dominio de anquirina de TRPV1 funciona como una estructura responsable para la asociación de TRPV1 con el C-terminal de Orai1. La delección de este dominio de anquirina (TRPV1-ΔANK1) disminuye el efecto en la CDI de Orai1 mediada por el Ca²⁺ entrante por TRPV1 (Fig. 21b); y los canales Orai1-GCaMP3 unitarios no detectaron el Ca²⁺ que entra por medio de TRPV1-ΔANK1 (Fig. 20d). Estos resultados resaltan la importancia de ANK1 para la asociación de TRPV1 con Orai1. Esta interacción brinda apoyo a la formación de un complejo entre TRPV1 y Orai1, por lo que entonces este dominio ANK1 permite a los dos canales estar en cercanía.

La asociación entre estos dos canales favorece la generación de un microambiente de Ca²⁺ (nanodominio) cerca del poro del canal Orai1 cuando TRPV1 es activado, lo cual promueve la CDI de Orai1. La potente CDI observada en los canales Orai1 inducida por la activación de

los canales TRPV1 permanece aún después de que TRPV1 ya no se encuentra activo o que este está desensibilizado^{170,171} (Fig. 14a, b). Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} que entra a través de TRPV1 dispara los pasos iniciales de la FCDI en los canales Orai1, pero un mecanismo sostenido mantiene la CDI aun cuando la entrada de Ca^{2+} a través de TRPV1 ya no se encuentra activa (por el lavado de la capsaicina). El mantenimiento continuo de la CDI puede ser explicado por el hecho de que la FCDI esta modulada tanto por las altas concentraciones de Ca^{2+} dentro del poro de Orai1 como por las por interacciones entre las proteínas que componen la SOCE. Por ejemplo, las interacciones entre Orai1 y STIM1 pueden ser moduladas por el cociente de expresión STIM1-Orai1^{35,55}, por la región de aminoácidos negativamente cargados en STIM1^{51,151,172}, por el bucle intracelular de Orai1⁴⁹, por una serie de aminoácidos de Orai1^{31,50}, por el amino terminal de Orai1^{53,54} y por el sitio de unión a calmodulina de Orai1³⁷. De manera interesante, un estudio reciente identificó al ácido benzóico 4-((5-phenyl-4-(trifluoromethyl)-thiazol-2-yl)amino) (IA65) como un potenciador de la actividad de Orai1, que ayuda a modular la CDI de Orai1, pero que no tiene efecto en Orai3; esta especificidad de IA65 se puede explicar debido a la importancia del N-terminal de Orai1 en la CDI, ya que esta región en Orai3 es más extensa y tiene algunas deleciones en comparación de Orai1¹⁷³, esto nos habla de la importancia de los sitios que interaccionan para producir la FCDI. Por ejemplo, otro estudio reciente demostró IDSTIM (el dominio de inactivación de STIM1) ayuda a mantener la inactivación manteniendo una conformación inactiva de STIM1¹⁷². También por otro lado se sabe que TRPV1 tiene un mecanismo de desensibilización dependiente de Ca^{2+} en la que está involucrada la calmodulina que se une al N-terminal de TRPV1¹⁷⁴, se sabe que la calmodulina también interacciona con Orai1³⁷, por lo que estas tres proteínas podrían estar en una proximidad tal que promovieran la regulación de ambos canales por la calmodulina. Otra posible explicación se da con un estudio donde se observó que la PKA fosforila de manera directa en la serina-34 de Orai1 para inducir la CDI¹⁵², por lo que es posible que la PKA sea reclutada en el nanodominio de Orai1-TRPV1 y fosforile a este último, promoviendo y manteniendo la CDI de Orai1.

Un estudio previo mostró hace ya 20 años que la capsaicina inhibe la activación de las células T (Jurkat) por el bloqueo de la SOCE¹⁷⁵. Otros estudios un poco más recientes también mostraron que la capsaicina o la activación de TRPV1 inhibe la SOCE¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Sin embargo, el mecanismo molecular para estas observaciones permanecía desconocido hasta ahora.

En este estudio, enfocamos nuestra atención en el papel del Ca^{2+} proveniente de un canal de Ca^{2+} distinto a Orai1 (TRPV1) en la inducción de CDI de este mismo canal, a este fenómeno lo denominamos aquí como inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} , como un opuesto a la inactivación homóloga dependiente de Ca^{2+} , la cual se induce por el Ca^{2+} que entra a través del poro del mismo canal. Identificamos al dominio anquirina-1 de TRPV1 y al carboxilo terminal de Orai1 como secuencias requeridas para la asociación entre estos dos canales. Sin embargo, no podemos descartar la participación de otras proteínas o aminoácidos como se mencionó previamente. Por lo que más estudios son necesarios para evaluar la participación de otras proteínas y/o aminoácidos de Orai1 y TRPV1 en la CDI de Orai1.

Muchas células y tejidos expresan tanto canales Orai1 como TRPV1^{178,180,181}, en particular como se describió previamente los astrocitos expresan ambos canales^{98,108,182}. En estas células,

la activación de TRPV1 podría modular la activación subsecuente (o concomitante) de los canales Orai1¹⁸³. En este trabajo demostramos que la activación con capsaicina de canales TRPV1 endógenos induce la CDI de los canales Orai1 endógenos de los astrocitos corticales (Fig. 19c). También mostramos que la modulación heteróloga de la FCDI de Orai1 por TRPV1 tiene un papel en el control de la migración de los astrocitos promovida por daño celular (Fig. 20). Como se explicó previamente, la migración es una de las funciones moduladas por la SOCE activada por trombina en astrocitos¹¹¹⁻¹¹⁵, pero por otro lado se sabe que la entrada de Ca^{2+} a través TRPV1 también puede mediar la migración celular de los astrocitos después de daño mecánico¹²⁶ y de la privación de glucosa y oxígeno¹⁸⁴, aunque el mecanismo por el cual se activan los canales TRPV1 no es claro aún, un par de las posibles explicaciones son, primero, que este tipo de canales se activan por estrés mecánico¹⁸⁵ (en el caso del daño celular) o por factores proinflamatorios como ocurre en la microglía¹⁸⁶. Se sabe que la entrada excesiva de Ca^{2+} en los astrocitos puede causar estrés del RE y la activación excesiva de este linaje celular convirtiéndose en astrocitos reactivos, lo que pueden llevar a la neurodegeneración por la liberación de especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno y de factores proinflamatorios¹⁸⁷. Por lo anterior, es posible que la activación de ambos canales no se pueda dar al mismo tiempo, a pesar de que los dos lleven a la migración celular. Es importante destacar que el Ca^{2+} es un importante modulador de la reorganización del citoesqueleto y la migración en múltiples tipos celulares, pero que la señalización de Ca^{2+} regula la migración en diferentes aspectos: la rotación de las adhesiones focales, las contracciones de fibras actina-miosina, la ondulación de la membrana plasmática y la formación de podosomas¹⁸⁸. Por lo que la forma en que se promueve la migración en astrocitos por parte de Orai1 y TRPV1 es distinta. En el caso de Orai1, reportes previos indican que se da por la rotación de las adhesiones focales a través de NFAT y la cinasa de adhesiones focales (FAK)¹⁸⁹⁻¹⁹¹. A pesar de que en TRPV1, el mecanismo aún no está muy claro, se ha observado que esto se podría dar por un aumento en la polimerización de G-actina a F-actina¹⁸⁴. También es importante señalar que en otros tipos celulares diversos estudios han mostrado efectos ambiguos en el efecto de la entrada de Ca^{2+} por TRPV1 en la migración celular¹⁹². Todo lo anterior sugiere que la inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} que propone este trabajo es un mecanismo que protege al astrocito de la entrada excesiva de Ca^{2+} y de sus efectos negativos.

Por otro lado, el nanodominio de Ca^{2+} entre Orai1 y TRPV1 detectado en este trabajo y el efecto funcional que tiene el Ca^{2+} de TRPV1 en la CDI de Orai1, puede ser apoyado por la existencia de otros nanodominios formados por dos canales o canales y proteínas sensoras de Ca^{2+} . En un estudio se demostró que la activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} ($\text{K}_{\text{Ca}2+}$: BK y SK2) son regulados por la entrada de Ca^{2+} que se da a través del canal $\text{Ca}_v2.1$ y que estos canales $\text{K}_{\text{Ca}2+}$ forman nanodominios con $\text{Ca}_v2.1$ ¹⁹³. Otro estudio mostró que los canales $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{KCa}3.1$, colocalizan y se asocian proporcionando un mecanismo de regulación dependiente de Ca^{2+} a nivel de nanodominio¹⁹⁴. En otra publicación se expuso un nanodominio formado por Orai1, AKAP79, calcineurina y NFAT, el cual permite una mejor comunicación entre Orai1 y calcineurina que a su vez permite la activación selectiva de NFAT¹⁹⁵. En el caso de los astrocitos un estudio demostró la existencia de un nanodominio

de Ca^{2+} , donde la activación de los canales aniónicos rectificadores salientes sensibles a volumen (VSOR) depende del Ca^{2+} que ingresa por los canales SOCE¹⁹⁶.

De manera interesante en una publicación reciente se encontró que en neuronas somatosensoriales periféricas existe un complejo formado por ANO1 (canal de Cl^- activado por Ca^{2+}), TRPV1 e $\text{IP}_3\text{R1}$, este estudio encontró que estas proteínas se encuentran a una gran cercanía, esto con el fin de asegurar que el Ca^{2+} entrante a través de TRPV1 proporcione suficiente concentración de Ca^{2+} para activar a $\text{PLC}\delta$, y que esta lleve a la activación de IP_3R , liberando Ca^{2+} de las reservas del RE para maximizar la activación de ANO1, lo que lleva a la salida de Cl^- y despolarización de la neurona¹⁹⁷. Es interesante que nuestro laboratorio demostró que IP_3R se encuentra directamente asociado a STIM1 en la punta¹⁹⁸, otros estudios apoyan esta asociación^{199,200}. Esto apuntala la idea de un complejo de proteínas que regulan la SOCE, donde TRPV1 podría tener también un papel destacado.

Todos los resultados aquí presentados proporcionan la primera evidencia (hasta donde tenemos conocimiento) que destaca el papel de la inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} en modular la entrada de Ca^{2+} de Orai1 y como esto modula la migración de astrocitos corticales, lo cual se resume en la figura 24.

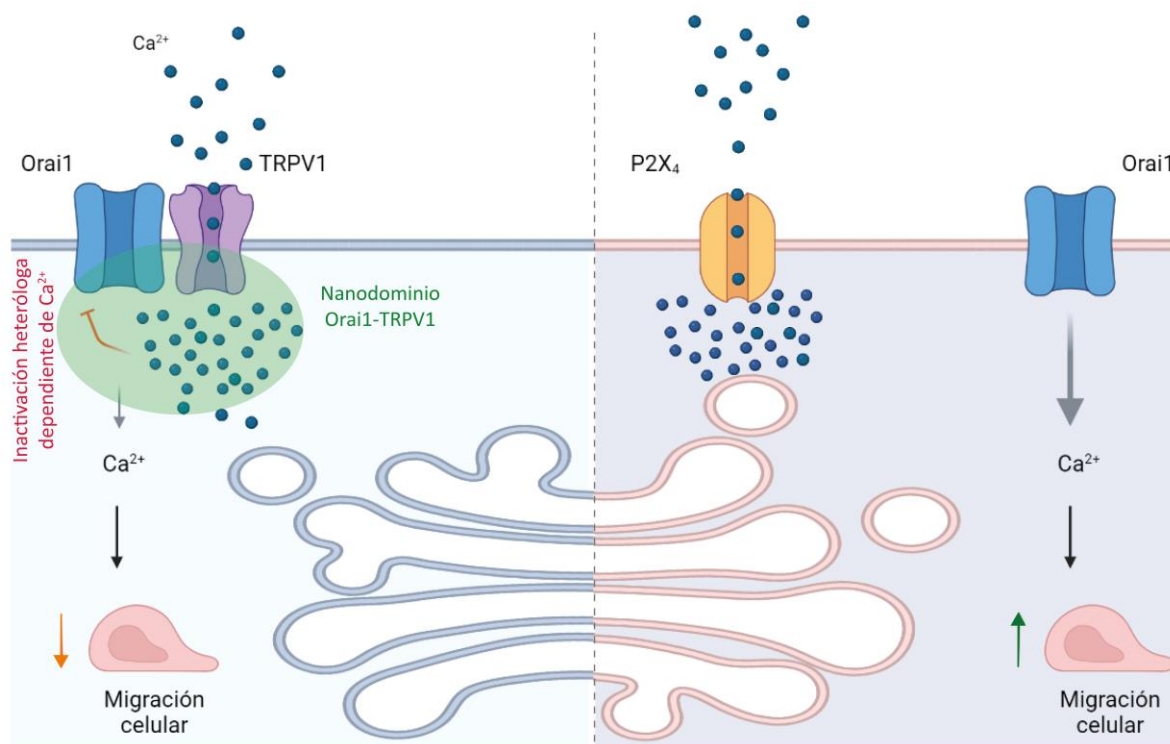


Figura 24. Mecanismo propuesto para el efecto de la inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} en la migración celular. Los canales TRPV1 y Orai1 forman un nanodominio de Ca^{2+} (elipse verde), este nanodominio facilita que el Ca^{2+} que entra a través de TRPV1 promueva la inactivación dependiente de Ca^{2+} de Orai1 (inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} , flecha con remate roja). La CDI de Orai1 promueve una disminución en la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1 lo que a su vez genera una disminución en la migración celular promovida por la SOCE (panel de la derecha, flecha naranja). En el panel de la izquierda se muestra un canal que no se encuentra dentro del nanodominio de Orai1 (P2X_4), por lo que no tiene efecto en la CDI de Orai1 y no afecta la migración celular promovida por la SOCE (flecha verde). Imagen creada con Biorender y editada con Adobe Illustrator.

8. CONCLUSIONES

- Los canales Orai1 y TRPV1 difunden en la membrana plasmática manteniendo una cercanía entre ellos de 60 nm, lo que permite formar un nanodominio. La entrada de Ca^{2+} a través del canal TRPV1 induce CDI en Orai1.
- Los canales Orai1 y P2X₄ mantienen una distancia entre ellos mayor a 300 nm. Esto impide que la entrada de Ca^{2+} a través de canales P2X₄ afecte al canal Orai1. Por ello no se induce CDI.
- El dominio de anquirina (ANK1) del canal TRPV1 se asocia al C-terminal de Orai1. Lo anterior permite mantener el nanodominio de Ca^{2+} entre ambos canales.
- La inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} de Orai1 inducida por TRPV1 modula la migración celular en astrocitos necesaria para la reparación intercelular.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar la construcción de un sensor de Ca^{2+} capaz de detectar el Ca^{2+} entrante a través del canal TRPV1 para observar cambios locales en el poro del Ca^{2+} TRPV1. Con esta herramienta recrear experimentos realizados en esta tesis.
- Determinar si la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1 puede producir la desensibilización de TRPV1.
- Determinar la vía de señalización responsable de la migración celular.
- Estudiar si la inactivación heteróloga dependiente de Ca^{2+} de Orai1 es capaz de modular otros mecanismos celulares como la proliferación, la liberación de gliotransmisores, o la activación de los astrocitos. En el caso de células del sistema inmune estudiar su participación en la activación de células T.
- Buscar otros canales que tengan este mecanismo de inactivación heterólogo de Ca^{2+} .

10. LITERATURA CITADA

1. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21 (2000).
2. Bootman, M. D. & Berridge, M. J. The Elemental Principles of Calcium Signaling Minireview. *Cell* **83**, 675–678 (1995).
3. Clapham, D. E. Calcium Signaling. *Cell* **131**, 1047–1058 (2007).
4. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Lipp, P. Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645–8 (1998).
5. Schwaller, B. The Regulation of a Cell's Ca²⁺ Signaling Toolkit: The Ca²⁺ Homeostasome. in *Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology* (ed. Islam, M. S.) vol. 740 1–25 (Springer Netherlands, 2012).
6. Bootman, M. D. & Bultynck, G. Fundamentals of cellular calcium signaling: A primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **12**, (2020).
7. Berridge, M. J. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* **40**, 405–12 (2006).
8. Laude, A. J. & Simpson, A. W. M. Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling. *FEBS J.* **276**, 1800–16 (2009).
9. Parekh, A. B. Ca²⁺ microdomains near plasma membrane Ca²⁺ channels: impact on cell function. *J. Physiol.* **586**, 3043–3054 (2008).
10. Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S. P. & Jonas, P. Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 7–21 (2012).
11. Demuro, A. & Parker, I. Imaging single-channel calcium microdomains. *Cell Calcium* **40**, 413–422 (2006).
12. Tay, L. H. *et al.* Nanodomain Ca²⁺ of Ca²⁺ channels detected by a tethered genetically encoded Ca²⁺ sensor. *Nat. Commun.* **3**, 778 (2012).
13. Neher, E. Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 389–399 (1998).
14. Arai, I. & Jonas, P. Nanodomain coupling explains Ca²⁺ independence of transmitter release time course at a fast central synapse. *Elife* **3**, 1–13 (2014).
15. Shang, W. *et al.* Imaging Ca²⁺ Nanosparks in Heart With a New Targeted Biosensor. *Circ. Res.* **114**, 412–420 (2014).
16. Rutter, G. A., Tsuboi, T. & Ravier, M. A. Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium* **40**, 539–551 (2006).
17. Tadross, M. R., Tsien, R. W. & Yue, D. T. Ca²⁺ channel nanodomains boost local Ca²⁺ amplitude. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15794–15799 (2013).
18. Akita, T., Fedorovich, S. V & Okada, Y. Cellular Physiology and Biochemistry

Biochemistry Ca²⁺ + Nanodomain-Mediated Component of Swelling-Induced Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Current Triggered by Autocrine Action of ATP in Mouse Astrocytes. **8585**, (2011).

19. Akita, T., Fedorovich, S. V. & Okada, Y. Ca²⁺ nanodomain-mediated component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying anion current triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 1181–1190 (2011).
20. Wolf, I. M. A., Guse, A. H. & Guse, A. H. Ca²⁺ Microdomains in T-lymphocytes. *Front. Oncol.* **7**, 1–11 (2017).
21. Katona, D., Rajki, A., Di, G., Pozzan, T. & Spät, A. Calcium-dependent mitochondrial cAMP production enhances aldosterone secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* **412**, 196–204 (2015).
22. Berridge, M. J. Module 3: Ion Channels. *Cell Signal. Biol.* **6**, csb0001003 (2014).
23. Mori, M. X. *et al.* Dynamics of receptor-operated Ca²⁺ currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P₂-PLC signaling pathway. *Front. Pharmacol.* **6**, 2–6 (2015).
24. Garaschuk, O. & Griesbeck, O. Calcium Measurement Methods. **43**, 101–117 (2010).
25. *Calcium Signaling*. (Springer Dordrecht, 2012). doi:10.1007/978-94-007-2888-2.
26. Putney, J. W. Alternative Forms of the Store-Operated Calcium Entry Mediators , STIM1 and Orai1. in *CRAC or ORAI Channels* vol. 71 109–123 (Elsevier Inc., 2013).
27. Lopez, J. J. *et al.* Molecular modulators of store-operated calcium entry. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 2037–2043 (2016).
28. Cahalan, M. D. STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nat. Cell Biol.* **11**, 669–677 (2009).
29. Shim, A. H., Tirado-lee, L. & Prakriya, M. Structural and Functional Mechanisms of CRAC Channel Regulation. *J. Mol. Biol.* **427**, 77–93 (2015).
30. Feske, S. *et al.* A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179–85 (2006).
31. Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M. & Long, S. B. Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai. *Science (80-)*. **338**, 1308–1313 (2012).
32. Penna, A. *et al.* The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**, 116–20 (2008).
33. Chen, L. & Xu, T. On the Stoichiometry of Resting and Activated CRAC Channels. in *Current Topics in Membranes* vol. 71 95–108 (Elsevier Inc., 2013).
34. Zhou, Y., Ramachandran, S., Oh-Hora, M., Rao, A. & Hogan, P. G. Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4896–901 (2010).
35. Scrimgeour, N. R., Wilson, D. P., Barritt, G. J. & Rychkov, G. Y. Structural and

- stoichiometric determinants of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channel Ca²⁺-dependent inactivation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 1281–1287 (2014).
36. Amcheslavsky, A. *et al.* Molecular biophysics of Orai store-operated Ca²⁺ channels. *Biophys. J.* **108**, 237–246 (2015).
 37. Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E. & Lewis, R. S. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15495–500 (2009).
 38. Tadross, M. R., Tsien, R. W. & Yue, D. T. Ca²⁺ channel nanodomains boost local Ca²⁺ amplitude. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 15794–15799 (2013).
 39. Dagan, I. & Palty, R. Regulation of store-operated Ca²⁺ entry by saraf. *Cells* **10**, (2021).
 40. Morad, M. & Soldatov, N. Calcium channel inactivation: Possible role in signal transduction and Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium* **38**, 223–231 (2005).
 41. Scrimgeour, N. R., Wilson, D. P. & Rychkov, G. Y. Glu¹⁰⁶ in the Orai1 pore contributes to fast Ca²⁺-dependent inactivation and pH dependence of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) current. *Biochem. J.* **441**, 743–753 (2012).
 42. Zweifach, A. & Lewis, R. S. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* **105**, 209–226 (1995).
 43. Fierro, L. & Parekh, A. B. Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (CRAC) in RBL-1 cells. *J. Membr. Biol.* **168**, 9–17 (1999).
 44. Jardín, I. *et al.* Fine-tuning of store-operated calcium entry by fast and slow Ca²⁺-dependent inactivation: Involvement of SARAF. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1865**, 463–469 (2018).
 45. Zweifach, A. & Lewis, R. S. Slow Calcium-dependent Inactivation of Depletion-activated Calcium Current. STORE-DEPENDENT AND -INDEPENDENT MECHANISMS. *J. Biol. Chem.* **270**, 14445–14451 (1995).
 46. Zhang, S. L. *et al.* Mutations in Orai1 transmembrane segment 1 cause STIM1-independent activation of Orai1 channels at glycine 98 and channel closure at arginine 91. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17838–43 (2011).
 47. Montalvo, G. B., Artalejo, A. R. & Gilibert, J. A. ATP from subplasmalemmal mitochondria controls Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *J. Biol. Chem.* **281**, 35616–35623 (2006).
 48. Parekh, A. B. Regulation of CRAC channels by Ca²⁺-dependent inactivation. *Cell Calcium* **63**, 20–23 (2017).
 49. Srikanth, S., Jung, H. J., Ribalet, B. & Gwack, Y. The intracellular loop of Orai1 plays a central role in fast inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **285**, 5066–5075 (2010).
 50. Liu, Y. *et al.* Crystal structure of calmodulin binding domain of Orai1 in complex

- with Ca²⁺·calmodulin displays a unique binding mode. *J. Biol. Chem.* **287**, 43030–43041 (2012).
51. Mullins, F. M., Yen, M. & Lewis, R. S. Orai1 pore residues control CRAC channel inactivation independently of calmodulin. *J. Gen. Physiol.* **147**, 137–152 (2016).
 52. Li, X. *et al.* Calmodulin dissociates the STIM1-Orai1 complex and STIM1 oligomers. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 53. Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, a. & Putney, J. W. Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J. Cell Sci.* (2012) doi:10.1242/jcs.104919.
 54. Desai, P. N. *et al.* Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message. *Sci. Signal.* **8**, 1–11 (2015).
 55. Scrimgeour, N., Litjens, T., Ma, L., Barritt, G. J. & Rychkov, G. Y. Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins. *J. Physiol.* **587**, 2903–2918 (2009).
 56. Krizova, A., Maltan, L. & Derler, I. Critical parameters maintaining authentic CRAC channel hallmarks. *Eur. Biophys. J.* **48**, 425–445 (2019).
 57. Gilabert, J. A. & Parekh, A. B. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca²⁺ current I(CRAC). *EMBO J.* **19**, 6401–6407 (2000).
 58. Akerboom, J. *et al.* Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J. Neurosci.* **32**, 13819–40 (2012).
 59. Tian, L., Hires, S. A. & Looger, L. L. Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2012**, 647–56 (2012).
 60. Navas-Navarro, P. *et al.* GFP-Aequorin Protein Sensor for Ex Vivo and In Vivo Resource GFP-Aequorin Protein Sensor for Ex Vivo and In Vivo Imaging. *Cell Chem. Biol.* **23**, 738–745 (2016).
 61. Rose, T., Goltstein, P. M., Portugues, R. & Griesbeck, O. Putting a finishing touch on GECIs. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 1–15 (2014).
 62. Podor, B. *et al.* Comparison of genetically encoded calcium indicators for monitoring action potentials in mammalian brain by two-photon excitation fluorescence microscopy. *Neurophotonics* **2**, 021014 (2015).
 63. Gee, J. M. *et al.* Imaging activity in astrocytes and neurons with genetically encoded calcium indicators following in utero electroporation. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 10 (2015).
 64. Yamada, Y. & Mikoshiba, K. Quantitative comparison of novel GCaMP-type genetically encoded Ca(2+) indicators in mammalian neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **6**, 41 (2012).
 65. Ohkura, M., Sasaki, T., Kobayashi, C., Ikegaya, Y. & Nakai, J. An improved genetically encoded red fluorescent Ca²⁺ indicator for detecting optically evoked

- action potentials. *PLoS One* **7**, e39933 (2012).
66. Shigetomi, E., Kracun, S. & Khakh, B. S. Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol.* **6**, 183–91 (2010).
 67. Zhao, Y. *et al.* An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science* **333**, 1888–91 (2011).
 68. Bastian, C., Sampieri, A., Benavides, M. O., Guerrero, A. & Vaca, L. Super-resolution microscopy for the study of store-operated calcium entry. *Cell Calcium* **104**, (2022).
 69. Vangindertael, J. *et al.* An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist. *Methods Appl. Fluoresc.* **6**, (2018).
 70. Jacquemet, G., Carisey, A. F., Hamidi, H., Henriques, R. & Leterrier, C. The cell biologist's guide to super-resolution microscopy. *J. Cell Sci.* **133**, (2020).
 71. Wang, X. *et al.* Super-resolution microscopy and its applications in neuroscience. *J. Innov. Opt. Health Sci.* **10**, 1–11 (2017).
 72. Sahl, S. J. & Moerner, W. E. Super-resolution fluorescence imaging with single molecules. *Current Opinion in Structural Biology* vol. 23 778–787 (2013).
 73. Sauer, M. & Heilemann, M. Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes. *Chemical Reviews* vol. 117 7478–7509 (2017).
 74. Deb, B. K., Pathak, T. & Hasan, G. Store-independent modulation of Ca²⁺ entry through Orai by Septin 7. *Nat. Commun.* **7**, 11751 (2016).
 75. Deb, B. K., Chakraborty, P., Gopurappilly, R. & Hasan, G. SEPT7 regulates Ca²⁺ entry through Orai channels in human neural progenitor cells and neurons. *Cell Calcium* **90**, 102252 (2020).
 76. Pavez, M. *et al.* STIM1 is required for remodeling of the endoplasmic reticulum and microtubule cytoskeleton in steering growth cones. *J. Neurosci.* **39**, 5095–5114 (2019).
 77. Huang, Y., Hsu, Y., Chen, Y. & Shen, M. Super-Resolution Microscopy Reveals That Stromal Interaction Molecule 1 Trafficking Depends on Microtubule Dynamics. *Front. Physiol.* **12**, 1–14 (2021).
 78. Hoge A, Shah S, Jones F, Carver CM, Hao H, Liang C, Huang D, Du X, G. N. Junctophilin-4 facilitates inflammatory signalling at plasma membrane-endoplasmic reticulum junctions in sensory neurons. *J. Physiol.* **599**, (2021).
 79. Volz, J. *et al.* BIN2 orchestrates platelet calcium signaling in thrombosis and thrombo-inflammation. *J. Clin. Investig.* **130**, 6064–6079 (2020).
 80. Zhou, Y. *et al.* Cross-linking of Orai1 channels by STIM proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E3398–E3407 (2018).
 81. Chanaday, N. L. *et al.* Presynaptic store-operated Ca²⁺ entry drives excitatory

- spontaneous neurotransmission and augments endoplasmic reticulum stress II
 Article Presynaptic store-operated Ca²⁺ entry drives excitatory spontaneous neurotransmission and augments endoplasmic re. *Neuron* **109**, 1314–1332 (2021).
82. Hertel, F., Mo, G. C. H., Duwé, S., Dedecker, P. & Zhang, J. RefSOFI for Mapping Nanoscale Organization of Protein-Protein Interactions in Living Cells. *Cell Rep.* **14**, 390–400 (2016).
 83. Moreno, C. Papel de las proteínas Stim1 y Orai1 en la respuesta de los astrocitos a la trombina. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2012).
 84. Schiweck, J., Eickholt, B. J. & Murk, K. Important shapeshifter: Mechanisms allowing astrocytes to respond to the changing nervous system during development, injury and disease. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 1–17 (2018).
 85. Okada, T. & Suzuki, H. The Role of Tenascin-C in Tissue Injury and Repair After Stroke. *Front. Immunol.* **11**, 1–14 (2021).
 86. Baldwin, K. T. & Eroglu, C. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **45**, 113–120 (2017).
 87. Potokar, M., Jorgačevski, J. & Zorec, R. Astrocyte aquaporin dynamics in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–18 (2016).
 88. Theparambil, S. M. *et al.* Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle. *Nat. Commun.* **11**, 1–15 (2020).
 89. Gao, X. *et al.* STIMs and Orai1 regulate cytokine production in spinal astrocytes. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–13 (2016).
 90. Shibasaki, K., Hosoi, N., Kaneko, R., Tominaga, M. & Yamada, K. Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1. *J. Neurochem.* **140**, 395–403 (2017).
 91. Descalzi, G., Gao, V., Steinman, M. Q., Suzuki, A. & Alberini, C. M. Lactate from astrocytes fuels learning-induced mRNA translation in excitatory and inhibitory neurons. *Commun. Biol.* **2**, (2019).
 92. Carlsen, E. M. & Perrier, J.-F. Purines released from astrocytes inhibit excitatory synaptic transmission in the ventral horn of the spinal cord. *Front. Neural Circuits* **8**, 1–11 (2014).
 93. Alberini, C. M., Cruz, E., Descalzi, G., Bessières, B. & Gao, V. Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. *Glia* **66**, 1244–1262 (2018).
 94. Stobart, J. L. L., Lu, L., Anderson, H. D. I., Mori, H. & Anderson, C. M. Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3149–3154 (2013).
 95. Allen, N. J. Astrocyte Regulation of Synaptic Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 439–463 (2014).
 96. Huda, R., Chang, Z., Do, J., Mccrimmon, D. R. & Martina, M. Activation of

- astrocytic PAR1 receptors in the rat nucleus of the solitary tract regulates breathing through modulation of presynaptic TRPV1. *J. Physiol.* **596**, 497–513 (2018).
97. Bazargani, N. & Attwell, D. Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nat. Neurosci.* **19**, 182–189 (2016).
 98. Enders, M., Heider, T., Ludwig, A. & Kuerten, S. Strategies for Neuroprotection in Multiple Sclerosis and the Role of Calcium. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1663 (2020).
 99. Guerra-Gomes, S., Sousa, N., Pinto, L. & Oliveira, J. F. Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 1–7 (2018).
 100. Chen, X. *et al.* Thrombin induces morphological and inflammatory astrocytic responses via activation of PAR1 receptor. *Cell Death Discov.* **8**, 1–9 (2022).
 101. Verkhratsky, A. & Parpura, V. Store-operated calcium entry in neuroglia. *Neurosci. Bull.* **30**, 125–133 (2014).
 102. Emrich, S. M., Yoast, R. E. & Trebak, M. Physiological Functions of CRAC Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **84**, 355–379 (2022).
 103. Verkhratsky, A., Rodríguez, J. J. & Parpura, V. Calcium signalling in astroglia. *Mol. Cell. Endocrinol.* **353**, 45–56 (2012).
 104. Zhang, I. & Hu, H. Store-Operated Calcium Channels in Physiological and Pathological States of the Nervous System. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 1–13 (2020).
 105. Moreno, C., Sampieri, A., Vivas, O., Peña-Segura, C. & Vaca, L. STIM1 and Orai1 mediate thrombin-induced Ca²⁺ influx in rat cortical astrocytes. *Cell Calcium* **52**, (2012).
 106. Schulte, A. *et al.* Homeostatic calcium fluxes, ER calcium release, SOCE, and calcium oscillations in cultured astrocytes are interlinked by a small calcium toolkit. *Cell Calcium* **101**, 102515 (2022).
 107. Golovina, V. A. Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J. Physiol.* **564**, 737–749 (2005).
 108. Toth, A. B. *et al.* CRAC channels regulate astrocyte Ca²⁺ signaling and gliotransmitter release to modulate hippocampal GABAergic transmission. *Sci. Signal.* **12**, 53–58 (2019).
 109. Kwon, J. *et al.* Orai1 and Orai3 in combination with STIM1 mediate the majority of store-operated calcium entry in astrocytes. *Exp. Neurobiol.* **26**, 42–54 (2017).
 110. Ubl, J. J. & Reiser, G. Characteristics of Thrombin-Induced Calcium Signals in Rat Astrocytes. *Glia* **369**, 361–369 (1997).
 111. Lin, C. C. *et al.* Thrombin mediates migration of rat brain astrocytes via PLC, Ca²⁺, CaMKII, PKC α , and AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol. Neurobiol.* **48**, 616–630 (2013).

112. Rajput, P. S. *et al.* Neuron-generated thrombin induces a protective astrocyte response via protease activated receptors. *Glia* **68**, 246–262 (2020).
113. Kim, J. *et al.* Thrombin-induced migration and matrix metalloproteinase-9 expression are regulated by MAPK and PI3K pathways in C6 glioma cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **15**, 211–216 (2011).
114. Kundumani-Sridharan, V. *et al.* Novel interactions between NFATc1 (nuclear factor of activated T cells c1) and STAT-3 (signal transducer and activator of transcription-3) mediate G protein-coupled receptor agonist, thrombin-induced biphasic expression of cyclin D1, with first phase infl. *J. Biol. Chem.* **287**, 22463–22482 (2012).
115. Wang, H., Ubl, J. J., Stricker, R. & Reiser, G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Physiol.* **283**, C1351–C1364 (2002).
116. Hu, S., Wu, G., Ding, X. & Zhang, Y. Thrombin preferentially induces autophagy in glia cells in the rat central nervous system. *Neurosci. Lett.* **630**, 53–58 (2016).
117. Zhan, J. S. *et al.* Astrocytes in Migration. *Neurochem. Res.* **42**, 272–282 (2017).
118. Shu, Q. *et al.* Orexin-A Promotes Cell Migration in Cultured Rat Astrocytes via Ca²⁺-Dependent PKC α and ERK1/2 Signals. *PLoS One* **9**, e95259 (2014).
119. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–9 (2003).
120. Lagos-Cabr e, R., Burgos-Bravo, F., Avalos, A. M. & Leyton, L. Connexins in astrocyte migration. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–16 (2020).
121. Ahmed, S. M., Rzigalinski, B. A., Willoughby, K. A., Sitterding, H. A. & Ellis, E. F. Stretch-Induced Injury Alters Mitochondrial Membrane Potential and Cellular ATP in Cultured Astrocytes and Neurons. *J. Neurochem.* **74**, 1951–1960 (2008).
122. Gadea, A., Schinelli, S. & Gallo, V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J. Neurosci.* **28**, 2394–2408 (2008).
123. Su, Z. *et al.* Reactive astrocytes in glial scar attract olfactory ensheathing cells migration by secreted TNF- α in spinal cord Lesion Of Rat. *PLoS One* **4**, (2009).
124. Liang, C. C., Park, A. Y. & Guan, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 329–333 (2007).
125. Martinotti, S. & Ranzato, E. Scratch wound healing assay. *Methods Mol. Biol.* **2109**, 225–229 (2020).
126. Ho, K. W., Lambert, W. S. & Calkins, D. J. Activation of the TRPV1 cation channel contributes to stress-induced astrocyte migration. *Glia* **62**, 1435–1451 (2014).
127. Lin, A. *et al.* Serum amyloid A inhibits astrocyte migration via activating p38 MAPK. *J. Neuroinflammation* **17**, 1–14 (2020).

128. Nishio, T. *et al.* Tenascin-C regulates proliferation and migration of cultured astrocytes in a scratch wound assay. *Neuroscience* **132**, 87–102 (2005).
129. Hsu, J. Y. C. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord. *J. Neurosci.* **28**, 13467–13477 (2008).
130. Etienne-Manneville, S. In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol.* **406**, 565–578 (2006).
131. Rozov, A. & Burnashev, N. Fast interaction between AMPA and NMDA receptors by intracellular calcium. *Cell Calcium* **60**, 407–414 (2016).
132. Zhao, Y. *et al.* Sensitized signalling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in the absence or inhibition of FKBP12.6 in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **113**, 332–342 (2017).
133. Courjaret, R., Dib, M. & Machaca, K. Spatially restricted subcellular Ca²⁺ signaling downstream of store-operated calcium entry encoded by a cortical tunneling mechanism. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
134. Guilcher, C. Le, Luyten, T., Parys, J. B., Pucheault, M. & Dellis, O. Synthesis and characterization of store-operated calcium entry inhibitors active in the submicromolar range. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–23 (2020).
135. Gustafsson, N. *et al.* Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
136. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
137. Dupont, A., Stirnagel, K., Lindemann, D. & Lamb, D. C. Tracking image correlation: Combining single-particle tracking and image correlation. *Biophys. J.* **104**, 2373–2382 (2013).
138. Cox, G. & Sheppard, C. J. R. Practical Limits of Resolution in Confocal and Non-Linear Microscopy. *Microsc. Res. Tech.* **63**, 18–22 (2004).
139. Huang, B., Bates, M. & Zhuang, X. Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 993–1016 (2009).
140. Bohórquez-Hernández, A., Gratton, E., Pacheco, J., Asanov, A. & Vaca, L. Cholesterol modulates the cellular localization of Orai1 channels and its disposition among membrane domains. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1481–1490 (2017).
141. Pankow, S., Bamberger, C., Calzolari, D., Bamberger, A. & Yates, J. R. Deep interactome profiling of membrane proteins by co-interacting protein identification technology. *Nat. Protoc.* **11**, 2515–2528 (2016).
142. Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. & Julius, D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* **504**, 113–118 (2013).
143. Asanov, A., Zepeda, A. & Vaca, L. A novel form of Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (LG-TIRFM) reveals different and independent lipid raft domains in living cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 147–

- 155 (2010).
144. Asanov, A., Zepeda, A. & Vaca, L. A platform for combined dna and protein microarrays based on total internal reflection fluorescence. *Sensors* **12**, 1800–1815 (2012).
 145. Blondeau, J. -P, Beslin, A., Chantoux, F. & Francon, J. Triiodothyronine Is a High-Affinity Inhibitor of Amino Acid Transport System L1 in Cultured Astrocytes. *J. Neurochem.* **60**, 1407–1413 (1993).
 146. Fernandes, A. *et al.* Glycoursodeoxycholic acid and interleukin-10 modulate the reactivity of rat cortical astrocytes to unconjugated bilirubin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 789–798 (2007).
 147. Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B. & Gaudet, R. The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron* **54**, 905–918 (2007).
 148. Huang, C. *et al.* Existence and distinction of acid-evoked currents in rat astrocytes. *Glia* **58**, 1415–1424 (2010).
 149. Ebrahimi, S. *et al.* Role of thrombin in the pathogenesis of central nervous system inflammatory diseases. *J. Cell. Physiol.* **232**, 482–485 (2017).
 150. Lin, C.-C. *et al.* Thrombin mediates migration of rat brain astrocytes via PLC, Ca²⁺, CaMKII, PKC α , and AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol. Neurobiol.* **48**, 616–30 (2013).
 151. Mullins, F. M. & Lewis, R. S. The inactivation domain of STIM1 is functionally coupled with the Orai1 pore to enable Ca²⁺-dependent inactivation. *J. Gen. Physiol.* **147**, 153–164 (2016).
 152. Zhang, X. *et al.* A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 153. Dynes, J. L., Amcheslavsky, A. & Cahalan, M. D. Genetically targeted single-channel optical recording reveals multiple Orai1 gating states and oscillations in calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 440–445 (2016).
 154. Richler, E., Chaumont, S., Shigetomi, E., Sagasti, A. & Khakh, B. S. Tracking transmitter-gated P2X cation channel activation in vitro and in vivo. *Nat. Methods* **5**, 87–93 (2008).
 155. Tay, L. H. *et al.* Nanodomain Ca²⁺ of Ca²⁺ channels detected by a tethered genetically encoded Ca²⁺ sensor. *Nat. Commun.* **3**, 711–778 (2012).
 156. Ko, J., Myeong, J., Yang, D. & So, I. Calcium permeability of transient receptor potential canonical (TRPC) 4 channels measured by TRPC4-GCaMP6s. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **21**, 133–140 (2017).
 157. Vellino, S. *et al.* Cross-talk between the calcium channel TRPV4 and reactive oxygen species interlocks adhesive and degradative functions of invadosomes. *J. Cell Biol.* **220**, (2021).

158. Hell, S. W. Far-field optical nanoscopy. *Opt. InfoBase Conf. Pap.* **2**, 1153–1159 (2009).
159. Coelho, S. *et al.* Ultraprecise single-molecule localization microscopy enables in situ distance measurements in intact cells. *Sci. Adv.* **6**, 1–10 (2020).
160. Sahu, I. *et al.* NFAT5-sensitive Orai1 expression and store-operated Ca²⁺ entry in megakaryocytes. *FASEB J.* **31**, 3439–3448 (2017).
161. Michiels, C. F., Fransen, P., De Munck, D. G., De Meyer, G. R. Y. & Martinet, W. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells alters contractility and Ca²⁺ homeostasis in mice. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **308**, H557–H567 (2015).
162. Giachini, F. R. C. *et al.* STIM1/Orai1 contributes to sex differences in vascular responses to calcium in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* **122**, 215–226 (2012).
163. Li, H. *et al.* Impaired Orai1-mediated resting Ca²⁺ entry reduces the cytosolic [Ca²⁺] and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in quiescent junctophilin 1 knock-out myotubes. *J. Biol. Chem.* **285**, 39171–39179 (2010).
164. Sztretye, M. *et al.* The Role of Orai1 in Regulating Sarcoplasmic Calcium Release, Mitochondrial Morphology and Function in Myostatin Deficient Skeletal Muscle. *Front. Physiol.* **11**, 1–15 (2020).
165. Alansary, D., Bogeski, I. & Niemeyer, B. A. Facilitation of Orai3 targeting and store-operated function by Orai1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 1541–1550 (2015).
166. Wang, Y. Y. *et al.* Expression of Orai1 and STIM1 in human oral squamous cell carcinogenesis. *J. Dent. Sci.* **17**, 78–88 (2022).
167. Kilch, T. *et al.* Mutations of the ca²⁺-sensing stromal interaction molecule stim1 regulate ca²⁺ influx by altered oligomerization of stim1 and by destabilization of the ca²⁺ channel orai1. *J. Biol. Chem.* **288**, 1653–1664 (2013).
168. Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A. & Putney, J. W. Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J. Cell Sci.* **125**, 4354–4361 (2012).
169. Henke, N. *et al.* The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell Death Dis.* **4**, 1–9 (2013).
170. Vyklický, L. *et al.* Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: A mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol. Res.* **57**, (2008).
171. Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* **504**, 107–112 (2013).
172. Lee, S. K. *et al.* IDstim helps STIM1 keep inactive via intramolecular binding to the coiled-coil domain in a resting state. *J. Cell Sci.* **133**, (2019).
173. Azimi, I. *et al.* A New Selective Pharmacological Enhancer of the Orai1 Ca²⁺

- Channel Reveals Roles for Orai1 in Smooth and Skeletal Muscle Functions. *ACS Pharmacol. Translational Sci.* **3**, 135–147 (2020).
174. Rosenbaum, T., Gordon-shaag, A., Munari, M. & Gordon, S. E. Ca²⁺/ Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin. *J. Gen. Physiol.* **123**, (2004).
 175. Fischer BS, Qin D, Kim K, M. T. Capsaicin inhibits Jurkat T-cell activation by blocking calcium entry current I(CRAC). *J Pharmacol Exp Ther.* **299**, 238–246 (2001).
 176. Choi SY, K. K. Capsaicin inhibits phospholipase C-mediated Ca(2+) increase by blocking thapsigargin-sensitive store-operated Ca(2+) entry in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **291**, 107–14 (1999).
 177. Wang, J., Tseng, C. & Sun, S. Capsaicin stimulates the non-store-operated Ca²⁺ entry but inhibits the store-operated Ca²⁺ entry in neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **209**, 134–144 (2005).
 178. Gouin, O. *et al.* Major Role for TRPV1 and InsP3R in PAR2-Elicited Inflammatory Mediator Production in Differentiated Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1564–1572 (2018).
 179. Nakayama, A. & Wakamori, M. Inhibition of CRAC channel current by TRPV1 channel agonist and antagonist in RBL cells. in *Proceedings for The 94th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society 2021* (2021).
 180. Woo, J. H. *et al.* Nootkatol prevents ultraviolet radiation-induced photoaging via ORAI1 and TRPV1 inhibition in melanocytes and keratinocytes. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **25**, 87–94 (2021).
 181. Mergler S, Valtink M, Takayoshi S, Okada Y, Miyajima M, Saika S, Reinach PS. Mergler S, Valtink M, Takayoshi S, Okada Y, Miyajima M, Saika S, R. P. Temperature-Sensitive Transient Receptor Potential Channels in Corneal Tissue Layers and Cells. *Ophthalmic Res.* **52**, 151–159 (2014).
 182. Nam, J. H. *et al.* TRPV1 on astrocytes rescues nigral dopamine neurons in Parkinson's disease via CNTF. *Brain* **138**, 3610–3622 (2015).
 183. Zhang, E. & Liao, P. Brain Transient Receptor Potential Channels and Stroke. *J. Neurosci. Res.* **93**, 1165–83 (2014).
 184. Wang, X. *et al.* TRPV1 translocated to astrocytic membrane to promote migration and inflammatory infiltration thus promotes epilepsy after hypoxic ischemia in immature brain. *J. Neuroinflammation* **16**, 1–14 (2019).
 185. Sappington, R. M. *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) influences how retinal ganglion cell neurons respond to pressure-related stress. *Channels* **9**, 102–113 (2015).
 186. Kong, W. *et al.* Activation of TRPV1 Contributes to Recurrent Febrile Seizures via Inhibiting the Microglial M2 Phenotype in the Immature Brain. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 1–16 (2019).
 187. Li, K., Li, J., Zheng, J. & Qin, S. Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases.

- Aging Dis.* **10**, 664–675 (2019).
188. Lopez-Guerrero, A. M. *et al.* RAC1-Dependent ORAI1 Translocation to the Leading Edge Supports Lamellipodia Formation and Directional Persistence. *Sci. Rep.* **10**, 1–18 (2020).
 189. Diez-Bello, R., Jardin, I., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**, 1064–1070 (2017).
 190. Yang, N. *et al.* Blockade of store-operated Ca(2+) entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett.* **330**, 163–9 (2013).
 191. Vandenberghe, M. *et al.* ORAI1 calcium channel orchestrates skin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, (2013).
 192. Li, L. *et al.* The impact of TRPV1 on cancer pathogenesis and therapy: A systematic review. *Int. J. Biol. Sci.* **17**, 2034–2049 (2021).
 193. Indriati, D. W. *et al.* Quantitative localization of Cav2.1 (P/Q-Type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: Somatodendritic gradient and distinct somatic Coclustering with calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* **33**, 3668–3678 (2013).
 194. Engbers, J. D. T. *et al.* Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2601–2606 (2012).
 195. Kar, P. *et al.* The N terminus of Orai1 couples to the AKAP79 signaling complex to drive NFAT1 activation by local Ca²⁺-entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, 1–11 (2021).
 196. Akita, T. & Okada, Y. Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca²⁺ nanodomains in mouse astrocytes. *J. Physiol.* **589**, 3909–3927 (2011).
 197. Shah, S. *et al.* Local Ca²⁺ signals couple activation of TRPV1 and ANO1 sensory ion channels. *Sci. Signal.* **13**, (2020).
 198. Sampieri, A., Santoyo, K., Asanov, A. & Vaca, L. Association of the IP3R to STIM1 provides a reduced intraluminal calcium microenvironment, resulting in enhanced store-operated calcium entry. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
 199. Béliveau, É., Lessard, V. & Guillemette, G. STIM1 Positively Regulates the Ca²⁺ Release Activity of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Bovine Aortic Endothelial Cells. *PLoS One* **9**, e114718 (2014).
 200. Thillaiappan, N. B., Chavda, A. P., Tovey, S. C., Prole, D. L. & Taylor, C. W. Ca²⁺ signals initiate at immobile IP3 receptors adjacent to ER-plasma membrane junctions. *Nat. Commun.* **8**, (2017).

11. ANEXOS

Anexo 1. Publicaciones derivadas del trabajo doctoral




ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0338-1>

OPEN

Heterologous calcium-dependent inactivation of Orai1 by neighboring TRPV1 channels modulates cell migration and wound healing

Carlos Ernesto Bastián-Eugenio¹, Arlette Bohórquez-Hernández¹, Jonathan Pacheco¹, Alicia Sampieri¹, Alexander Asanov², Jose Pablo Ocelotl-Oviedo³, Adán Guerrero⁴, Alberto Darszon³ & Luis Vaca¹ 

Store-operated calcium entry (SOCE) is an essential calcium influx mechanism in animal cells. One of the most important auto regulatory control systems involves calcium-dependent inactivation (CDI) of the Orai channel, which prevents excessive calcium influx. In the present study we analyze the role of two channels in the induction of CDI on Orai1. Here we show that calcium entering through freely diffusing TRPV1 channels induce strong CDI on Orai1 while calcium entering through P2X₄ channel does not. TRPV1 can induce CDI on Orai1 because both channels were found in close proximity in the cell membrane. This was not observed with P2X₄ channels. To our knowledge, this is the first study demonstrating that calcium arising from different channels may contribute to the modulation of Orai1 through CDI in freely diffusing single channels of living cells. Our results highlight the role of TRPV1-mediated CDI on Orai1 in cell migration and wound healing.

¹Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico. ²TIRF Labs Inc., 106 Grendon Place, Cary 27519 NC, USA. ³Departamento Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 62250, Mexico. ⁴Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 62250, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.V. (email: lvaca@ifc.unam.mx)

The calcium ion (Ca^{2+}) is a second messenger with a key role in numerous cellular processes¹. Cells have developed many mechanisms to regulate this ion². Store-operated calcium entry (SOCE) is the principal mechanism for calcium mobilization in non-excitable cells^{3,4}. The prototypical store-operated calcium channel is the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channel^{5,6}. The essential components of CRAC are the endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} sensor STIM1^{7,8} and the plasma membrane (PM) channel Orai⁹. In general, activation of inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) receptors on the ER produces a rapid and transient release of Ca^{2+} from ER store. The resulting decrease of the Ca^{2+} concentration inside the ER is sensed by the EF-hand motif of STIM1, which then translocates to the PM, associating to Orai and inducing channel activation.

Orai activity is regulated through a negative feedback mechanism that maintains intracellular Ca^{2+} homeostasis and prevents excessive Ca^{2+} influx. Such a mechanism is known as Ca^{2+} -dependent inactivation (CDI).

CDI consists of slow CDI (SCDI) and fast CDI (FCDI), which have different kinetics and sites of action. SCDI occurs gradually in tens of seconds after channel activation and has been reported to occur by global increases in cytosolic calcium concentrations¹⁰. The most important regulator of SCDI is the SOCE-associated regulatory factor (SARAF)¹¹. Moreover, SCDI can be regulated by other factor such as caveolin, E-syt1, septin4, and $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ^{12,13}.

FCDI take place within ~10–100 ms after channel activation and is controlled by Ca^{2+} binding to a site located ~8 nm from the channel pore^{14,15}. FCDI is modulated by various factors, including the STIM1-Orai1 expression ratio¹⁶, an amino acid region negatively charged in STIM1 (residues 475–483)^{17–19}, the intracellular loop II–III of Orai1²⁰, the N-terminus of Orai1 (residues 68–91)^{17,21}, and also probably the first 63 amino acids from Orai1²². Most interestingly, a single amino acid mutation alters FCDI in Orai1 channels rendering the channel CDI insensitive²¹.

To our knowledge, all the studies carried out to this date to understand and explore CDI have been conducted by artificially increasing intracellular Ca^{2+} via the patch clamp pipette or by measuring CDI with normal and reduced extracellular calcium concentrations, which reflects CDI induced by Ca^{2+} entering through the Orai channel pore (homologous CDI). Less studied are physiological sources of Ca^{2+} , such as the contribution of other channels to CDI in Orai.

In the present study, we have explored other sources of Ca^{2+} arising from different channels that may play a role in Orai's CDI. We have found that Ca^{2+} entering the cell through TRPV1 channels induce strong CDI in Orai1, while Ca^{2+} entering through P2X_4 purinergic channels does not. Super resolution studies indicate that Orai1 and TRPV1 are associated and move in close proximity to each other at the PM, while P2X_4 and Orai1 do not. These results were confirmed by co-immunoprecipitation (CoIP) and Förster resonance energy transfer (FRET) studies between Orai1-TRPV1 and Orai1- P2X_4 .

All the results presented here strongly suggest that a close association between TRPV1 and Orai1 results in an elevated Ca^{2+} microenvironment near the Orai1 pore when TRPV1 channels are activated, which enhances CDI in Orai1. Because P2X_4 and Orai1 are not found in close proximity at the PM, Ca^{2+} entering P2X_4 channels do not induce CDI in Orai1, in spite the fact that Ca^{2+} entering through P2X_4 channels contribute to increments in cytosolic Ca^{2+} concentrations.

These results have important physiological implications in the modulation of calcium influx in cells where TRPV1 and Orai1 channels coexist, such as astrocytes. We show that TRPV1 is an important modulator of Orai1 channel activity in cortical astrocytes by controlling CDI in this channel and thus reducing the

amount of Ca^{2+} entering to the cell when TRPV1 and Orai1 are simultaneously or sequentially activated. This heterologous modulation of CDI plays a role in controlling cell migration and wound healing mediated by astrocytes.

Results

Engineering of Orai1-GCaMP3 to characterize CDI. In an attempt to identify how Orai1 may sense changes of Ca^{2+} in its vicinity, we engineered a fusion protein consisting of the green genetically encoded calcium indicator (GCaMP3) fused to the amino terminus of Orai1 channel (Orai1-GCaMP3). We use the red calcium indicator (R-GECO) to simultaneously measure changes in global calcium in the cytosol and compare it to local calcium changes reported by the fusion protein Orai1-GCaMP3, which would presumably report only calcium changes near the channel pore from Orai1.

Firstly, we characterize Orai1-GCaMP3 to determine if the fusion protein behaves like a wild type Orai1 channel. Orai1-GCaMP3 is found primarily at the PM, similarly to Orai1 alone or Orai1-GFP used as controls (Fig. 1a). The expression of the fusion protein was identified also by western blot (Fig. 1b, for full-length blot see Supplementary Fig. 1). As expected, cells overexpressing Orai1-GCaMP3 or Orai1-GFP showed enhanced SOCE (Fig. 1c, d), indicating that the functionality of Orai1-GCaMP3 is indistinguishable from that of Orai1-GFP. This was clear when measuring the area under the curve (AUC) for calcium entry (Fig. 1d), but also with the peak increments in Fura-2 fluorescence from the same data (endogenous 0.43 ± 0.15 , Orai1-GCaMP3 0.92 ± 0.18 , and Orai1-GFP 0.99 ± 0.16 , Fig. 1c).

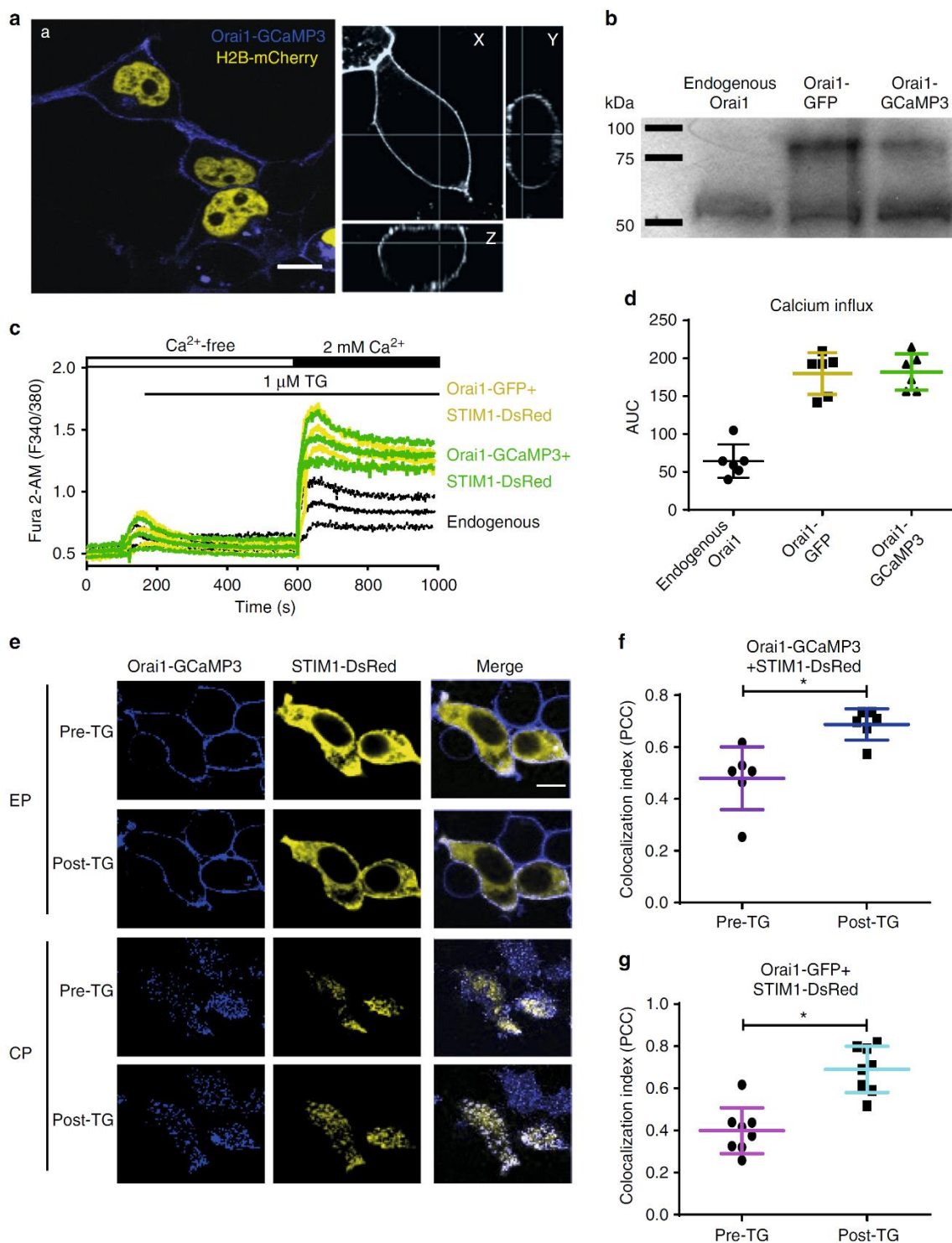
Furthermore, Orai1-GCaMP3 forms regular puncta with STIM1 when internal calcium stores are depleted with thapsigargin (TG) (Fig. 1e–g). These results indicate that the function of Orai1 is unaltered by fusing the GCaMP3 calcium indicator.

We characterize further the calcium changes sensed by Orai1-GCaMP3 or by R-GECO present in the cytosol as a soluble protein. We proceeded to explore the ability of Orai1-GCaMP3 to sense calcium increments when other channels that permeate calcium are activated. We explored several channels and found that Orai1-GCaMP3 senses calcium arising from the activation of TRPV1 channel (Fig. 2a, b) but not from the P2X_4 purinergic receptor (Fig. 2c, d). Most interestingly, a PM targeted calcium sensor (Lck-GCaMP5)²³ detects calcium increments derived from the activation of both, TRPV1 and P2X_4 channels (Supplementary Fig. 2). These results suggest that, even though both fusion proteins (Orai1-GCaMP3 and Lck-GCaMP5) are located at the PM, they may be contained within different microdomains conferring them differential sensitivity to calcium increments arising from different sources.

We decided to characterize in greater detail the interactions between Orai1-TRPV1 and Orai1- P2X_4 in an attempt to identify the molecular mechanism responsible for the differential sensing of calcium by Orai1-GCaMP3 when TRPV1 or P2X_4 are activated.

If Orai1-GCaMP3 is sensing increments in calcium upon activation of TRPV1 but not P2X_4 , then the calcium accumulating in the proximity from Orai1 should have an effect on Orai1 CDI. To explore this hypothesis, we developed a sequential activation patch clamp protocol to induce channel activity first on TRPV1 or P2X_4 followed by the activation of Orai1 with TG and measure whole-cell currents in the perforated patch clamp mode. Control experiments consisting of perfusion with extracellular solution (Methods) provided a basal Orai1 activity and a control for CDI (Fig. 3a, b).

Activation of TRPV1 with capsaicin (Cap) followed by the activation of Orai1 with TG resulted in strong CDI (Fig. 3b, c).



This phenomenon was not observed when we activated $P2X_4$ with cytidine triphosphate (CTP) followed by the activation of Orai1 with TG (Fig. 3d, e). To further demonstrate that the rapid decay in Orai1 current was the result of CDI, we conducted experiments with the Orai1 mutant insensitive to CDI (Orai1-Y80W)²¹. Activation of TRPV1 followed by activation of Orai1-Y80W with

TG did not induce significant CDI (Fig. 3f, g). Furthermore, using strong calcium buffering with BAPTA inside the cell (BAPTA-AM) further confirmed that the rapid reduction in Orai1 current was the result of CDI (Fig. 3b, d). The CDI observed in Orai1 after TRPV1 activation was evident at all voltages explored (Fig. 3h).

Fig. 1 Developing and testing the Orai1-GCaMP3 sensor. **a** Representative confocal images of the fluorescence obtained with Orai1-GCaMP3 (blue) and histone 2B fused to mCherry as nuclear marker (yellow) expressed in HEK293 cells obtained from at least 3 independent transfections. Left panels show the 3D (*x*, *y*, and *z* axes) confocal projections from Orai1-GCaMP3 to illustrate its plasma membrane localization. Scale bar 5 μ m. **b** Western blot analysis from HEK293 cells expressing the Orai1-GCaMP3 sensor and Orai1-GFP (representative blot from 3 independent blots). Notice the 55 kDa band corresponding to endogenous Orai1 and the 79 kDa band from Orai1-GFP and the Orai1-GCaMP3 sensor. **c** Cell population calcium measurements using a spectrofluorometer with HEK293 cells expressing Orai1-GFP + STIM1-DsRed (yellow) or Orai1-GCaMP3 + STIM1-DsRed (green) or measuring the endogenous SOCE (black). Measurements obtained from at least 5 independent transfections. Calcium increments induced by the application of thapsigargin (TG) in free extracellular calcium and SOCE measured after re-addition of 2 mM calcium to the extracellular solution. **d** Area under the curve (AUC) for fluorescence obtained after re-addition of 2 mM calcium (calcium influx) with endogenous Orai1 (gray), Orai1-GFP (yellow), and Orai1-GCaMP3 (green). **e** Representative confocal images of the puncta formation after TG application in cells expressing Orai1-GCaMP3 (blue) and STIM1-DsRed (yellow). Images shown before the application of thapsigargin (pre-TG) and after (post-TG) for the equatorial plane (middle) of the cell (EP) and the cortical plane (CP, the plane closest to the Petri dish bottom). Scale bar 5 μ m. **f** Co-localization index (PC, Pearson's correlation coefficient) for Orai1-GCaMP3 + STIM1-DsRed before and after TG. **g** Co-localization index (PCC) for Orai1-GFP + STIM1-DsRed before and after TG. In all cases, data shows the mean \pm standard deviation from at least 6 independent transfections. Asterisks show *p* values of < 0.01. The statistical significance was *p* < 0.05. Statistics was performed by Student's *t*-test

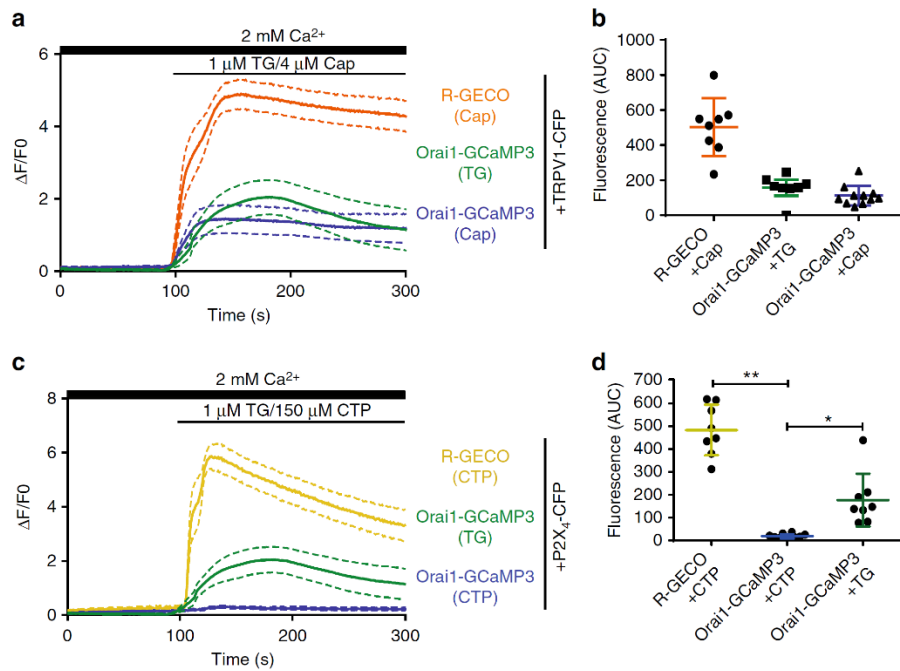
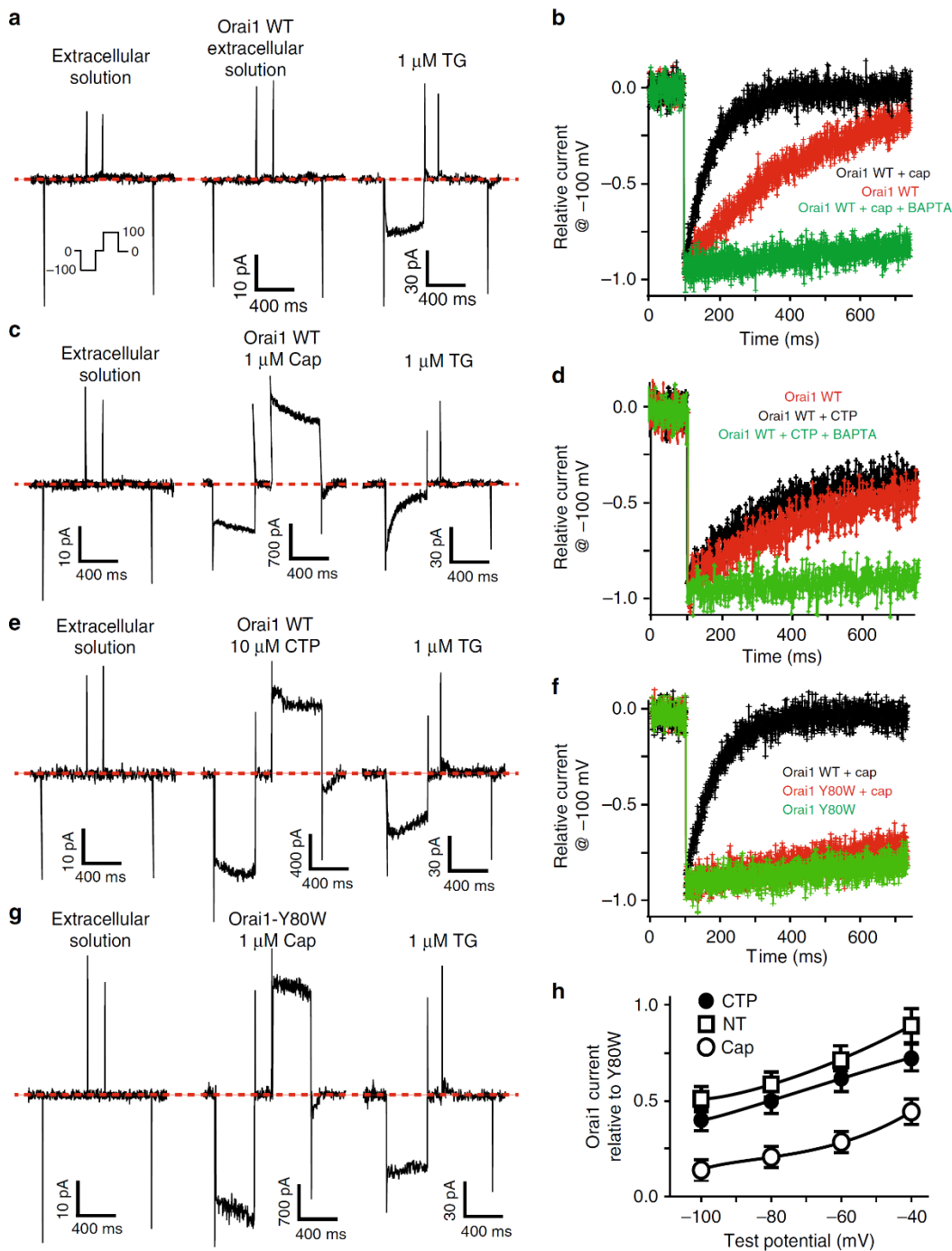


Fig. 2 Orai1-GCaMP3 senses local calcium increments through TRPV1 but not through P2X₄. **a** Calcium increments reported by R-GECO when the cells were exposed to capsaisin, Orai1-GCaMP3 with capsaisin and Orai1-GCaMP3 with thapsigargin (TG) from at least 12 independent transfections. **b** Area under the curve (AUC) for fluorescence of R-GECO with capsaisin (orange), Orai1-GCaMP3 with capsaisin (blue), and Orai1-GCaMP3 with TG (green). **c** Calcium increments reported by R-GECO when the cells were exposed to CTP, Orai1-GCaMP3 with CTP, and Orai1-GCaMP3 with thapsigargin (TG). **d** Area under the curve (AUC) for fluorescence of R-GECO with CTP (yellow, *n* = 8), Orai1-GCaMP3 with CTP (blue, *n* = 10), and Orai1-GCaMP3 with TG (green, *n* = 8). Notice that Orai1-GCaMP3 does not sense calcium increments with CTP while the R-GECO reports large calcium increments. In all cases, data shows the mean \pm s.e.m. ***p* < 0.01, **p* < 0.05. The statistical significance was *p* < 0.05. Statistics was performed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test

Orai1 is in close proximity to TRPV1 but not to P2X₄. If calcium entering TRPV1 is inducing strong CDI in Orai1 but not calcium entering through P2X₄, this result strongly suggests that TRPV1 and Orai1 must be in close proximity from each other. Indeed FRET analysis indicates that Orai1-YFP and TRPV1-CFP are within less than 10 nm from each other (Fig. 4a, c). FRET was not observed between Orai1-YFP and CFP-P2X₄ (Fig. 4b, c). These results were confirmed by CoIP studies with Orai1-TRPV1 and Orai1-P2X₄ (Fig. 4d, for full-length blots see Supplementary Fig. 3).

To explore at the single channel level how calcium entering TRPV1 is sensed by our Orai1-GCaMP3 fusion protein, we

conducted super resolution studies. Super resolution imaging showed individual Orai1, TRPV1, and P2X₄ channels freely diffusing at the PM of living cells (Fig. 5a and Supplementary Movies 1 and 2). Measuring the distance between Orai1-TRPV1 and Orai1-P2X₄ confirmed the results obtained by FRET and CoIP. The distance between individual Orai1 and TRPV1 channels was significantly smaller than that between Orai1-P2X₄ (Fig. 5b). Average distances over time obtained from hundreds of single channels showed at least a 4-fold greater distance between Orai1 and P2X₄ compared to Orai1 and TRPV1 (Fig. 5c). Furthermore, super resolution imaging of fluorescence increments using Orai1-GCaMP3 single channels showed that



this fusion protein could sense calcium increments arising from TRPV1 but not P2X₄ channels (Fig. 5d, e and Supplementary Movies 1 and 2). These differences in sensing calcium from TRPV1 or P2X₄ were evident also when measuring the average change in fluorescence from hundreds of single Orai1-GCaMP3 channels (Fig. 5f, g).

ANK1 of TRPV1 is essential for the association to Orai1 C terminus. To identify the molecular structures responsible for the association between Orai1 and TRPV1 channels, we conducted a wide screening using peptide microarrays with a platform we

have previously developed and tested²⁴ (data available here²⁵). Previous studies have highlighted the role of the ankyrin domains from TRPV1 in the association to regulatory proteins and scaffolds²⁶. To evaluate the role of each of the 6 ankyrin domains from TRPV1 we produced fusion proteins of each domain to the green fluorescent protein (GFP) and conducted CoIP studies using Orai1 as bait. CoIP analysis indicated that the first 3 ankyrin domains associate to Orai1, although the first ankyrin domain (ANK1) showed to strongest interaction (Fig. 6a, for full-length blots see Supplementary Fig. 4). To explore further to what sequence from Orai1 was the ANK1 associating, we produced

Fig. 3 Activation of TRPV1 induces strong CDI in Orai1. **a** Perforated patch measurements in HEK293 cells expressing Orai1-GFP and STIM-DsRed. The sequential protocol consisted in the application of extracellular solution followed by a second control application of extracellular solution (ES) and finally thapsigargin. The second ES application will be replaced by either capsaicin or cytidine triphosphate (CTP) in the following experiments. In all cases, capsaicin or CTP were incubated for 3 min and then the cells were washed with fresh ES for 1–2 min prior to TG stimulation (TG was present for the remaining duration of the experiment). **b** Relative current illustrating the activation by applying a voltage step from 0 to -100 mV for cells expressing Orai1 and TRPV1 pre-stimulated with capsaicin (cap, black), Orai1 only with thapsigargin (red), and Orai1 and TRPV1 pre-stimulated with capsaicin in cells incubated with BAPTA-AM (green). **c** Perforated patch measurements using the sequential protocol pre-simulating with capsaicin in cells expressing Orai1-GFP and TRPV1-CFP. The middle panel shows the currents elicited by capsaicin stimulation (TRPV1). Panel to the right shows the subsequent activation of Orai1 with TG. **d** Relative current illustrating the activation of current by applying a voltage step from 0 to -100 mV for cells expressing Orai1 and P2X₄ and pre-stimulated with CTP (black) and cells expressing Orai1 and P2X₄ and pre-stimulated with CTP and previously incubated with BAPTA-AM (green). Lines show mean \pm standard deviation from at least 31 cells. **e** Perforated patch measurements using the sequential protocol in a cell expressing Orai1 and P2X₄. **f** Relative current illustrating the activation for cells expressing Orai1 wild type (WT) with pre-stimulation with capsaicin (black) and cells expressing the CDI-resistant mutant Orai1 Y80W with (red) or without pre-stimulation (green). **g** Perforated patch measurements using the sequential protocol in cells expressing Orai1 Y80W and TRPV1. **h** Orai1 currents relative to mutant Orai1 Y80W at different voltages. Cells pre-stimulated with CTP (black circle), with capsaicin (open circle) or cells not exposed to capsaicin, only TG (NT). All experiments show the mean \pm standard deviation from at least 20 cells

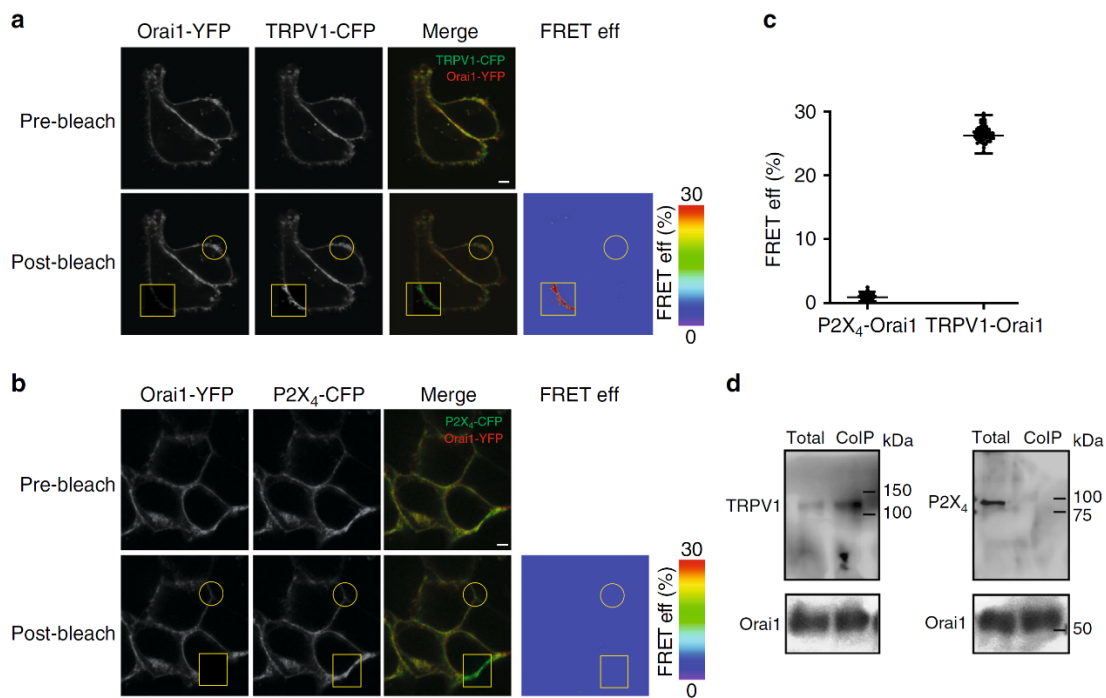
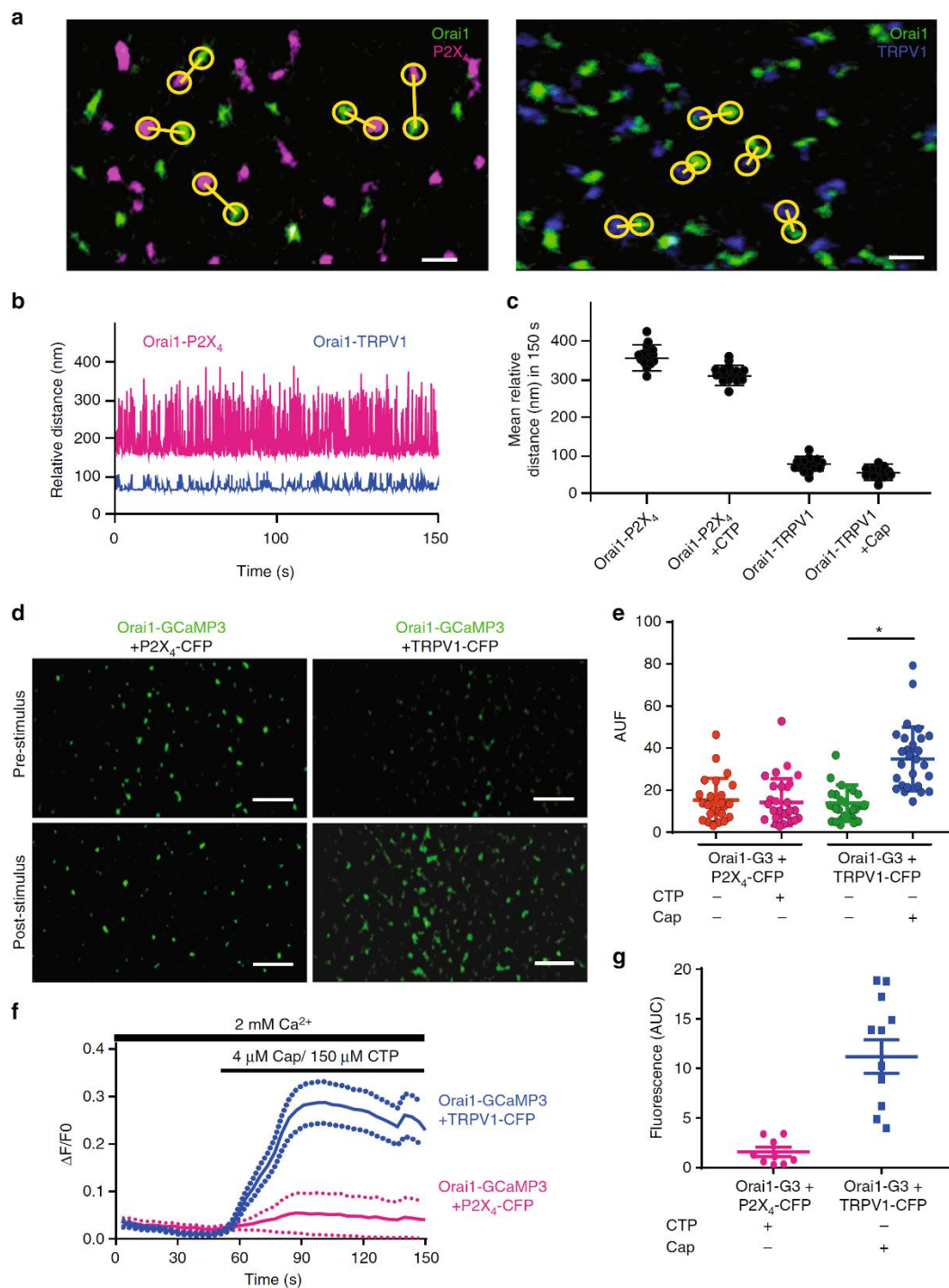


Fig. 4 TRPV1 is in close proximity to Orai1. **a** Representative confocal images illustrating the expression of Orai1-YFP and TRPV1-CFP before (pre-bleach) or after (post-bleach) photobleaching of the acceptor (YFP). The square shows the area photobleached and the circle a control area not exposed to the photobleach procedure. We used both areas to calculate the FRET efficiency as indicated in Methods. Right panel shows the FRET efficiency (FRET eff) in pseudo color calculated from the acceptor photobleaching protocol (Methods). Scale bar 1 μ m. **b** Representative confocal images illustrating the expression of Orai1-YFP and P2X₄-CFP before (pre-bleach) or after (post-bleach) photobleaching of YFP. The square shows the area photobleached and the circle a control area not exposed to the photobleach procedure. FRET efficiency (FRET eff) in pseudo color calculated from the acceptor photobleaching protocol (Methods). Scale bar 1 μ m. **c** FRET eff (%) obtained from at least 45 cells for P2X₄-Orai1 and TRPV1-Orai1. Data show the mean \pm standard deviation. **d** Co-immunoprecipitation analysis of cells expressing c-Myc-Orai1 and TRPV1-YFP or P2X₄-CFP (for the entire blots check Supplementary Figures). Total indicates the protein that was not retained in the affinity column, thus reflects the protein that did not co-immunoprecipitate (Methods). Blots are representative examples from at least 3 independent blots

fusion proteins between the amino terminus from Orai1 and GFP (Orai1-NH2-GFP) and the carboxyl terminus from Orai1 (Orai1-COOH-GFP). Peptide microarray studies showed that the strongest interaction was between ANK1 and COOH-GFP (Fig. 6b). COOH-GFP interacts with the first 3 ankyrin domains from TRPV1, but the strongest interaction is with ANK1 (Fig. 6c). To ensure that the amount of Orai1-COOH deposited on each microarray spot was not affecting the binding of the

different ankyrin domains, we produced a fusion protein of the carboxyl terminus from Orai1 fused to the red fluorescent protein (Orai1-COOH-DsRed). In this way, we can determine how much of the Orai1-COOH-DsRed was deposited on each microarray spot (using the red fluorescence channel) and the binding from the 6-ankyrin domains fused to GFP (using the green fluorescence channel), simultaneously (Methods). Below the strips of the microarray from the 6 ankyrin domains are illustrated examples



of the Orai1-COOH-DsRed deposited on the microarray coverlip for each condition (Fig. 6c, lower panels labeled Orai1-COOH-DsRed)²⁵.

To explore the role of the first 3 ankyrin domains in the entire TRPV1 protein, we produced individual deletions of these 3 ankyrin domains. Unfortunately, only the deletion of the first ankyrin domain produced channels that reached the PM, deleting beyond this first ankyrin domain resulted in channels that were

retained in intracellular compartments. This finding was previously reported, showing that only the first amino acids from the amino terminus of TRPV1 can be deleted without affecting channel localization and function²⁶. In particular, the ankyrin domain 3 plays a key role in channel tetramerization²⁷. Nevertheless, we could explore the role of the first ankyrin domain on CDI using the deletion mutant TRPV1- Δ ANK1, which is lacking the first ankyrin domain (Methods).

Fig. 5 Super resolution studies reveal that TRPV1 and Orai1 move in close proximity in the plasma membrane. **a** Super resolution single channel TIRFM images from cells expressing Orai1 (green) and P2X₄ (magenta) in the left panel or Orai1 (green) and TRPV1 (blue, right panel). Yellow circles show measurements between the nearest two channels for Orai1-P2X₄ (left panel) or Orai1-TRPV1 (right panel). Scale bar 60 nm. **b** Relative distance over time for a single pair of channels measured in cells expressing Orai1-P2X₄ (magenta) and Orai1-TRPV1 (blue). **c** Mean relative distance obtained from several hundred channels in cells expressing Orai1-P2X₄ (magenta) with or without CTP and Orai1-TRPV1 (blue) with or without capsaicin. Notice that agonist stimulation (CTP or capsaicin) did not alter mean distances. **d** Super resolution single channel TIRFM images from cells expressing Orai1-GCaMP3 (green) + P2X₄-CFP (left panels) or TRPV1-CFP (right panels) before and after stimulation with CTP or capsaicin. Notice the increment in the fluorescence of single Orai1-GCaMP3 channels after capsaicin stimulation but not with CTP. Scale bar 200 nm. **e** Fluorescence intensity in arbitrary units (AUF) reported by the Orai1-GCaMP3 sensor under the different stimulations. Notice that only cells expressing TRPV1 (TI-CFP) exposed to capsaicin produced an increment in fluorescence (blue bar). Capsaicin stimulation in cells without TRPV1 (orange and magenta bar) or cells expressing TRPV1-CFP but not exposed to capsaicin (green bar) did not result in changes in the fluorescence of Orai1-GCaMP3. **f** Fluorescence measurements of the entire field of view (containing dozens of individual channels) over time with cells expressing the Orai1-GCaMP3 sensor and TRPV1 with capsaicin (blue line) or cells expressing P2X₄ and stimulated with CTP (magenta line). Lines show the mean ± standard deviations (dotted lines). Fluorescence from Orai1-GCaMP3 sensor increases only after capsaicin stimulation in cells expressing TRPV1. **g** Area under the curve (AUC) for the different conditions shown in panel **f**. Notice that only the fluorescence is observed in cells expressing the Orai1-GCaMP3 sensor + the TRPV1 channel and stimulated with capsaicin (green bar). **p* < 0.01. The statistical significance was *p* < 0.05. Statistics was performed by Student's *t*-test

Super resolution imaging analysis showed that the relative distance between TRPV1-ΔANK1 and Orai1 was greater than that between TRPV1 wild type (TRPV1-WT) and Orai1 (Fig. 6d–f). Most interestingly, Orai1-GCaMP3 partially sense changes in calcium when TRPV1-ΔANK1 was activated with capsaicin compared to TRPV1-WT (Fig. 6g). Activation of TRPV1-WT and TRPV1-ΔANK1 with capsaicin results in robust increments in intracellular calcium reported by R-GECO produced as a soluble protein in the cytosol (Supplementary Fig. 5), discarding the possibility that the reduced sensing of calcium entering via TRPV1-ΔANK1 by Orai1-GCaMP3 may be the result of reduced calcium influx by the TRPV1-ΔANK1 deletion mutant. Furthermore, TRPV1-ΔANK1 does not co-immunoprecipitate with Orai1 (Supplementary Fig. 5).

Activation of TRPV1-ΔANK1 using our sequential activation patch clamp protocol showed only reduced CDI in Orai1 while TRPV1-WT produced strong CDI as previously shown (Fig. 3 and Supplementary Fig. 6). To discard any nonspecific effects of capsaicin on ionic currents, we conducted additional controls using the synthetic antagonist of capsaicin, capsazepine (Supplementary Fig. 5). Capsazepine stimulation had no effect on Orai1 CDI. Furthermore, the activation of TRPV1 with capsaicin in cells incubated with BAPTA-AM showed no effect on Orai1 CDI, strongly supporting the hypothesis that the CDI observed on Orai1 is the result of increments in intracellular calcium mediated by TRPV1 (Supplementary Fig. 5).

These results highlight the role of the first ankyrin domain in the association of TRPV1 to the carboxyl terminus from Orai1. This molecular interaction supports the formation of a complex between Orai1 and TRPV1, bringing the two channels in close proximity. This association between both channels favors the generation of a calcium microenvironment near the Orai1 channel pore when TRPV1 is activated, which modulates CDI on Orai1. The strong CDI observed in Orai1 channels induced by the activation of TRPV1 remains even after TRPV1 is not active anymore (Fig. 3c). These results suggest that calcium entering TRPV1 triggers the initial steps of CDI on Orai1 channels, but a sustained mechanism maintains CDI even when the influx of calcium through TRPV1 has been stopped (by washing out capsaicin). The sustain CDI can be explained by the fact that FCDI is modulated by Orai1-STIM1 interactions and not only high calcium near the Orai1 pore. Such Orai1-STIM1 interactions are mediated by the STIM1-Orai1 expression ratio¹⁶ an amino acid region negatively charged in STIM1 (residues 475–483)^{17–21} from Orai1²².

CDI may prevent excessive calcium entry into the cell when both channels (TRPV1 and Orai1) are activated simultaneously or sequentially.

To facilitate the study of the interactions between TRPV1 and Orai1 and the identification of the amino acid domains involved in this association, we conducted all the experiments described to this point in HEK293 cells. However, in order to assess the effect of TRPV1-induced CDI on Orai1 channels in a physiological model, we implemented a scratch-wound assay (SWA) using primary cultures of cortical astrocytes. We have previously shown that the majority of thrombin-activated calcium influx in cortical astrocytes is carried by Orai1 channels²⁸. Cortical astrocytes express TRPV1 channels²⁹. Furthermore, thrombin plays a key role in astrocyte migration and wound healing^{30–32}.

First, we validated that our Orai1-GCaMP3 sensor behaved in astrocytes similarly to what we have observed in HEK293 cells. Indeed, primary cultures of cortical astrocytes expressing our Orai1-GCaMP3 calcium sensor responded to capsaicin stimulation but not to the activation of P2X₄ purinergic receptors with CTP (Fig. 7a). Nevertheless, astrocytes respond normally to CTP with a robust increment in intracellular calcium measured with the soluble calcium sensor R-GECO (Fig. 7a). Orai1-GCaMP3 senses also calcium increments induced with TG (Fig. 7a). All these results recapitulate what we observed with HEK293 cells expressing our Orai1-GCaMP3 construct (Fig. 2).

Capsaicin induces CDI on endogenous Orai1 currents from cortical astrocytes but not CTP stimulation (Fig. 7b). Furthermore, expression of the first ankyrin domain in astrocytes (ANK1-GFP) reduces the amount of CDI obtained with capsaicin pre-stimulation in our sequential perforated patch clamp protocol (Fig. 7c, d). Endogenous TRPV1 immunoprecipitate with endogenous Orai1 in cortical astrocytes (Supplementary Fig. 7), similarly to what we observed with the overexpression of these channels in HEK293 cells (Fig. 4d).

Using the SWA model, we have found that endogenous Orai1 participates in thrombin-induced cell migration and wound healing with cortical astrocytes, since transfection with a selective siRNA for Orai1²⁸ prevents the effects of thrombin on wound healing (Supplementary Fig. 7).

Capsaicin stimulation previous to activation of Orai1 with thrombin significantly reduces wound healing (Fig. 7e, f), this effect is not observed with the synthetic antagonist of capsaicin, capsazepine (Supplementary Fig. 7). Expressing the ANK1-GFP domain in cortical astrocytes prevents the effect of capsaicin on thrombin-induced wound healing (Fig. 7e, f).

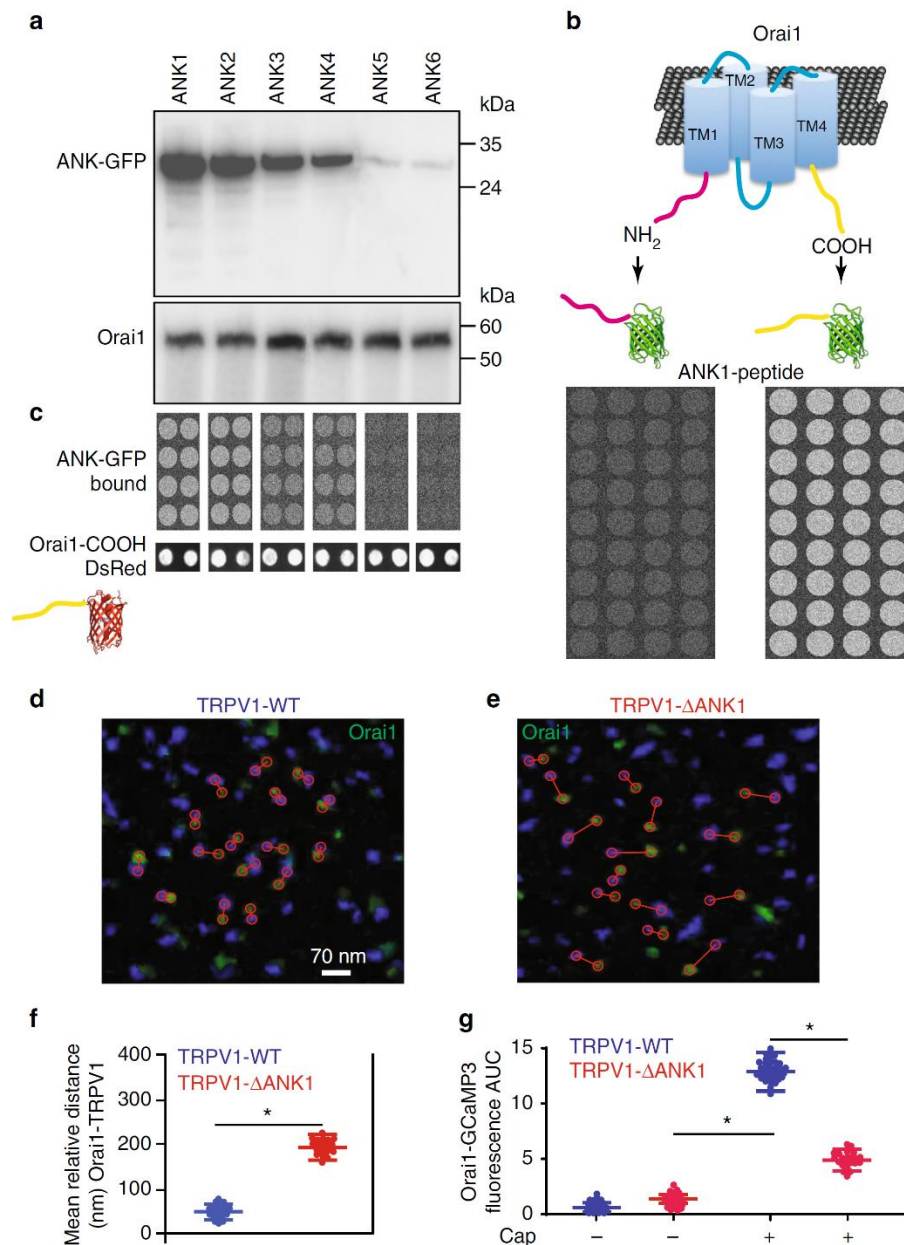


Fig. 6 The first ankyrin domain from TRPV1 associates to the carboxyl domain from Orai1 to favor TRPV1-Orai1 association. **a** Co-immunoprecipitation analysis of cells expressing c-Myc-Orai1 and the 6 ankyrin domains fused to GFP (ANK1-ANK6). **b** Cartoon showing the fusion of the amino or the carboxyl terminus from Orai1 to GFP. Lower panels show the results of the peptide microarrays using ANK1 as bait. Notice that only COOH-GFP is captured by ANK1 but not NH₂-GFP. **c** Peptide microarrays using the 6 ankyrin domains individually fused to GFP. In this case Orai1-COOH is used as bait (printed on the glass coverslip). Notice that Orai1-COOH retained ANK1-GFP, ANK2-GFP and less efficiently ANK3 and ANK4 but not ANK5 and ANK6. **d** Super resolution TIRFM images of cells expressing TRPV1 wild type (TRPV1-WT, blue) and Orai1 (green) or cells expressing TRPV1-ΔANK1 (right panel, **e**). Red circles show the distance between the closest pair of channels and the lines connect the pair. **f** Mean relative distance obtained from hundreds of individual channels for Orai1 with TRPV1-WT (blue) or TRPV1-ΔANK1 (red). Data shows the mean \pm standard deviation. **g** Fluorescence increments reported by the Orai1-GCaMP3 sensor with and without capsaicin stimulation. Notice that the Orai1-GCaMP3 increases about half the fluorescence after capsaicin in cells expressing TRPV1-ΔANK1 (red bar) compared to the cells stimulated with capsaicin and expressing TRPV1-WT (green). This indicates that deletion of the first ANK domain results in Orai1 moving apart from TRPV1 and the Orai1-GCaMP3 sensor reporting less of the calcium that enters through the TRPV1 channel. * $p < 0.01$. The statistical significance was $p < 0.05$. Statistics was performed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test

All these results strongly suggest that the activation of endogenous TRPV1 channels in cortical astrocytes modulate the activity of endogenous Orai1 channels by inducing CDI and reducing calcium entry through Orai1 channels. Enhanced CDI reduces thrombin-induced cell migration and

wound healing. The results presented here provide the first evidence, to our knowledge, of the role of Orai1 in thrombin-activated cell migration and wound healing, while highlighting the role of CDI on Orai1 activity during this physiological process.

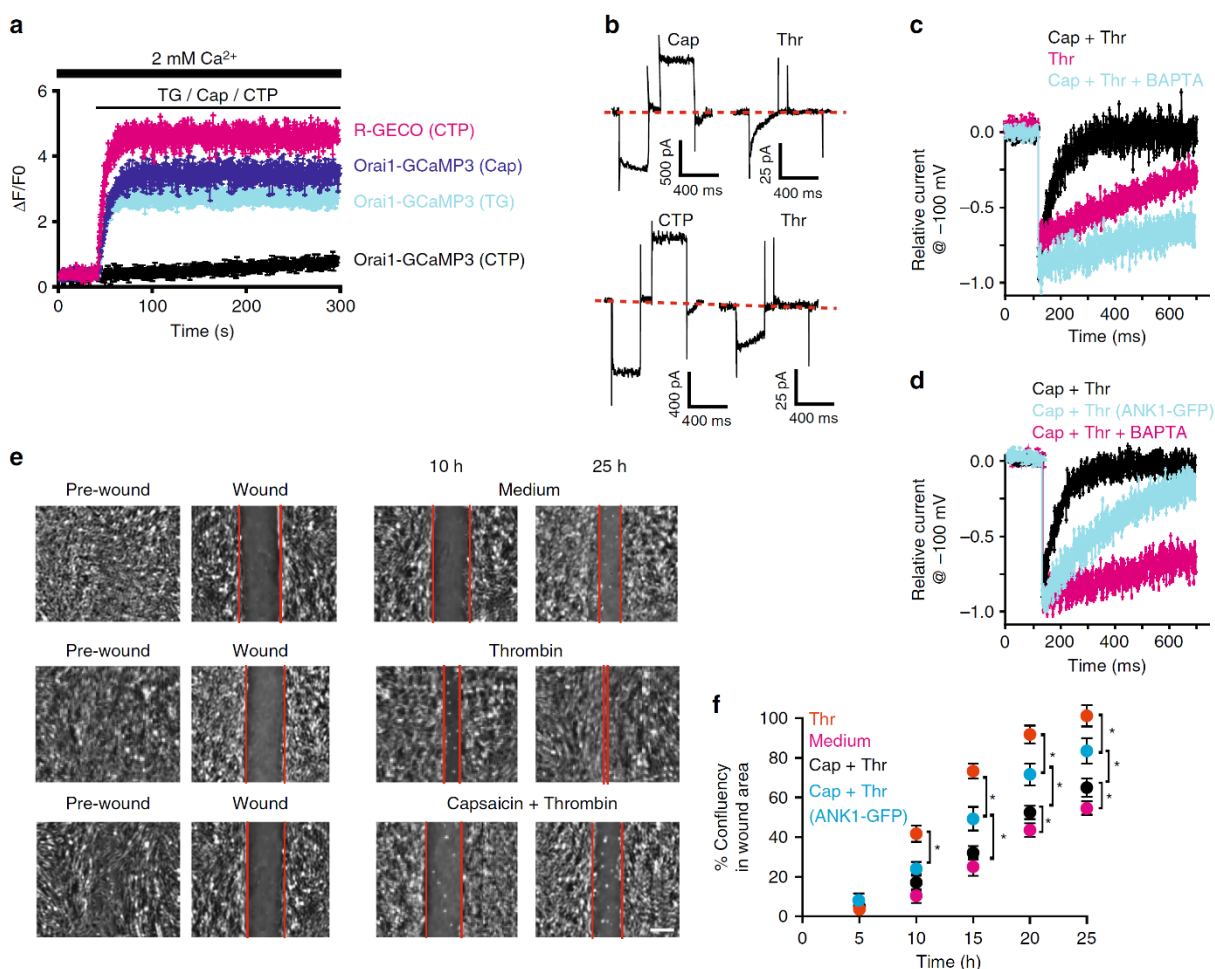


Fig. 7 TRPV1 induced CDI on Orai1 modulates wound healing. **a** Cell population calcium measurements obtained with cortical astrocytes primary cultures transfected with Orai1-GCaMP3. Endogenous TRPV1 and P2X₄ were used. Orai1-GCaMP3 senses calcium increments evoked with capsaicin (500 nM, blue) and TG (1 μ M, cyan) but not with CTP (black). CTP induces robust calcium increments as reported by R-GECO (magenta). Data shows the mean \pm standard deviation from at least 10 independent measurements obtained from 5 different cultures. **b** Stimulation with capsaicin (500 nM) prior to activation of Orai1 with thrombin induces strong CDI. CTP stimulation induces large P2X₄ currents, however not CDI in Orai1 (activated by thrombin). **c** Perforated patch measurements of currents evoked by a voltage step from 0 to -100 mV in response to capsaicin followed by thrombin (black lines), thrombin alone (magenta) and capsaicin + thrombin in cells incubated with BAPTA-AM (cyan). BAPTA incubation strongly reduces CDI in cells stimulated with capsaicin and thrombin. Capsaicin incubated for 3 min and then the cells were washed with fresh PBS for 3 min prior to thrombin stimulation. **d** Perforated patch measurements of currents evoked by a voltage step from 0 to -100 mV in response to capsaicin + thrombin in cells expressing TRPV1 (black) and cells expressing also the ANK1-GFP domain (cyan) and cells incubated with BAPTA-AM (magenta). **e** Scratch-wound assay in cortical astrocytes. Representative photographs of the cell culture around the wound area are shown for 10 and 25 h after wound. Medium shows the cells that were maintained in DMEM. Thrombin indicates cells treated with thrombin (5 U mL⁻¹ thrombin) for 3 min⁴². Cell cultures were exposed to capsaicin (500 nM) for 3 min and then incubated with thrombin (5 U mL⁻¹ thrombin) for 3 min. **f** Percentage of confluency in wound area under the different treatments shown in **e**. Cells were also transfected with a construct carrying ANK1-GFP (blue). Data points show the mean \pm standard deviation from at least 5 cell culture dishes for each condition. * $p < 0.01$. The statistical significance was $p < 0.05$ according to ANOVA

Discussion

The present study identifies the molecular determinants of the association between TRPV1 and Orai1 channels, which favor heterologous CDI of Orai1 by calcium entering through single TRPV1 channels. Using super resolution studies on living cells, we observed that both channels move associated at the PM. This physical interaction results in relevant physiological modulation of channel activity (TRPV1 contributes to CDI on Orai1). This was not observed for another channel that does not associate to Orai1, the purinergic P2X₄ receptor, even though activation of this receptor/channel results in robust increments in cytosolic calcium as reported by our cytosolic soluble sensor, R-GECO.

CDI is a regulatory process that prevents excessive calcium influx via Orai channels, which may have deleterious or toxic effects in the cell. Up until now, this phenomenon has been studied using electrophysiological whole-cell current measurements evoked by Orai channels. To induce CDI under these conditions, the extracellular and/or intracellular calcium concentrations have been artificially controlled. To our knowledge, this is the first report showing that a physiological source of calcium (e.g., activation of TRPV1) can induce CDI on Orai1 both in an heterologous expression system (HEK293 cells) and in cell that naturally express both channels (cortical astrocytes). We have shown that the induction of CDI is the result of the close

proximity between Orail and TRPV1 at the PM, since the activation of a different channel (P2X₄) did not induce CDI on Orail. Furthermore, super resolution studies show that both channels (TRPV1 and Orail) move in close proximity to each other. This was not observed for P2X₄ and Orail. The use of our local calcium reporter Orail-GCaMP3 in super resolution studies shows that Orail single channels detect increments in calcium mediated by the activation of TRPV1 while freely diffusing at the PM. However, our Orail-GCaMP3 sensor does not detect increments in calcium mediated after the activation of P2X₄. These results obtained with super resolution studies indicate that Orail and TRPV1 are moving in close proximity to each other, maintaining a microenvironment where calcium entering via TRPV1 accumulates and induces CDI in Orail.

Super resolution analysis showed at least a 4-fold greater distance between P2X₄ and Orail, when compared to the distance between TRPV1 and Orail (Fig. 5). The average distance between individual TRPV1 and Orail channels obtained from super resolution studies was around 50 nm. This distance contrasts to that observed with our FRET studies (less than 10 nm). The discrepancy can be explained by the resolution limits attained by both methods. While FRET detects distances between two proteins smaller than 10 nm (100 Å), the super resolution method (even though has gone beyond the light diffraction limit) it is still far away from the resolution of FRET. For example, STED (stimulated emission depletion) imaging has achieved a resolution of 20 nm when using organic dyes and 50–70 nm resolution when using fluorescent proteins³³. The association of Orail and TRPV1 channels was evaluated also with CoIP studies. Even though all CoIP studies presented here are in agreement with the FRET and super resolution results, we would like to highlight the fact that the molecular weight obtained from Orail (~55 kDa) differs from the predicted molecular weight for this protein (~33 kDa). Thus, we would like to take the CoIP studies with caution, even though other reports have found similar discrepancies in the molecular weight for Orail^{34,35}. Feasible explanations for the higher molecular weight observed may involve glycosylation, phosphorylation, and other post-translational modifications of Orail^{36–38}.

We have identified the first ankyrin domain (ANK1) as a structure responsible for the association of TRPV1 to the carboxyl terminus from Orail. Deletion of this ANK1 domain (TRPV1-ΔANK1) prevents TRPV1-mediated CDI on Orail. Single Orail-GCaMP3 channels do not longer sense calcium entering through TRPV1-ΔANK1.

A previous study shows that capsaicin inhibits Jurkat T-cell activation by blocking I_{CRAC}³⁹. Other studies have also shown that capsaicin or TRPV1 activation inhibits SOCE^{40–43}. However, the molecular mechanism for these observations remained unknown until now.

CDI is a complex process, which involves the participation of several proteins such as SARAF¹¹, caveolin, E-syt1, septin4, and PI(4,5)P₂¹³. Furthermore, several amino acid regions have been identified in Orail and STIM1 to play a role in CDI^{17–21}. This may be one of the reasons why CDI remained for several minutes after TRPV1 was not active anymore. Calcium entering through TRPV1 channel was the triggering event that initiated CDI in neighboring Orail channels, but other factors were involved in the sustained CDI even after the calcium source (TRPV1) was not active anymore (after washing out capsaicin).

In the present study, we focused our attention on the role of a different channel (TRPV1) in the induction of CDI on Orail, to induced what we have named here heterologous CDI (as opposed to homologous CDI, which is induced by calcium entering via the Orail channel pore). We identified the ankyrin 1 domain from TRPV1 and the carboxyl terminus from Orail as sequences required for the association of these two channels. We cannot

discard the participation of other proteins (as those mentioned above) or other amino acid regions in CDI. Further studies are required to evaluate the participation of other proteins and/or amino acid regions in Orail and TRPV1 in CDI.

Many cells and tissues express both TRPV1 and Orail channels, in particular cortical astrocytes. In these cells, activation of TRPV1 may modulate the subsequent (or concomitant) activation of Orail channels⁴⁴. The role of astrocytes in chronic pain is well established⁴⁴. We have previously shown that Orail mediates the thrombin response in cortical astrocytes²⁸. Furthermore, thrombin induces cell migration and proliferation in astrocytes^{30–32}.

In the present study, we have shown that the activation of endogenous TRPV1 channels with capsaicin induces CDI on endogenous Orail channels from cortical astrocytes. In this study, we showed that the heterologous modulation of Orail by TRPV1 via CDI plays a role in controlling injury-promoted astrocyte migration (Fig. 7). All these results provide the first evidence highlighting the role of heterologous CDI in controlling calcium entry via Orail and how this modulates migration in astrocytes primary cultures.

Methods

Plasmids and reagents. Capsaicin and the synthetic antagonist of capsaicin, capsazepine and cytidine triphosphate (CTP) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). TG was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA).

Plasmids Orail-GFP, GCaMP3, STIM1-DsRed, H2B-mCherry, and Lck-GCaMP5 were purchased from Addgene (Cambridge, MA), R-GECO was a generous gift from Dr. Takeharu Nagai (Osaka University, Japan), TRPV1-CFP and TRPV1-YFP were kindly donated by Dr. Leon Islas-Suárez (Facultad de Medicina, UNAM), CFP-P2X₄ was a generous gift of Dr. Jorge Arreola (Instituto de Física, UASLP). Full length complementary DNA of human-Orail was inserted into GCaMP3 between BamHI and EcoRI to generate Orail-GCaMP3. All constructs were fully sequenced before using them.

Ankyrin domains fused to GFP. Oligonucleotides were synthesized (Integrated DNA Technologies, Skokie, IL) to generate peptides corresponding to the amino acid sequences for the 6 ankyrin (ANK) domains from rat TRPV1 (Genbank NM_031982). Ankyrin domains were obtained from ref. ⁴⁵.

Oligonucleotides were cloned in the pDrive plasmid after PCR amplification and cloned in frame at the 5' of GFP. The resulting peptides were:

ANK1 110.152 (42 aa) RLYDRRSIFDAVAQNSQCLESLLPFLQRSKRLTDS EFKDPE

ANK2 153.199 (46 aa) TGKTCLLKAMLNLHNGQNDTIALLLDVARKTDLSL KQFVNASYTDSYY

ANK3 200.246 (46 aa) KGQ TALHIAIERRNMTLVTLVENGADVQAAANG DFFKTKGRPGFY

ANK4 247.282 (35 aa) FGELPLSLAACTNQLAIVKFLQLNSWQPADISARDS

ANK5 283.331 (48 aa) VGNTVLHALVEVADNTVDNTKFTVSMYNEILLGA KLHPTLKLEIETNR

ANK6 332.358 (26 aa) KGLTPLALAASSGKIGVLAYLQREIH

Followed by the enhanced GFP sequence. All fusion genes were fully sequenced prior to use. For CoIP studies, the pCDNA 3.1 plasmid containing the nucleotide sequences for the 6 ankyrin domains individually fused to the GFP sequence (above) were transfected in HEK293 cells combined with the plasmid containing Orail. For peptide microarray studies, the plasmids mentioned above were transfected in HEK293 cells maintained in suspension in 500 mL flasks to produce fusion proteins. Cells were harvested and sonicated to disrupt the cell membrane. Supernatants were immunoprecipitated using the commercial anti-GFP antibody (632376, Clontech, Mountain View, CA). Aliquots of the 6 ankyrin domains fused to GFP were utilized for TIRFM peptide microarray studies as previously described⁴⁶. Briefly, silica glass was coated with a 0.01 mg mL⁻¹ poly-D-lysine (Sigma, St. Louis, MO). Orail-dsRED-COOH peptide was spotted on the microarray slide using a peptide solution of 500 ng in 50 μL. Approximately 2 μL were manually deposited on each spot using a pipette. Spots were allowed to dry for 20 min at room temperature prior to starting the TIRFM microarray experiment. Microarray slides were mounted on the Ig-TIRFM closed chamber (TIRF Labs, Cary, NC).

A similar PCR strategy was conducted to produce the fusion proteins between the amino terminus from Orail and GFP (NH₂-GFP), the carboxyl terminus from Orail (COOH-GFP), and the carboxyl terminus from Orail fused to the red fluorescent protein (DsRed, Takara Bio, USA). Production and purification of recombinant fused proteins followed the procedure described above. The Orail-COOH domain contained the last 38 amino acids (amino acid 200–238) with the sequence: HKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHYA (Genbank:

AAH13386.1). Followed by the GFP or dsRED protein (Takara Bio, USA). The amino terminus of Orai1 contained the first 54 amino acids (1–54, Genbank: AAH13386.1): MSLSNEHSMQALSWRKLKLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMV EVQLDADHDYPP. Followed by the GFP protein. The deletion mutant TRPV1-RPV1 was produced by PCR amplification of TRPV1 cDNA using a forward oligonucleotide that started after nucleotide 536 (amino acid 153).

Cell culture and transfection. Human embryonic kidney 293 cells (HEK293; ATCC) were cultured using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) supplemented with 10% (V/V) fetal bovine serum, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ penicillin–streptomycin and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 .

Transient transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer instruction using cells seeded to 80% confluence in Optimum medium (GIBCO). Before imaging, culture medium was changed in Krebs solution (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 1.3 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, 11 mM glucose, 1.8 mM CaCl_2 , 500 μM EGTA and adjusted to 7.4 pH).

Western blot. Proteins of cells transfected with Orai1-GCaMP3 or Orai1-GFP were separated using SDS-Page with 10% acrylamide and transferred to the membrane using 110 V for 60 min in a wet chamber. A specific antibody was used to identify Orai1 (ab59330, Abcam) and for TRPV1 the antibody used was VR1 (sc-398417) from Santa Cruz Biotechnology. Primary antibody was incubated with agitation at 4°C for 1 h. The secondary antibody was incubated for 2 h with agitation at room temperature. Signal was acquired using X-ray films and then the image was digitalized and analyzed using ImageJ software. Full-length blots are included in Supplementary Figures.

Confocal microscopy. HEK293 cells transfected with the different constructs and channels were plated on 25 mm coverslips. Cells were imaged in Krebs–Ringer's solution. TG (1 μM ; Calbiochem) was used for store depletion. Image acquisition for co-localization experiments was conducted 12 min after store depletion. Enhanced GFP (EGFP), GCaMP3, DsRed, and R-GECO were excited at 488, 488, 494, and 594 nm, respectively. Fluorescence emission was collected at 500–540 nm for EGFP and GCaMP3 and 605–650 nm for DsRed and R-GECO. All images were captured at room temperature with a $\times 60$, 1.40 numerical aperture oil-immersion objective lens controlled by Fluoview Olympus software on a FV10i confocal microscope (Olympus imaging). Pearson's correlation coefficient was calculated with Fluoview Olympus software.

Ca^{2+} measurements. Calcium imaging was performed in 25 mm coverslip with cells transfected with the plasmid of choice indicated in the figures. Cells expressing Orai1-GCaMP3 in Krebs–Ringer solution with Ca^{2+} were exposed to TG (1 μM) to induce store depletion. Capsaicin (4 μM) was utilized to activate TRPV1 channels and 150 μM cytidine triphosphate (CTP) to open P2X_4 channels. Calcium dynamics were measured in individual cells (at least 20 per coverslip per condition) using a wide-field inverted IX81 Olympus[®] microscope with a $\times 60$ 1.42 NA oil immersion objective, MT-20 illumination system, 420/10, 484/25 excitation filter, and 450, 550/25, 520 nm/40 bandpass and 605/40 bandpass emission filter with an EMCCD camera iXon-897 (Andor Technology, South Windsor, CT, USA). Sampling was acquired each second during 300 s. The acquired images were analyzed using Olympus Cell-R software. To measure calcium increments in cell populations, we loaded HEK293 cells with FURA-2 AM (Molecular Probes) at 2 μM final concentration. FURA-2 AM was incubated for 30 min at 25°C . Calcium-free Krebs solution contained (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 1.3 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, 11 mM glucose, 1 mM EGTA and adjusted to 7.4 pH). Then cells were rinsed with the same solution and were exposed to 1 μM TG to induce store depletion and Orai1 activation. Ca^{2+} entry was measured through an Aminco-Bowman luminescence spectrometer (Thermo Electron, Madison, WI). Dual excitation wavelength was selected at 340 and 380 nm and emission was collected at 510 nm. Fluorescence sampling was acquired each 10 s during 1000 s.

FRET measurements. The cells were seeded on 25 mm coverslips and co-transfected with TRPV1-CFP and Orai1-YFP. We performed FRET measurements using the acceptor photobleaching protocol with TRPV1-CFP as donor and Orai1-YFP as acceptor, as previously described⁴.

For acceptor photobleaching, the images were acquired with an inverted Olympus FV1000 confocal microscope. The photobleaching of the acceptor was performed exposing the selected ROI to the laser at 50% of its maximum intensity (ROI indicated by a yellow square in Fig. 4), at a wavelength of 492 nm. This wavelength does not affect the donor as the excitation of GFP beyond 480 nm is negligible. The photobleaching protocol consisted of continuous excitation at 492 nm for 4 min, during this time, the fluorescence emission of CFP and YFP were monitored using the confocal microscope. Photobleaching excitation was alternated with image acquisition of CFP (460 nm) and YFP (520 nm). We used a 1.45 NA $\times 100$ objective (Olympus, Japan) for image acquisition.

FRET efficiency, which indicates the percentage of excitation photons that contribute to FRET, was calculated measuring the fluorescence intensity in a ROI, before and after photobleaching the acceptor (Orai1-YFP), we also measured the

fluorescence of acceptor and donor in a different ROI (without the photobleaching protocol applied, indicated by a yellow circle in Fig. 4) to correct for photobleaching that might occur during acquisition unrelated to the photobleaching protocol. FRET efficiency was calculated with the formula $E_{\text{FRET}} = (D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}) / D_{\text{pre}}$, where D_{pre} and D_{post} are YFP fluorescence before and after the photobleaching protocol, respectively. The E_{FRET} calculated from the area not subjected to photobleaching (indicated by a yellow circle in Fig. 4) was considered the baseline. This baseline value was indistinguishable from the E_{FRET} obtained between Orai1-YFP and CFP-P2X₄ (Fig. 4). For a detailed description of the protocol, please refer to ref. ⁴⁷.

Electrophysiology. HEK293 cells expressing the different constructs described in Fig. 3 were placed on coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma). Cells were studied between 24 and 48 h post-transfection. Coverslips were mounted on an open perfusion chamber (TIRF Labs, Cary, NC). The patch clamp amplifier used for whole-cell recordings was the EPC-10 (Heka Electronics, Germany). The patch clamp pipettes were prepared from Corning 7052 glass and had a resistance of 1–5 M Ω when filled with the pipette solution (see below). An Ag/AgCl electrode was utilized to attain electrical continuity and was connected to the bath solution via a KCl-agar bridge. TG was applied using a multibarrel perfusion system driven by gravity (TIRF Labs, Cary, NC).

Whole-cell currents were studied in the perforated patch mode. Amphotericin B was dissolved in 50 μL DMSO to give a 60 mg mL^{-1} stock solution and stored at -20°C until use. The amphotericin B stock solution was dissolved to a final concentration of 0.24 mg mL^{-1} in a syringe containing the pipette solution: cesium aspartate 120 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl_2 2 mM, and NaCl 8 mM; pH to 7.2 adjusted with CsOH. The bath solution contained NaCl 120 mM, tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) 10 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 2 mM, glucose 30 mM, and HEPES 10 mM; pH to 7.2 adjusted with NaOH. Osmolarity of both solutions was adjusted to 310 mOsm with mannitol (Sigma).

To determine Orai1 current inactivation, the cell was first stimulated with either 1 μM capsaicin (Cap) or 10 μM cytidine triphosphate (CTP) for approximately 1 min. The solution was removed and washout for 1–2 min with bathing solution before stimulation with 1 μM TG. Relative inactivation was obtained after obtaining the current density relative to the non-inactivating Orai1 Y80W mutant.

Current density was obtained after dividing the current from each cell by the cell capacitance (measured directly from the amplifier readout). The amplifier provided current density in real time calculated via the Patchmaster software and EPC10 electronics (Heka Electronics, Germany). For time courses studying Orai1 whole-cell current activation, TG was applied while the cell membrane potential was held at -100 mV. All whole-cell current illustrated in Fig. 3 represents the mean \pm standard deviation (SD) from at least 30 independent cells obtained from 4 different days and transfections.

Orai1 whole-cell currents were imported into Igor pro v. 7 (Wavemetrics, Oregon) for further analysis and plotting. Final figures were created with Adobe Illustrator (Adobe Systems).

Super-resolution microscopy. The total internal reflection fluorescence (TIRF) excitation (cellTIRF Illuminator; Olympus) system was mounted on an Olympus IX81 inverted microscope for all super resolution experiments reported here. The excitation angle was set up to attain the critical angle for total internal reflection, which provided a penetration of less than 100 nm. Cells were continuously illuminated using excitation sources depending on the fluorophore studied. Blue (CFP-P2X₄) and green (Orai1-YFP) were excited with either a 405 and 491-nm diode-pumped solid-state laser, respectively. Cells were continuously illuminated using the following excitation sources: blue (CFP-P2X₄) and green (Orai1-YFP) were excited with either a 405 and 491-nm diode-pumped solid-state laser, respectively. The maximum laser power, measured at the back of the focal plane of the objective lens, ranged between 20 and 25 mW, depending on the laser line used. Excitation wavelength and intensity were modulated using the Xcellence software v.1.2. A multiband laser cube set was used to discriminate the selected light sources (LF 405/488/561/635 A-OMF, Bright Line; Semrock). The microscope was equipped with an Olympus UApO N $\times 100/1.49$ -numerical-aperture oil-immersion objective lens with an extra $\times 1.6$ intermediate magnification lens. All movies were recorded on a crop chip mode (512 \times 32 pixels) of an EMCCD camera (Andox, Ixon 888) at 100 nm per pixel.

For each independent experiment, sub-diffraction images were derived from the Super Resolution Radial Fluctuation (SRRF) analysis⁴⁸. Reconstructions contained thousands of TIRF images acquired within the evanescent field. All images were collected using stroboscopic illumination, alternating between laser lines in a per-frame basis, each with an exposure time of 1–5 ms.

Each serial stack (300 images block) was analyzed using the NanoJ-core and NanoJ-SRRF plugins of Image J^{48,49}. For the analysis the following parameters were utilized: ring radius 0.5, radiality magnification 5, axes in ring 10; all other parameters were set up as the default options in NanoJ-core and NanoJ-SRRF plugins. The radiality maps were drift corrected using pre-calculated drift tables obtained with the Estimate Drift tool of NanoJ-SRRF, considering an average of 300 images. These drift-corrected radiality maps were then finally integrated on a super-resolution image by calculating the Temporal Radiality Pairwise Product Mean.

To obtain distances between Orai1 and TRPV1 or Orai1 and P2X₄ overtime, we used the tracking image correlation method⁵⁰. For this purpose, HEK293 cells were transfected with a combination of Orai1-YFP and TRPV1-CFP or Orai1-YFP and CFP-P2X₄, respectively. The signal of individual fluorophores was tracked overtime by alternating the excitation wavelengths, as described above. Temporal blocks of 300 images were analyzed. Tracking image correlation (TrIC) computes a colocalization analysis on single particles along their trajectory based on local image cross-correlation. The accuracy of the correlation is limited to the SRRF, which in our case is between 40 and 60 nm. All of the analysis was programmed with MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) using the original algorithms described by Dupont and collaborators⁵⁰. Unlike the original study, which tracked particles in the 3D space, we conducted only 2D tracking within the depth of the evanescent wave (less than 100 nm). The depth resolution of TIRFM (less than 100 nm) provided high accuracy when determining the 2D spatial localization of the particles when compared to confocal microscopy, which in the best case scenario has a depth resolution of around 600 nm⁵¹.

TIRFM microarrays. For peptide microarrays studies using ankyrin domains fused to GFP, we utilized a novel system specifically developed for this purpose based on total internal reflection microscopy (TIRFM)⁴⁶. We have documented extensively this method elsewhere⁴⁶. Briefly, purified peptides (either the ANK1 domain (see above) or the Orai1-COOH-DsRed terminal domain) were printed using a micropipette on conventional glass microarray slides previously coated with a film of 0.01 mg mL⁻¹ poly-D-lysine (Sigma, St. Louis, MO). The microarray-closed chamber was bathed with a solution containing the ANK domains fused to GFP (see above) at a final concentration of 1 μM. After 3 min incubation, the chamber was bathed with saline solution and fluorescence signal was collected for 1 min. Excitation was in TIRFM mode using the LG-TIRFM system (TIRF Labs, Cary, NC). Excitation was alternated between 405 nm (GFP excitation) and 594 nm (DsRed excitation). DsRed emission was used to evaluate the amount of Orai1-COOH-dsRED deposited on each microarray spot. Microarray spots containing less than 80% of the average DsRed fluorescence were discarded because insufficient Orai1-COOH-dsRED was deposited in those spots. Emission of GFP (D505/40 m) and DsRed (ET620/60 m) were collected using high-quality single band emission filter from Chroma (Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, VT, USA). For details on our TIRFM microarray system and protocols for micro-perfusion and fluorescence detection, please refer to ref. ²⁴.

Co-immunoprecipitation. Plasmids c-Myc-Orai1 and TRPV1-YFP or CFP-P2X₄ were overexpressed in HEK293 cells. Cells were washed twice with PBS, then the cells were lysed with TNI lysis buffer⁵² (0.5% Igepal CA-630, 50 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1× Complete ULTRA-EDTA-free protease inhibitor cocktail) during 30 min at 4 °C with agitation and sonicated using a bath sonicator (55 kHz, 5 min). The samples were centrifuged 40 min (4 °C, 18,000×g) and the supernatant was incubated overnight with sepharose resin beads coupled to anti-myc antibody. Proteins were recovered by centrifuging the beads (4 °C, 500×g). Bound proteins were eluted with elution buffer⁵² (0.2 M glycine pH 2.3 and 0.5% Igepal CA-630) during 30 min at 37 °C. The proteins were analyzed by western blot using specific antibodies c-myc (Invitrogen, MA1-21316) for c-Myc-Orai1 (50 kDa), VRI (Santa Cruz, 398417) for TRPV1-YFP (125 kDa) and P2X₄ (Abcam, 134559) for CFP-P2X₄ (71 kDa), all the antibodies were used according to the manufacturer's recommendations. For endogenous Orai1 and TRPV1 from astrocytes we use the following protocol. Cells from 5 to 7 100 mm Petri dishes with confluent monolayers of primary culture astrocytes were rinsed and cells were detached mechanically. All cells from the Petri dishes were concentrated and lysed using TNI lysis buffer during 30 min with agitation at 4 °C and sonicated using a bath sonicator (55 kHz, 5 min). The samples were centrifuged 40 min (4 °C, 18,000×g) and the supernatant was incubated overnight with sepharose resin beads coupled to anti-Orai1 antibody. Proteins were recovered by centrifuging the beads (4 °C, 500×g). Bound proteins were eluted with elution buffer during 30 min at 37 °C. The proteins were analyzed by western blot using the specific antibodies described above.

Scratch-wound assay. Primary cortical astrocytes were isolated from rat brains²⁸. All procedures for maintaining the rats and for isolation of astrocytes were approved by the Animal Care Committee of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Animal care was performed according to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Council for International Organizations of Medical Sciences, 2010). Cortical astrocytes cultures were obtained from 1-day-old Wistar rat pups provided by our animal facility center. The astrocytes were isolated from the brain cortex of 6–8 pups. Brains were placed in Krebs solution and cut in small slices. The tissue was dissociated with a solution containing trypsin (4800 U mL⁻¹, Sigma, St. Louis, MO) for 10 min. Cells were mechanically dispersed by passage through 80 μm nylon mesh and resuspended in Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco), 2 mM glutamine (Sigma), 50 U mL⁻¹ penicillin (Gibco), and 50 μg mL⁻¹ streptomycin (Gibco). The dissociated astrocytes were plated on 35 mm plastic Petri dishes and incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂, 95% air atmosphere for 2 weeks.

When indicated astrocytes were transfected with the constructs described in the figure legends²⁸. For RNA interference experiments, astrocytes cultures of 80% confluence in 35 mm plates were transfected with a set of three oligonucleotides of Stealth siRNAs for Orai1 (RSS357633, RSS357634, RSS357635) purchased from Invitrogen. A Stealth RNAi scramble negative control (Invitrogen) was used in parallel experiments. siRNAs transfection was carried out on primary astrocytes using Lipofectamine 2000 and Opti-MEM reduced serum medium according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

For the SWA, we followed the next protocol. Cover glass chambers (ThermoScientific, Rochester, NY) were coated with 0.01 mg mL⁻¹ poly-D-lysine (Sigma, St. Louis, MO). Confluent primary cortical astrocytes were seeded onto chambers²⁸. Once confluent, astrocytes were serum-deprived overnight. A single scratch with a 1 mL pipet tip was made through the astrocyte monolayer, cells were rinsed three times with serum-free media. The scratch area was marked with a sharpie for later identification and positioning in the microscope. Images of cells were obtained with a low magnification ×10 objective attached to an inverted IX81 microscope (Olympus). A low-resolution 5 MP USB c-mount microscope camera (Zowaysoon) attached to the microscope c-port was used to acquire individual images of the scratch wound area at 0 time (pre-wound), immediately after the scratch wound, 5, 10, 15, 20, and 25 h after scratch wound. After every image acquisition cells were placed in the CO₂ incubator.

Reporting summary. Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All constructs used in the present study are available upon request. Super resolution image files are too big (each file is over 1 terabyte in size) to be included in any archiving system but are available upon request. Microarray data is publicly available (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7621955.v1>). Other data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 10 August 2018 Accepted: 5 February 2019

Published online: 04 March 2019

References

- Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21 (2000).
- Bagur, R. & Hajnóczky, G. Intracellular Ca²⁺ sensing: its role in calcium homeostasis and signaling. *Mol. Cell* **66**, 780–788 (2017).
- Redondo, P. C. & Rosado, J. A. Store-operated calcium entry: unveiling the calcium handling signalplex. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **316**, 183–226 (2015).
- Bohórquez-Hernández, A., Gratton, E., Pacheco, J., Asanov, A. & Vaca, L. Cholesterol modulates the cellular localization of Orai1 channels and its disposition among membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1481–1490 (2017).
- Muik, M., Schindl, R., Fahrner, M. & Romanin, C. Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) current, structure, and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 4163–4176 (2012).
- Mullins, F. M. & Lewis, R. S. The inactivation domain of STIM1 is functionally coupled with the Orai1 pore to enable Ca²⁺-dependent inactivation. *J. Gen. Physiol.* **147**, 153–164 (2016).
- Roos, J. et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J. Cell Biol.* **169**, 435–445 (2005).
- Liou, J. et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr. Biol.* **15**, 1235–1241 (2005).
- Feske, S. et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179–185 (2006).
- Zweifach, A. & Lewis, R. S. Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 14445–14451 (1995).
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R. & Reuveny, E. SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* **149**, 425–438 (2012).
- Li, X. et al. Calmodulin dissociates the STIM1-Orai1 complex and STIM1 oligomers. *Nat. Commun.* **8**, 1042 (2017).
- Maléth, J., Choi, S., Muallem, S. & Ahuja, M. Translocation between PI(4,5)P₂-poor and PI(4,5)P₂-rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating. *Nat. Commun.* **5**, 1–10 (2014).
- Zweifach, A. & Lewis, R. S. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* **105**, 209–226 (1995).

15. Fierro, L. & Parekh, A. B. Membrane biology fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current. *J. Membr. Biol.* **168**, 9–17 (1999).
16. Scrimgeour, N., Litjens, T., Ma, L., Barritt, G. J. & Rychkov, G. Y. Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins. *J. Physiol.* **587**, 2903–2918 (2009).
17. Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E. & Lewis, R. S. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15495–15500 (2009).
18. Lee, K. P. et al. Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 14687–14692 (2009).
19. Derler, I. et al. A Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca²⁺-dependent inactivation of ORAI1 channels. *J. Biol. Chem.* **284**, 24933–24938 (2009).
20. Srikanth, S., Jung, H. J., Ribalet, B. & Gwack, Y. The intracellular loop of Orai1 plays a central role in fast inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **285**, 5066–5075 (2010).
21. Mullins, F. M., Yen, M. & Lewis, R. S. Orai1 pore residues control CRAC channel inactivation independently of calmodulin. *J. Gen. Physiol.* **147**, 137–152 (2016).
22. Desai, P. N. et al. Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message. *Sci. Signal.* **8**, ra74 (2015).
23. Shigetomi, E., Kracun, S. & Khakh, B. S. Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol.* **6**, 183–191 (2010).
24. Asanov, A., Zepeda, A. & Vaca, L. A platform for combined DNA and protein microarrays based on total internal reflection fluorescence. *Sensors* **12**, 1800–1815 (2012).
25. Vaca, L. Microarrays showing binding of the six ankyrin domains from TRPV1 to Orai1 carboxyl terminus. Figshare. Fileset. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7621955.v1> (2019).
26. Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B. & Gaudet, R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905–918 (2007).
27. Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V. & Niemeyer, B. A. Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J. Biol. Chem.* **279**, 34456–34463 (2004).
28. Moreno, C., Sampieri, A., Vivas, O., Pena-Segura, C. & Vaca, L. STIM1 and Orai1 mediate thrombin-induced Ca(2+) influx in rat cortical astrocytes. *Cell Calcium* **52**, 457–467 (2012).
29. Huang, C. et al. Existence and distinction of acid-evoked currents in rat astrocytes. *Glia* **58**, 1415–1424 (2010).
30. Wang, H., Ubl, J. J., Stricker, R. & Reiser, G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C1351–C1364 (2002).
31. Ebrahimi, S. et al. Role of thrombin in the pathogenesis of central nervous system inflammatory diseases. *J. Cell. Physiol.* **232**, 482–485 (2017).
32. Lin, C.-C. et al. Thrombin mediates migration of rat brain astrocytes via PLC, Ca²⁺, CaMKII, PKC α , and AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol. Neurobiol.* **48**, 616–630 (2013).
33. Hell, S. W. Far-field optical nanoscopy. *Science* **316**, 1153–1158 (2007).
34. Sahu, I. et al. NFAT5-sensitive Orai1 expression and store-operated Ca²⁺ entry in megakaryocytes. *FASEB J.* **31**, 3439–3448 (2017).
35. Michiels, C. F., Franssen, P., De Munck, D. G., De Meyer, G. R. Y. & Martinet, W. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells alters contractility and Ca²⁺ homeostasis in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **308**, H557–H567 (2015).
36. Henke, N. et al. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell Death Dis.* **4**, e470 (2013).
37. Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A. & Putney, J. W. Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J. Cell Sci.* **125**, 4354–4361 (2012).
38. Penna, A. et al. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**, 116–120 (2008).
39. Fischer, B. S., Qin, D., Kim, K. & McDonald, T. V. Capsaicin inhibits Jurkat T-cell activation by blocking calcium entry current I(CRAC). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 238–246 (2001).
40. Choi, S. Y. & Kim, K. T. Capsaicin inhibits phospholipase C-mediated Ca(2+) increase by blocking thapsigargin-sensitive store-operated Ca(2+) entry in PC12 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 107–114 (1999).
41. Wang, J. P. et al. Capsaicin stimulates the non-store-operated Ca²⁺ entry but inhibits the store-operated Ca²⁺ entry in neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **209**, 134–144 (2005).
42. Fischer, B. S. et al. Capsaicin inhibits Jurkat T-cell activation by blocking calcium entry current I CRAC. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 238–246 (2001).
43. Gouin, O. et al. Major role for TRPV1 and InsP3R in PAR2-elicited inflammatory mediator production in differentiated human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1564–1572 (2018).
44. Zhang, E. & Liao, P. Brain transient receptor potential channels and stroke. *J. Neurosci. Res.* **93**, 1165–1183 (2015).
45. Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. & Julius, D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* **504**, 113–118 (2013).
46. Asanov, A., Zepeda, A. & Vaca, L. A novel form of Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (LG-TIRFM) reveals different and independent lipid raft domains in living cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 147–155 (2010).
47. Van Munster, E. B., Kremers, G. J., Adjobo-Hermans, M. J. W. & Gadella, T. W. J. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. *J. Microsc.* **218**, 253–262 (2005).
48. Gustafsson, N. et al. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat. Commun.* **7**, 12471 (2016).
49. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
50. Dupont, A., Stirnmagel, K., Lindemann, D. & Lamb, D. C. Tracking image correlation: combining single-particle tracking and image correlation. *Biophys. J.* **104**, 2373–2382 (2013).
51. Cox, G. & Sheppard, C. J. R. Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy. *Microsc. Res. Tech.* **63**, 18–22 (2004).
52. Pankow, S., Bamberger, C., Calzolari, D., Bamberger, A. & Yates, J. R. Deep interactome profiling of membrane proteins by co-interacting protein identification technology. *Nat. Protoc.* **11**, 2515–2528 (2016).

Acknowledgements

L.V. and A.D. were supported by grants from Direccion General de Asuntos del Personal Academico (DGAPA) UNAM and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (Conacyt). C.E.B.-E. (CVU 486558) performed this study in partial fulfillment of the requirements for the PhD in Programa de Maestria y Doctorado en Ciencias Bioquímicas at the Universidad Nacional Autónoma de México and he is recipient of PhD fellowship (277682) from CONACYT. The authors would like to thank the imaging, the molecular biology, computing center and animal facility center from the Instituto de Fisiología Celular, UNAM for their support on image acquisition and analysis and for sequencing and primer synthesis for molecular biology and providing animals for this study. The authors thank the Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada, UNAM for their assistance on image acquisition and analysis for the super resolution studies.

Author contributions

C.E.B.-E., A.B.-H., J.P., A.S., A.A., J.P.O.-O., A.G., and A.D. performed experiments. C.E. B.-E., A.G., J.P., and L.V. analyzed data. C.E.B.-E., J.P., A.B.-H., and L.V. produced figures. C.E.B.-E. and L.V. wrote the manuscript. All authors revised and approved the final version.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0338-1>.

Competing interests: Dr. Alexander Asanov is the CEO of TIRF Labs. The Ig-TIRFM system is the property of TIRF Labs. TIRF Labs did not provide any financial support for this study, only equipment. The remaining authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



Review

Super-resolution microscopy for the study of store-operated calcium entry

Carlos Bastian^a, Alicia Sampieri^a, Manuel Ortíz Benavides^b, Adán Guerrero^c, Luis Vaca^{a,*}^a Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, Mexico^b Taller de electrónica y mecánica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, Mexico^c Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

SOCE
Super-resolution, STIM1
Orail

ABSTRACT

The use of a variety of techniques based on super-resolution (SR) microscopy unveiled a close and complex relationship between cytoskeleton reorganization and SOCE. By using SR microscopy many new proteins involved in SOCE regulation have been identified over the last few years. Many enigmas remain unsolved in this highly dynamic field, however, recent developments in SR microscopy promise new answers soon. In the present review, we describe the most relevant findings in SOCE components and SOCE modulation using different methods derived from SR microscopy.

1. Introduction

The ion calcium is one of the most relevant second messengers in the cell. Calcium has numerous roles in very different processes ranging from cellular division to cellular death; for this reason, calcium concentration is finely controlled. During evolution, cells have acquired a sophisticated toolkit to regulate the intracellular calcium concentration. This kit is composed of calcium pumps, calcium sensors, calcium buffering systems, calcium-activated enzymes and calcium permeable ion channels.

One of the most important mechanisms for the control of calcium in non-excitatory cells is the store-operated calcium entry (SOCE), which is constituted mainly of Orail channels and the protein calcium sensor STIM1 (Stromal interaction molecule 1). These molecules are the core of the SOCE, however other proteins also have important roles. SOCE is physiologically relevant in many processes, such as B- and T-cell activation [1,2], releasing of histamine and serotonin in mast cells [3], proliferation [4], differentiation [5], control of gene expression [6] and many other cellular mechanisms [7].

SOCE is activated by stimuli that release calcium from the endoplasmic reticulum (ER), which is the main reservoir of calcium in the cell. Calcium release from the ER begins when G-protein-coupled receptors activate phospholipase C, provoking the generation of inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃), which binds to the IP₃ receptors (IP₃R) located at the ER membrane, opening this channel, and leading to the release of calcium from the ER into the cytosol. The decrement of calcium in the ER is sensed by STIM1, which then oligomerizes and accumulates at ER-

plasma membrane (ER-PM) junctions, where this protein recruits and activates Orail channels, resulting in calcium influx [8,9].

In the last decade, many studies have presented new advances in our understanding of the molecular interactions and dynamics of SOCE components. In recent years super-resolution (SR) microscopy has provided new insights into the assembly of the SOCE complex at very high resolutions. The present review summarizes recent findings on the structural and functional aspects of SOCE, where SR microscopy has played a significant role.

2. SOCE components

2.1. STIM and Orail

Store-operated calcium entry (SOCE) is a phenomenon identified early as the activation of calcium influx into the cell, triggered by the depletion of intracellular calcium from the ER [10]. This mechanism of calcium mobilization was initially identified in parotid acinar cells and named capacitative calcium entry [11]. The more appropriate name Store-Operated Calcium Entry (SOCE) was later adopted in the field [12].

For many years the molecular mechanisms linking the depletion of the ER with the subsequent activation of calcium entry were unclear. In 2005, RNA interference (RNAi) screening studies in *Drosophila* S2 cells identified STIM (dSTIM) as an ER membrane protein that senses the changes in the calcium concentrations in ER lumen, two months later were identified the mammalian homologs STIM1 and STIM2 in HELA

* Corresponding author.

E-mail address: lvaca@ifc.unam.mx (L. Vaca).<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102595>

Received 22 March 2022; Received in revised form 3 May 2022; Accepted 5 May 2022

Available online 6 May 2022

0143-4160/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

cells [13,14].

STIM1 was originally identified as a ubiquitously expressed tumor suppressor protein. STIM1 is a 77 kDa single pass ER membrane protein and is divided in several domains, the luminal N-terminal portion contains an EF-hand motif and SAM (sterile α motif) domain, have a transmembrane region, and the C-terminal portion, which includes 3 coiled-coiled domains (CC1–3), a serine-proline-rich domain and a lysine-rich domain. STIM1 has been established as an ER calcium sensor. Its EF-hand domain in N-terminal binds calcium in the range of resting ER calcium concentrations ($K_d = \sim 200\text{--}600 \mu\text{M}$) [15].

Once the calcium ER sensor STIM was identified, many attempts were directed to the identification of the channel responsible for calcium influx after ER depletion. The so-called Calcium-Release Activated Calcium Current (I_{crac}) channel was identified in 2006, after a genetic analysis of patients suffering hereditary severe combined immune deficiency (SCID) syndrome [16]. In the same year was demonstrated that the combined expression of Orai and STIM1 reconstitutes SOCE and I_{crac} [17].

2.2. Orai1 and STIM1 interactions

Since most of the STIM1 protein is located at the ER while the majority of Orai channels reside at the plasma membrane of the cells, it became obvious earlier in the study of these two proteins that they most come in closed proximity to interact and for STIM1 to activate calcium influx via Orai1. Several studies have identified the protein sequences or domains in charge of the association between STIM1 and Orai channels [18]. The physical interaction between ER and PM poses a very interesting challenge particularly well suited for microscopy studies. Unfortunately, physics imposes a resolution barrier to classical optical microscopy limiting its capacity to observe events occurring at the nanoscale level: the so-called light diffraction limit [19]. While electron microscopy provides higher resolution compared to optical microscopy, unfortunately, electron microscopy does not provide any temporal resolution and the dynamics of protein-protein interactions cannot be resolved using electron microscopy. This is the main reason why optical microscopy has benefitted so much from the improvements provided in spatial resolution by the recent development of super-resolution (SR) methods.

Even though in mammals there are 3 genes (Orai1–Orai3) encoding Orai channels, most of the SR microscopy studies have been directed to the study of Orai1. A similar phenomenon has been observed with STIM proteins. There are two STIM genes, but the focus of most SR microscopy studies has been placed on STIM1. Several studies have shown that Orai2 and Orai3 are mainly present in intracellular membranes, but SR microscopy research is still lacking with these two channels.

For many years it was known that 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) at low concentrations ($< 5 \mu\text{M}$) was a potentiator of SOCE and I_{crac}, but at higher concentrations ($> 10 \mu\text{M}$) was an inhibitor [20]. The mechanisms responsible for SOCE activation by low concentrations of 2-APB remained unclear. In 2017 we showed that Orai3 forms an ER leak channel activated by 2-APB [21]. The leak of calcium from the ER via Orai3 channel results in the subsequent activation of SOCE.

3. Fluorescence microscopy

Much of our knowledge concerning cell biology at the cellular and molecular level has come from various microscopy techniques. From four hundred years ago with the first studies of biological structures by pioneers like Hooke or Van Leeuwenhoek to today, the invention of light microscopy strongly influenced biological research.

Fluorescence microscopy (FM) is currently one of the most versatile and powerful techniques of light microscopy available for biological sciences, for two important advantages: noninvasive molecule-specific labeling of cellular components and live-cell monitoring in real-time. FM is one of the leading technologies used to drive discoveries in

modern biology [22–24].

Confocal microscopy (CM) is perhaps one of the most important innovations in FM, mainly because generates high-contrast images through optical sectioning, and additionally improves the resolution obtained with FM by advancing imaging into the third dimension [25, 26].

Unfortunately, the optical resolution of FM (including CM) is limited by the nature of the light. The diffraction of the light imposes a limitation on the spatial resolution of about 200–300 nm in the lateral direction (x - y) and 500–700 nm in the axial direction (z), this is nearly two orders of magnitude larger than the size of a typical protein molecule [27–29], therefore FM and confocal microscopy might be sufficient for observe whole-cell dynamics or tissue morphology, for example, but are inadequate for studies of organelles, subcellular structures or multi-protein complexes such as the Store-Operated Calcium Influx Complex (SOCIC) [26,28].

3.1. Resolution limit in microscopy

The spatial resolution of an optical system can be defined as the smallest distance between two light emitting points that can be resolved, allowing the identification of two independent objects [26,30]. Understanding this principle is essential to visualize the complexity involved in breaking the optical diffraction limit barrier.

There are numerous criteria which can be used to calculate the resolution of an optical system. For example, the Abbe limit and the Rayleigh criterion, both with similar results [31].

Ernst Abbe in nineteenth-century proposed that the optical resolution is fundamentally restricted by the properties of light diffraction, which commonly sets the limit to half the emission wavelength ($\sim \lambda/2$), this prevents resolving structures smaller than about half the wavelength of the emitted light [32].

In practice, the resolution limit of a microscope depends on two main factors, the wavelength of light (λ is light in the visible range between 400 nm to 700 nm) and the numerical aperture (NA) of the objective lens [26,33], which can be defined as:

$$NA = n \sin \alpha$$

here, n is the refractive index of the medium and α is the half-cone angle of the focused light of the objective, NA can be defined in a simple way as the ability of an objective to capture light. Applying a simplified equation based on Abbe principle [26, 30, 33], the resolution of a microscope (d) in terms of the NA of an objective lens is:

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

On another hand, Lord Rayleigh redefined this equation to produce the Rayleigh criterion for resolution. The Rayleigh principle defines resolution as the shortest distance at which two point emitters can be discerned as two separate objects. In the case of FM (where the objective lens serves also as a condenser), the resolution limit is defined by:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{NA_{obj}}$$

Both criteria (Rayleigh and Abbe) are still widely accepted as useful and convenient mathematical treatments for the lateral resolution of FM [26,27,33].

In addition to these criteria, resolution can be quantified by analyzing the point spread function (PSF), defined as the three-dimensional (3D) intensity profiles of the light emitted by an infinitely small point object. In a hypothetical perfect optical system, the PSF is equivalent to the Airy pattern. Resolution can be expressed by the above-mentioned criteria on PSF, for example, the Rayleigh criterion is satisfied when the distance between the images of two neighboring point sources is equal to the width between the maximum peak of the PSF

from one source with the minimum peak of the other.

The width of the PSF is also used as a measure for the resolution limit of microscopy. However, it is important to know that the width of the PSF can be defined in different ways. For example, a widely accepted measure is the full width at half-maximum (FWHM) that is the width of the central Airy disk at the half of the maximum intensity [30].

Applying the Rayleigh criterion with imaging samples with light ($\lambda \approx 480$ nm), using modern objectives with immersion liquids (oil) to attain maximal NAs (1.49), the best theoretical resolution is ~ 190 nm. However, in a practical condition, the lateral resolution in fluorescence microscopy is lower (around 250 nm).

Axial resolution (z_{\min}) can be defined by the minimum distance that the diffraction images of two points can approach each other along the axis of the microscope, yet still be differentiated as two emitters. Axial resolution is also determined mainly by the NA of the objective and the λ . Thus, z_{\min} can be calculated by:

$$z_{\min} = \frac{2\lambda n}{(NA)^2}$$

The axial resolution is about 3 times larger than the lateral resolution for high NA objectives. When imaging with light ($\lambda \approx 480$ nm), high NA objectives (1.49), and oil (1.5), the theoretical resolution is ~ 650 nm, however in real conditions is usually larger than 700 nm.

The resolution calculated for FM or confocal microscopy is enough to study tissues or whole-cell dynamics but is insufficient for study of the vast majority of subcellular structures that are smaller than the wavelength of the light [26,28]. Fortunately, scientists in the two past decades have developed imaging techniques which break the light diffraction limit, allowing access to dimensions near to the electron microscopy resolution [22,29,30,32].

In the following sections we will discuss the main SR techniques and how they help to shape our current knowledge about the different actors involved in initiating, assembling, and controlling SOCE and its components.

4. Super-resolution microscopy

There is no consensus on the definition of super-resolution (SR) microscopy, here we defined SR as all the microscopy techniques that overcome the “classical” diffraction limit of optical resolution [29,33]. These techniques conserve the advantages of FM (target specificity, live-cell monitoring) but incessantly are pushing the resolution towards nanometric scale, therefore SRM allows the studying of cells with more detail, often obtaining, with some of these techniques, information to molecular scale [29,32].

A recent study shows that calcium entry through SOCE activates synaptotagmin-1 (E-syt1) resulting in its repositioning 12 nm closer to the plasma membrane [34]. This small movement would not be detectable using traditional confocal microscopy. Surprisingly, E-syt1 does not form part of the RE-PM junction but instead facilitates the rearrangement of neighboring ER to form the junctions. E-syt1 surrounds the so-called puncta (RE-PM junction) similarly to what we have observed with the SERCA [35]. In our study, we identified the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) as a new member of the store-operated calcium influx complex (SOCIC) [36]. The SERCA2 is not incorporated into the RE-PM junction but rather forms a ring around the junction ensuring an expedite (and focalized) calcium refilling of the ER.

The findings of rings of SERCA decorating the ER-PM junctions provided a feasible explanation for an old observation about calcium entering the cell via SOCE. Initial studies on calcium entry upon depletion of the ER obtained with a preparation of lacrimal gland showed that calcium entry could rapidly refill the ER without a discernible increment in cytosolic calcium [37]. These results suggested that calcium could enter from the extracellular space directly into the

ER, bypassing the cytosol.

Our finding together with many other relevant observations demonstrated that the rapid refilling of the ER is the result of the structural reorganization of the ER-PM junction and the recruiting of SERCA. IP3R and other members from the SOCIC. In particular, SERCA relocation near the ER-PM junction accelerates ER refilling, although calcium do transit the cytosol [36]. Fig. 1 illustrates the recruitment of the SERCA near the ER-PM junction.

The participation of the inositol trisphosphate receptor (IP3R) in modulating store-operated calcium entry (SOCE) was established many years ago. However, the precise role of IP3R in the formation of the ER-PM junction was unknown. A recent study shows that the IP3R determines the size of the puncta, by modulating the intraluminal calcium levels at the ER near the ER-PM junction (Fig. 1) [38]. Overexpression of the IP3R provides a reduced intraluminal calcium microenvironment near STIM1, resulting in enhanced activation of Orai currents and SOCE, with the concomitant increase in the size of the ER-PM junction (observed by SR as puncta). Individual puncta were observed using a novel form of total internal reflection microscopy (TIRFM), which provides enhanced resolution over conventional TIRFM, by splitting the excitation and emission optical pathways, while reducing stray light [39].

Combination of SR microscopy and organelle optogenetics has provided relevant information about the spatiotemporal calcium dynamics upon depletion of the ER and activation of SOCE. By expressing a ER-targeted rhodopsin to induce ER calcium depletion with light, Asano and colleagues have shown with great detail the spatiotemporal calcium dynamics in the ER and cytosol upon activation of SOCE [40].

4.1. Super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM)

SR-SIM is considered among the original super-resolution techniques and have been implemented in many different variants, some are two-dimensional SIM (2D-SIM), three-dimensional SIM (3D SIM), total internal reflection fluorescence SIM (TIRF-SIM), coherent SIM, spot scanning SR-SIM, etc. [41–45].

The idea of SR-SIM can be explained with the Moiré fringes, all the implementations utilize periodic interference patterns (structured illumination), such as nonhomogeneous illuminations with known spatial patterns (originally a sinusoidal grid, however other distributions also are used) [46], which generates interferences with the high frequency variations in the fluorescence caused by the small structures in the sample producing lower frequency Moiré interference pattern [30], different orientations and phases are registered and finally because the illumination pattern is known, the original sample frequencies can be mathematically calculated from the recorded lower frequency Moiré pattern (inverse Fourier transform) producing the super-resolution images [26].

Other SR-SIM alternatives approaches use photon reassignment microscopy such as image scanning microscopy (ISM), rescan confocal microscopy, etc. [47], however, the physical principles are the same [22,41].

The spatial resolution in SR-SIM is improved 2X in all the three dimensions (~ 100 nm lateral and ~ 300 nm axial) and despite other SR methods having more spatial resolution in comparison to SR-SIM, this is still the best option for SR imaging of live samples, particularly in 4D applications [23,41].

SR-SIM is one of the SR microscopy techniques most frequently used (and perhaps one of the most accessible) because the design is based often on widefield configuration, facilitating the use of conventional fluorescence microscopes [26]. SR-SIM can be applied to samples prepared for FM because does not require special fluorochromes to improve the resolution [47,48], this helps to acquire multicolor images (typically three or four color channels) [22]. Moreover, conventional excitation light sources can be used to acquire images, resulting in less photo-damage in comparison to other SR techniques [33].

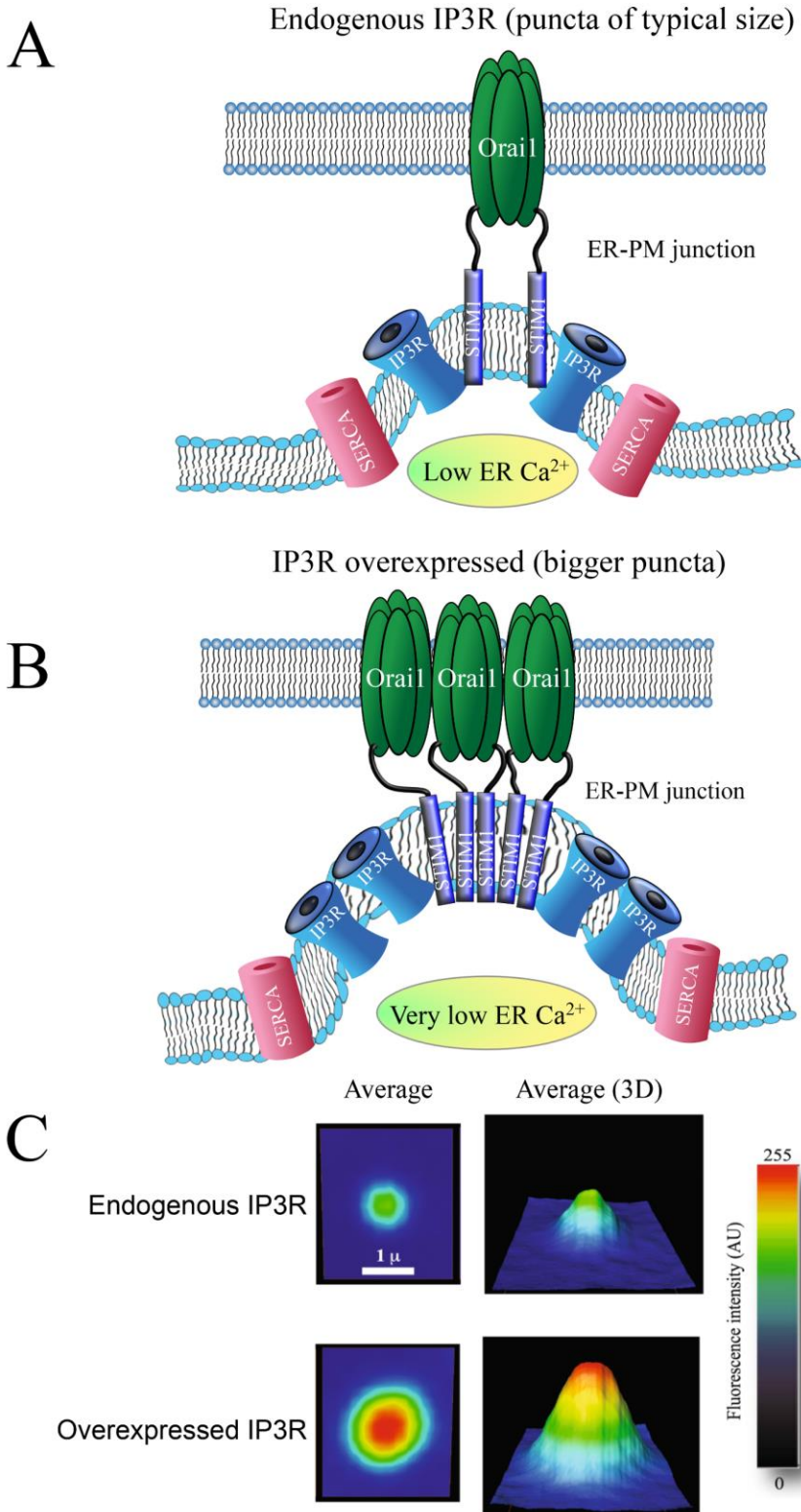


Fig. 1. Schematic representation of the effect on the ER-PM junction of the overexpression of the IP3R. A, Cartoon illustrating the ER-PM junction with the SERCA and the IP3R in close proximity to STIM1. Under these conditions the intraluminal calcium at the ER is low and therefore the ER-PM junction is formed. B, Cartoon illustrating the effect of the overexpression of the IP3R on the size of the ER-PM junction (puncta) and the intraluminal calcium concentration. Under these conditions with high expression of the IP3R the size of the puncta is larger, and the intraluminal calcium is very low, compared to the condition where the IP3R is endogenous. C, effect of overexpressing the IP3R on the size of the puncta. The image shows the average of at least 120 individual punctum obtained from 15 independent transfections with the IP3R (for details please refer to [38]). Average 3D shows the fluorescence intensity represented in the third axes as the depth of image. Thus image height shows the intensity of fluorescence.

Using SR-SIM a recent study has identified Septin7 as a modulator of Orai channels [49]. Septins are GTP-binding proteins that function as diffusion barriers in cells. Thus, septins play key roles in cellular cytoskeleton organization. Most surprisingly, Septin7 can activate Orai and SOCE without ER store depletion [49]. Knockdown of Septin7 increases spontaneous calcium entry in human neurons [50]. Septin7 modulates SOCE via association of its N-terminal domain to Orai channels [50]. The identification of the role of Septin7 in SOCE in human neural progenitor cells and neurons was possible, in part, thanks to the use of fluorescently labelled Septin7, Orai observed with SR-SIM [50]. Another study, using SIM demonstrates that STIM1 is required for dynamic EB localization and the remodeling of microtubules and ER [51].

4.2. Single-molecule localization microscopy (PALM/STORM)

Single-molecule localization microscopy (SMLM) is a group of computational-based microscopy techniques that instead of detecting the fluorescence signal of all fluorophores in a sample, detect single fluorescence, as the name suggests, molecule by molecule [33, 52, 53].

The main principle of SMLM is that the position of a spatially isolated fluorophore can be determined with great accuracy, an isolated point spread function (PFS) can be approximated by a Gaussian intensity distribution, allowing the determination of the exact center of a single emitter [26, 54]. The necessary separation of fluorophores is done by the temporal confinement of fluorescence emission, using fluorophores that exhibit stochastic photo-switching, photo-activation, photo-convertibility or binding reversibly to a target structure. Alternatively, blinking can be achieved by the transient interaction between two short DNA sequences, one labeled and one unlabeled (a method known as DNA painting) [22, 52, 55, 56].

The use of STORM was essential to demonstrate that STIM1 trafficking relies on microtubule dynamics, the microtubule end binding protein (EB1) is required for correct STIM1 trafficking [57]. STORM shows the spatiotemporal association of STIM1 to the microtubule EB1 protein at nanometer scales [57]. Another study with STORM described that cathepsin inhibition decreases the colocalization between STIM1 and EB1 [58]. The results show that mutations in STIM1 which alter microtubule dynamics may have profound effects on cancer and calcium signaling.

A recent study took advantage of STORM to illustrate the clustering and functional coupling of a variety of ionic channels including TRPV1 with G-protein coupled receptors and kinases [59]. All these proteins form macromolecular complexes to expedite cellular signaling and to restrict the signal to confine spaces within the cell. The clustering of TRPV1 with components from SOCE is a rather interesting observation, since we have recently shown that calcium entering individual TRPV1 channels is sufficient to induce calcium-dependent inactivation of Orai1 [60]. This inactivation takes place while TRPV1 and Orai1 diffuse freely at the plasma membrane [60].

Another study revealed that in cardiomyocytes, functional SOCE sites and the corresponding molecular complexes of STIM1-Orai1 are enriched at discrete regions located in the intercalated discs (IDs) [61]. Furthermore, redistribution of STIM1 and ORAI1 from interior regions to the IDs resulted in augmented SOCE in myocytes from arrhythmia-prone (CPVT) hearts [61].

Using proximity ligation and STORM a recent study identified the role of Junctophilin-4 in facilitating the convey of inflammatory signaling pathways at the ER-PM junctions in sensory neurons [62]. Junctophilin-4 (JPH4) is a member of the junctophilin family, these proteins are found in all excitable cells from striated muscle to neurons.

Interestingly, data obtained with FRAP and PALM demonstrate that septin4 promotes ER-PM junctions that enhance the STIM1 and Orai1 interactions [63]. Moreover, STORM data support the interaction of STIM1 with the BAR domain superfamily member bridging integrator 2 (BIN2), this association is important for the role of BIN2 as central regulator of platelet activation [64].

4.3. STED

Stimulated emission depletion (STED) microscopy is one of the techniques in super-resolution microscopy. It creates super-resolution images by the selective deactivation of fluorophores, minimizing the area of illumination at the focal point and therefore reducing the point spread function (PFS). This technique gained attention for the high resolution attained, earning the Nobel Prize in chemistry to its inventor Dr. Stefan W. Hell in 2014.

The endoplasmic reticulum (ER) is a very dynamic organelle, rather than being considered as a single compartment, one must consider the sophisticated network arrangement of the ER. This complex and dynamic arrangement of the ER has been explored only recently due to the complex spatiotemporal changes of the ER network which are difficult to resolve using conventional microscopy. A recent study using STED has shown just how complex and dynamic the ER is by surveying the dynamic nanoscale morphology changes [65]. One of the most impressive findings is the fact that rapidly moving ER tubules where originally mistaken for sheets by conventional light microscopy [65]. These novel findings invite us to revisit the classical view of the ER, and most importantly, the dynamic association of this organelle with other membranes, including the plasma membrane and the role of such interactions in the formation of nanodomains. The role of the ER remodeling via microtubules and the participation of STIM1 in this process was described earlier in a compelling study [66]. In this study, it was demonstrated that STIM1 is indeed a bona fide microtubule plus-end tracking protein. The constant remodeling of the ER, particularly near the plasma membrane, via ER-derived tubules is essential for SOCE activation, as we and others have shown [35, 66–70, 35].

STED was one of the first super-resolution methods used to identify the mechanism by which STIM1 reunites several Orai1 channels at the ER-PM junction to initiate calcium entry upon depletion of the ER [71]. In this elegant study, Yandong Zhou and colleagues showed that a cross-linking of Orai1 monomers was induced by STIM1 to form a functional calcium entry channel [71].

More recently, STED identified STIM2 as the molecule responsible for activating SOCE upon depletion of the ER in neurons [72]. This study showed that SOCE is mediated by STIM2 and drives neurotransmitter release through *syt7* [72]. In hippocampal neurons, ER calcium depletion increases presynaptic calcium levels via SOCE and glutamate release through a pathway dependent on STIM2. This finding is most interesting and surprising since many of the studies on SOCE show that STIM1 is the molecule responsible for Orai1 activation.

Using time-lapse FRET imaging with TIRF microscopy and ground-state depletion (GSD) super-resolution (SRM) imaging a recent study has identified that two nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Aspirin and Sulindac) exert their effects by inhibiting SOCE via different mechanisms [73]. This finding is relevant for the treatment of different inflammatory diseases [73].

Using a new form of depletion microscopy known as GSDIM (ground state depletion microscopy followed by individual molecule return), a recent study identified the role of STIM1 in governing the contractility of vascular smooth muscle cells [74]. The study highlights the role of STIM1 in controlling sarcoplasmic reticulum (SR) and plasma membrane (PM) junctions and the assembly of the Store-Operated Calcium Influx Complex (SOCIC) at the SR-PM sites. These findings were reinforced by analyzing tissue obtained from STIM1-knockout (Stim1^{-/-}smKO) mice [74].

Using STED in different studies, it was possible to define with greater clarity concepts like local calcium signals and calcium microdomains [75]. Complex supramolecular microdomains involving the local modulation of calcium, phospholipids [75], RYR [76] and even cAMP [77] has been possible using STED and other SR imaging techniques. Using SR and other high-resolution imaging techniques, we have shown that adenylyl cyclase (AC8) directly controls its micro-environment by modulating the reorganization of the cytoskeleton in a very dynamic

way [77]. Furthermore, we have shown that the N-terminus of AC8 is responsible for redistributing actin filaments near the PM [77]. The microdomains near the PM generated by AC8 facilitate the synchronous elevation of local calcium and cAMP as a result of direct binding between Orai channels and AC8 [78].

4.4. Fluctuation based super-resolution microscopy

Fluorescence fluctuations-based super-resolution microscopy (FF-SRM) is an emerging field promising live-cell compatible imaging beyond the light diffraction limit. There are a handful of techniques derived from FF-SRM. For a comprehensive review of the different methods used for FF-SRM refer to [79,80].

Using super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI, a form of

FF-SRM) a study shows the nanoscale organization of SOCIC in living cells [81]. Most interestingly, the study shows that SOCE activation increases the number, rather than the size, of STIM1-Orai1 puncta. There appears to be a control governing the maximum puncta size. We have recently shown that such control might be the local calcium concentration, since we can increase the puncta size by overexpressing the IP3 receptor (IP3R) and thus drastically reducing the local intraluminal (ER) calcium in closed proximity to the puncta where the SOCIC is being assembled [38]. The enhanced reduction of ER intraluminal calcium in nanodomains near the ER-PM junction results in larger puncta. Even when under these conditions the puncta are larger, still there appears to be a limit to which puncta can grow. The mechanisms controlling and limiting the maximum puncta size remain largely unexplored to this date.

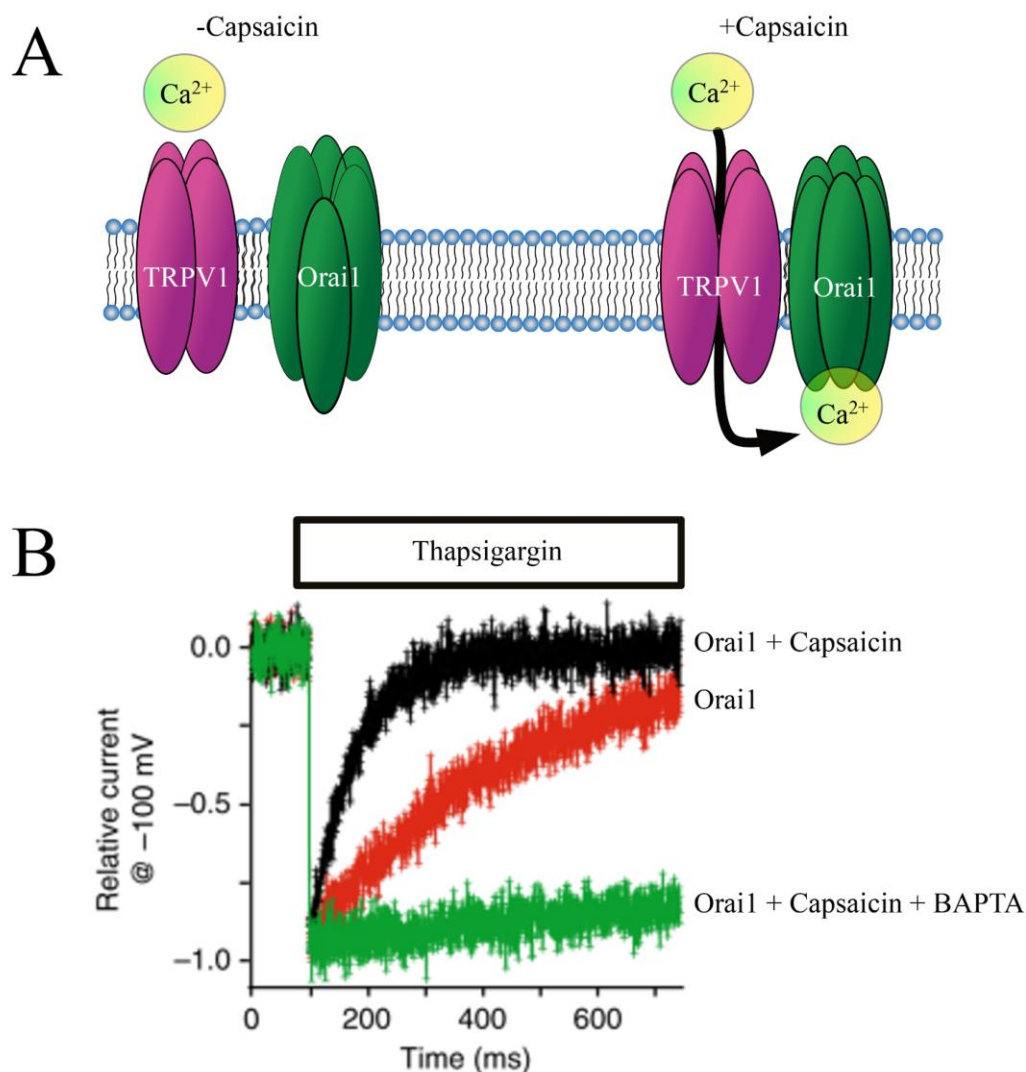


Fig. 2. Calcium entering via individual TRPV1 channels inactivate neighboring Orai1 channels. A, Schematic representation of the association between individual TRPV1 and Orai1 channels. Activation of TRPV1 with capsaicin results in the influx of calcium, which provokes calcium-dependent inactivation of the neighboring Orai1. Association of single TRPV1 and Orai1 channels was demonstrated by SFR analysis [60]. B, Data shows the mean \pm standard deviation of whole cell inward currents produced by Orai1 channels in the absence (red) and presence (black) TRPV1 channels activated with capsaicin. Notice how current inactivation is greatly increased when TRPV1 channels are activated with capsaicin. To demonstrate that the Orai1 inactivation is produced by the calcium entering TRPV1 channels, cells were incubated with the calcium chelator BAPTA (green). Under these conditions, Orai1 current inactivation is greatly reduced, even when TRPV1 channels were activated with capsaicin. For additional results and control experiments please refer to [60].

Using Super-Resolution Radial Fluctuation (SRRF) analysis, we have recently shown that Orai associates and travels the PM in close proximity to TRPV1 channels [60]. Calcium entering via the TRPV1 channel induces calcium-dependent inactivation of neighboring Orai channels (Fig. 2A) [60]. Using SRRF we identified single TRPV1 and single Orai channels interacting at the PM of living cells [60]. The calcium-dependent inactivation of Orai channels is an essential mechanism to prevent cell damage for exaggerated calcium influx through Orai channels (Fig. 2B). As far as we know, this was the first study using SR to identify single ion channels interacting at the PM of living cells and affecting the function of each other by this interaction. Furthermore, the dynamics of the interactions of single Orai1 and TRPV1 channels could be monitored over time with high temporal resolution. This would have been impossible to resolve using electron microscopy or conventional optical microscopy methods.

Recently, we have extended the use of SRRF to study single TRPV1 channels (Fig. 3AB). By creating a fusion protein consisting of the GECI (Genetically Encoded Calcium Indicator) calcium sensor (we used the GCaMP 5A [82]) attached to the carboxyl terminal domain from the TRPV1 channel (TRPV1-GECI), we have observed local calcium increments resulting from the opening of individual TRPV1 channels diffusing freely at the PM of a living cell (Fig. 3C). TRPV1 channel activation was achieved by perfusing the cell with capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), an active component of chili peppers, and a natural activator of this channel (Fig. 3C). As illustrated in this figure, individual TRPV1-GECI channels are monitored at the PM of a living cell and increments in fluorescence intensity are observed after capsaicin application (Fig. 3C). Measuring the fluorescence from many individual TRPV1-GECI channels shows clearly that the increment occurs after capsaicin application (Fig. 3D). The combination of TIRFM and SRRF provide a relatively inexpensive approach to SR without the use of special fluorophores or complex confocal systems like those required for STED and other SR methods. This method facilitates the use of genetically encoded fluorescent indicators, providing the opportunity to target proteins to desired compartments or regions of the cell.

5. SC-SMD (Single channel-single molecule determinations)

SC-SMD method combines two powerful technologies: single-channel electrophysiological measurements and single-molecule determinations, a powerful new method we have developed for the study of ionic channels and in particular for transient receptor potential (TRPC) channels [83,84]. Although this technique relies on electrophysiological measurements, it may be considered as part of SR microscopy because uses also single-molecule imaging to determine single-channel stoichiometry and functionality of individual channels.

Using this novel method, we have identified the stoichiometry of the entire TRPC family of channels and went to show that all form tetramers as a functional channel unit [83]. Unfortunately, SC-SMD cannot be utilized with Orai channels since the channel conductance is below the resolution limit of single-channel electrophysiological recordings. This method only works with channels whose conductance is resolvable with the patch clamp technique.

Recently we have used the fusion protein TRPV1-GECI to illustrate the correlation between local calcium increments via single TRPV1 channels and channel activity via single channel electrophysiological recordings. As illustrated in Fig. 4, using our SC-SMD system (Fig. 4A) in patches of membrane obtained from cells expressing the fusion protein TRPV1-GECI (Fig. 4B), we measured the fluorescence emitted by the GECI attached to the TRPV1 channel and correlated fluorescence increments with single channel currents (Fig. 4CD). A clear correlation in the time courses of cumulative single channel currents (black line) and fluorescence integral (red line) from individual channels is observed, when plotting side to side both measurements from several independent experiments (Fig. 2E). Worth highlighting is the fact that increments in fluorescence from individual TRPV1-GECI channels and single channel

currents is triggered by the application of capsaicin. Video 1 illustrates a typical time course of fluorescence and single channel currents obtained with the SC-SMD system with the TRPV1-GECI channel. Notice the correlation between channel opening and the increment of fluorescence reported by the GECI in the TRPV1-GECI fusion protein after capsaicin application.

A similar method was developed by Weatherill and Wallace [85] in 2015. However, SC-SMD attains higher signal-to-noise ratios because we use the patch pipette as a light guide to propagate an evanescent wave through the glass pipette (Fig. 2A), resulting in total internal reflection fluorescence illumination at the tip of the patch pipette [83]. This results in restricted illumination near the patch of the membrane containing the channel of interest. Using the patch pipette as a light guide allows the separation of the excitation and emission, reducing stray light and improving the signal-to-noise ratio. For a detail explanation of the principles of SC-SMD please refer to [83,84].

6. Conclusions

The use of a variety of SR microscopy techniques has broadened our understanding of the complex interplay between cytoskeleton, cellular microdomains and ion channel organization to modulate SOCE. While understanding SOCE dynamics we have learnt also novel properties and uncovered a new structural organization of the ER. SOCE activation requires a profound reorganization of specialized areas of the ER and the PM, by forming the so-called ER-PM junctions. The direct visualization of these junctions would have not been possible using conventional microscopy methods, because of the diffraction limit imposed on conventional optical microscopy.

The rapid advancement of SR microscopy and the constant development of novel methods to improve spatial or temporal resolutions will provide, without a doubt, new insights into the complex relationship between cytoskeleton reorganization and calcium signaling. Broadening our understanding about SOCE and the multiple molecular mechanisms controlling it may help in the development of novel therapies for diseases where calcium signaling is altered.

The future of SR microscopy is bright and enlightening, and many groups around the world are engaged in developing new alternatives in this highly dynamic area. Computational methods such as SRRF, SOFI and others in combination with TIRFM and epifluorescence microscopy will help to broaden the use of SR, by eliminating the need of acquiring expensive equipment.

Author contributions

CB, AS, MOB, AG and LV wrote the manuscript. CB and LV coordinated the final edits. CB, AG and LV produced the figures. All authors approved the final version of the manuscript.

Supplementary materials

Video 1. Time course of a typical SC-SMD experiment with TRPV1-GECI. The upper panel shows the fluorescence generated by the TRPV1-GECI fusion protein. The green Genetically Encoded Calcium Indicator (GECI) was fused to TRPV1 at its carboxyl terminus end. GECI is based on GCaMP 5 [82]. Fluorescence intensity is presented in pseudo-color using the scale shown at the right of the video (arbitrary units from 0 to 100). Excitation was 450 nm and emission collected at 515 nm. The Ixon EMCCD camera (Oxford Instruments) was used for image acquisition. The lower panel shows the single channel activity before and after stimulation with capsaicin. White arrow shows the closed (zero current) level. Downward deflections indicate channel openings. Amplitude scale shows 5 pA. Time scale shows a total of 1 min and 19 s. Video images and single channel current are acquired simultaneously (for a detail description of the SC-SMD system please refer to [83,84]).

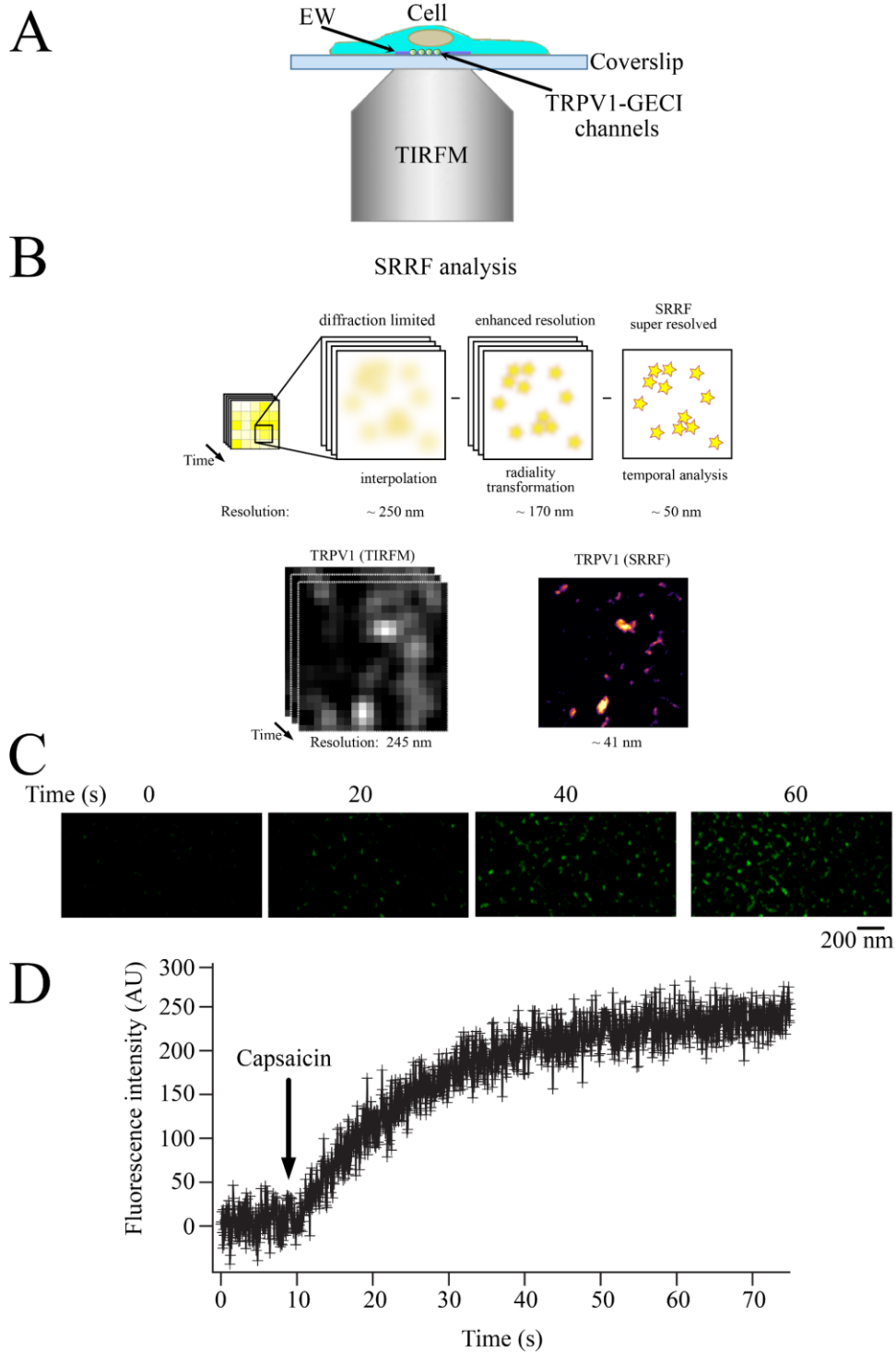


Fig. 3. Combination of TIRFM and Super-Resolution Radial Fluctuation (SRRF) analysis for the study of individual TRPV1 channels. **A**, typical TIRFM experiment using cells expressing the fusion protein TRPV1-GECI. **B**, schematic representation of the SRRF analysis of images acquired with TIRFM. **C**, typical SRRF result of individual TRPV1-GECI channel fluorescence before and after capsaicin application. Capsaicin applied at second 9. **D**, time course of fluorescence of many individual TRPV1-GECI channels as those illustrated in the panels on **C**. Data shows the mean \pm standard deviation of individual fluorescence spots (single TRPV1-GECI channels) obtained after SRRF analysis. Arrow indicates time of capsaicin application.

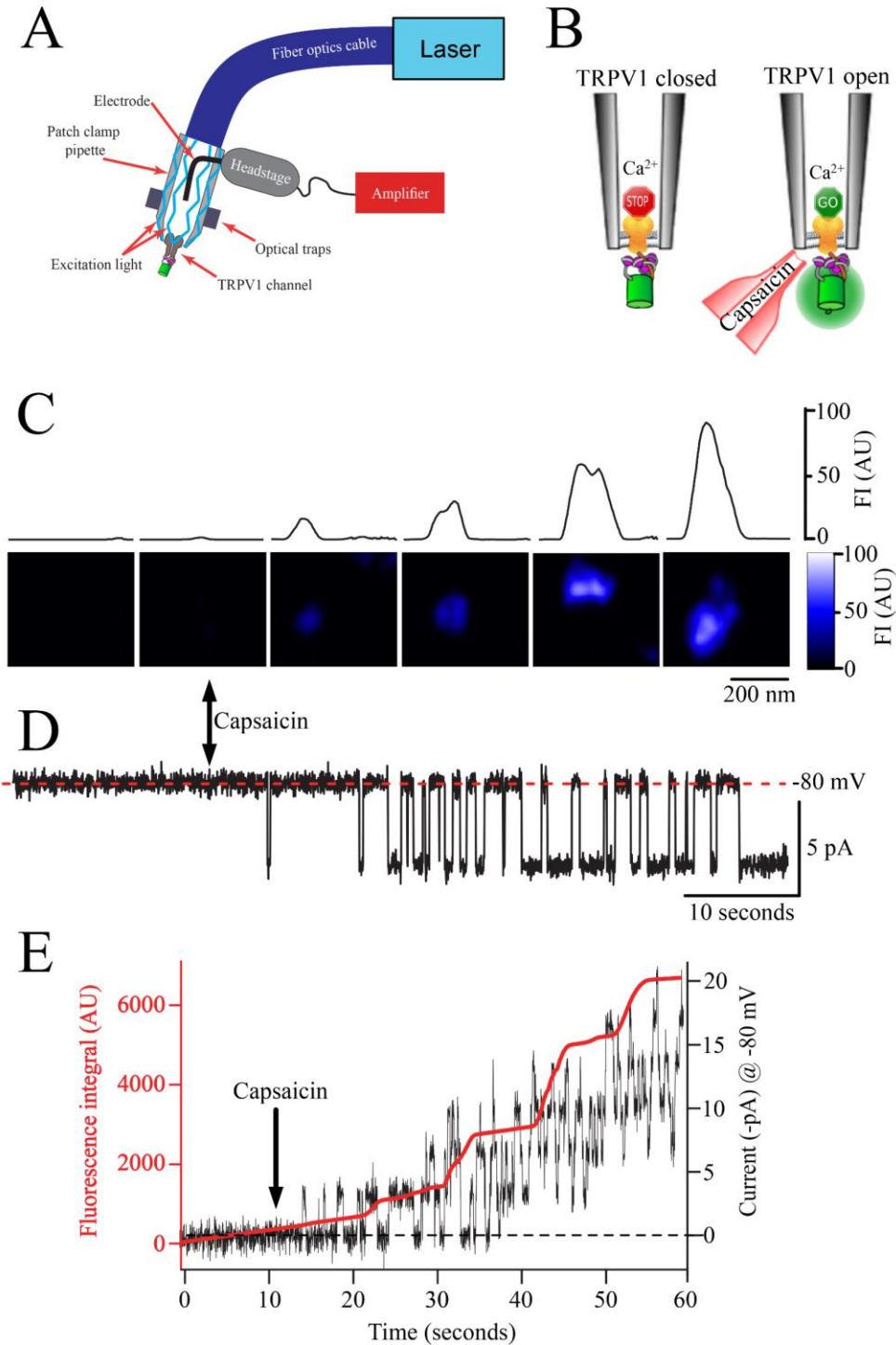


Fig. 4. SC-SMD measurements correlating local increments in calcium with single TRPV1 channel activity. **A**, Schematic representation illustrating the configuration of the SC-SMD system. **B**, cartoon illustrating the configuration of the patch clamp with the TRPV1-GECI with and without capsaicin application (via a second pipette illustrated in red). **C**, fluorescence signal produced by a single TRPV1-GECI fusion channel in response to capsaicin application. Fluorescence emitted by the GECI fused to the c-terminal domain from TRPV1 is synchronized with the electrophysiological single channel recording (**D**) in the SC-SMD system. **D**, single channel currents measured with the SC-SMD system. GECI fluorescence (**C**) and channel currents (**D**) are measured simultaneously. Arrow indicates the time of capsaicin application. **E**, Fluorescence integral (shown in red) and cumulative single channel activity (shown in black) obtained from 5 independent SC-SMD experiments like the one illustrated in panels **C** and **D**. For a detail explanation of the SC-SMD system please refers to [83].

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants IN201319 and AV200320 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) to LV. CB (CVU 486558) performed this study in partial fulfillment of the requirements for the PhD in Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas at the Universidad Nacional Autónoma de México and he was a recipient of PhD fellowship (277682) from The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ceca.2022.102595](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102595).

References

- J. Pacheco, L. Vaca, A microscopic view of the store-operated calcium entry pathway, *ISRN Cell Biol.* 2013 (2013) 1–13, <https://doi.org/10.1155/2013/237192>.
- Y. Baba, M. Matsumoto, T. Kurosaki, Calcium signaling in B cells: regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2, *Mol. Immunol.* 62 (2014) 339–343, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.10.006>.
- M. Yamashita, L. Navarro-Borelly, B.A. McNally, M. Prakriya, Orai1 mutations alter permeation and Ca²⁺-dependent fast inactivation of CRAC channels: evidence for coupling of permeation and gating, *J. Gen. Physiol.* 130 (2007) 525–540, <https://doi.org/10.1085/jgp.200709872>.
- A. Bokhobza, N. Ziental-Gelus, L. Allart, O. Iamshanova, F. Vanden Abeele, Impact of SOCE abolition by Orai1 knockout on the proliferation, adhesion, and migration of HEK-293 cells, *Cells* 10 (2021), <https://doi.org/10.3390/cells10113016>.
- B. Darbellay, S. Arnaudeau, S. König, H. Jousset, C. Bader, N. Demaurex, L. Bernheim, STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 5370–5380, <https://doi.org/10.1074/jbc.M806726200>.
- P.J. Shaw, S. Feske, Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity, *J. Physiol.* 590 (2012) 4157–4167, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.233221>.
- N. Zhang, H. Pan, X. Liang, J. Xie, W. Han, The roles of transmembrane family proteins in the regulation of store-operated Ca²⁺ entry, *Cell. Mol. Life Sci.* 79 (2022) 1–13, <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04034-y>.
- A. Jairaman, M. Prakriya, Molecular pharmacology of store-operated CRAC channels, *Channels* 7 (2013) 402–414, <https://doi.org/10.4161/chan.25292>.
- S.M. Emrich, R.E. Yoast, M. Trebak, Physiological functions of CRAC channels, *Annu. Rev. Physiol.* 84 (2022) 355–379, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-052521-013426>.
- J.W. Putney, J.W. Putney, A model for receptor-regulated calcium entry, *Cell Calcium* 7 (1986) 1–12, [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6).
- H. Takemura, J.W. Putney, Capacitative calcium entry in parotid acinar cells, *Biochem. J.* 258 (1989) 409–412, <https://doi.org/10.1042/bj2580409>.
- J.W. Putney, A personal journey, *Cell Calcium* 72 (2018) 127–131, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.05.004>.
- 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. Velicelebi, K.A. Stauderman, G. Veli?elebi, K.A. Stauderman, STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 435–445, <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>.
- J. Liou, M.L. Kim, D.H. Won, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell, T. Meyer, STIM is a Ca²⁺-sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺-influx, *Curr. Biol.* 15 (2005) 1235–1241, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>.
- P.B. Stathopoulos, L. Zheng, G.-Y. Li, M.J. Plevin, M. Ikura, Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry, *Cell* 135 (2008) 110–122, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.006>.
- S. Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.-H.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, <https://doi.org/10.1038/nature04702>.
- A.V. Yeromin, S.L. Zhang, W. Jiang, Y. Yu, O. Safrina, M.D. Cahalan, Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai1, *Nature* 443 (2006) 226–229, <https://doi.org/10.1038/nature05108>.
- M.M. Wu, R.M. Luik, R.S. Lewis, Some assembly required: constructing the elementary units of store-operated Ca²⁺ entry, *Cell Calcium* 42 (2007) 163–172, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.03.003>.
- S. Weiss, Shattering the diffraction limit of light: a revolution in fluorescence microscopy? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8747–8749, <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8747>.
- M. Prakriya, R.S. Lewis, Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca (2+) channels by 2-aminoethylidiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP (3) receptors, *J. Physiol.* 536 (2001) 3–19, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00003.x>.
- D. Leon-Aparicio, J. Pacheco, J. Chavez-Reyes, J.M. Galindo, J. Valdes, L. Vaca, A. Guerrero-Hernandez, Orai3 channel is the 2-APB-induced endoplasmic reticulum calcium leak, *Cell Calcium* 65 (2017) 91–101, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.012>.
- G. Jacquemet, A.F. Carisey, H. Hamidi, R. Henriques, C. Leterrier, The cell biologist's guide to super-resolution microscopy, *J. Cell Sci.* 133 (2020), <https://doi.org/10.1242/jcs.240713>.
- X. Wang, J. Wang, X. Zhu, Y. Zheng, K. Si, W. Gong, Super-resolution microscopy and its applications in neuroscience, *10* (2017) 1–11, <https://doi.org/10.1142/S1793545817300014>.
- J.W. Lichtman, J.-A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nat. Methods.* 2 (2005) 910–919, <https://doi.org/10.1038/nmeth817>.
- J. Jonkman, C.M. Brown, G.D. Wright, K.L. Anderson, A.J. North, Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy, *Nat. Protoc.* 15 (2020) 1585–1611, <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0313-9>.
- J. Vangindertael, R. Camacho, W. Sempels, H. Mizuno, P. Dedecker, K.P.F. Janssen, An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist, *Methods Appl. Fluoresc.* 6 (2018), <https://doi.org/10.1038/2050-6120/aaae9c>.
- B. Huang, M. Bates, X. Zhuang, Super-resolution fluorescence microscopy, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 993–1016, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem.77.061906.092014>.
- C.G. Galbraith, J.A. Galbraith, Super-resolution microscopy at a glance, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 1607–1611, <https://doi.org/10.1242/jcs.080085>.
- L. Schermelleh, A. Ferrand, T. Huser, C. Eggeling, M. Sauer, O. Biehlmaier, G.P. C. Drummen, Super-resolution microscopy demystified, *Nat. Cell Biol.* 21 (2019) 72–84, <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8>.
- E. Sezgin, Super-resolution optical microscopy for studying membrane structure and dynamics, *J. Phys. Condens. Matter.* (2017) 29, <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa7185>.
- S. Cox, Super-resolution imaging in live cells, *Dev. Biol.* 401 (2015) 175–181, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.11.025>.
- S.J. Sahl, S.W. Hell, S. Jakobs, Fluorescence nanoscopy in cell biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 685–701, <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.71>.
- J.A. Thorley, J. Pike, J.Z. Rappoport, Super-resolution microscopy: a comparison of commercially available options, *Fluoresc. Microsc. Super-Resolution Other Nov. Tech.* (2014) 199–212, [10.1016/B978-0-12-409513-7.00014-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409513-7.00014-2).
- F. Kang, M. Zhou, X. Huang, J. Fan, L. Wei, J. Boulanger, Z. Liu, J. Salamerio, Y. Liu, L. Chen, E-syt1 re-arranges STIM1 clusters to stabilize ring-shaped ER-PM contact sites and accelerate Ca²⁺ store replenishment, *Sci. Rep.* 9 (2019) 3975, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40331-0>.
- A. Sampieri, A. Zepeda, A. Asanov, L. Vaca, Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member, *Cell Calcium* 45 (2009) 439–446, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.02.010>.
- L. Vaca, SOCl₂: the store-operated calcium influx complex, *Cell Calcium* 47 (2010) 199–209, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.002>.
- R.J. Parod, J.W. Putney, Stimulus-permeability coupling in rat lacrimal gland, *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 239 (1980) G106–G113, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.239.2.G106>.
- A. Sampieri, K. Santoyo, A. Asanov, L. Vaca, Association of the IP3R to STIM1 provides a reduced intraluminal calcium microenvironment, resulting in enhanced store-operated calcium entry, *Sci. Rep.* 8 (2018) 13252, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31621-0>.
- A. Asanov, A. Zepeda, L. Vaca, A novel form of total internal reflection fluorescence microscopy (IG-TIRFM) reveals different and independent lipid raft domains in living cells, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1801 (2010) 147–155, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.10.004>.
- T. Asano, H. Igarashi, T. Ishizuka, H. Yawo, Organelle Optogenetics, Direct manipulation of intracellular Ca²⁺ dynamics by light, *Front. Neurosci.* 12 (2018) 561, <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00561>.
- Y. Wu, H. Shroff, Faster, sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging, *Nat. Methods.* 15 (2018) 1011–1019, <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0211-z>.
- A. Zhovmer, C.A. Combs, A step-by-step guide to instant structured illumination microscopy (iSIM), *Methods Mol. Biol.* 2304 (2021) 347–359, [10.1007/978-1-0716-1402-0_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1402-0_19).
- J. Demmerle, C. Innocent, A.J. North, G. Ball, M. Müller, E. Miron, A. Matsuda, I. M. Dobbie, Y. Markaki, L. Schermelleh, Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy, *Nat. Protoc.* 12 (2017) 988–1010, <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.019>.
- J. Mertz, Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination, *Nat. Methods.* 8 (2011) 811–819, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1709>.
- M.F. Langhorst, J. Schaffer, B. Goetze, Structure brings clarity: structured illumination microscopy in cell biology, *Biotechnol. J.* 4 (2009) 858–865, <https://doi.org/10.1002/biot.200900025>.
- A.G. Godin, B. Lounis, L. Cognet, Super-resolution microscopy approaches for live cell imaging, *Biophys. J.* 107 (2014) 1777–1784, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.028>.

- [47] R. Heintzmann, T. Huser, Super-resolution structured illumination microscopy, *Chem. Rev.* 117 (2017) 13890–13908, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218>.
- [48] M. Yamanaka, N.I. Smith, K. Fujita, Introduction to super-resolution microscopy, *Microscopy* 63 (2014) 177–192, <https://doi.org/10.1093/micro/dfu007>.
- [49] B.K. Deb, T. Pathak, G. Hasan, Store-independent modulation of Ca²⁺ entry through Orai by septin 7, *Nat. Commun.* 7 (2016), <https://doi.org/10.1038/ncomms11751>.
- [50] B.K. Deb, P. Chakraborty, R. Gopurappilly, G. Hasan, SEPT7 regulates Ca²⁺ entry through Orai channels in human neural progenitor cells and neurons, *Cell Calcium* 90 (2020), 102252, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102252>.
- [51] M. Pavez, A.C. Thompson, H.J. Arnott, C.B. Mitchell, I. D'Atri, E.K. Don, J. K. Chilton, E.K. Scott, J.Y. Lin, K.M. Young, R.J. Gasperini, L. Foa, STIM1 is required for remodeling of the endoplasmic reticulum and microtubule cytoskeleton in steering growth cones, *J. Neurosci.* 39 (2019) 5095–5114, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2496-18.2019>.
- [52] M. Sauer, M. Heilemann, Single-molecule localization microscopy in eukaryotes, *Chem. Rev.* 117 (2017) 7478–7509, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00667>.
- [53] G. Huszka, M.A.M. Gijs, Super-resolution optical imaging: a comparison, *Micronano Eng* 2 (2019) 7–28, <https://doi.org/10.1016/j.mne.2018.11.005>.
- [54] B.O. Leung, K.C. Chou, Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology, *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 967–980, <https://doi.org/10.1366/11-06398>.
- [55] L. Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt, A guide to super-resolution fluorescence microscopy, *J. Cell Biol.* 190 (2010) 165–175, <https://doi.org/10.1083/jcb.201002018>.
- [56] R. Jungmann, M.S. Avendaño, J.B. Woehrstein, M. Dai, W.M. Shih, P. Yin, Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT, *Nat. Methods* 11 (2014) 313–318, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2835>.
- [57] Y.-T. Huang, Y.-T. Hsu, Y.-F. Chen, M.-R. Shen, Super-resolution microscopy reveals that stromal interaction molecule 1 trafficking depends on microtubule dynamics, *Front. Physiol.* 12 (2021), 762387, <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.762387>.
- [58] H.H. Lin, S.J. Chen, M.R. Shen, Y.T. Huang, H.P. Hsieh, S.Y. Lin, C.C. Lin, W.S. W. Chang, J.Y. Chang, Lysosomal cysteine protease cathepsin S is involved in cancer cell motility by regulating store-operated Ca²⁺ entry, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1866 (2019), 118517, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.012>.
- [59] J. Zhang, C.M. Carver, F.S. Choveau, M.S. Shapiro, Clustering and functional coupling of diverse ion channels and signaling proteins revealed by super-resolution STORM microscopy in neurons, *Neuron* 92 (2016) 461–478, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.014>.
- [60] C.E.C.E. Bastián-Eugenio, A. Bohórquez-Hernández, J. Pacheco, A. Sampieri, A. Asanov, J.P.J.P. Ocelotl-Oviedo, A. Guerrero, A. Darson, L. Vaca, Heterologous calcium-dependent inactivation of Orai1 by neighboring TRPV1 channels modulates cell migration and wound healing, *Commun. Biol.* 2 (2019) 88, <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0338-1>.
- [61] I.M. Bonilla, A.E. Belevych, S. Baine, A. Stepanov, L. Mezache, T. Bodnar, B. Liu, P. Volpe, S. Priori, N. Weisleder, G. Sakuta, C.A. Carnes, P.B. Radwanski, R. Veerarghavan, S. Gyorke, Enhancement of cardiac store operated calcium entry (SOCE) within novel intercalated disk microdomains in arrhythmic disease, *Sci. Rep.* 9 (2019) 10179, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46427-x>.
- [62] A. Hoge, S. Shah, F. Jones, C.M. Carver, H. Hao, C. Liang, D. Huang, X. Du, N. Gampfer, Junctophilin-4 facilitates inflammatory signalling at plasma membrane-endoplasmic reticulum junctions in sensory neurons, *J. Physiol.* 599 (2021) 2103–2123, <https://doi.org/10.1113/JP281331>.
- [63] Z.B. Katz, C. Zhang, A. Quintana, B.F. Lillemeier, P.G. Hogan, Septins organize endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions for STIM1-Orai1 calcium signalling, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–17, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46862-w>.
- [64] J. Volz, C. Kusch, S. Beck, M. Popp, T. Vögtle, M. Meub, I. Scheller, H.S. Heil, J. Preu, M.K. Schuhmann, K. Hemmen, T. Premisler, A. Sickmann, K.G. Heinze, D. Stegner, G. Stoll, A. Braun, M. Sauer, B. Nieswandt, BIN2 orchestrates platelet calcium signaling in thrombosis and thrombo-inflammation, *J. Clin. Invest.* (2020), <https://doi.org/10.1172/jci136457>.
- [65] L.K. Schroeder, A.E.S. Barentine, H. Merta, S. Schweighofer, Y. Zhang, D. Baddeley, J. Bewersdorf, S. Bahmanyar, Dynamic nanoscale morphology of the ER surveyed by STED microscopy, *J. Cell Biol.* 218 (2019) 83–96, <https://doi.org/10.1083/jcb.201809107>.
- [66] I. Grigoriev, S.M. Gouveia, B. van der Vaart, J. Demmers, J.T. Smyth, S. Honnappa, D. Splinter, M.O. Steinmetz, J.W. Putney, C.C. Hoogenraad, A. Akhmanova, STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER, *Curr. Biol.* 18 (2008) 177–182, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.050>.
- [67] K. Groschner, N. Shrestha, N. Fameli, Non-Orai partners of STIM proteins: role in ER-PM communication and Ca²⁺ signaling, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30299651>.
- [68] K.P. Subedi, H.L. Ong, I.S. Ambudkar, Assembly of ER-PM junctions: a critical determinant in the regulation of SOCE and TRPC1, *Adv. Exp. Med. Biol.* 981 (2017) 253–276, https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5_11.
- [69] L.B. de Souza, H.L. Ong, X. Liu, I.S. Ambudkar, PIP2 and septin control STIM1/Orai1 assembly by regulating cytoskeletal remodeling via a CDC42-WASP/WAVE-ARP2/3 protein complex, *Cell Calcium* 99 (2021), 102475, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102475>.
- [70] C. Moreno, L. Vaca, Microdomain organization and the role of second messengers microdomain organization of SOCE signaling, 2013. 10.1007/978-3-7091-0962-5_7.
- [71] Y. Zhou, R.M. Nwokonko, X. Cai, N.A. Loktionova, R. Abdulqadir, P. Xin, B. A. Niemeyer, Y. Wang, M. Trebak, D.L. Gill, Cross-linking of Orai1 channels by STIM proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E3398–E3407, <https://doi.org/10.1073/pnas.1720810115>.
- [72] N.L. Chanaday, E. Nosyryeva, O.-H. Shin, H. Zhang, I. Aklan, D. Atasoy, I. Bezprozvanny, E.T. Kavalali, Presynaptic store-operated Ca²⁺ entry drives excitatory spontaneous neurotransmission and augments endoplasmic reticulum stress, *Neuron* 109 (2021) 1314–1332, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.023>, e5.
- [73] Y.-S. Wang, N.-K. Huang, Y.-C. Lin, W.-C. Chang, W.-C. Huang, Aspirin and Sulindac act via different mechanisms to inhibit store-operated calcium channel: implications for colorectal cancer metastasis, *Biomed. Pharmacother.* 145 (2022), 112476, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112476>.
- [74] V. Krishnan, S. Ali, A.L. Gonzales, P. Thakore, C.S. Griffin, E. Yamasaki, M. G. Alvarado, M.T. Johnson, M. Trebak, S. Earley, STIM1-dependent peripheral coupling governs the contractility of vascular smooth muscle cells, *Elife* (2022) 11, <https://doi.org/10.7554/eLife.70278>.
- [75] A.H. Guse, D.C. Gil Montoya, B.-P. Diercks, Mechanisms and functions of calcium microdomains produced by Orai channels, D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, or ryanodine receptors, *Pharmacol. Ther.* 223 (2021), 107804, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107804>.
- [76] B. Diercks, R. Werner, P. Weidemüller, F. Czarniak, L. Hernandez, C. Lehmann, A. Rosche, A. Krüger, U. Kaufmann, M. Vaeth, A.V. Failla, B. Zobiak, F.I. Kandil, D. Schetelig, A. Ruthenbeck, C. Meier, D. Lodygin, A. Flügel, D. Ren, I.M.A. Wolf, S. Feske, A.H. Guse, Orai1, STIM1/2, and RYR1 shape subsecond Ca²⁺ microdomains upon T cell activation, *Sci. Signal.* 11 (2018) 1–14, <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat0358>.
- [77] L.J.J. Ayling, S.J.J. Bridson, M.L.L. Halls, G.R.V.R. Hammond, L. Vaca, J. Pacheco, S.J.J. Hill, D.M.F.M. Cooper, Adenylyl cyclase AC3 directly controls its micro-environment by recruiting the actin cytoskeleton in a cholesterol-rich milieu, *J. Cell Sci* 125 (2012) 869–886, <https://doi.org/10.1242/jcs.091090>.
- [78] D. Willoughby, K.L.L.K.L. Everett, M.L.L.M.L. Halls, J. Pacheco, P. Skroblin, L. Vaca, E. Klusmann, D.M.F.D.M.F.M.F. Cooper, Direct binding between Orai1 and AC3 mediates dynamic interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling, *Sci. Signal.* 5 (2012), <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002299> ra29–ra29.
- [79] I.C. Patel, J.A. Sirs, Dispersion of solutes during blood flow through curved tubes, *Med. Biol. Eng. Comput.* 21 (1983) 113–118, <https://doi.org/10.1007/BF02441524>.
- [80] W.E. Moerner, Y. Shechtman, Q. Wang, Single-molecule spectroscopy and imaging over the decades, *Faraday Discuss.* 184 (2015) 9–36. 10.1039/c5fd00149h.
- [81] F. Hertel, G.C.H. Mo, S. Duwé, P. Dedecker, J. Zhang, RefSOFI for mapping nanoscale organization of protein-protein interactions in living cells, *Cell Rep* 14 (2016) 390–400, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.036>.
- [82] J. Akerboom, T.-W. Chen, T.J. Wardill, L. Tian, J.S. Marvin, S. Mutlu, N. C. Calderón, F. Esposti, B.G. Borghuis, X.R. Sun, A. Gordus, M.B. Orger, R. Portugues, F. Engert, J.J. Macklin, A. Filosa, A. Aggarwal, R.A. Kerr, R. Takagi, S. Kraucun, E. Shigetomi, B.S. Khakh, H. Baier, L. Lagnado, S.S.-H. Wang, C. I. Bargmann, B.E. Kimmel, V. Jayaraman, K. Svoboda, D.S. Kim, E.R. Schreiner, L. L. Looger, Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging, *J. Neurosci.* 32 (2012) 13819–13840, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012>.
- [83] A. Asanov, A. Sampieri, C. Moreno, J. Pacheco, A. Salgado, R. Sherry, L. Vaca, Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels., *Cell Calcium*. 57 (2015) 1–13. 10.1016/j.ceca.2014.10.011.
- [84] L.G. Ceballos, A. Asanov, L. Vaca, Single-channel single-molecule detection (SC-SMD) system, *Methods Mol. Biol.* 1843 (2018) 189–201, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8704-7_16.
- [85] E.E. Weatherill, M.I. Wallace, Combining single-molecule imaging and single-channel electrophysiology, *J. Mol. Biol.* 427 (2015) 146–157, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.007>.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A self-aggregating peptide: implications for the development of thermostable vaccine candidates



Adolfo Cruz-Reséndiz¹, Jesús Zepeda-Cervantes¹, Alicia Sampieri¹, Carlos Bastián-Eugenio¹, Gonzalo Acero², J. Iván Sánchez-Betancourt³, Goar Gevorkian² and Luis Vaca^{1,4*}

Abstract

Background: The use of biomaterials has been expanded to improve the characteristics of vaccines. Recently we have identified that the peptide $PH_{(1-110)}$ from polyhedrin self-aggregates and incorporates foreign proteins to form particles. We have proposed that this peptide can be used as an antigen carrying system for vaccines. However, the immune response generated by the antigen fused to the peptide has not been fully characterized. In addition, the adjuvant effect and thermostability of the particles has not been evaluated.

Results: In the present study we demonstrate the use of a system developed to generate nano and microparticles carrying as a fusion protein peptides or proteins of interest to be used as vaccines. These particles are purified easily by centrifugation. Immunization of animals with the particles in the absence of adjuvant result in a robust and long-lasting immune response. Proteins contained inside the particles are maintained for over 1 year at ambient temperature, preserving their immunological properties.

Conclusion: The rapid and efficient production of the particles in addition to the robust immune response they generate position this system as an excellent method for the rapid response against emerging diseases. The thermostability conferred by the particle system facilitates the distribution of the vaccines in developing countries or areas with no electricity.

Keywords: Vaccines, Particles, Self-assembling, Thermostable, Immunology

Background

Vaccines are considered one of the most important medical advances in the history of humanity, preventing and eradicating diseases [1, 2]. The World Health Organization (WHO) estimates that vaccines save around 2–3 million lives a year [3]. Traditional vaccines are based on two main methodologies: live-attenuated and inactivated/killed pathogens [4]. Even though vaccines produced with these methods are immunologically effective, they still show some disadvantages, such as the need for a cold-chain, reduced shelf life and the time-consuming processes involved in the production and purification [5–7]. On the other

hand, new methodologies have been used such as subunit and recombinant vaccines that weakly stimulate the immune system and their immunological effect is of short durability, so they require the use of adjuvant to potentiate their effect. Currently available adjuvants may lead to unwanted effects such as the generation of granulomas, allergies and neurotoxicity due to the different components used [5, 8, 9]. However, even with the evolution of vaccines, vaccination continues to represent a high cost mainly for developing countries, due to the fact that they have the highest number of people vulnerable to infectious diseases [10–12]. An effective, low cost technology to produce thermostable vaccines would represent a major advancement in the fight against infectious diseases worldwide, and may significantly reduce the risk of pandemics [13].

* Correspondence: lvaca@ifc.unam.mx

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510 Mexico City, Mexico

⁴Department of Physiology and Biophysics, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA 98124, USA

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

RESEARCH ARTICLE

Palmitic acid induces insulin resistance by a mechanism associated with energy metabolism and calcium entry in neuronal cells

Karina Sánchez-Alegría¹ | Carlos Ernesto Bastián-Eugenio² | Luis Vaca² | Clorinda Arias¹

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

²Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Correspondence

Clorinda Arias, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510, Ciudad de México, Mexico.
Email: carias@unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Grant/Award Number: A1-S9559; UNAM Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA, UNAM), Grant/Award Number: IN202318

Abstract

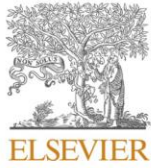
Palmitic acid (PA) is a saturated fatty acid whose high consumption has been largely associated with the development of different metabolic alterations, such as insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. Particularly in the brain, insulin signaling disruption has been linked to cognitive decline and is considered a risk factor for Alzheimer's disease. Cumulative evidence has demonstrated the participation of PA in the molecular cascade underlying cellular insulin resistance in peripheral tissues, but its role in the development of neuronal insulin resistance and the mechanisms involved are not fully understood. It has generally been accepted that the brain does not utilize fatty acids as a primary energy source, but recent evidence shows that neurons possess the machinery for fatty acid β -oxidation. However, it is still unclear under what conditions neurons use fatty acids as energy substrates and the implications of their oxidative metabolism in modifying insulin-stimulated effects. In the present work, we have found that neurons differentiated from human neuroblastoma MSN exposed to high but nontoxic concentrations of PA generate ATP through mitochondrial metabolism, which is associated with an increase in the cytosolic Ca^{2+} and diminished insulin signaling in neurons. These findings reveal a novel mechanism by which saturated fatty acids produce Ca^{2+} entry and insulin resistance that may play a causal role in increasing neuronal vulnerability associated with metabolic diseases.

KEYWORDS

intraneuronal Ca^{2+} , neuronal insulin resistance, neuronal β -oxidation, palmitic acid, PKC activation

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; BIM, bisindolylmaleimide 1; BSA, bovine serum albumin; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; DHA, docosahexaenoic acid; DNA, deoxyribonucleic acid; ECL, enhanced chemiluminescence; FBS, fetal bovine serum; GPR40, G-protein-coupled receptor 40; HFD, high-fat diet; InRs, insulin receptors; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAD^+ , nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NGF, nerve growth factor; PA, palmitic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; PKC, protein kinase C; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; RNA, ribonucleic acid; ROS, reactive oxygen species; RT, room temperature; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SEM, standard error of the mean; VGCCs, voltage-gated calcium channels.

© 2021 Federation of American Societies for Experimental Biology



LIPID transfer proteins regulate store-operated calcium entry via control of plasma membrane phosphoinositides

Gergo Gulyas^{a,1}, Marek K. Korzeniowski^{a,b,1}, Carlos Ernesto Bastián Eugenio^{a,c}, Luis Vaca^c, Yeun Ju Kim^a, Tamas Balla^{a,*}

^a Section on Molecular Signal Transduction, Program for Developmental Neuroscience, Eunice Kennedy Shriver NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 20892, USA

^b Department of Anatomy, Physiology, and Genetics, Uniformed Services University, Bethesda, MD, USA

^c Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México City DF, CP, 04510, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Calcium
Plasma membrane
ER
Membrane contact sites
Lipid transfer proteins
Phosphatidylinositol
Phosphoinositides

ABSTRACT

The ER-resident proteins STIM1 together with the plasma membrane (PM)-localized Orai1 channels constitute the molecular components of the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) pathway. Prepositioning of STIM1 to the peripheral ER close to the PM ensures its efficient interaction with Orai1 upon a decrease in the ER luminal Ca^{2+} concentration. The C-terminal polybasic domain of STIM1 has been identified as mediating the interaction with PM phosphoinositides and hence positions the molecule to ER-PM contact sites. Here we show that STIM1 requires PM phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) for efficient PM interaction. Accordingly, oxysterol binding protein related proteins (ORPs) that work at ER-PM junctions and consume PI4P gradients exert important control over the Ca^{2+} entry process. These studies reveal an important connection between non-vesicular lipid transport at ER-PM contact sites and regulation of ER Ca^{2+} store refilling.

1. Introduction

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) has been recognized long time ago as an important Ca^{2+} influx pathway present in most mammalian cells [1]. It is now understood that SOCE requires the interplay between two distinct molecules: the ER-localized STIM1 that senses the ER luminal Ca^{2+} concentration and the plasma membrane (PM)-localized Orai1 channels, that directly interact when the ER luminal Ca^{2+} concentration decreases [2–5]. Substantial experimental evidence has accumulated concerning the activation sequence leading to Ca^{2+} influx through this pathway. Briefly, a drop in the ER luminal Ca^{2+} concentration sensed by EF hands in the ER-luminal side of the single membrane spanning STIM1 molecule initiates a conformational change that results in the disruption of an intramolecular clamp in the cytoplasmic segment of the molecule [6,7]. This rearrangement which liberates the Orai1 activation domain within the STIM1 molecule called SOAR [8] or CAD [9], also induces STIM1 clustering and promotes interaction with the PM-located Orai1 molecules [10–12]. Several structural features of STIM1 and Orai1 have been identified as critical for the various steps in the activation sequence

(see Qiu and Lewis for a recent review [13]).

An important aspect of STIM1/Orai1 function is its sensitivity to the lipid-environment of the PM. It has been postulated early on that the polybasic C-terminus of STIM1 is important for its PM interaction likely due to its binding to acidic phospholipids found in the inner leaflet of the PM [14]. Importantly, however, the polybasic domain becomes dispensable when both STIM1 and Orai1 are overexpressed due to the strong direct interaction between the respective domains of STIM1 and Orai1 that mediate their activation [15,16]. Even before STIM1 and Orai1 were discovered, it was reported that SOCE and its current equivalent, I_{CRAC} was inhibited by concentrations of the PI 3-kinase inhibitor, wortmannin (Wm) that inhibited phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) formation, suggesting for the first time that PM lipids and not their hydrolytic product, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) was important for SOCE [17]. This finding was further confirmed by our previous studies using various PI kinase inhibitors leading to the tentative conclusion that PI4P rather than phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) was required for the STIM1/Orai1-mediated Ca^{2+} entry process [18]. Consistent with the

* Corresponding author at: National Institutes of Health, Bldg 35A, Rm 2D842, 35 Convent Drive, Bethesda, MD 20892, USA.

E-mail address: ballat@mail.nih.gov (T. Balla).

¹ These authors equally contributed to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102631>

Received 14 March 2022; Received in revised form 24 June 2022; Accepted 8 July 2022

Available online 11 July 2022

0143-4160/Published by Elsevier Ltd.