

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA
INVOLUCRADO EN LA REGULACIÓN DE LA ENTRADA DE
CALCIO OPERADA POR RESERVORIOS INTERNOS (SOCE) EN
CÉLULAS NO EXCITABLES***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica de Proteínas y Biotecnología por:**

RODRIGO ALEJANDRO SANTOS ALFARO

Director de Tesis: Dr. Óscar Cerda Arancibia

Santiago-CHILE

Enero 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

RODRIGO ALEJANDRO SANTOS ALFARO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica de Proteínas y Biotecnología, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Óscar Cerda _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Valentina Parra _____

Dr. Mario Chiong _____

Dr. Roberto Bravo _____

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a todas las personas que se encuentran aquejando enfermedades y que se encuentran hospitalizadas, a todas las personas que hemos visto la muerte y la discriminación. Que todos los problemas pueden pasar y se pueden superar, no importa lo difícil que puede ser. Todas las cosas pasan por algo y tal vez no lo entendemos en el momento, pero algún día todo tendrá sentido.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a los Doctores Mauricio Báez, Daniela Seelenfreund y Oscar Cerda ya que, sin conocerme confiaron en mí y me aceptaron en el programa de Magíster en Bioquímica.

Le agradezco a mi madre, familia y Milito, que siempre han estado al lado mío, tanto en la salud como ahora en este nuevo desafío de estudiar un postgrado.

Le agradezco a mis compañeros de laboratorio por su ayuda en la incorporación al laboratorio, en el desarrollo y aprendizaje de diferentes metodologías y por compartir sus conocimientos y habilidades.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada y financiada gracias al Proyecto FONDECYT 1200917 y Millennium Nucleus of Ion Channel-Associated Diseases (MiNICAD) de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).

TABLA DE CONTENIDO

CALIFICACIONES	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
FINANCIAMIENTO	iv
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1.1 El calcio y SOCE	1
1.2 Participación de Orai1 y STIM1 en la respuesta SOCE.	3
1.3 SARAF como principal regulador de SOCE	7
1.4 Regulación de SOCE, un mecanismo no caracterizado.....	9
1.5 Reguladores de la respuesta SOCE	14
1.6 Marcaje Molecular por proximidad con Biotina.....	17
2. HIPÓTESIS.....	22
3. OBJETIVO GENERAL.	22
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4.1. Identificar y caracterizar el proteoma de la respuesta SOCE mediante Split-TurboID utilizando marcaje molecular por proximidad con biotina.	23
4.2. Validar la interacción de proteínas asociadas.	23
4.3. Determinar la participación de proteínas identificadas en la regulación de la respuesta SOCE.	23
5. METODOLOGÍA	24
5.1 Cultivo celular y transfecciones	24
5.2 Soluciones y medios de cultivo.....	24
5.3 Plásmidos y clonamientos.....	25
5.4 Marcaje Molecular con Biotina por Split-TurboID.....	27
5.5 SDS-PAGE e <i>Immuno Blot</i>	29

5.6 Inmuoprecipitación.....	30
5.7 Inmunofluorescencia	30
5.8 Medición de imagen de calcio.....	31
5.9 Análisis Bioinformáticos y Base de Datos	32
5.10 Análisis estadísticos.	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1 Generación de vectores de expresión codificantes para Split-TurboID.....	34
6.2 Marcaje molecular con biotina por Split-TurboID	35
6.3 RNA Helicasa A, DHX9.....	46
6.4 Validación de interacción entre DHX9 con SARAF	55
6.5 Efecto de la sobreexpresión de DHX9 en SOCE	56
7. DISCUSIÓN	62
7.1 Caracterización del proteoma de la respuesta SOCE por Split-turboID y detección de DHX9 en el complejo STIM1/SARAF.....	62
7.2 DHX9 co-inmunoprecipita con SARAF en condiciones de reposo.....	68
7.3 Sobreexpresión de DHX9 afecta la entrada de calcio a la célula en SOCE.	69
7.4 DHX9 se sobreexpresa en ciertos cánceres, teniendo implicancia en la disminución en la sobrevivencia de los pacientes.	70
8. CONCLUSIONES	73
9. PERSPECTIVAS	74
10. ANEXOS	75
11. BIBLIOGRAFÍA	76

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

APEX2: Ascorbato Peroxidasas 2.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

BioID: Marcaje Molecular de Proximidad dependiente de Biotina.

BirA*: Biotina Ligasa de *E. coli* (R118G).

BSA: Albúmina de suero bovino.

CC: Regiones Coiled-Coil.

CHOL: Colangiocarcinoma.

CRAC: Canal Activado por Liberación de Calcio.

CTID: Dominio C-Terminal inhibitorio de STIM1.

DAG: Diacilglicerol.

DLBC: Linfoma Difuso de Células B Grandes.

FCDI: Inactivación Rápida Dependiente de Ca^{2+} .

GBM: Glioblastoma.

I_{CRAC}: Corriente de canales activados por liberación de calcio.

ID: Dominio de inactivación de STIM1.

IF: Inmunofluorescencia.

IP: Inmunoprecipitación.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

IPP: Interacciones Proteína-Proteína.

KO: *KnockOut*.

LC-MS/MS: Espectrometría de Masa.

LGG: Gliomas de bajo grado.

LIHC: Carcinoma Hepatocelular de Hígado.

LUAD: Cáncer de pulmón.

MP: Membrana Plasmática.

NTP: Nucleósidos trifosfatos.

PAAD: Adenocarcinoma pancreático.

PIP₂: Fosfoinositol 4,5-bifosfato.

PLA: Ligación por proximidad.

PLC: Fosfolipasa C.

PP: Proteínas purificadas.

RE: Retículo Endoplasmático.

RE-MP: Uniones Retículo Endoplasmático-Membrana Plasmática.

RNA-seq: Secuenciación del transcriptoma.

SCDI: Inactivación Lenta Dependiente de Ca^{2+} .

scrRNA: RNA *scramble*.

SERCA: Bomba Ca^{2+} ATPasa del retículo sarco/endoplásmico.

siRNA: RNA de interferencia.

SOAR: Región Activadora STIM1-ORAI.

SOCE: Entrada de Ca^{2+} Operada por Reservorios Internos.

TG: Tapsigargina.

THYM: Cáncer de Timo.

WT: *Wild Type* (Tipo silvestre o natural).

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

	Página
Figura 1: SOCE.....	2
Figura 2: Topología de la proteína ORAI1.....	3
Figura 3: Topología, dominios y motivos de STIM1.....	5
Figura 4: SARAF como principal regulador de SOCE.....	8
Figura 5: Modelos de SCDI mediado por SARAF.....	11
Figura 6: Reguladores de SOCE.....	15
Figura 7: Marcaje molecular con Biotina.....	18
Figura 8: Controles para marcaje molecular con biotina.....	28
Figura 9: Esquema de marcaje molecular con Biotina en SOCE.....	34
Figura 10: Validación de plásmidos para Split-TurboID.....	35
Figura 11: Detección de proteínas biotiniladas durante depleción reticular....	36
Figura 12: Detección de STIM1-V5-NTurbo.....	37
Figura 13: Detección de proteínas biotiniladas en reposo.....	38
Figura 14: Detección de STIM1-V5-NTurbo y SARAF-HA-CTurbo.....	39
Figura 15: Controles negativos del marcaje molecular con biotina.....	40

	Página
Figura 16: Inmunofluorescencia de Split-TurboID en depleción reticular.....	42
Figura 17: Identificación de DHX9 en espectrometría de masa.....	45
Figura 18: Asociación de DHX9 con patologías.....	47
Figura 19: Evidencia de interacción con DHX9.....	48
Figura 20: Niveles de expresión de DHX9 en diversos tumores.....	50
Figura 21: Supervivencia en cáncer respecto a DHX9.....	52
Figura 22: Relación de expresión entre <i>DHX9</i> , <i>STIM1</i> , <i>ORAI1</i> y <i>SARAF</i>	53
Figura 23: Detección de DHX9 en inmunoprecipitación de SARAF.....	55
Figura 24: SOCE al sobreexpresar DHX9-mCherry2.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Proteínas reguladoras de SOCE.....	4
Tabla 2: Lista de partidores.....	25
Tabla 3: Lista de anticuerpos.....	29

RESUMEN

La entrada de Ca^{2+} operada por reservorios internos (SOCE) es el mecanismo principal para regular las señales de Ca^{2+} en células no excitables. Las proteínas STIM1, ORAI1 y SARAF participan en SOCE, que median este mecanismo a través de interacciones proteína-proteína (IPP). Sin embargo, los mecanismos reguladores o los componentes que componen los complejos proteicos asociados no son del todo conocidos, por lo anterior, el objetivo de este estudio es identificar proteínas reguladoras de las principales características de la respuesta SOCE en reposo y al inducir la depleción de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). Para ello se utilizó la herramienta de marcaje molecular de proximidad con biotina, Split-TurboID, utilizando las principales proteínas que median SOCE. Se identificó la proteína ARN Helicasa A, DHX9, que participa principalmente en el mantenimiento del material genético, pero se ha demostrado su participación en patologías como el cáncer y la senescencia. En este trabajo se determinó que DHX9 se encuentra en las proximidades del complejo STIM1/SARAF y, mediante experimentos de imagen de calcio, se observó que la sobreexpresión de DHX9 genera una disminución de la entrada de Ca^{2+} a la célula. Juntos, estos datos sugieren que DHX9 podría constituir un nuevo regulador de la respuesta SOCE.

ABSTRACT

Store Operated Calcium Entry (SOCE) is the primary mechanism for regulating Ca^{2+} signals in non-excitable cells. STIM1, ORAI1, and SARAF participate in SOCE, which mediates this mechanism through protein-protein interactions (PPIs). However, the regulatory mechanisms or the components that make up the associated protein complexes are not fully known. Therefore, this study aims to identify regulatory proteins of the main features of the SOCE response at rest and when inducing Ca^{2+} depletion of the endoplasmic reticulum (RE). For this purpose, the biotin proximity molecular labeling tool, Split-TurboID was used, using the main proteins that mediate SOCE. The RNA Helicase A protein, DHX9, was identified, which mainly participates in the maintenance of genetic material, but its participation in pathologies such as cancer and senescence has been shown. This work determined that DHX9 is located in the vicinity of the STIM1/SARAF complex. Calcium imaging experiments showed that the overexpression of DHX9 generates a decrease in the entry of Ca^{2+} into the cell. Together, these data suggest that DHX9 might constitute a novel regulator of SOCE response.

INTRODUCCIÓN

1.1 El calcio y SOCE.

El catión divalente calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero requerido para diversos procesos de señalización celular tales como; la liberación vesicular, proliferación, apoptosis, motilidad y contracción muscular; transmitiendo la estimulación extracelular en cascadas de señalización intracelular específicas (1). La desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular se ha asociado con múltiples enfermedades humanas, incluidos defectos del desarrollo, inmunodeficiencia (2), enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y en el desarrollo del cáncer (3). Por esta razón es importante caracterizar las señalizaciones mediadas por Ca^{2+} para detectar posibles blancos terapéuticos.

Las células utilizan una variedad de mecanismos celulares y moleculares para controlar los cambios de concentración de Ca^{2+} citoplasmático, esta señalización está presente tanto en células excitables como en no excitables (4). En éstas últimas, la señalización de Ca^{2+} se inicia generalmente por la estimulación de un receptor acoplado a proteína G o un receptor tirosina quinasa, los cuales desencadenan la activación de Fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) generando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (Fig. 1(2)). En el caso del IP_3 , éste activa canales en la membrana del retículo endoplasmático (RE) produciendo la liberación de Ca^{2+}

reticular hacia el citoplasma, depletando por tanto el RE, lo que activa un proceso llamado Entrada de Calcio Operada por Reservorios Intracelulares (SOCE, del inglés, *Store-Operated Calcium Entry*) (Fig. 1), como respuesta que se desencadena para reponer los reservorios internos de Ca^{2+} y que afecta a un sin número de procesos celulares como los mencionados anteriormente, generando cambios a nivel transcripcional (5).

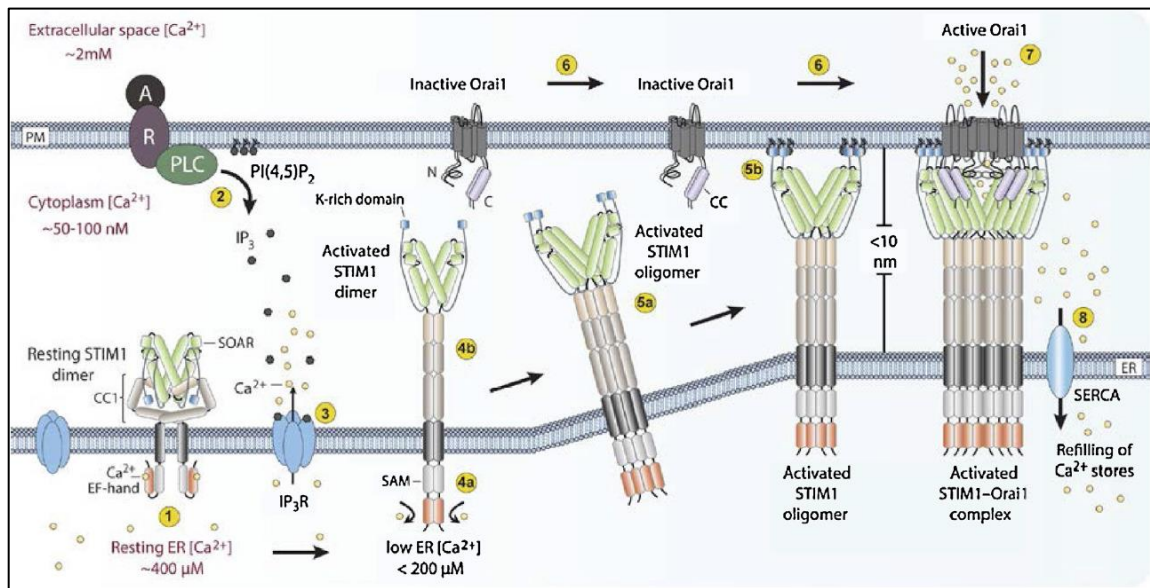


FIGURA 1: SOCE. 1) STIM1 en reposo, 2) PLC, 3) Liberación calcio, 4) STIM1 activo, 5) Oligomerización STIM1, 6) translocación a MP, 7) complejo STIM1-Orai1, 8) Bomba Ca^{2+} ATPasa. (Obtenido de Bhardwaj, R. *et al.* 2016).

En lo que respecta a la respuesta SOCE, una vez desencadenada la depleción de Ca^{2+} del RE, se induce la oligomerización y translocación de la proteína denominada “Molécula de Interacción Estromal 1” (STIM1) a regiones cercanas a la membrana plasmática (MP) en las llamadas uniones Retículo Endoplasmático-Membrana Plasmática (RE-MP), en donde STIM1 interactúa con

el canal Orai1, e inicia el ingreso de Ca^{2+} , iniciando la reposición de los reservorios intracelulares, hasta la inhibición de SOCE (6) (Fig. 1).

1.2 Participación de Orai1 y STIM1 en la respuesta SOCE.

La principal corriente que media la respuesta SOCE es la corriente CRAC (I_{CRAC}) (7), la cual es altamente selectiva para Ca^{2+} y depende del canal Orai1 (8), este canal se expresa en diversos tejidos y tipos celulares en el cuerpo humano y es consistente con la observación de la presencia de corrientes SOCE e I_{CRAC} en muchos tipos de células (9).

El canal Orai1 se encuentra formado por tres homodímeros de la proteína de transmembrana Orai1 localizada en la MP (Fig. 2), formando un hexámero (10, 11). Este canal se puede encontrar en tres conformaciones; cerrada, parcialmente abierta (cuando se une con los primeros dímeros de STIM1) y una conformación totalmente abierta cuando ya interactúa con todas las moléculas de STIM1 necesarias para su completa activación (12).

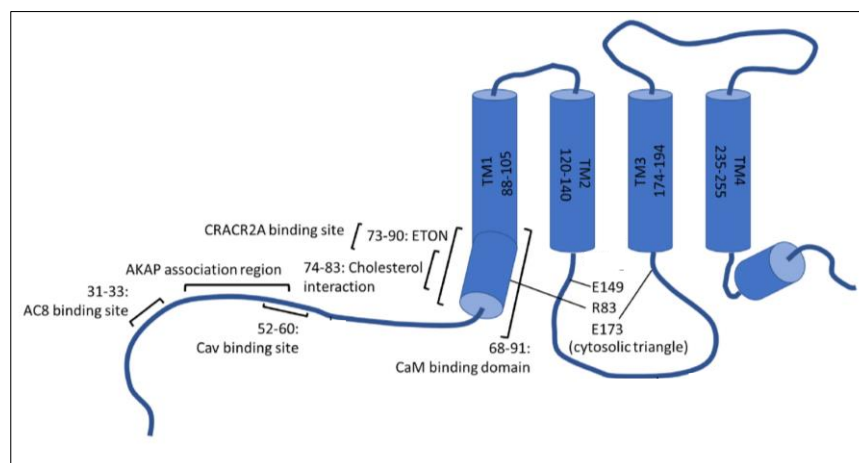


FIGURA 2: TOPOLOGÍA DE LA PROTEÍNA ORAI1. Se indican diferentes regiones donde hay evidencia de interacción con diferentes proteínas: AC8: Adenilato ciclasa 8, AKAP: Proteína de anclaje de quinasa A, Cav: Caveolina, CaM: Calmodulina, CRACR2A: Proteína reguladora 2A de CRAC, ETON: N-terminal transmembrana de Orai1, TM: Dominios de transmembranas del 1 al 4. Imagen adaptada de Humer C., *et al.* 2022. 3

En el canal Orai1, tanto el N-terminal como el C-terminal cumplen una función importante en la unión con STIM1, que mediante interacciones proteína-proteína (IPP) provocan cambios conformacionales que modulan su apertura, donde la región C-terminal contribuye a una alta unión por afinidad (13). Si bien se conocen proteínas que interactúan con Orai1 como CRACR2A (14) o la Adenilato ciclasa (15) (Tabla 1 y Fig. 2) en las uniones RE-MP, no se conocen totalmente las proteínas reguladoras que puedan controlar tanto su apertura como su inactivación y tampoco se conoce los componentes del complejo proteico STIM1-Orai1 (Fig. 1 (7)).

Regulador	Interacciona	Región	Función	Ref
CRACR2A	Orai1	N-t	Estabilización complejo STIM1-Orai1	14
AC8	Orai1	N-t	Coordinar señales Ca^{2+} /AMPc	15
AKAP79	Orai1	N-t	Dirigir activación NFAT1	16
Caveolina	Orai1	N-t	internalización vía endocitosis	17
Calmodulina	Orai1	N-t	Promover inactivación canales CRAC	18
α -SNAP	Orai1/STIM1	C-t/SOAR	Re-arreglo molecular STIM1-Orai1	19
Septinas	Orai1/STIM1	Citosólica	Reclutamiento y translocación a RE-MP	20
EFHB	STIM1/SARAF	Citosólica	Estabilizar interacción	21
ALG-2	STIM1/SARAF	Citosólica	Estabiliza interacción	22
STIMATE	STIM1	CC	Reclutamiento STIM1 y formación RE-MP	23
Golli	STIM1	C-t	Atenuación de SOCE	24
ORMDL3	STIM1	C-t en RE	Atenúa corriente I_{CRAC}	25
JUNCTATE	STIM1	Luminal	Reclutamiento STIM1 y regular RE-MP	26
PGRMC1	STIM1	Citosólica	Potencia señales de Ca^{2+} en cáncer de mamas	27

TABLA 1: PROTEÍNAS REGULADORAS DE SOCE. Nomenclatura: N-t: N-terminal, C-t: C-terminal, AMPc: AMP cíclico, CC: Región Coiled-Coil, NFAT1: *Nuclear factor of activated T-cells 1*; SOAR: Región activadora STIM1-Orai1 Ref: referencia.

El canal Orai1 es activado por la proteína STIM1, una proteína integral de membrana, localizada en el RE, la cual contiene un dominio transmembrana, un dominio luminal hacia el N-terminal y un dominio citosólico hacia el C-terminal

(28, 29), ambos dominios tienen funciones importantes en SOCE: La región luminal tiene como función censar los niveles de Ca^{2+} en el RE, gracias a que presenta un dominio EF-hand, el cual posee sitios de unión a Ca^{2+} (30). Por lo tanto, cuando se depleta el Ca^{2+} del RE y, por tanto, la concentración de Ca^{2+} disminuye, éste se disocia del dominio EF-hand, generando un cambio conformacional que lleva a STIM1 a un estado desplegado activo en donde homodimeriza (31). Además, en la región luminal se localiza el dominio SAM que es primordial para la formación de los homodímeros. Cabe destacar que tanto el dominio EF-hand como el dominio SAM interactúan entre ellos (32), por lo que se denominan dominio EF-SAM (Fig. 3).

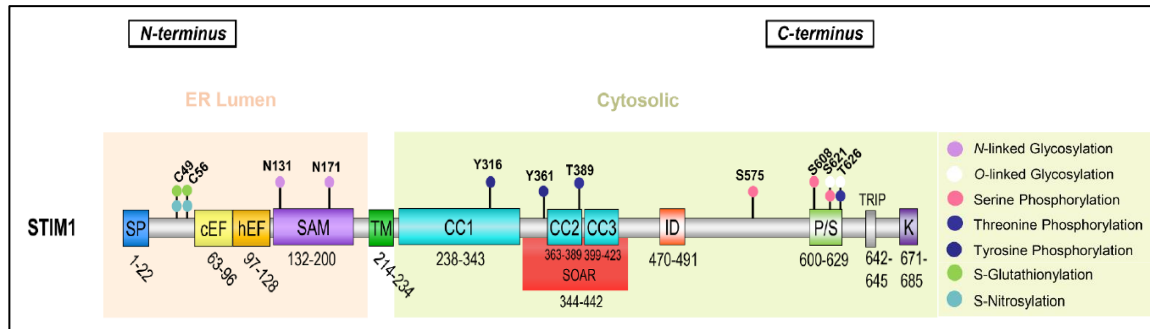


FIGURA 3: TOPOLOGÍA, DOMINIOS Y MOTIVOS DE STIM1. En la región N-terminal se indica el péptido señal (SP) y el dominio EF-SAM (EF-hand y dominio SAM). Luego se indica la región transmembrana (TM). En la región C-terminal se indican las regiones coiled coil (CC), la región SOAR, luego la región inhibitoria (ID), la región rica en serina y prolina (P/S) y la región rica en lisinas (K). Se indican diversos residuos que presentan modificaciones post-traduccionales. Imagen adaptada de Jhonson J., et al. 2022.

La región citosólica presenta varios motivos que cumplen funciones específicas en SOCE (33) (Fig. 3), como la región rica en lisinas, cuya carga positiva permite que pueda interactuar con la MP generando la unión RE-MP (34). En lo que respecta a la región rica en prolina y serina (P/S), se ha estudiado que ocurren fosforilaciones mediadas por ERK1/2 o O-Nacetil-glicosilaciones que

permiten regular su función (35). Adicionalmente, STIM1 presenta una región denominada SOAR, la cual interactúa con el canal Orai1, cuando ocurre la translocación de STIM1 hacia las cercanías de la MP (36), siendo SOAR indispensable para esta unión (37), formando la unión RE-MP y provocando el cambio conformacional en Orai1 lo cual permite la entrada de Ca^{2+} a la célula (38). Estos cambios conformacionales se han estudiado gracias a la determinación de la estructura cristalográfica de SOAR y Orai1 (39). Por otra parte, STIM1 también presenta un dominio de inactivación (ID) que fue recientemente identificado como un elemento importante para mantener a SOAR en la conformación de reposo (40).

En estado de reposo, STIM1 se encuentra en su conformación cerrada gracias a las interacciones en sus regiones coiled-coil (CC) ubicadas en la región citosólica, asociada a la proteína reguladora SARAF (41). Adicionalmente, se sabe que la proteína EFHB (21) se asocia a STIM1 previniendo su activación espontánea, pero se desconoce el complejo proteico asociado en reposo. De esta manera, STIM1 y Orai1 son proteínas esenciales para la activación de los canales CRAC y la actividad de SOCE, en donde STIM1 es el sensor de Ca^{2+} y Orai1 el canal que forma el poro para el ingreso de Ca^{2+} . Sin embargo, a pesar de que los mecanismos de regulación no se encuentran totalmente caracterizados, se ha descrito que uno de los reguladores importantes de la respuesta SOCE, es la proteína SARAF (42, 43).

1.3 SARAF como principal regulador de SOCE

El Factor Regulatorio Asociado a SOCE (SARAF) el cual se encuentra en el RE, ha sido recientemente presentado como un nuevo regulador de la homeostasis del Ca^{2+} a través de su interacción con STIM1 (44). Estructuralmente SARAF, es una proteína de transmembrana de 339 aminoácidos que presenta un dominio luminal hacia el N-terminal y hacia su C-terminal, el dominio citosólico (45).

Se ha evidenciado que el dominio luminal regula la actividad de SARAF, pero es su región citosólica la necesaria para la modulación de la respuesta SOCE mediante IPP al complejo STIM-Orai1 (45). Se han realizado ensayos basados en FRET (del inglés, *Förster Resonance Energy Transfer*), que han demostrado que SARAF interactúa con STIM1 en condiciones de reposo y previene la activación espontánea de STIM1 (46) (Fig. 4A).

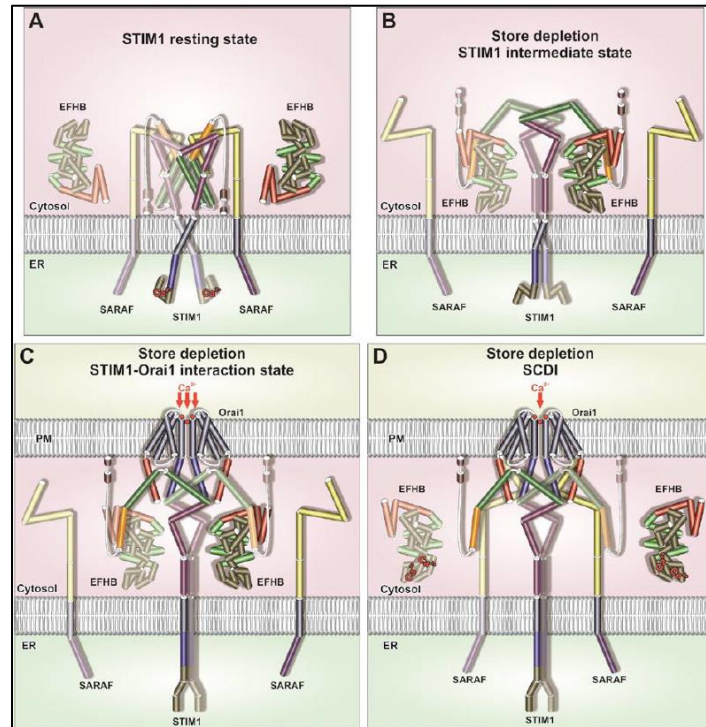


FIGURA 4: SARAF COMO PRINCIPAL REGULADOR DE SOCE. **A:** SARAF interactúa con STIM1 en reposo. **B:** Durante la depleción del RE, STIM1 sufre cambio conformacional y ocurre disociación de SARAF. **C:** STIM1 interactúa con Orai1 para permitir entrada de calcio, SARAF se co-localiza en uniones RE-MP. **D:** SARAF promueve la inhibición lenta (SCDI) de SOCE. (Obtenido de Albarran, L., et al. 2018).

La interacción de STIM1 con SARAF ocurre en el dominio C-terminal de STIM1 (aminoácidos 448-530), cuya deleción se ha informado que induce la agrupación espontánea de STIM1 y activación completa de Orai1 independientemente de las concentraciones de Ca²⁺ en el RE (44). Una vez que ocurre la depleción del RE, SARAF se disocia del dominio SOAR de STIM1 (Fig. 4B), y de esta manera permite la activación de Orai1 y genera como consecuencia la respuesta SOCE (47).

Por otra parte, en las uniones RE-MP también se encuentra presente SARAF (Fig. 4C), en donde ocurre la interacción con Orai1. Es una interacción

transitoria, donde se ha visto que dicha interacción ocurre hasta 30 segundos después de la estimulación y requiere de la región C-terminal de Orai1, permitiendo la regulación de SOCE (47). Se ha evidenciado que mutantes de Orai1 que carecen del extremo C-terminal no pueden unirse a SARAF, lo cual evidencia la relevancia de esta región presente en Orai1 para permitir la respuesta SOCE (46).

Por lo tanto, SARAF se ha establecido como el regulador más importante, involucrado en la inhibición de la respuesta SOCE, en donde, el dominio citosólico es necesario para impulsar la inactivación de SOCE a través de IPP con STIM1 evitando su activación espontánea (48), pero en un estudio reciente se han desarrollado líneas estables de células no excitables (HEK293 y Jurkat) *knockout* (KO) para SARAF, en donde se evidenciaron diferentes efectos en éstas células, como por ejemplo; una reducción en la magnitud y en la corriente SOCE, una disminución del reclutamiento de STIM1 en RE-MP y una disminución del Ca^{2+} luminal y citoplasmático, por lo que SARAF también ayuda a promover SOCE, por lo que la regulación que genera SARAF es dual y bidireccional en este tipo de respuesta (49).

1.4 Regulación de SOCE, un mecanismo no caracterizado.

En términos de la regulación de la actividad de los canales Orai1, la respuesta SOCE, está sujeta a variadas IPP, siendo éstas directas o indirectas, así como a procesos regulatorios que determinan la duración y magnitud del flujo

de Ca^{2+} (6). Existen dos modos de control de los canales CRAC, el primer modo consiste en una inactivación rápida (FCDI, *Fast Ca²⁺-Dependent Inactivation*), cercano en un tiempo de milisegundos (50), que depende en gran parte de STIM1 y de la unión de calmodulina a Orai1, y el segundo modo consiste en una inactivación lenta (SCDI, *Slow Ca²⁺-Dependent Inactivation*), que se desarrolla gradualmente sobre los 10 segundos, el cual es un mecanismo que no se encuentra totalmente dilucidado en la actualidad. SCDI depende de múltiples proteínas y mecanismos celulares, pero es sabido que SARAF es uno de sus principales reguladores (Fig. 2D) y por lo tanto, un regulador de SOCE, para mantener la homeostasis de Ca^{2+} al interior de la célula (51).

Con respecto a SCDI mediada por SARAF, se han descrito diferentes mecanismos, demostrando lo complejo que ha sido su caracterización. Se ha evidenciado que SARAF interactúa con Orai1, y es dirigida tanto por el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico global (51), así como la interacción de proteínas como es el caso de la proteína ALG-2, donde tras el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular al intracelular, ALG-2 interactúa con el complejo STIM1/SARAF promoviendo SCDI (22) (Fig. 5A).

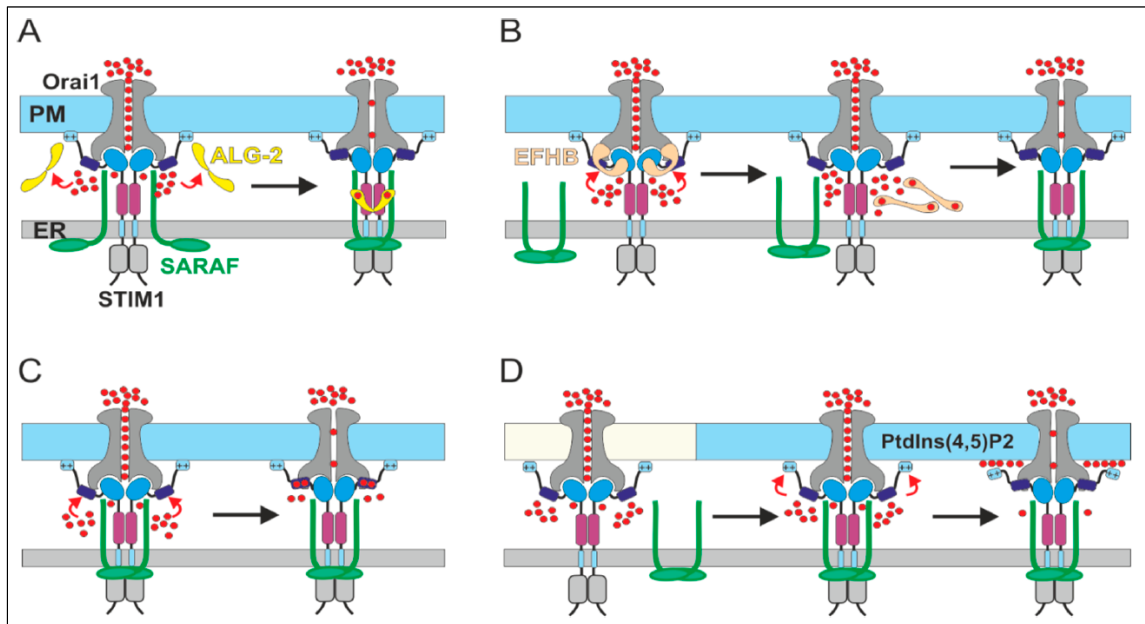


FIGURA 5: MODELOS DE SCDI MEDIADO POR SARAF. A: El aumento de Ca²⁺ citoplasmático promueve la interacción de la proteína ALG-2. B: El aumento de Ca²⁺ causa disociación de EFHB. C: Unión de Ca²⁺ a ID de STIM1. D: Unión de SARAF a STIM1 facilita la translocación de STIM1 e interacción con PIP₂. Dagan I., et al. 2021.

En SCDI además participa calmodulina, la cual al aumentar la concentración de Ca²⁺, cambia su conformación por la unión de Ca²⁺ a sus dominios EF-hand e interacciona con la región SOAR de STIM1, permitiendo a su vez la disociación de SOAR de Orai1 y, por consiguiente, la pérdida de interacción entre STIM1 y Orai1 (52). Por el contrario, se ha reportado que ocurre lo opuesto con la proteína EFHB, ya que al incrementar los niveles de Ca²⁺ citoplasmático, causa la disociación de STIM1 favoreciendo su interacción con SARAF y la subsecuente inactivación del canal (21) (Fig. 5B).

Estudios recientes de SCDI, han demostrado que ocurre la unión de Ca²⁺ a ID de STIM1 induciendo la inactivación del canal cuando SARAF interactúa con

esta última (49) (Fig. 5C). Además, se ha estudiado que la región poli-básica de STIM1 interactúa con PIP₂ en la MP. En regiones donde ocurre la formación de RE-MP, es requerido para la re-asociación de SARAF con STIM1, lo cual permite la SCDI (53). Mientras que el aumento local de Ca²⁺ promueve la inactivación del canal al remodelar la interacción de STIM1 con PIP₂, y promueve la inactivación del canal al remodelar la interacción de STIM1 con la MP (54) (Fig. 5D).

Además de los estudios de SCDI, también se ha estudiado la importancia de SARAF en la regulación de SOCE. Se ha demostrado que la concentración basal de Ca²⁺ en el RE es menor en células que sobreexpresan SARAF y al reducir la expresión de SARAF con siRNA resulta en una significativa elevación del Ca²⁺ citoplasmático basal, en comparación con las células control, además de elevar los niveles de Ca²⁺ en el RE (44). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en las células KO para SARAF se afecta tanto la activación del canal Orai1 como su inactivación (49). Cabe mencionar que al utilizar siRNA contra SARAF, no se silencia completamente la expresión de esta proteína, sin embargo, la baja cantidad de SARAF, se ha visto que es suficiente para la activación de Orai1, pero no para provocar su inactivación, siendo consistente con que SOCE y el Ca²⁺ citoplasmático se incrementan con la reducción parcial de SARAF. En células SARAF KO se observa lo contrario, ya que se elimina completamente su expresión provocando la disminución de SOCE (50).

Por otro lado, se ha evidenciado que tanto la región N- como C- terminal de SARAF cumplen un rol en la regulación de SOCE comprobándose experimentalmente que la región C-terminal citosólica es requerida para la inactivación de SOCE, y su delección elimina la capacidad de SARAF para modularla, ya que como se ha mencionado anteriormente, la región C-terminal de SARAF interactúa con STIM1 en las uniones RE-MP y con una interacción más débil interactúa con Orai1. Por lo tanto, la eliminación de la región C-terminal no controla la entrada de Ca^{2+} , pero si aumenta la concentración de Ca^{2+} en la célula (45, 46).

Con respecto a la región N-terminal de SARAF, se ha visto que está involucrada en la regulación de la actividad inhibitoria de SARAF y presenta una interacción débil con STIM1 (44). Experimentalmente, la delección de esta región resulta en una fuerte inhibición de SOCE, y al mutar un residuo clave en la región N-terminal (E148A), inactiva la actividad de SARAF, generando un efecto similar que, al silenciar la expresión de SARAF, evitando que pueda controlar la entrada de Ca^{2+} y, por tanto, aumentando la concentración, pero de igual manera esta mutante, es capaz de translocar a las uniones RE-MP durante SOCE (45, 46).

Otros estudios han revelado una región en STIM1 entre los residuos 448 y 530 denominada dominio C-terminal inhibitorio (CTID), que induce la espontanea oligomericación de STIM1 y activación de Orai1. Por lo tanto, en reposo la región SOAR-CTID de STIM1 facilita el acceso de SARAF a SOAR para

evitar la activación espontánea de Orai1 y al activarse STIM1 por depleción del RE lleva a un cambio conformacional seguido por la disociación de SARAF del dominio SOAR permitiendo la activación de Orai1 y SOCE (51). SARAF también interactúa con la región C-terminal de Orai1, es una interacción transitoria y dinámica, esta interacción es independiente de STIM1 en RE-MP, a pesar de ello, es requerida la translocación de STIM1 a la MP para que ocurra esta interacción (46).

1.5 Reguladores de la respuesta SOCE

Como se ha descrito, SARAF juega un papel relevante en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (44), pero se han identificado otras proteínas reguladoras que participan en SOCE (55), algunas de ellas se nombran en la Tabla 1. Si bien se conocen proteínas que participan en este proceso (Fig. 6), no se conocen los mecanismos de regulación ni los complejos proteicos asociados al reposo o tras la formación del complejo STIM1-Orai1 producto de la depleción del Ca^{2+} reticular, y se sugiere que la respuesta es más compleja. De esta manera, la identificación de proteínas reguladoras de los complejos Orai1-STIM-SARAF y sus dinámicas constituyen una interesante pregunta de interés biológico y por extensión, biomédico. En este contexto, la identificación de los constituyentes de un complejo proteico o presentes en estos mecanismos dinámicos siempre es un

desafío, por la dificultad de detectar interacciones débiles o transitorias. Sin embargo, existen diferentes herramientas y enfoques que se puede ejecutar.

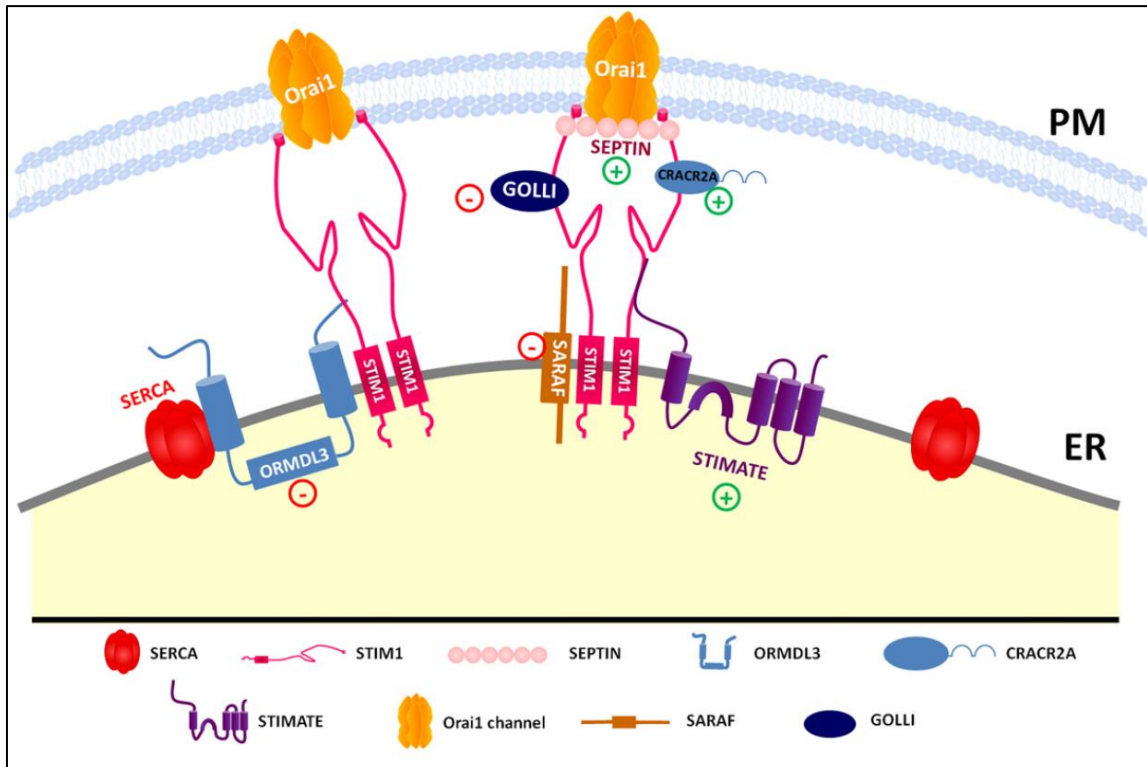


FIGURA 6: REGULADORES DE SOCE. Se conocen diversas proteínas que interactúan con STIM1 y Orai1 ejerciendo diversas funciones [Tabla 1], en donde, con un signo negativo (-) se indica que promueven la inhibición de SOCE, y con un signo positivo (+) son reguladores positivos, a pesar de ello, no se conoce totalmente los mecanismos de regulación. (Obtenido de Lopez, J. J., et al. 2016).

Una herramienta de gran utilidad que puede utilizarse es el análisis de la información previa de proteínas homólogas en otros organismos, como se ha visto previamente en los estudios del canal Orai1 en *Drosophila melanogaster*. En estos estudios se realizó un análisis de 6 genes en humanos y mediante el uso de RNAi, se determinó que α -SNAP cumple un rol en el re-arreglo molecular del complejo STIM1-Orai1 para su activación (19). Sin embargo, no siempre se

puede contar con esa información y no necesariamente las funciones de proteínas homólogas son equivalentes.

Otra herramienta para la determinación de componentes de un complejo proteico es la cromatografía de afinidad, en la cual, mediante inmuno-afinidad, purificando Orai1, se determinó que la proteína JUNCTATE interacciona con el complejo STIM1-Orai1 en las uniones RE-MP (26). Por otra parte, se determinó mediante siRNA y mutagénesis sitio dirigida, que la proteína CRACR2A se encuentra en el complejo molecular STIM1-Orai1, estabilizando su interacción (14). Por otra parte, también se puede estudiar posibles proteínas involucradas en esta dinámica de interacciones transitorias mediante inmunoprecipitación, tal como se determinó en un estudio donde se identificó que EFHB interacciona con STIM1 y SARAF en reposo (21).

Las técnicas mencionadas pueden tener limitaciones, como la no detección de proteínas con una interacción transitoria o débil con el complejo proteico, por lo que se han desarrollado nuevas estrategias. Por ejemplo, STIMATE (23, 56), se identificó mediante la herramienta APEX2, que es una técnica de marcaje molecular por proximidad dependiente de biotina (BioID), que utiliza la enzima ascorbato peroxidasa 2 (APEX2), fusionada a la proteína de interés, que con un sustrato de biotina-fenol y peróxido de hidrógeno, genera radicales altamente reactivos de vida corta, que atacan regiones ricas en electrones de las proteínas próximas generando un enlace covalente en residuos

aromáticos (57). Para la identificación de STIMATE se generó STIM1-APEX2, detectando 73 proteínas interactuando, de las cuales se encontraron proteínas residentes del RE y la MP, componentes del citoesqueleto, proteínas asociadas al tráfico intracelular o proteínas asociadas a modificaciones post-traduccionales (23, 56). No obstante, esta herramienta tiene una desventaja que es el uso de peróxido de hidrógeno que es tóxico para las células a altas concentraciones (57). Otra herramienta basada en el marcaje molecular por proximidad con biotina, es el sistema Split-BioID que consiste en la utilización de la región N y C terminal de la biotina ligasa de *E. coli* (58), en donde cada fragmento se fusionó a STIM1 y ORAI1, que al interactuar durante la depleción del RE, provoca la biotilación de las proteínas que interactúen con el complejo STIM1-ORAI1, y de esta manera se identificó a la proteína “componente 1 del receptor de membrana de progesterona” (PGRMC1, *Progesterone Receptor Membrane Component 1*), se caracterizó su unión a STIM1 y se determinó que es esencial para la señalización de Ca²⁺ en cáncer de mamas (27). De esta manera, el empleo de este tipo de estrategias puede contribuir a la caracterización de complejos asociados de manera dinámica al complejo Orail-STIM1 durante la respuesta SOCE.

1.6 Marcaje Molecular por proximidad con Biotina.

La identificación de proximidad dependiente de biotina (BioID) es un método desarrollado para la identificación de proteínas cercanas de una proteína

de interés en células vivas (59). La comprensión del interactoma o de complejos proteicos es clave en el entendimiento de la función celular, que no pueden determinarse por métodos binarios de IPP ya que no incorpora interacciones indirectas o en su contexto celular (60). BioID es una técnica en donde se fusiona una proteína de interés con la enzima encargada del marcaje covalente y que los productos marcados covalentemente con biotina pueden ser purificados e identificados mediante espectrometría de masa (LC-MS/MS) (61) (Fig. 7).

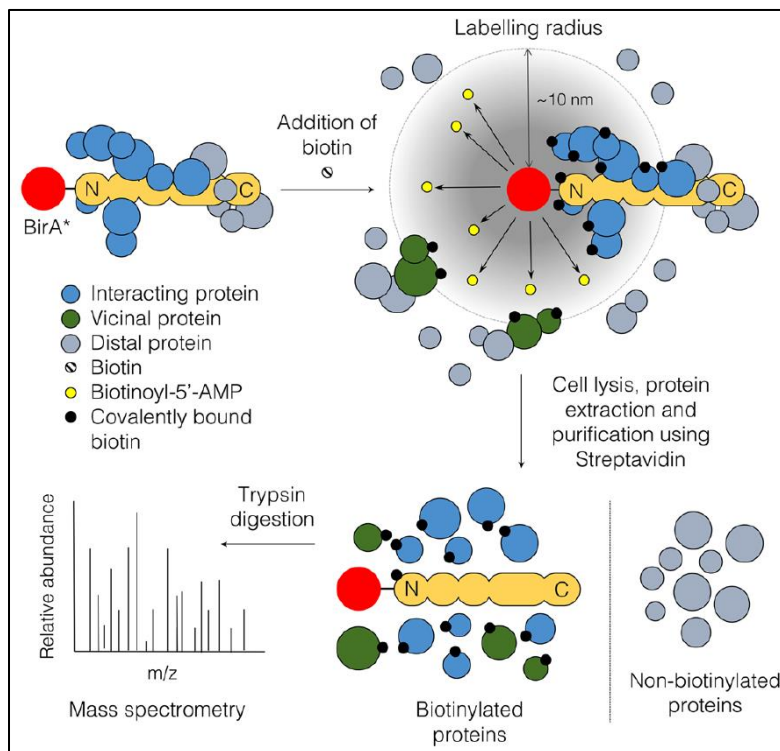


FIGURA 7: MARCAJE MOLECULAR CON BIOTINA. Esquema representativo del ensayo BioID (Obtenido de Varnaité, R. et al. 2016).

BioID ofrece ventajas sobre otros métodos convencionales binarios como el sistema de doble híbrido, co-Imunoprecipitación o crosslinking de complejos

proteicos, ya que estos métodos no permiten la identificación de interacciones transitorias o débiles (62).

Bioid hace uso de la habilidad de una mutante de biotina ligasa de *E. coli*, (BirA*), la cual realiza una biotinilación promiscua a las proteínas próximas debido a una mutación puntual en el sitio activo, R118G (63). Las biotinas ligasas son enzimas altamente conservadas y biológicamente importantes (59), la biotinilación es una reacción de dos pasos, en donde la enzima utiliza biotina y ATP para generar biotinilil-5'-AMP altamente reactivo, luego éste reacciona con una lisina de la proteína blanco para formar un enlace amida entre la biotina y la lisina en la cadena blanco con la liberación de AMP (64). La mutación de BirA* en el sitio activo, R118G, provoca una significativa reducción de la afinidad para biotinilil-5'-AMP y su liberación prematura. Este intermediario altamente reactivo puede ser accesible a las lisinas de proteínas cercanas, marcándolas covalentemente con biotina (59, 60). Con BirA* activa y biotina en el medio de cultivo de las células, se incuba por un período de tiempo para luego realizar la extracción, purificación e identificar las proteínas biotiniladas con LC-MS/MS. Cabe destacar que las proteínas próximas se biotinilan en un área de 10 nm (65).

Las ventajas de usar esta herramienta son: (I) No se requiere una interacción directa con las proteínas blanco en donde las proteínas próximas son biotiniladas, (II) las interacciones transitorias también son marcadas, (III) se pueden usar métodos para la purificación de proteínas biotiniladas con

estreptavidina debido a su alta afinidad con biotina, (IV) el marcaje con biotina es permanente debido a la formación de un enlace covalente con las proteínas, por lo que no es removido a pesar de los métodos de extracción y (V), es posible detectar proteínas de estructuras insolubles o detectar proteínas en organelos que pueden ser difíciles de purificar (63). Otra ventaja es que la modificación post-traducciona con biotina es poco frecuente en células de mamíferos, por lo que no existe una interferencia nativa y finalmente solo se requiere la expresión de la proteína de fusión en las células (66).

La técnica de BioID se ha empleado de manera exitosa en la determinación del proteoma de diversos complejos y procesos, como la lámina nuclear (67), el complejo del poro nuclear (68), el centrosoma (69), interacción célula-célula o célula-matriz extracelular (70), autofagia y la vía Hippo (71).

Existen diferentes variaciones de esta técnica, como la herramienta que se ha realizado mediante error prone PCR, dos nuevas variantes de BirA* de *E. coli*, denominadas TurboID y miniTurbo, las cuales presentan un incremento de su actividad catalítica en comparación con BirA*, estas enzimas presentan 14 y 12 mutaciones respectivamente que alteran la estructura del sitio catalítico que resulta en el incremento de la actividad (72).

Se han realizado ensayos que se basan en la expresión de dos mitades de una proteína reportera, fusionada a otras dos proteínas que interactúan. La asociación de las últimas proteínas atrae a los fragmentos informadores divididos

lo suficientemente cerca para reconstituir una proteína reportera funcional (58). A partir de esto, se ha diseñado la complementación de fragmentos utilizando TurboID como herramienta para identificar interacciones proteicas (Split-TurboID), así la enzima TurboID, cuando se fusiona por separado su C-terminal y N-terminal a dos proteínas, que al interactuar se forma una TurboID funcional que biotinila proteínas vecinas por la dimerización de las proteínas (73). De esta manera, en el contexto de la caracterización del proteoma asociado a los componentes de la respuesta SOCE, el uso de estas tecnologías puede dar luces a la identificación de proteínas regulatorias que se asocien de manera dinámica a los complejos Orai1-STIM-SARAF durante la respuesta SOCE, por lo que Split-TurboID es una buena herramienta para el estudio del interactoma de SOCE, por ser un mecanismo dinámico y así determinar no solo las proteínas asociadas al complejo proteico sino también interacciones débiles o transitorias y así identificar proteínas que regulen SOCE que no han sido descritas anteriormente y si estas proteínas se encuentran asociadas en condiciones de reposo o luego de la depleción del RE, por lo que se presenta la hipótesis de este trabajo.

2. HIPÓTESIS.

Los complejos proteicos asociados a la respuesta SOCE durante la depleción de calcio del retículo endoplasmático son diferentes a los complejos proteicos en condiciones de reposo, asociándose de manera distinta para permitir su regulación en células no excitables.

3. OBJETIVO GENERAL.

Identificar proteínas reguladoras de los principales componentes de la respuesta SOCE en reposo y al inducir la depleción de calcio del retículo endoplasmático en células HEK293.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

4.1. Identificar y caracterizar el proteoma de la respuesta SOCE mediante Split-TurboID utilizando marcaje molecular por proximidad con biotina.

Se trabajará con las proteínas STIM1, SARAF y ORAI1, para evaluar su proteoma, para ello se generarán vectores de expresión codificantes para el sistema Split-TurboID (73). Se realizará en células HEK293, incubando con biotina en condiciones de reposo y depleción del RE, para efectuar el marcaje molecular de proteínas cercanas, las proteínas biotiniladas serán purificadas con estreptavidina y detectadas por *immuno blot* e inmunofluorescencia (74, 75, 76). Se espera así identificar una proteína que pueda estar siendo parte del proteoma de SOCE.

4.2. Validar la interacción de proteínas asociadas.

Se validará la interacción de la proteína identificada en el proteoma con alguna de las proteínas principales que median SOCE, STIM1, ORAI1 o SARAF mediante inmunoprecipitación (77, 78).

4.3. Determinar la participación de proteínas identificadas en la regulación de la respuesta SOCE.

Mediante Imagen de Ca^{2+} utilizando la sonda Fura 2-AM, se detectará si la sobreexpresión de la proteína identificada que participa en SOCE afecta la entrada de calcio a la célula (79).

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivo celular y transfecciones

Las células HEK293 y HeLa fueron cultivadas en medio DMEM con glucosa (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (FBS) y 1% Penicilina/Estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) a 37°C y 5% CO₂. Las células HEK293 fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), utilizando 1 µL del reactivo por cada µg de DNA plasmidial, durante 6 h de incubación en DMEM con glucosa sin suero. Las células HeLa fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamina LTX (Thermo Fisher Scientific) utilizando 2 µL del reactivo por cada µg de DNA plasmidial, durante toda la noche en DMEM con glucosa 5% FBS (77).

5.2 Soluciones y medios de cultivo

Solución extracelular Ringer pH 7,4: 140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,18% Glucosa, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES; Solución extracelular Ringer sin calcio pH 7,4: 140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,18% Glucosa, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA; DPBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; Solución de lisis: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,1% Tritón X-100, 1 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 1 mM PMSF, 1X Cocktel Inhibidor Proteasas (PIC); Tampón reductor RSB 5X: 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, 0,1% azul bromofenol, 2% SDS, 70,5 mM β-Mercaptoetanol; Medio LB: 10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 10 g/L NaCl; Medio LB-agar:

medio LB con 15 g/L Agar-Agar bacteriológico; Tampón TAE: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA; Tampón TBS: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl; Tampón electroforesis: 49.5 mM Tris base, 384 mM Glicina, 0,1% SDS; Tampón de transferencia: 20 mM Tris base, 150 mM glicina, 20% metanol.

5.3 Plásmidos y clonamientos

Los plásmidos que contienen los fragmentos N- y C- terminal de la enzima TurboID se adquirieron en Addgene: pLX304 CMV FKBP-V5-sTurboID (N) (#153002) y pLX304 CMV HA-HaloTag-FRB-sTurboID (C) (#153003) (73). Los plásmidos se linealizaron mediante PCR con la enzima DNA polimerasa Pfu Ultra II Fusion HS (Agilent). De igual manera, a partir de las secuencias *STIM1* (NCBI: JX014264.1), *ORAI1* (NCBI: NM_032790.3) y *SARAF* (NCBI: NM_016127.6) se realizó PCR para amplificar estas secuencias, en donde se utilizó los partidores mencionados en la Tabla 2.

Partidor	Secuencia 5' - 3'	Tm (°C)	% GC
Turbo-N-F	ATGCAGGTGGAAACCATCTCCCC	61.5	56.5
Turbo-N-R	TCCTTCGAAGCCTGCTTTTTTG	56.2	45.4
STIM1-Turbo-F	CAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAATGGATGTATGCGTCCGTCTTGCCCTG	69.6	51
STIM1-Turbo-R	TGGGGAGATGGTTTCCAGCTGCATCTTCTTAAGAGGCTTCTTAAAG	66.8	45.7
Turbo-C-F	ATGTACCCATACGACGTTCCAGAC	58.3	50
Turbo-C-R	TCCTTCGAAGCCTGCTTTTTTG	56.2	45.4
SARAF-Turbo-F	GTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAATGGCCGCAGCCTGCGGG	71.7	58.1
SARAF-Turbo-R	GTCTGGAACGTCGTATGGGTACATTCGTCTCCTGGTACCACCATATC	67.6	51.1
ORAI1-Turbo-F	GTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAATGCATCCGGAGCCCGCC	70.5	55.8
ORAI1-Turbo-R	GTCTGGAACGTCGTATGGGTACATGGCATAGTGGCTGCCGGG	70.7	59.5
DHX9-Cherry-F	AAAAAGCTAGCATGCATCATCATCATCATATGGGTGACGTTAAAAATTTTC	64.6	33.3
DHX9-Cherry-R	AAAAAGGATCCATATAGCCGCCACCTCCTCTTCCCTG	66.6	51.4

TABLA 2: LISTA DE PARTIDORES. Partidores utilizados para los diferentes clonamientos. Tm: Temperatura de melting, %GC: corresponde al porcentaje de guanina y citosina.

Se procedió con la ligación Gibson (NEB Gibson Assembly Master Mix NEB #E2611) para incorporar la secuencia de los genes mencionados en los plásmidos, en donde se incubó el plásmido linealizado con los productos de PCR en una relación 1:3 con el reactivo Master Mix Gibson durante 1 h a 50°C. Luego se procedió con la transformación: Se incubó 2 µL de ligación con 50 µL de células quimiocompetentes *E. coli* DH5α en hielo por 30 min, luego se sometió a un shock térmico a 42°C por 1 min, y posterior incubación en hielo de 5 min, se agregó 1 mL de medio LB, se incubó 1 h 37°C con agitación, luego se plaqueó en medio LB agar 100 µg/mL ampicilina, e incubación toda la noche a 37°C. Las colonias fueron respaldadas en una nueva placa con medio LB agar Ampicilina, y se realizó PCR de colonia utilizando la enzima Taq Polimerasa (New England Biolabs) y se visualizó en un gel de agarosa 1% en tampón TAE. Las colonias positivas se crecieron en 5 mL de medio LB con ampicilina, se purificaron los plásmidos utilizando kit de purificación plasmidial E.Z.N.A. (Omega Bio-TEK), se confirmó mediante secuenciación, en donde se envió las muestras al centro de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se validaron los plásmidos mediante ensayos con enzimas de restricción; Para STIM1 se utilizó la enzima *NdeI* y para ORAI1 y SARAF *NcoI* (New England Biolabs) incubando los plásmidos con las enzimas 1 h a 37°C. Por lo tanto, las construcciones presentan en su región C-Terminal los fragmentos de la enzima TurboID, así estos plásmidos codifican para las proteínas de fusión: STIM1-V5-NTurbo, ORAI1-HA-CTurbo y SARAF-HA-CTurbo.

Se validó la expresión de las proteínas de fusión mediante *immuno blot* (materiales y métodos 5.5) y su localización mediante inmunofluorescencia (materiales y métodos 5.6), así como su funcionalidad mediante imagen de calcio (materiales y métodos 5.8) que fue corroborado por bibliografía según Jing, J., *et al.* 2015. y Lee, S. K., *et al.* 2022. (23, 27).

Para el diseño del plásmido que codifica la proteína de fusión DHX9-mCherry2, se utilizó el plásmido mCherry2-N1 (Addgene #54517) digerido con enzimas de restricción *NheI* y *BamHI* (New England, Biolabs) durante 1h a 37°C, y se amplificó la secuencia de *DHX9* mediante PCR utilizando los partidores indicados en la Tabla 2 y la enzima Pfu Ultra II Fusion HS (Agilent). Se digirió el producto de PCR de la misma manera que el plásmido, luego se procedió con la ligación utilizando la ligasa T4 (New England Biolabs) con una relación Vector:Inserto 1:3, se incubó 18 h a 16°C. Luego se transformó y buscó colonias positivas de la misma manera que las construcciones Split-TurboID, el plásmido con la secuencia de *DHX9*, MSCV-Myc-hDHX9-PuroR, fue donado por el Dr. Jerry Pelletier, McGill University.

5.4 Marcaje Molecular con Biotina por Split-TurboID

Se realizó el marcaje molecular con biotina en condiciones de depleción reticular utilizando las proteínas STIM1-V5-NTurbo y ORAI1-HA-CTurbo, y en condiciones de reposo utilizando las proteínas STIM1-V5-NTurbo y SARAF-HA-CTurbo, con los respectivos controles como lo indica la figura 8.

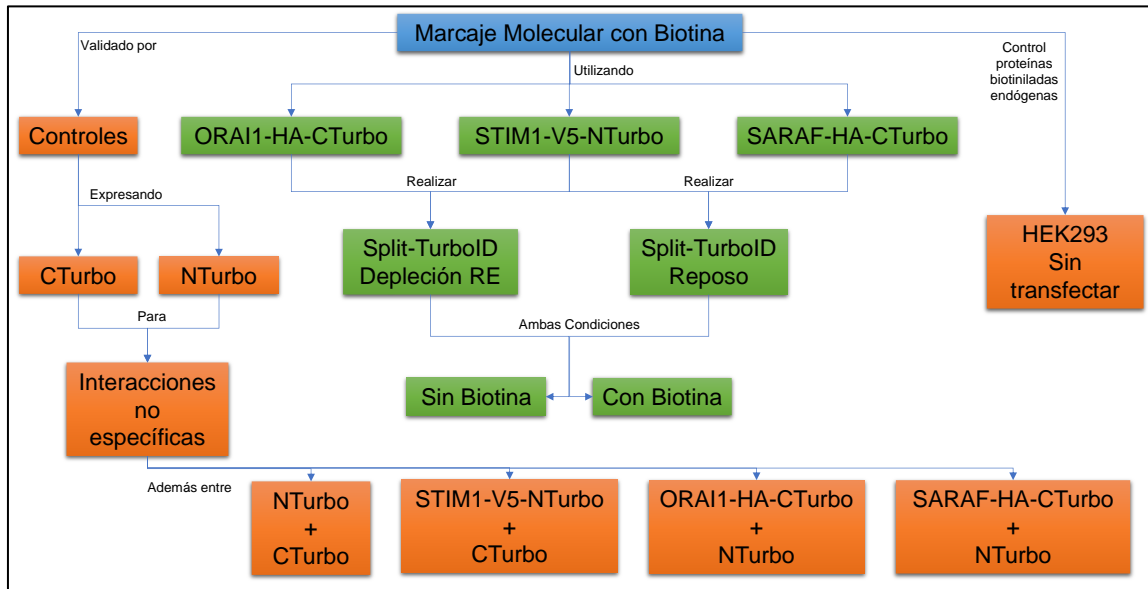


FIGURA 8: CONTROLES PARA MARCAJE MOLECULAR CON BIOTINA MEDIANTE SPLIT-TURBOID. En verde se indica el diseño experimental de la utilización de las construcciones realizadas para el marcaje molecular en reposo y depleción del RE. En anaranjado los diferentes controles del marcaje molecular.

Las células HEK293 48 horas post transfección, fueron incubadas con 50 μM D-Biotina (US Biologicals) en solución Ringer con Ca^{2+} por 15 min y posteriormente se indujo la depleción de Ca^{2+} del RE, utilizando 2 μM Tapsigargina (TG, un inhibidor de la bomba SERCA, provocando la disminución de Ca^{2+} en el RE), en solución Ringer sin Ca^{2+} en presencia de biotina por 15 min. Posteriormente, las células fueron lavadas con abundante DPBS, y se incubó con 1 mL de solución de lisis por 30 min, luego se centrifugó por 10 min 11.000 g a 4°C. El sobrenadante se incubó a 4°C con agitación toda la noche con 70 μL resina agarosa estreptavidina (Thermo Scientific). Posteriormente, la resina fue lavada con solución de lavado (Solución de lisis sin PIC) 7 veces mediante

centrifugación a 1000 g por 2 min y se resuspendió la resina en tampón reductor RSB 5X calentando la muestra a 95°C por 5 min (73).

5.5 SDS-PAGE e *Immuno Blot*

Para la detección de proteínas biotiniladas, se realizó gel 9% poliacrilamida, resuelto a 80 V constante en tampón de electroforesis y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa por 90 min a 450 mA en tampón de transferencia. La membrana se bloqueó con 5% BSA en TBS-Tween por 1 h y posteriormente se incubó con estreptavidina-HRP 1:5000 (Cell Signaling) en 5% BSA/TBS-Tween toda la noche a 4°C. Se reveló utilizando un sustrato químico luminiscente (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent substrate, Thermo Scientific). Para la detección de proteínas específicas, se realizó gel 7% poliacrilamida, en donde la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con Blotto (4% leche en TBS-Tween) y se utilizaron los anticuerpos específicos mencionados en la Tabla 3.

Anticuerpo	Especie	Isotipo	Tipo	Dilución	Origen	Catálogo
Anti-DHX9 (RNA Helicasa A) (EPR13521)	Conejo	IgG (H+L)	Monoclonal	1:2000	Abcam	ab183731
Anti-Flag	Conejo	IgG	Policlonal	1:4000	Sigma-Aldrich	AB_439687
Anti-HA (12CA5)	Ratón	IgG2b	Monoclonal	1:500	Roche	11583816001
Anti-KCTD5	Ratón	IgG2b	Monoclonal	1:200	OriGene	TA501035
Anti-SARAF	Conejo	IgG (H+L)	Policlonal	1:250	OriGene	TA341997
Anti-V5 (C9)	Ratón	IgG2a	Monoclonal	1:200	Santa Cruz	sc-271944
Anticuerpos Secundarios						
Anti-IgG Ratón-HRP	Cabra	IgG	Policlonal	1:10000	R&D SYSTEMS	HAF018
Anti-IgG Conejo-HRP	Cabra	IgG	Policlonal	1:10000	R&D SYSTEMS	HAF008
Anti-IgG2a Mouse-Alexa Fluor 647	Cabra	IgG	Policlonal	1:500	Invitrogen	A21241
Anti-IgG2b mouse-Alexa Fluor 488	Cabra	IgG	Policlonal	1:500	Invitrogen	A21131

TABLA 3: LISTA DE ANTICUERPOS. Lista de anticuerpos utilizados en este trabajo.

5.6 Inmuoprecipitación

Se realizó en células HEK293 y HEK293^{kctd5^{-/-}}, se transfectó con plásmido codificante para SARAF-myc-Flag. A las 48 h post transfección, las células fueron lavadas con DPBS y se lisó con tampón de lisis por 30 min, posteriormente se centrifugó 11.000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se incubó con 2 µL de anticuerpo anti-Flag (Tabla 3) y se incubó 3 h con agitación constante a 4°C, luego se incubó 1 h con 50 µL *beads* agarosa-Proteína G (Thermo Scientific). Posteriormente se lavaron las *beads* con solución de lavado (Solución de lisis sin PIC) 7 veces y se eluyó con tampón reductor RSB y finalmente se realizó *immuno blot* como se indica en el punto 5.5.

5.7 Inmunofluorescencia

Se realizó en células HeLa sembradas en cubreobjetos tratados con 200 µg/mL poli-lisina (MilliporeSigma), se fijaron por 15 min con 4% formaldehído/4% Sacarosa pH 7.4 por 15 min a 4°C, posteriormente fueron lavadas con DPBS, seguido del bloqueo/permeabilización con Blotto (3% Leche, 0,1% Tritón-X100 en DPBS) por 1 h a temperatura ambiente. Luego se procedió con la incubación con anticuerpos primarios (Tabla 3) en Blotto, por 1 h a temperatura ambiente con cada anticuerpo primario por separado, y luego de 3 lavados con Blotto, se procedió con la incubación con los anticuerpos secundarios (Tabla 3) en Blotto, 1 h a temperatura ambiente. Luego se realizó lavados con DPBS/0,1% Tritón X-

100. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con medio de montaje Fluoromount™ (Sigma-Aldrich) (75, 76, 77).

5.8 Medición de imagen de calcio

Las células HEK293 sembradas en cubreobjetos tratados con poli-lisina (200 µg/mL; MilliporeSigma) se incubaron con 5 µM de la sonda Fura 2-AM (Thermo Fisher Scientific) en medio Ringer con 2 mM de Ca²⁺ con 0,02% ácido plurónico durante 30 min a temperatura ambiente, luego las células fueron lavadas con solución Ringer con Ca²⁺ y los cubreobjetos se montaron y mantuvieron en solución Ringer en la cámara de registro de un microscopio invertido Eclipse Ti2-U-Ca²⁺ (Nikon, Tokio, Japón) controlado con el software Micromanager 1.4 (Vale Lab, Universidad de California, San Francisco, CA, EE.UU.). Las imágenes de Fura 2-AM se adquirieron cada 5 s mediante excitación alterna a 340 y 380 nm y las emisiones se capturaron a 510 nm. Se midió por 1200 s que representa 240 ciclos de 5 s cada uno. En el ciclo 25 se retiró el medio y se agregó medio Ringer sin Ca²⁺ con 2 µM TG y al ciclo 120 se repuso el medio Ringer con Ca²⁺. A partir de las mediciones, se obtuvo la proporción de fluorescencia de 340 nm a fluorescencia de 380 nm y luego todos los datos se representaron como un cambio en las unidades de proporción $(F - F_0) / F_0$, en donde F_0 es la fluorescencia inicial (79).

5.9 Análisis Bioinformáticos y Base de Datos

Para el diseño de partidores y análisis de secuencias se utilizó las siguientes herramientas bioinformáticas: OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), Translate-Tool (<https://web.expasy.org/translate>), Reverse and Complement (<https://www.bioinformatics.org>) y los programas SnapGene® Viewer 5.1.5 y ClustalX 2.1. Las secuencias se obtuvieron de National Center of Biotechnology Information, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para los análisis de proteínas se utilizó los siguientes recursos: Base de datos de interacción proteína-proteína STRING (<https://string-db.org/>); Análisis de expresión de genes se utilizó Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>); Información funcional de proteínas se utilizó Uniprot (<https://www.uniprot.org/>); Para el estudio de modificaciones post-traduccionales de proteínas se utilizó la plataforma PhosphoSitePlus® (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>); Para la búsqueda de genes asociados a senescencia se utilizó la plataforma Senequest (<https://senequest.net/>); Como base de datos de proteómica basada en espectrometría de masa se utilizó PPI-MASS (Protein-Protein interactions from mass spectrometry-based proteomics data) (<https://minicad.appsbio.usalca.cl/ppi-mass/>) (82); Se utilizó DisGeNET (<https://www.disgenet.org/home/>) como plataforma de genes asociados a

enfermedades humanas. Para el procesamiento de imágenes de inmunofluorescencia se utilizó el programa ImageJ.

5.10 Análisis estadísticos.

Para la realización del análisis estadístico entre la comparación de los niveles de expresión de DHX9 procedentes de muestras con cáncer versus en tejido normal, obtenidos de la plataforma “GEPIA2”, se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías. La significancia estadística se considera con un $p < 0,05$.

El análisis de correlación de genes se realizó en la plataforma de GEPIA2, mediante la correlación lineal de Pearson, en donde un $R > 0$ y < 1 se considera una relación positiva.

Para los descriptores matemáticos de las curvas de imagen de Ca^{2+} , se realizó en primer lugar, una prueba de distribución normal, utilizando el programa GraphPad Prism 8, donde solo los datos del área de depleción del RE presentan una distribución normal, para el cual se realizó la prueba estadística “t de student”. Para el resto de los datos que presentaron una distribución no normal, se realizó la prueba estadística *Mann-Whitney test*. La significancia estadística se considera con un $p < 0,05$ en ambas pruebas estadísticas.

6. RESULTADOS

6.1 Generación de vectores de expresión codificantes para Split-TurboID.

Para el marcaje molecular con biotina, se requirió generar los plásmidos que codifiquen para las proteínas STIM1, ORAI1 y SARAF fusionadas a los fragmentos N-terminal (NTurbo) y C-terminal (CTurbo) de la enzima TurboID. Se fusionó NTurbo a la región C-terminal de STIM1 y CTurbo a la región C-terminal de ORAI1 y SARAF. Así al interactuar STIM1 y SARAF en reposo o STIM1 y ORAI1 en las uniones RE-MP, se complementa la enzima, biotinilando tanto las proteínas que formen parte del complejo proteico como cualquier interacción débil o transitoria, como se ejemplifica en la Figura 9.

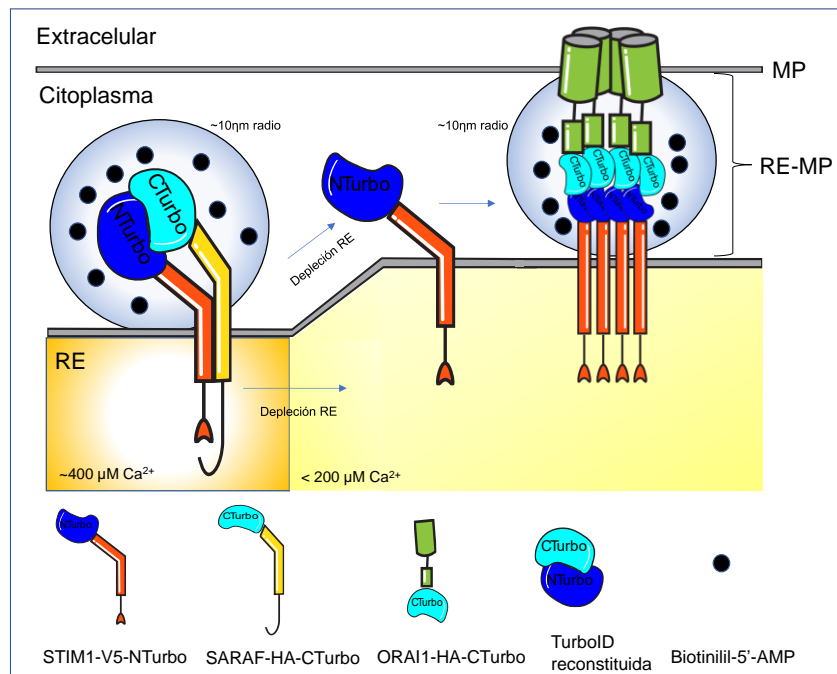


FIGURA 9: ESQUEMA DE MARCAJE MOLECULAR CON BIOTINA EN SOCE: En estado de reposo STIM1-V5-NTurbo y SARAF-HA-CTurbo interactúa y se complementa la enzima TurboID, provocando la biotinilación de proteínas cercana en un radio de 10nm por la difusión del intermediario reactivo biotinilil-5'-AMP. Luego de la depleción, ocurre la translocación de STIM1-V5-Nturbo e interactúa con ORAI1-HA-CTurbo provocando la biotinilación en las uniones RE-MP.

Los plásmidos se generaron por ligación Gibson y se verificó por secuenciación, además, se corroboraron mediante análisis de enzimas de restricción, donde cada enzima generó un patrón de bandas específico y esperado, tal como se muestra en la Figura 10.

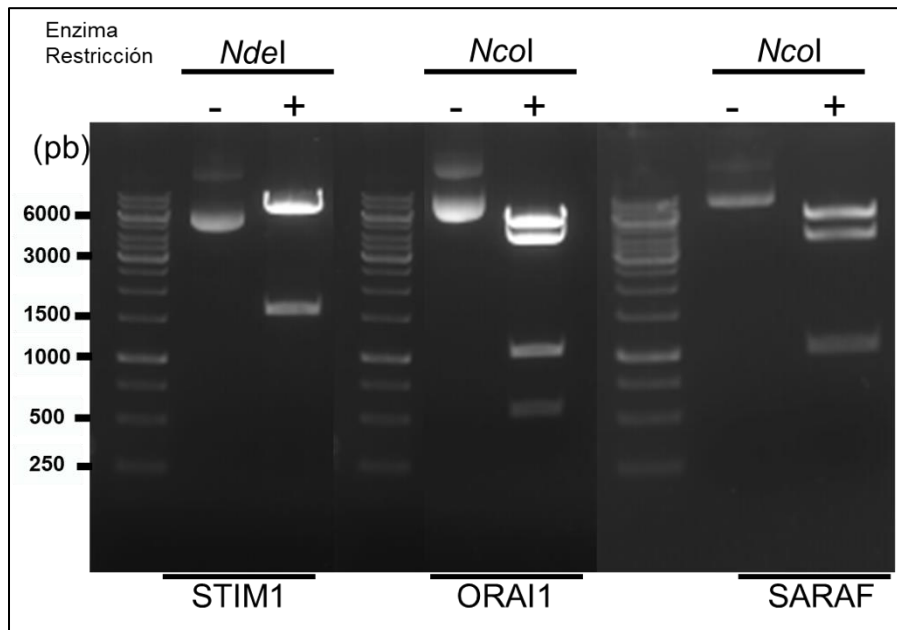


FIGURA 10: VALIDACIÓN DE PLÁSMIDOS PARA SPLIT-TURBOID. Digestión con enzimas de restricción, patrón teórico: STIM1: 9279pb, 1531pb, ORAI1: 6819pb, 5558pb, 991pb, 562pb, SARAF: 5558pb, 3515pb, 980pb. Gel de agarosa 1%. Estándar de peso molecular GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

6.2 Marcaje molecular con biotina por Split-Turboid

En primer lugar, se realizó el marcaje molecular entre las proteínas STIM1-V5-NTurbo y ORAI1-HA-CTurbo, se transfectó los plásmidos que codifican para las proteínas en células HEK293, y 48 h post transfección se procedió con el ensayo en 2 condiciones: Condición basal con Ca^{2+} y depleción del RE por tapsigargina (TG), (un inhibidor de la bomba SERCA del RE disminuyendo la

concentración de Ca^{2+} en el RE en medio sin Ca^{2+} extracelular), en ambas condiciones en presencia de biotina. En la Figura 11 se observan las proteínas purificadas (PP) con estreptavidina, una mayor cantidad de proteínas biotiniladas cuando las células son incubadas con 50 μM Biotina (C/Biotina) en presencia de TG en comparación cuando no se agrega biotina (S/Biotina) en el medio de cultivo.

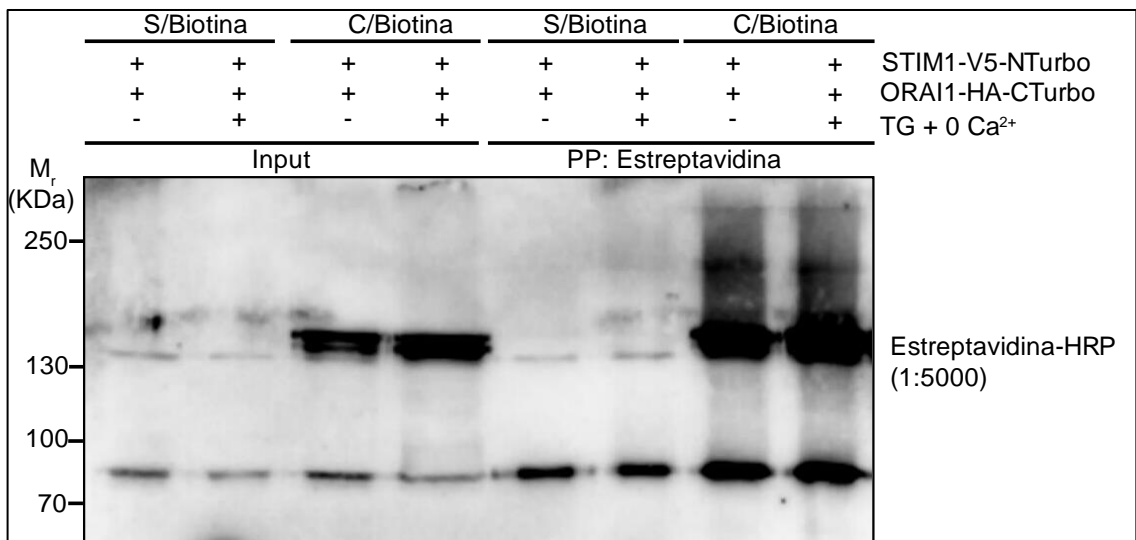


FIGURA 11: DETECCIÓN DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS DURANTE DEPLECIÓN RETICULAR. Se realizó entre STIM1-V5-NTurbo y ORAI1-HA-CTurbo, Se detectaron las proteínas biotiniladas mediante *Immuno blot*. Estreptavidina-HRP 1:5000 (Cell Signaling). PP: Proteínas purificadas, C/Biotina: 50 μM Biotina, S/Biotina: 0 Biotina, TG: Tapsigargina. Se indica plásmidos transfectados. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). (N=5).

Este resultado es lo esperado, ya que cuando ocurre la depleción de Ca^{2+} del RE, STIM1 interactúa con el canal Orai1 en las uniones RE-MP (29, 31) provocando la complementariedad de la enzima TurboID provocando la biotinilación de las proteínas cercanas en un radio de 10 ηm (60). También se observan proteínas biotiniladas en células con Biotina y sin TG, por lo tanto, sin depleción de Ca^{2+} del RE. Esto puede explicarse por la existencia de complejos

preformados STIM1-ORAI1, debido a la sobreexpresión de estas proteínas. Posteriormente, se detectó la proteína STIM1-V5-NTurbo, mediante *Immuno blot* como se observa en la Figura 12:

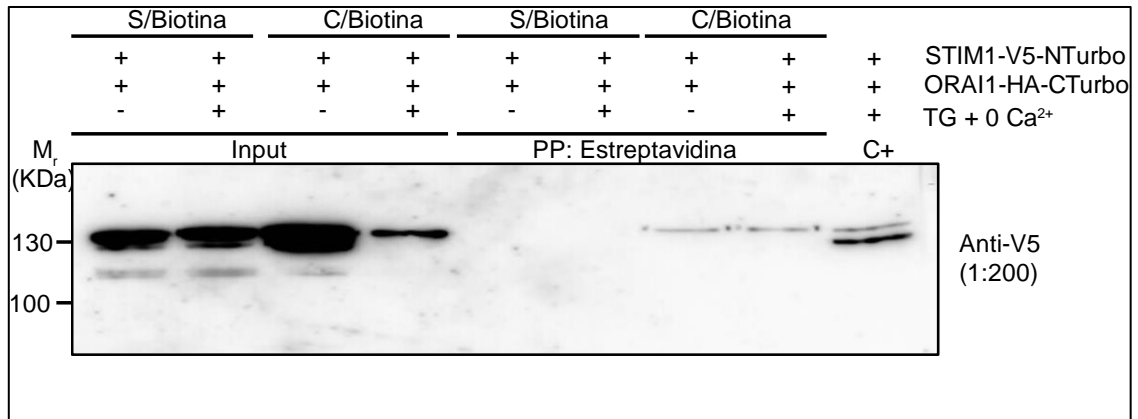


FIGURA 12: DETECCIÓN DE STIM1-V5-NTURBO. Se realizó mediante *Immuno blot*. Anticuerpo anti-V5 1:200 (Santa Cruz), anticuerpo secundario anti-Mouse IgG HRP 1:5000 (R&D SYSTEMS). PP: Proteínas purificadas, C/Biotina: 50µM Biotina, S/Biotina: 0 Biotina, TG: Tapsigargina, C+: Control positivo. Se indica plásmidos transfectados. Estándar de Peso Molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). (N=5).

Se observa en el Input la presencia de la proteína STIM1-V5-NTurbo que tiene un tamaño de 126,9 KDa, sin embargo, se observa además una banda superior al tamaño teórico, lo que puede indicar que es la proteína STIM1-V5-NTurbo con modificaciones pos-traduccionales como la biotinilación provocada por la complementariedad de la enzima TurboID, generando una migración electroforética distinta. Al ver las PP con estreptavidina, se observa que se logra purificar solo la banda superior lo que correspondería a la proteína biotinilada y no se observa en las condiciones sin biotina en la purificación.

Posteriormente se realizó de igual manera el marcaje molecular con biotina transfectando STIM1-V5-NTurbo/SARAF-HA-CTurbo con las mismas condiciones ya mencionadas, cuyo resultado se muestra en la Figura 13.

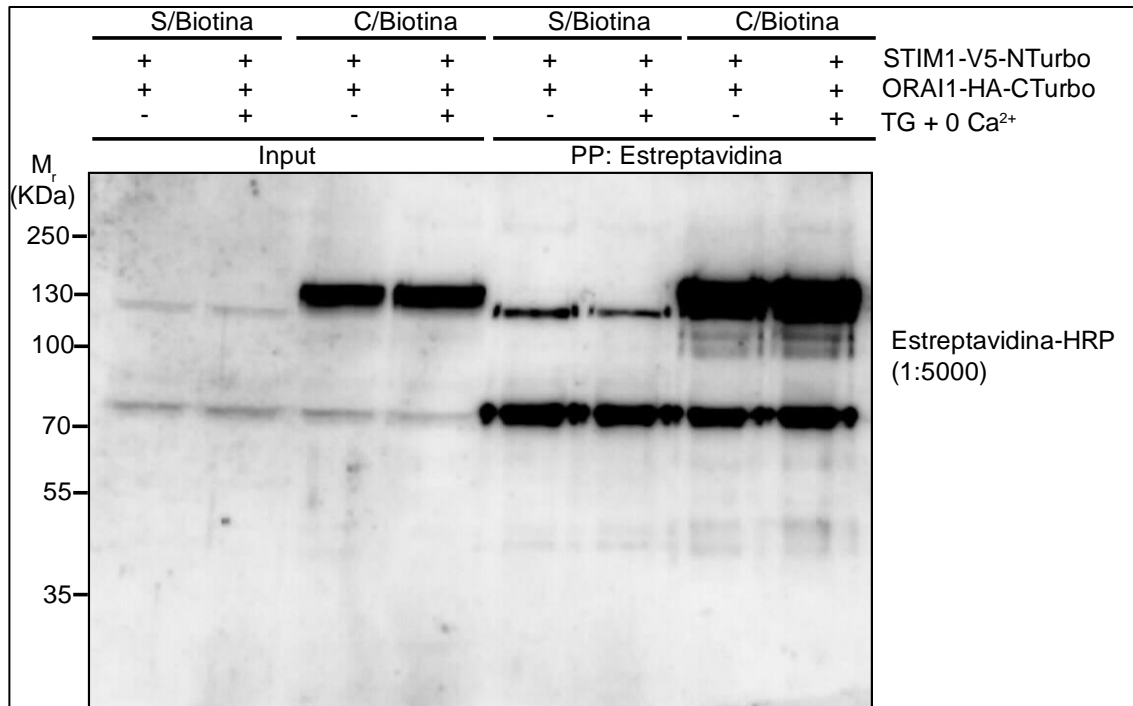


FIGURA 13: DETECCIÓN DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS EN REPOSO. Se realizó entre STIM1-V5-NTurbo y SARAF-HA-CTurbo. Se detectó las proteínas biotiniladas mediante *Immuno blot*. Estreptavidina-HRP 1:5000 (Cell Signaling). PP: Proteínas purificadas, C/Biotina: 50µM Biotina, S/Biotina: 0 Biotina, TG: Tapsigargina. Se indica plásmidos transfectados. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). (N=5).

Se observa de igual manera la mayor cantidad de proteínas biotiniladas en presencia de biotina en el medio. Con respecto a la detección de la proteína STIM1-V5-NTurbo (Fig. 14) se observa una mayor intensidad en la purificación al comparar con STIM1/ORAI1, puede deberse que STIM1 y SARAF se encuentran asociadas en condiciones basales (44) y, por lo tanto, presentando una biotilación durante las 48 h post traducción. También se observa en los inputs más bandas superiores que no se encuentran presente en el marcaje molecular

STIM1/ORAI1, pero no se detectan en la purificación, en donde se observa una mayor cantidad de la banda superior.

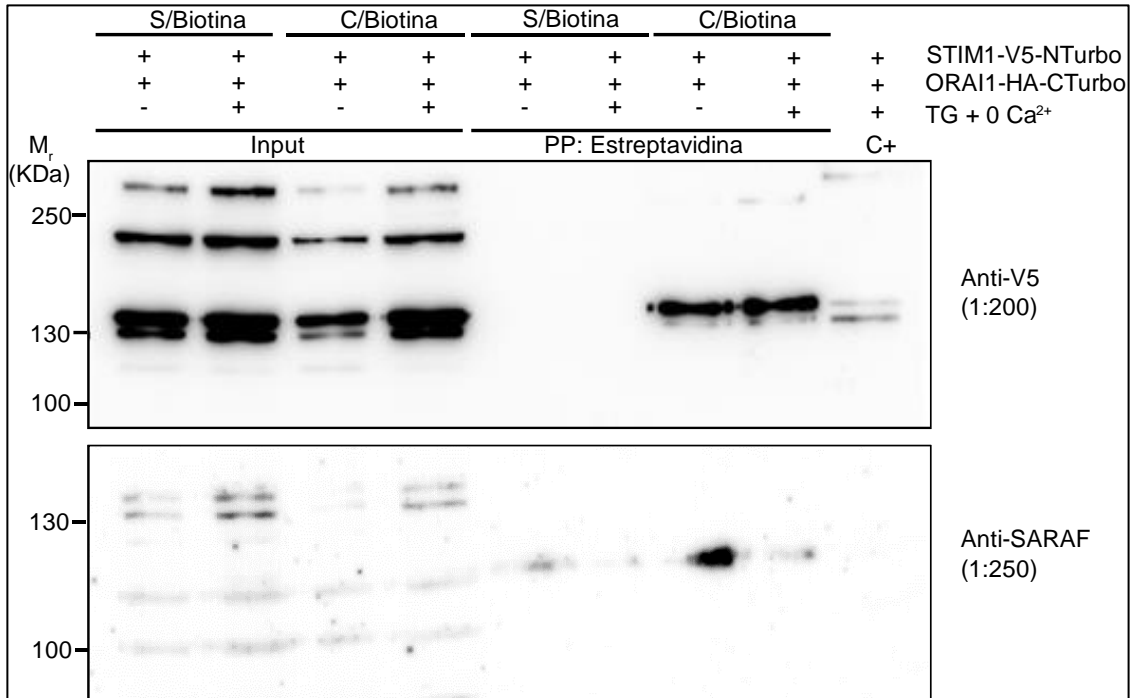


FIGURA 14: DETECCIÓN DE STIM1-V5-NTURBO Y SARAF-HA-CTURBO. Se realizó mediante *Immuno blot*, se detectó a STIM1-V5-NTurbo utilizando el anticuerpo Anti-V5 1:200 (Santa Cruz) y a SARAF-HA-CTurbo con el anticuerpo Anti-SARAF 1:250 (Origene). Anticuerpo secundario anti-Mouse IgG HRP 1:5000 (R&D SYSTEMS). PP: Proteínas purificadas, C/Biotina: 50µM Biotina, S/Biotina: 0 Biotina, TG: Tapsigargina, C+: Control positivo. Se indica plásmidos transfectados PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). (N=5)

Con respecto a la detección de la proteína SARAF-HA-CTurbo, que presenta un peso molecular de 111,59 KDa, se observa de una intensidad menor en la purificación y se logra visualizar también en las condiciones sin biotina en el medio, lo cual puede explicarse ya que el medio de cultivo presenta biotina, pero a una concentración menor a 50 µM.

Para validar la metodología se realizó controles para confirmar que el marcaje que se está observando es por el sistema Split-TurboID. Se transfectó

en células HEK293 los plásmidos con los fragmentos de TurboID en conjunto con las construcciones realizadas, se realizó protocolo de marcaje molecular por Split-TurboID en las condiciones donde se observó mayor cantidad de proteínas biotiniladas (50 μ M Biotina, 2 μ M TG), se realizó la purificación de las proteínas biotiniladas con resina agarosa estreptavidina en donde se realizó *immuno blot*, como se muestra en la Figura 15:

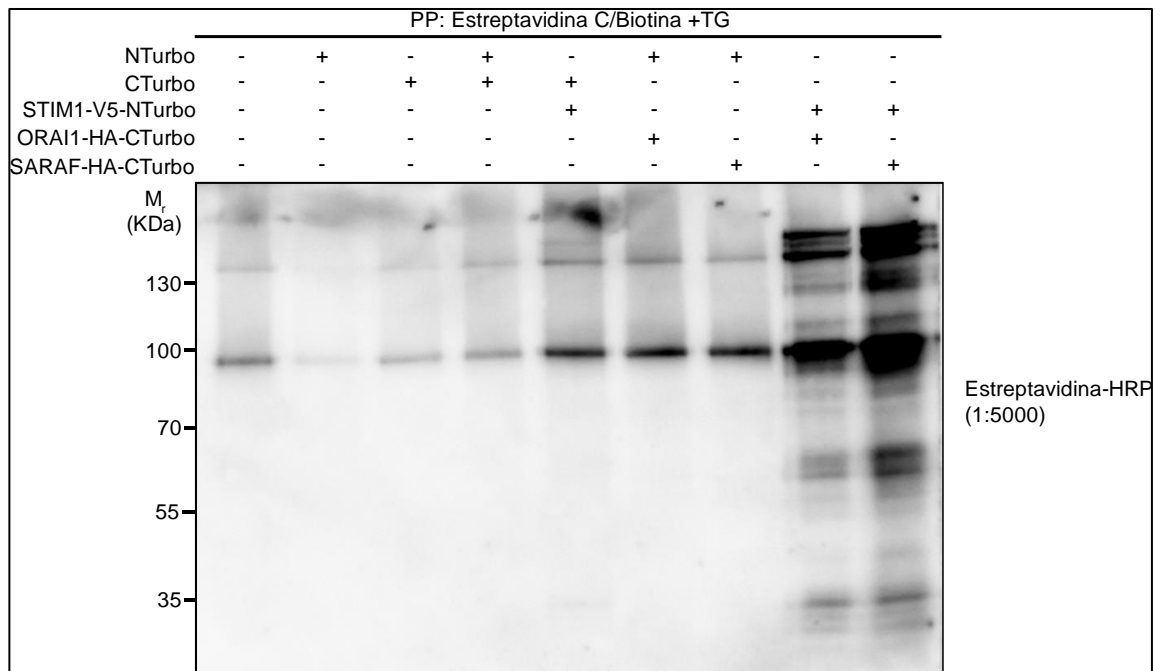


FIGURA 15: CONTROLES NEGATIVOS DEL MARCAJE MOLECULAR CON BIOTINA. Detección de proteínas biotiniladas estreptavidina-HRP 1:5000 (Cell Signaling)]. Se muestra la purificación de proteínas (PP) con estreptavidina en presencia de 50 μ M biotina con 2 μ M TG. Estándar de Peso Molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). (N=2).

Se observa que las células HEK293 sin transfectar, se aprecian solo dos bandas, lo que es esperable ya que la biotinilación es una modificación post-traducciona poco común en eucariontes (83), pero importante para procesos como el metabolismo, degradación de proteínas y expresión génica, en donde la

biotina actúa como coenzima como por ejemplo en enzimas carboxilasas (84). Cuando se expresan los fragmentos NTurbo y CTurbo tanto juntos como separados de igual forma no se observan más bandas. Al expresar cada proteína STIM1, ORAI1 y SARAF con los fragmentos de TurboID complementarios tampoco se observan más bandas, salvo en STIM1-V5-NTurbo expresada con CTurbo que se observa una banda más con una intensidad tenue, pero en ningún control se observa una evidente biotinylación de proteínas como en las condiciones experimentales, ya que los fragmentos presentan una baja afinidad por lo que la biotinylación depende de la cercanía de las proteínas a la cual se encuentran fusionadas (73). Confirmando que las proteínas biotinylladas detectadas son provocadas por la complementariedad de la enzima TurboID por la interacción entre las proteínas STIM1/ORAI1 y STIM1/SARAF.

Otra metodología utilizada para la validación del marcaje molecular con biotina es mediante inmunofluorescencia (IF), en donde se trasfectó con los plásmidos que codifican para STIM1-V5-NTurbo y ORAI1-HA-CTurbo en células HeLa, realizando el mismo ensayo de marcaje molecular con biotina mencionado anteriormente. En la IF (Fig. 16) se observa la presencia de la proteína ORAI1-HA-CTurbo (Verde) y la presencia de la proteína STIM1-V5-NTurbo (Rojo), la cual presenta una distribución principalmente en la parte central de la célula por lo que se relaciona con su localización en el RE (30, 31). Al marcar las proteínas biotinylladas (Azul) se observa una señal intensa en las células con Biotina en el medio ya sea en estado basal o con TG.

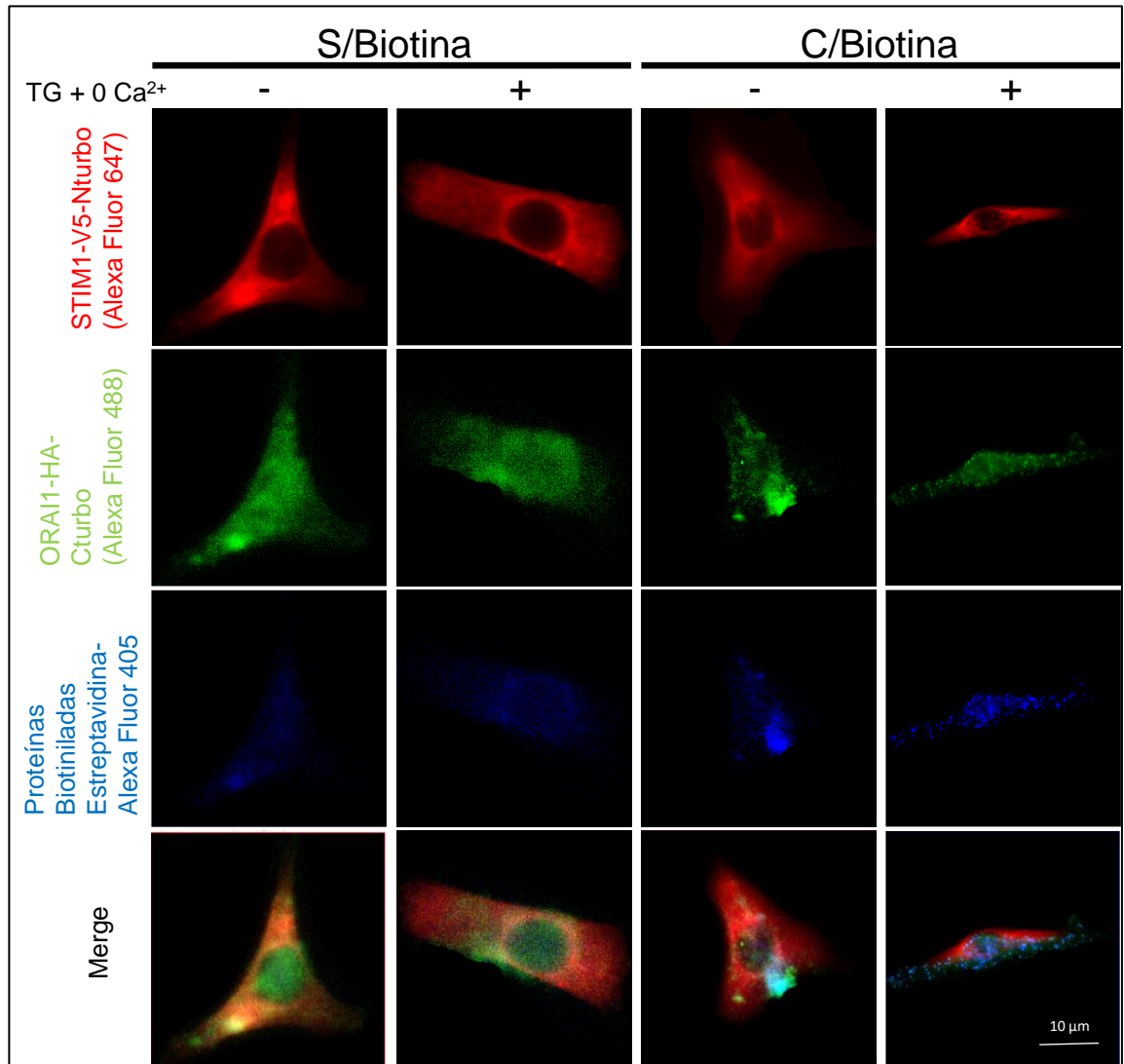


FIGURA 16: INMUNOFLUORESCENCIA DE SPLIT-TURBOID EN DEPLECIÓN RETICULAR. Se realizó el marcaje molecular con biotina en células HeLa, expresando STIM1-V5-NTurbo y ORAI1-HA-CTurbo condiciones basal y con depleción reticular (TG, Tapsigargina), C/Biotina: 50μM Biotina, S/Biotina: 0 Biotina. (N=3).

Se logra visualizar una mayor intensidad de la señal de proteínas biotiniladas con TG, y una distribución a lo largo de la célula en puntos, que puede ser por la interacción de ambas proteínas en las uniones RE-MP provocando la biotinilación de proteínas por la complementariedad de la enzima TurboID por lo que estas proteínas pueden estar presente en estos *clusters* (37). En el estado

basal hay igualmente una gran cantidad de proteínas biotiniladas, esto es debido a que en el sistema de sobreexpresión existen complejos preformados de STIM1-ORAI1 que provocan la biotinilación de las proteínas sin necesidad de la depleción del RE por TG, como se observa en la condición con biotina sin TG, en donde hay una concentración de la proteína ORAI1-HA-CTurbo se observa una intensa marca de proteínas biotiniladas provocado por los complejos preformados. Para resolver esto se pueden realizar líneas estables que no presenten una expresión tan elevada de las proteínas para minimizar esta biotinilación que no ocurre en las uniones RE-MP. Otra estrategia es mover el marco de lectura a un vector con un promotor menos potente como el promotor HSV-TK (85), ya que los plásmidos utilizados presentan el promotor CMV.

Al analizar los resultados, se observa que el marcaje molecular en SOCE provocó la biotinilación de proteínas provocada por la complementación de TurboID, y que los patrones de biotinilación entre STIM1/ORAI1 y STIM1/SARAF (Fig. 11 y 13) son diferentes, lo que indica que los proteomas pueden tener diferencias en condiciones de reposo y en las uniones RE-MP y que las proteínas biotiniladas son por la interacción de las proteínas en estudio, por lo que estas proteínas pueden ser analizadas e identificadas por espectrometría de masa para identificar diferencias entre ambos proteomas y como se asocian de manera distinta para permitir la regulación de SOCE.

De la misma manera que la espectrometría de masa nos ayudará a identificar los proteomas en SOCE, se analizaron resultados obtenidos de LC-MS/MS de experimentos previos, en donde se identificó proteínas purificadas a partir de la inmunoprecipitación (IP) de SARAF en células HEK293 WT y *KnockOut* (KO) para la proteína KCTD5 (HEK293^{kctd5^{-/-}}), en donde KCTD5 es una proteína adaptadora que promueve la ubiquitinación de SARAF, promoviendo SOCE y su eliminación disminuye la entrada de Ca²⁺ a la célula (86). En la IP se halló la proteína RNA Helicasa A (DHX9) en células HEK293^{kctd5^{-/-}} (Fig. 17).

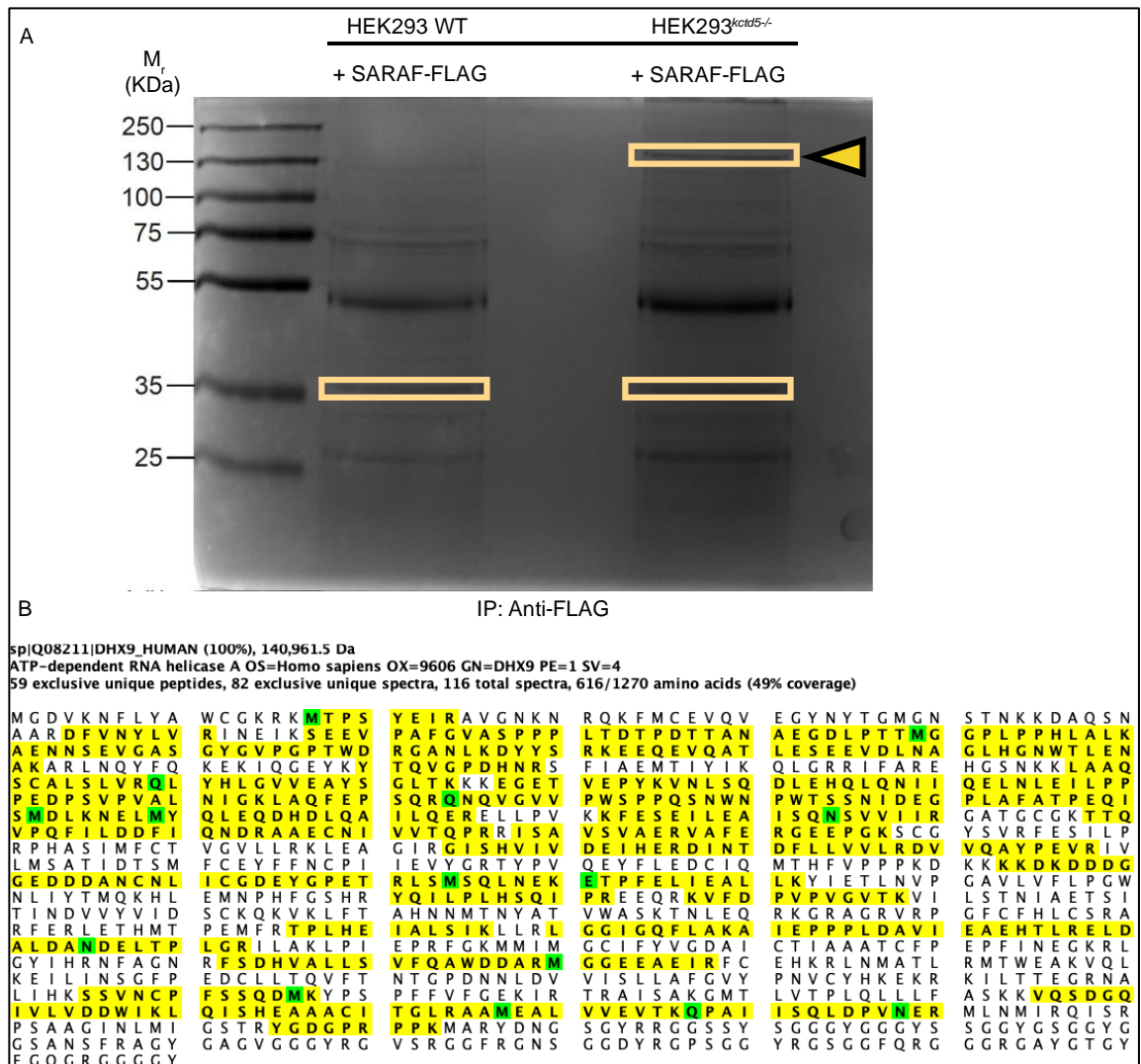


FIGURA 17: IDENTIFICACIÓN DE DHX9 EN ESPECTROMETRÍA DE MASA: (A): Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie. La flecha amarilla indica la banda analizada en células HEK293^{kctd5^{-/-}} y a los 35 KDa se destaca la proteína SARAF. (B): Secuencia de la proteína DHX9 identificada en la banda donde indica la flecha. En amarillo se indica los péptidos identificados en la espectrometría de masa, con un *coverage* de 49%.

Se encontró 59 péptidos únicos exclusivos para esta proteína, encontrado una razón de 616/1270 aminoácidos de DHX9, en donde hay un 49% de cobertura de la secuencia (*coverage*). Al ser una proteína la cual no se ha identificado que interactúe con SARAF y que no se ha descrito alguna implicancia

en SOCE (3, 4, 55, 87, 88) es de interés poder caracterizarla y determinar si tiene alguna implicancia en SOCE.

6.3 RNA Helicasa A, DHX9.

DHX9, llamada RNA Helicasa A, es una proteína de 1270 aminoácidos (~140 KDa), helicasa dependiente de NTP, capaz de desenrollar tanto el ADN como el ARN. Es una proteína multi-dominios y multi-funcional con roles regulatorios en la replicación del DNA, transcripción, traducción, procesamiento y transporte de RNA y mantención de la estabilidad genómica (88), y en estudios recientes se ha implicado en enfermedades humanas como el cáncer, en donde tiene una participación dual, ya que en algunos cánceres promueven la expresión de oncogenes y en otros se relaciona con genes supresores de tumores (89). También existe evidencia que participa en infecciones virales, ayuda a controlar infecciones virales con virus de DNA (90) y además promueve el replicamiento de virus de RNA (91), además, se ha evidenciado su interacción con diversas proteínas en diversos procesos biológicos (88, 89).

Utilizando la plataforma PPI-MASS y DisGeNET, se identificó que DHX9 se encuentra asociada a 54 enfermedades como se observa en la figura 18:

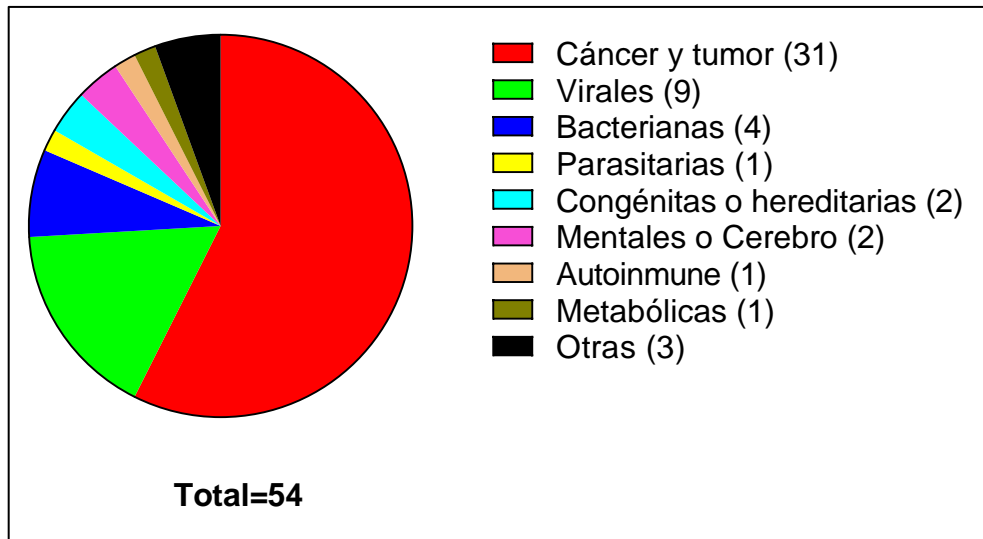


FIGURA 18: ASOCIACIÓN DE DHX9 CON PATOLOGÍAS. Evidencia de la participación de la proteína DHX9 en diversas enfermedades o patologías. Fuente: PPI-MASS y DisGeNET.

Dentro de las principales patologías con las cuales se ha asociado DHX9 se encuentra el cáncer, por lo que es de interés estudiar su participación en SOCE, ya que hay evidencia que SOCE juega un rol crítico en proliferación celular en cáncer, metástasis y neovascularización (92).

Una de las formas que existe para evidenciar la función de una proteína es determinar con que proteínas interactúa, para ello se utilizó la plataforma STRING para analizar que evidencia existe de interacción, como se observa en la figura 19:

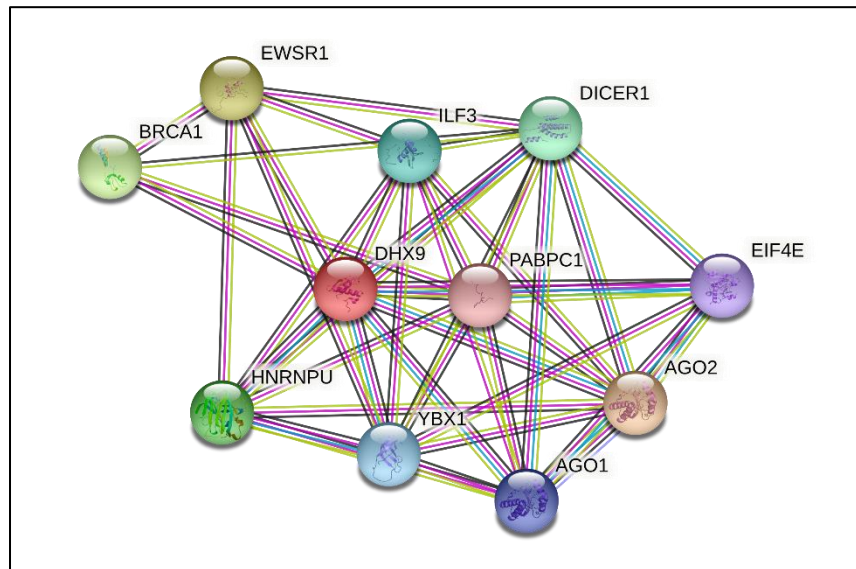


FIGURA 19: EVIDENCIA DE INTERACCIÓN CON DHX9. Proteínas que interactúan con DHX9, utilizando la base de datos STRING. Cada círculo representa una proteína, unidas por líneas que representa el tipo de asociación entre ellas. Cada color de las líneas representa un tipo de asociación distinta. En caso de DHX9 todas las proteínas presentan una interacción conocida ya sea por información curada de base de datos (línea celeste) o determinada experimentalmente (línea violeta).

La mayoría de las proteínas con evidencia de interacción están involucradas en el procesamiento del material genético como en procesos de silenciamiento de genes (AGO2), transcripción (EWSR1), traducción (HNRNPU, EIF4E, AGO1) (87). Pero como se ha visto previamente, DHX9 ha sido asociada a cáncer, y una de las proteínas que hay evidencia de interacción es BRCA1 (*Breast Cancer 1*), que interactúa en una subregión del dominio BRCT de BRCA1 (93). BRCA1 regula el ciclo celular, evita la proliferación incontrolada y repara daños en el ADN, además promueve ubiquitinación y la regulación transcripcional para mantener la estabilidad genómica desempeñando un papel central en la reparación del ADN al facilitar las respuestas celulares al daño del ADN, en donde

su actividad E3 ubiquitina ligasa es necesaria para su función supresora de tumores (94) teniendo una participación en cáncer al igual que DHX9.

DHX9 se ha evidenciado la participación en cáncer, por ejemplo, se ha determinado que la alta expresión de DHX9 promueve el crecimiento y la metástasis de carcinoma hepatocelular (95), por esta razón se analizó los niveles de expresión en diferentes tipos de tumores en la base de datos GEPIA2 como se observa en la figura 20.

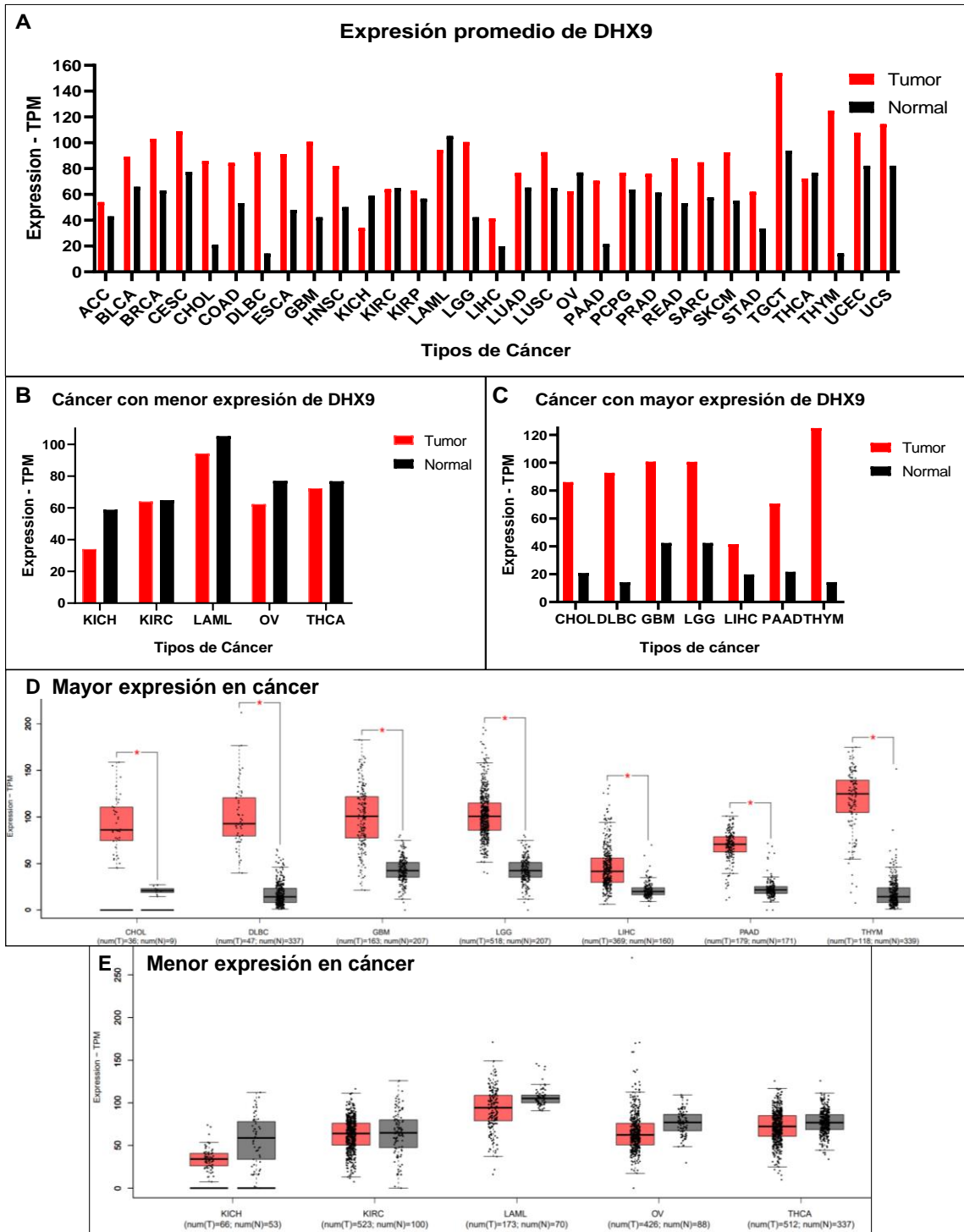


FIGURA 20: NIVELES DE EXPRESIÓN DE DHX9 EN DIVERSOS TUMORES. Cada sigla representa un tipo de tumor distinto. Los datos de expresión y el análisis estadístico se realizó en GEPIA2 en donde se utilizó ANOVA. Diferencia significativa se representa como (*).

En la mayoría de los cánceres hay una mayor expresión de DHX9 en comparación con el tejido normal (Fig. 20A), de los cuales en 7 de ellos existe una diferencia significativa en comparación con el tejido normal (Fig. 20C, 20D). Con respecto en donde hay una menor expresión de DHX9 en los cánceres (Fig. 20B), solo 5 presentan esta característica, pero no hay una diferencia significativa entre el tejido normal y el tumoral (Fig. 20E).

Dentro de los cánceres que presentan una alta expresión significativa de DHX9 se encuentran dos asociados al cerebro: LGG (Gliomas de bajo grado) y GBM (Glioblastoma), éste último muy difícil de tratar, y a veces no se puede curar (Fuente: Instituto Nacional del Cáncer). También, cánceres asociados al sistema digestivo como: CHOL (Colangiocarcinoma), LIHC (Carcinoma Hepatocelular de Hígado) y PAAD (Adenocarcinoma pancreático). Y finalmente también existe una alta expresión en DLBC (Linfoma Difuso de Células B Grandes) y THYM (Cáncer de Timo). Por lo que puede ser de importancia buscar nuevos blancos terapéuticos para su tratamiento y el estudio de proteínas que pueden ser de importancia para el desarrollo de éstos, como lo puede ser DHX9.

Para analizar si la alta expresión de DHX9 tiene un efecto en la prognosis de los pacientes, se realizó un análisis de la sobrevivencia utilizando la plataforma GEPIA2, de los pacientes en estos cánceres como se muestra en la figura 21.

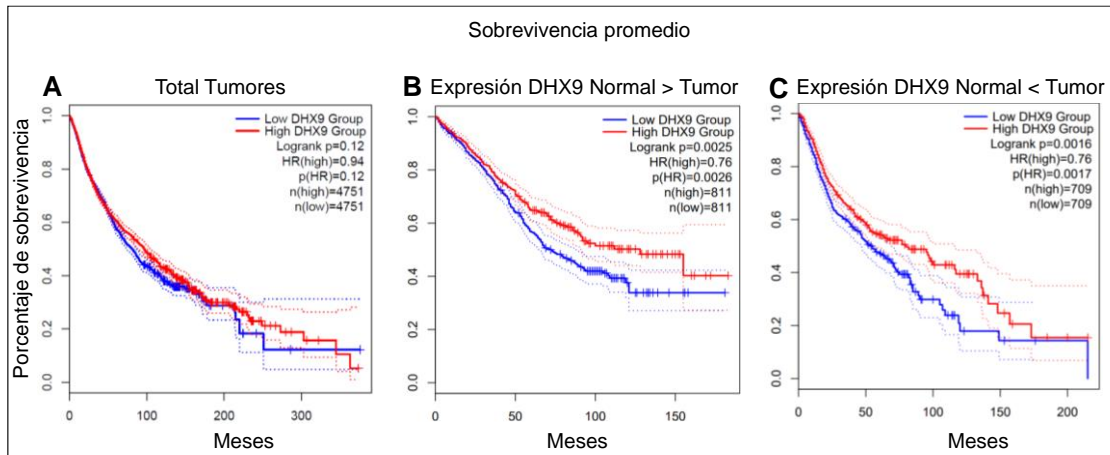


FIGURA 21: SOBREVIVENCIA EN CÁNCER RESPECTO A DHX9. Análisis de supervivencia relacionado a la expresión de DHX9, utilizando la plataforma GEPIA2. Se utilizó la supervivencia promedio. Las muestras con un nivel de expresión superior o inferior al 50% de la mediana se considera alta o baja expresión respectivamente, con un 95% intervalo de confianza. En azul valores de baja expresión y en rojo de alta expresión de DHX9. n: número analizado de muestras. LogrankK: rango logarítmico

Al analizar todos los tumores no es posible observar alguna diferencia en la supervivencia respecto a los grupos con baja o alta expresión de DHX9 (Fig. 21A). Si se analizan específicamente los 5 tumores con baja expresión de DHX9 en los tumores (Fig. 21B) a los 150 meses existe un porcentaje de supervivencia que oscila entre un 35% y 50%.

Con los 7 tumores con alta expresión de DHX9 (Fig. 21C), a los 150 meses presentan entre un 18% y 25% de supervivencia, Por lo que los porcentajes de supervivencia de los tumores con alta expresión de DHX9 muestran una supervivencia menor de los pacientes en comparación con los tumores con baja expresión de DHX9, por lo que esta proteína tiene un impacto en el desarrollo del cáncer que puede tener relación en que esté implicado en expresión de oncogenes (89). También cabe destacar que en ambos grupos analizados (Fig. 21 B y C), las muestras con una mayor expresión de DHX9 (línea roja) la

sobrevida es mayor al promedio, que puede explicarse ya que también DHX9 tiene implicación en la capacidad de reparación de ADN o en la expresión de ciertos genes protectores (96). Por lo que esta proteína en el cáncer tiene un gran efecto en sobrevivencia, y puede emerger como un posible potencial blanco terapéutico y puede ser de interés su relación con SOCE, y por ello se analizó si existe alguna relación en la expresión de DHX9 con las principales proteínas que median SOCE (Fig. 22).

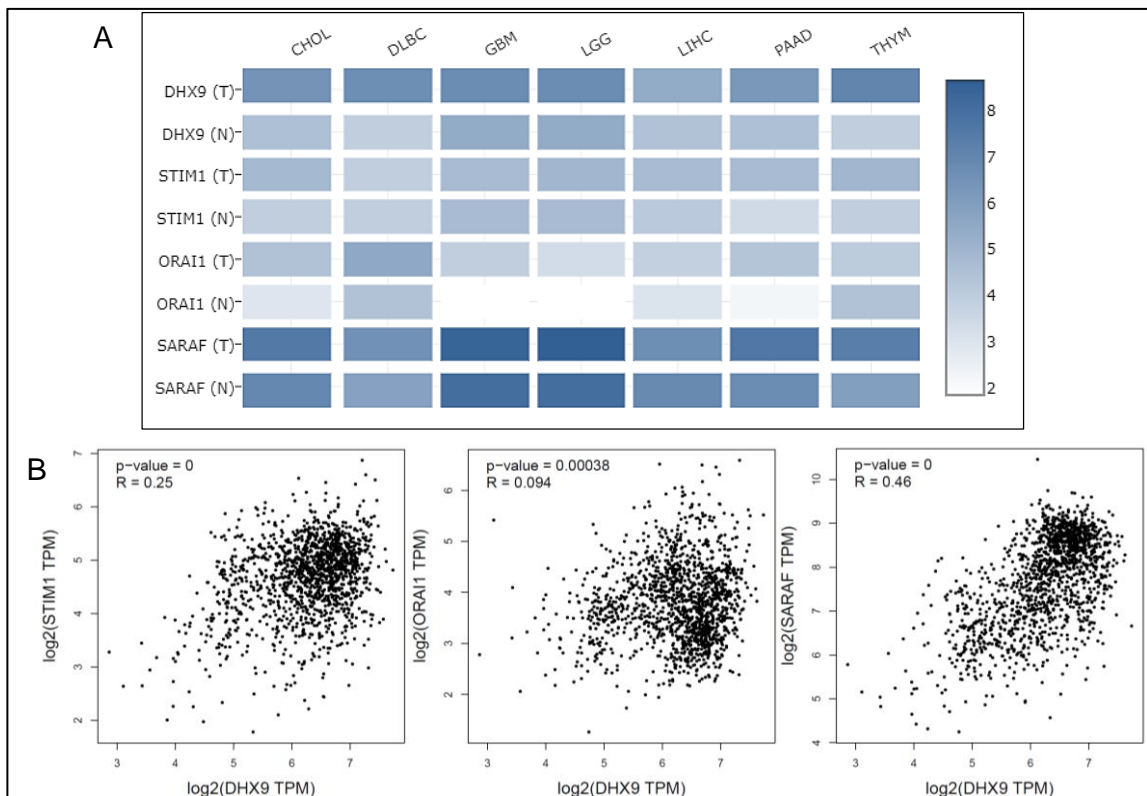


FIGURA 22: RELACIÓN DE EXPRESIÓN ENTRE DHX9, STIM1, ORAI1 Y SARAF. A: Comparación de la expresión de genes en tejido normal (N) y tejido tumoral (T) de la expresión de DHX9. En donde el color blanco corresponde a una expresión baja (2) y a mayor azul mayor expresión (8). Se utilizó los valores de expresión promedio. **B:** Correlación de expresión de DHX9 en tumores con STIM1, ORAI1 y SARAF. Se realizó mediante Correlación de Pearson.

Se comparó los niveles de expresión en los tumores donde hay una alta expresión de DHX9 (Fig. 22A), si se observa la expresión de STIM1, no existe una gran diferencia de expresión al comprar los tumores con el tejido normal. Con respecto a ORAI1, se observa un aumento en los niveles de expresión en los tejidos tumorales e interesantemente SARAF presenta una alta expresión tanto en tejido normal y tumoral.

Con respecto a la correlación lineal de Pearson (Fig. 22B), se puede apreciar que existe una correlación positiva de la expresión de DHX9 con STIM1, SARAF y ORAI1, lo cual sugiere que cuando la expresión de DHX9 aumenta, la expresión de los otros tres genes estudiados lo hacen en proporciones equivalentes. Si se entiende que el valor R igual 1 es una correlación perfecta, que significa una relación directa que aumentan en proporciones constantes, SARAF presenta un mayor coeficiente con un valor R igual a 0,46 respecto a DHX9, por lo que existiría una mayor relación de la expresión de DHX9 y en SARAF tumores, respecto a DHX9 y STIM1 o DHX9 y ORAI1.

Como no existe evidencia anteriormente de alguna relación en la expresión de las principales proteínas que participan en SOCE ni tampoco de interacción con alguna de ellas, es de importancia poder validar si existe una interacción directa de DHX9 con SARAF.

6.4 Validación de interacción entre DHX9 con SARAF

Como se mencionó anteriormente, se detectó DHX9 en 4 experimentos de inmunoprecipitación de SARAF, las cuales fueron experimentos independientes, en células HEK293^{kctd5^{-/-}} y WT, se realizó mediante *immuno blot* y se muestra una IP representativa (Fig. 23).

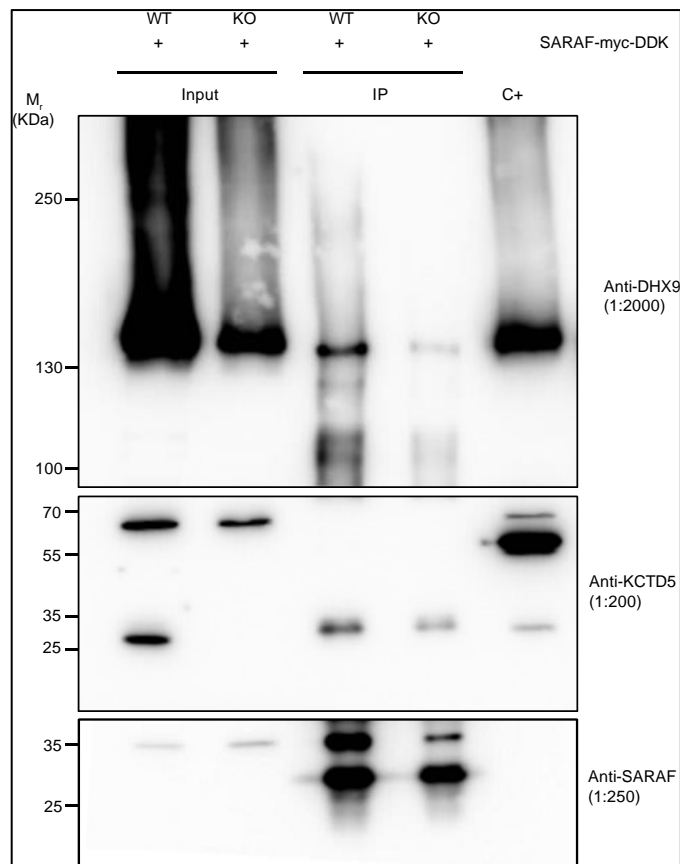


FIGURA 23: DETECCIÓN DE DHX9 EN INMUNOPRECIPITACIÓN DE SARAF. Se expresó SARAF-Myc-DDK en células HEK293 Wild type (WT) y HEK293^{kctd5^{-/-}}. Para la inmunoprecipitación de SARAF-Myc-DDK se utilizó el anticuerpo Anti- FLAG (Invitrogen). Se observa la detección de las proteínas Helicasa DHX9 (~130 KDa), KCTD5 (~25KDa) y SARAF (~35KDa). (N=4).

Se observa la presencia de DHX9 tanto al IP SARAF en células HEK293 WT como en las células HEK293^{kctd5^{-/-}}, por lo que es posible que esta interacción puede ser efectiva.

6.5 Efecto de la sobreexpresión de DHX9 en SOCE

Para determinar si DHX9 tiene algún efecto en SOCE, se sobreexpresó la proteína de fusión DHX9-mCherry2 y mCherry2 solo (condición control) en células HEK293, en donde se midió la respuesta SOCE mediante experimentos de imagen de calcio utilizando la sonda Fura 2-AM. El protocolo consistió en primer lugar en la depleción del RE con TG en medio Ringer sin Ca²⁺, y luego se reincorporó el Ca²⁺ al medio extracelular para permitir la entrada de éste a la célula. Como se puede observar en la figura 25, efectivamente existe una diferencia entre las células que sobreexpresan DHX9-mCherry2 respecto a la condición control (Fig. 24).

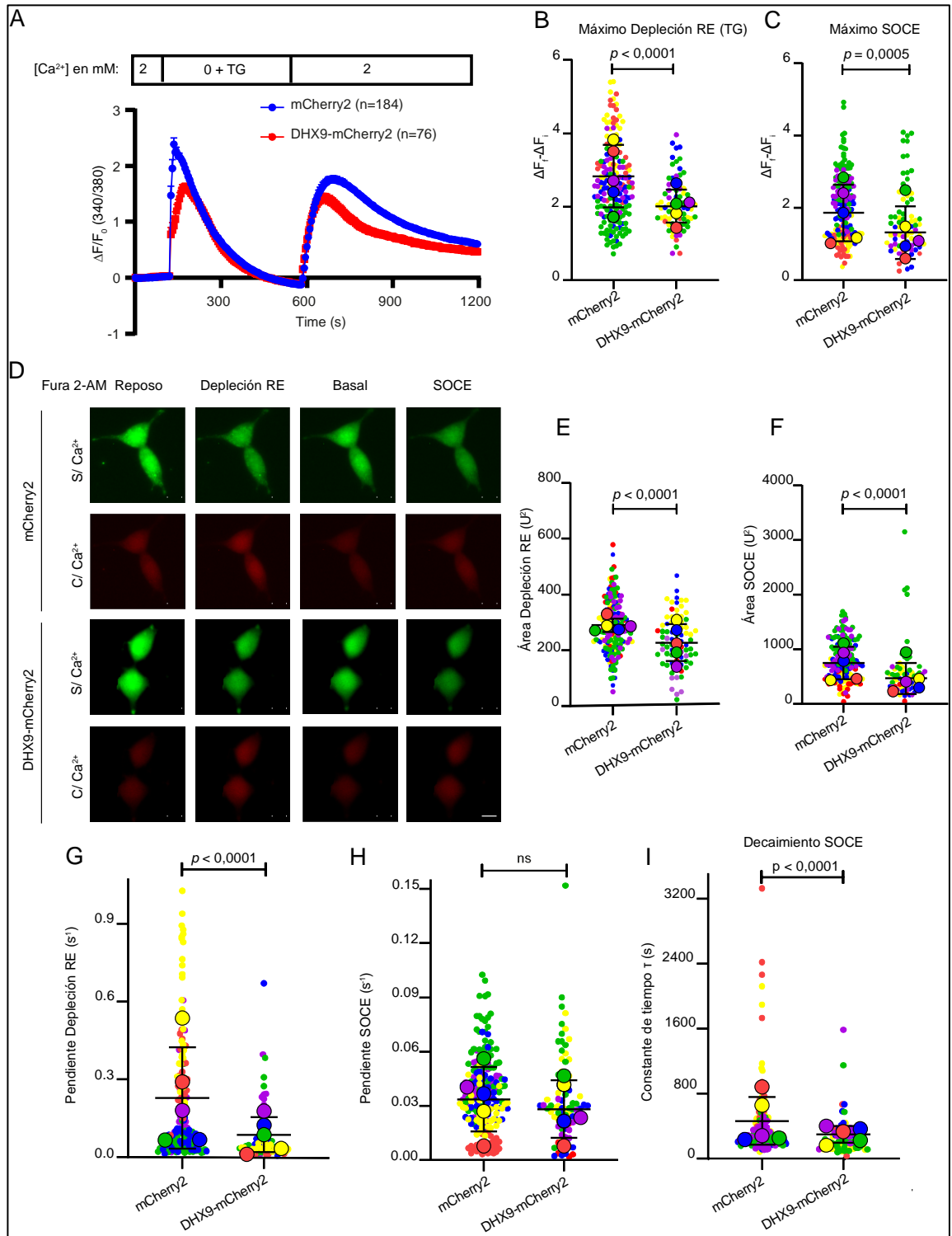


FIGURA 24: SOCE AL SOBREENPRESAR DHX9-mCherry2: (Descripción en siguiente página)

FIGURA 24: SOCE AL SOBREENPRESAR DHX9-mCHERRY2. **A:** Medición de imagen de Ca^{2+} utilizando Fura 2-AM como indicador de los niveles de Ca^{2+} , en células HEK293 sobreexpresando DHX9-mCherry2 (línea roja) o mCherry2 (línea azul). Se registró los niveles de fluorescencia cada 5 s. Se indujo la depleción del RE con 2 μM TG, y finalizando con 2 mM de Ca^{2+} . En paréntesis se indica el número de células analizadas (n). Se determinó la razón de fluorescencia 340/380. **B:** Análisis de detección de punto máximo de razón de fluorescencia 340/380 nm (ΔF_i) normalizada por la fluorescencia basal en la depleción del RE (ΔF_b). **C:** Análisis de detección de punto máximo de razón de fluorescencia 340/380 nm (ΔF_i) normalizada por la fluorescencia basal (ΔF_b) luego de añadir 2 mM Ca^{2+} en el medio extracelular, SOCE. **D:** Imágenes representativas de la fluorescencia en células HEK293, por la sonda Fura 2-AM cuando no está unida a Ca^{2+} (S/ Ca^{2+}) y cuando está unida a Ca^{2+} (C/ Ca^{2+}) en 4 puntos de la medición. La barra de escala indica 10 μm . **E y F:** Área bajo la curva de la depleción del RE (**E**) y SOCE (**F**), se calculó el área entre 2 puntos consecutivos y luego la suma del área de cada sección, siguiendo la fórmula $(Y_1+Y_2)/2*(X_2-X_1)$, en donde Y es valor de fluorescencia (eje y) y X es valor del tiempo en s (eje x) (U^2 , Unidad de área). **G y H:** Determinación de la pendiente de la ecuación de la recta ($Y = mX + b$), en donde m es la pendiente, de la curva durante la depleción del RE (**G**) y SOCE (**H**). **I:** Constante de tiempo (τ) del decaimiento de SOCE desde el valor máximo. Se realizó mediante la función de decaimiento exponencial ($N(t) = N_0e^{-\lambda t}$), en donde N(t) es un valor en tiempo t, N_0 valor inicial, y λ es constante de decaimiento exponencial, en donde si $\tau = 1/\lambda$, $N(t) = N_0e^{-t/\tau}$.

Los datos corresponden a 5 experimentos independientes, en donde, los siguientes gráficos descriptivos, cada color representa un experimento independiente, en que el círculo de mayor tamaño indica el promedio de los datos, y cada punto más pequeño corresponde el valor de cada célula. En cada gráfico se indica el promedio y la desviación estándar. El análisis estadístico realizado es *Mann-Whitney test*, salvo para el área de depleción RE, en donde se utilizó *t de student*. Significancia estadística $p < 0,05$.

Se observa en la medición de imagen de calcio (Fig. 24A), que los niveles de Ca^{2+} basal son los mismo en ambas condiciones, luego el primer aumento de los niveles de Ca^{2+} corresponde a la depleción del RE por TG, en donde se observa una menor depleción reticular al sobreexpresar DHX9-mCherry2 respecto a la condición control, pero en ambas condiciones las respuestas decaen a niveles basales. El segundo aumento de la curva corresponde a la entrada de Ca^{2+} a la célula proveniente del medio extracelular, dando cuenta de la respuesta SOCE, que luego va disminuyendo por los mecanismos de extrusión de la célula (1). Cabe destacar, que también se observa una diferencia significativa en los mecanismos de extrusión de calcio en las células que sobreexpresan DHX9-mCherry2 respecto a la condición control.

La fluorescencia de la sonda Fura 2-AM (Fig. 24D), se ve alterada por los niveles de calcio, esto quiere decir que cuando hay un aumento de las

concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático, hay una mayor cantidad de sonda Fura 2-AM unida a calcio y se observa de manera más intensa la emisión recibida por la excitación a 380 nm (color rojo), y por lo tanto una disminución de la emisión por la excitación a 340 nm (color verde), ya que hay una menor cantidad de sonda libre de Ca^{2+} . Por lo que, al aumentar los niveles de calcio en el citoplasma tanto por la depleción del RE, como por la entrada de calcio desde el medio extracelular, se ve reflejado en un color rojo más intenso y una disminución del color verde como se observa en las imágenes (Fig. 24D), en donde la condición con sobreexpresión de DHX9-mCherry2 presenta un cambio menos intenso que el control. Finalmente, una vez removidos los estímulos, los niveles de fluorescencia vuelven a su condición basal en ambas condiciones.

Al analizar el valor máximo durante la depleción del RE (Fig. 24B) y durante SOCE (Fig. 24C) en ambos casos, se puede observar que es menor la respuesta en aquellas células que sobreexpresan la proteína DHX9-mCherry2 en comparación con la condición control, lo que también se ve reflejado en el área bajo la curva (Fig. 24E y 24F), siendo este último, un indicador de la cantidad de Ca^{2+} presente en el citoplasma, el cual también disminuye al sobreexpresar DHX9-mCherry2.

Si se analiza la pendiente de la salida de Ca^{2+} del RE (Fig. 24G), se puede observar que ésta es menor en aquellas células que sobreexpresan DHX9-mCherry2 respecto a la condición control. Por otro lado, al analizar la pendiente

del ingreso de Ca^{2+} a la célula (Fig. 24H), no se observa una diferencia significativa en ambas condiciones, por lo que la sobreexpresión DHX9-mCherry2 no estaría afectando la entrada de calcio.

Al analizar la constante de tiempo (τ) del decaimiento de SOCE (Fig. 24I), se observa que la sobreexpresión de DHX9-mCherry2, provoca una disminución significativa de τ en comparación con la condición control. En donde τ indica el tiempo cuando se alcanza el 63% de la disminución de la respuesta (97), por lo que una menor τ indica que se alcanza esta disminución en un menor tiempo. Esto significaría que la inhibición de SOCE al sobreexpresar DHX9-mCherry2 se logra de manera más rápida que la condición control.

El hecho de que DHX9 se encuentre en las cercanías del complejo STIM1/SARAF, según lo observado en la espectrometría de masa, sumado a que DHX9 podría estar interactuando con SARAF según los resultados de IP, sugiere que tras sobreexpresar DHX9-mCherry2, ésta podría estar afectando las funciones regulatorias de la proteína SARAF, y de esta manera provocar una menor respuesta SOCE. Además, si se encuentra interactuando entre STIM1/SARAF, se podría deducir que DHX9 se encontraría en las cercanías del RE, lo que podría explicar porque afecta la depleción del RE. Sin embargo, hay que tener presente que con los experimentos de imagen de calcio no es posible determinar cuál es la función o efecto que está realizando DHX9 en la depleción

reticular. Cabe destacar que estos resultados son la primera evidencia donde se ve la participación de la proteína DHX9 implicada en la respuesta SOCE.

7. DISCUSIÓN

El marcaje molecular por proximidad con biotina ha sido una herramienta que se ha utilizado en el último tiempo para determinar proteomas asociados a proteínas y en especial para procesos celulares dinámicos (60), en donde las interacciones débiles o transitorias son difíciles de identificar con otras metodologías como la inmunoprecipitación o el doble híbrido (62). Por esta razón, lo hace idóneo para el estudio de SOCE, un mecanismo dinámico que se regula mediante IPP (55). La proteína identificada en el marcaje por proximidad con biotina por Split-TurboID es la RNA helicasa A, DHX9, que anteriormente no se ha descrito que tenga una implicancia en SOCE, y en este trabajo se determina su cercanía con el complejo STIM1/SARAF, su efecto en la disminución en la entrada de Ca^{2+} en SOCE, y también que se sobreexpresa en distintos cánceres teniendo efectos en la sobrevivencia.

7.1 Caracterización del proteoma de la respuesta SOCE por Split-turboID y detección de DHX9 en el complejo STIM1/SARAF.

Como se observa en la figura 11 y 13, las proteínas biotiniladas son provocadas por la interacción entre STIM1/ORAI1 y STIM1/SARAF y que al agregar TG hay un aumento de proteínas biotiniladas, provocadas por la interacción de estas proteínas a lo largo del desarrollo de SOCE. En el caso de STIM1/SARAF, si bien al ocurrir la depleción del RE se disocian, esta separación es temporal ya que también ambas proteínas migran e interactúan en las uniones

RE-MP (46, 49, 50) por lo que en la depleción igual puede generarse la biotinilación de proteínas cercanas.

La biotinilación ocurre por la complementación de TurboID provocada por la cercanía de las 2 proteínas que se estudian y no por efecto de interacciones al azar, en donde se puede comprobar al observar la figura 15, en donde los diferentes controles negativos no se evidencia proteínas biotiniladas, tal cual como se observó cuando se diseñó el sistema Split-TurboID por Cho, K., *et al.* 2020, en donde cuando no agregan biotina o no fuerzan la interacción de los 2 fragmentos observan las mismas bandas cercanas a 70 y 130 KDa correspondientes a la biotinilación nativa de la célula (73).

Cho y colaboradores también determinaron el tiempo en la biotinilación de los 2 fragmentos, fusionados a FKBP y FRB para forzar la interacción al agregar rapamicina al medio, en donde se empiezan a observar las primeras proteínas biotiniladas a los 30 min, y es con 1 h de incubación en donde se observa una mayor cantidad de proteínas biotiniladas, concordantemente, con lo observado en esta tesis que con 15 min de pre-incubación con biotina y 15 min durante depleción del RE se observa ya las proteínas biotiniladas, aunque existe una diferencia metodológica en lo realizado por Cho, ya que los fragmentos solubles se fuerza la interacción con rapamicina (73), mientras que en este trabajo fue por la interacción entre las proteínas que median SOCE.

Además de los controles de Split-TurboID (Fig. 15), se verificó mediante inmunofluorescencia (Fig. 16) la presencia de proteínas biotiniladas, las cuales se distribuye como *clusters*, al igual que los *clusters* formados por la interacción STIM1-ORAI1 descritos en diferentes publicaciones (23, 31, 36, 41) indicando que la biotilación está ocurriendo en las uniones RE-MP.

Por otro lado, se ha estudiado SOCE anteriormente con herramientas de marcaje por proximidad con biotina, como en Jing, J., *et al.* 2015, en donde se utilizó la enzima ascorbato peroxidasa APEX2 fusionada a STIM1 (STIM1-APEX2) generando un marcaje molecular alrededor de esta proteína (23). Jing y colaboradores realizan la depleción del RE sin Ca^{2+} con 1 μM TG para el estudio del proteoma en las uniones RE-MP, al igual que en esta tesis, pero la desventaja de utilizar APEX2 es la utilización de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por 1 min para permitir el marcaje con el sustrato fenil-biotina (57), ya que el H_2O_2 en altas concentraciones es tóxico para la célula, promoviendo peroxidación lipídica, disfunción mitocondrial, apoptosis celular y alteración de la homeostasis del calcio (98), y por esto último no sería tan apropiado para el estudio de SOCE. Además, el intermediario reactivo es de vida corta de solo un minuto aproximadamente (57) por lo que el marcaje que ocurre es una “fotografía” en un momento corto del proceso por lo que al utilizar esta técnica solo se identifican proteínas en un periodo corto de tiempo y no del mecanismo completo, por lo que Split-TurboID es una mejor herramienta para caracterizar de manera más robusta el proteoma de SOCE.

Se identificaron diferentes proteínas en Jing, J., *et al.* 2015, si bien no se detectó DHX9, es interesante de resaltar que se detectó la proteína ILF2 (Interleukin Enhancer Binding Factor 2) con un 12.1% de *coverage*, bastante menor si se compara con lo detectado en la IP de SARAF con DHX9 que presenta un *coverage* de 49% (Fig. 17), pero se destaca ya que existe evidencia, tanto por cromatografía de afinidad (99) como por co-inmunoprecipitación (100) que DHX9 interactúa con ILF3.

ILF2 e ILF3 funcionan como un complejo heterodimérico para estabilizar los ARNm y regular la expresión génica (101), y se ha informado que el complejo ILF2/ILF3 participa en múltiples procesos celulares, como la reparación y replicación del ADN, la estabilización del ARNm, la transcripción, la inhibición de la traducción y la biogénesis de microARN e involucrados en el desarrollo de varios tipos de cáncer (102). Por lo que podría ser posible que exista interacción ya sea directa o indirecta entre STIM1-APEX2, con el complejo ILF2/ILF3 y con DHX9, aunque ésta última no se identificó por APEX2, posiblemente por las propias limitaciones de la técnica por lo que se necesitarían otras metodologías para su validación.

Otra proteína interesante identificada por STIM1-APEX2 es CYFIP1, aunque el *coverage* de esta proteína es solo de 4.8%, CYFIP1 es un componente del complejo CYFIP1-EIF4E-FMR1 que se une al ARNm y media la detención de la traducción (103) y existe evidencia que DHX9 interactúa con EIF4E (104) como

se observa en la Figura 19, por lo que es una evidencia de que también DHX9 a través de EIF4E interactúa con CYFIP1 y por consiguiente con STIM1.

Otro estudio de marcaje por proximidad con biotina en SOCE, se realizó utilizando el sistema Split-BioID entre las proteínas ORAI1 y STIM1 (Lee, S., *et al.* 2022) en donde se fusionó a cada proteína la región N y C terminal de la enzima BirA* (27), el marcaje se desarrolló durante 16 h con TG en medio con Ca^{2+} , siendo necesario este largo tiempo de incubación ya que la enzima BirA* realiza una biotilación en un menor tiempo que TurboID (59), lo que puede provocar un marcaje inespecífico por las largas horas de incubación, así Split-TurboID presenta una ventaja sobre Split-BioID, ya que solo en unos minutos permite identificar el proteoma en las uniones RE-MP (63).

Otra diferencia, es que en esta tesis se realizó el marcaje molecular en medio sin Ca^{2+} para mantener estable el complejo STIM1-ORAI1 y determinar su proteoma, en cambio en los experimentos desarrollados por Lee y colaboradores ocurre el ensamble y desensamble del complejo STIM1-ORAI1 ya que se utilizó medio con Ca^{2+} , el cual al entrar a la célula promueve la inhibición de SOCE, por lo que no están detectando las proteínas del complejo STIM1-ORAI1 sino de todo el proceso lo que difiere de lo realizado en esta tesis.

Además, cabe destacar, que si se desea utilizar la enzima BirA* en medio sin Ca^{2+} por 16 horas no sería viable ya que se perderían las uniones intercelulares como cadherinas que son dependientes de calcio (105) y las

células se desprenderían de la placa al momento de lavar el exceso de biotina en el medio, por lo que los resultados obtenidos no necesariamente deben ser iguales con los desarrollados en esta tesis.

Dentro de las proteínas identificadas por Lee y colaboradores, no se detectó DHX9, pero una proteína interesante que destacar es DDX39B, una RNA helicasa que participa en el metabolismo del RNA y promueve el reclutamiento del spliceosoma y la exportación de ARN (106), por lo que DHX9 no es la primera RNA helicasa que se ha identificado en el complejo STIM1/ORAI1/SARAF, aunque los autores no caracterizaron su participación en SOCE.

También se identificó la proteína YBX1, una proteína de unión al ADN y al ARN implicada en varios procesos, como la traducción, la estabilización del ARN, la reparación del ADN y la regulación de la transcripción (107).

La identificación de proteínas como, DHX9, DDX39B, YBX1, cuyas funciones son similares, en donde regulan la mantención y estabilización del material genético puede ser una interesante área de estudios, ya que muchas de ellas al igual que DHX9 tienen participaciones en enfermedades como en el cáncer (109, 106) ya que también están implicadas en la expresión de genes y en el reclutamiento de factores de transcripción (111, 107).

7.2 DHX9 co-inmunoprecipita con SARAF en condiciones de reposo.

DHX9, fue identificada al inmunoprecipitar SARAF tanto en células HEK293 WT como en HEK293^{kctd5^{-/-}} (Fig. 23), en donde KCTD5 es una proteína adaptadora que promueve la ubiquitinación de SARAF, al ubiquitinar SARAF, se favorece la separación con STIM1 y aumenta la activación de SOCE, mientras en células HEK293^{kctd5^{-/-}}, disminuye la ubiquitinación de SARAF y por lo tanto disminuye la entrada de calcio a la célula (86).

La inmunoprecipitación fue realizada en condiciones de reposo, por lo que DHX9 podría encontrarse en la cercanía del complejo STIM1/SARAF, y si bien esta proteína se ha identificado que sale del núcleo (108), no se ha descrito que tenga alguna implicancia en SOCE o que interactúe con STIM1/SARAF por lo que es un hallazgo que es interesante de estudiar si se encuentra formando un complejo proteico o se trata de interacciones débiles o transitorias.

DHX9 presenta diversos dominios y motivos que le permite interactuar con diversos complejos, se han descrito 2 dominios dsRBD de unión a RNA en la región N-terminal, y en su región C-terminal presenta un dominio RGG que consta de repeticiones de arginina y glicina-glicina que se unen de manera no específica al RNA, también un dominio HA2 importante para la separación de la hebra de RNA y OB-fold importante en el proceso de desenrollado del RNA (109). Como se puede observar los dominios que presenta DHX9 se centran en la interacción con DNA o RNA, pero aun así esta proteína se ha descrito que interacciona con

proteínas como por ejemplo con factores de transcripción para promover la expresión de genes (110), o con proteínas del procesamiento del material genético (88), pero no se ha descrito que interactúa con proteínas relacionadas con SOCE o que presente sitios de unión a Ca^{2+} , aunque en DHX9 se han descrito sitios de unión a Mn^{2+} (111), por lo que su implicancia en SOCE se deberá dilucidar.

7.3 Sobreexpresión de DHX9 afecta la entrada de calcio a la célula en SOCE.

Al sobreexpresar DHX9 se puede observar que principalmente afecta como ocurre la inhibición de SOCE, pero no parece afectar la entrada de Ca^{2+} a la célula (Fig. 24). Si bien con los resultados de imagen de Ca^{2+} no se puede saber que específicamente está realizando la sobreexpresión de DHX9, se puede deducir que DHX9 interactúa de manera más directa entre STIM1 y SARAF por los resultados de inmunoprecipitación (Fig. 23), lo que explicaría porque no afecta SOCE, pero si su inhibición, aunque no se puede saber si DHX9 se encuentra en las uniones RE-MP, porque STIM1 y SARAF si se encuentran en estas uniones (47).

DHX9 puede estar interactuando con el complejo STIM1-SARAF (Fig. 17 y 23) promoviendo esta unión y así promoviendo la inhibición de SOCE y, por lo tanto, una inhibición de manera más rápida como se observa en las mediciones de imagen de calcio (Fig. 24). Podría ser que DHX9 por la depleción del RE, salga al citoplasma a través del RE ya que este es una continuación de las membranas

nucleares (89) y al ocurrir la depleción del RE también ocurra la modificación post-traducciona l y ocurra la translocación al citoplasma (90, 108) y al interactuar con el complejo STIM1-SARAF puede promover de manera más rápida la inhibición de SOCE.

Además, como se observa en la Figura 24, también la sobreexpresión de DHX9 estaría afectando la salida de Ca^{2+} del RE, que puede relacionarse también por esta posible translocación al citoplasma (90, 108) y además de poder estar interactuando entre STIM1-SARAF, también puede estar afectando los mecanismos de como ocurre la salida de Ca^{2+} del RE, aunque con los experimentos de imagen de Ca^{2+} no es posible saber específicamente cual es el efecto de DHX9 en este mecanismo.

7.4 DHX9 se sobreexpresa en ciertos cánceres, teniendo implicancia en la disminución en la supervivencia de los pacientes.

Como se ha visto DHX9 tiene implicancias en el cáncer, en donde su sobreexpresión en diversos tumores (Fig. 20) disminuye el porcentaje de supervivencia de los pacientes (Fig. 21), ya que se ha visto que promueve la expresión de oncogenes (89).

Recientemente Chellini, L., *et al.* 2022, encontraron que el aumento de la expresión de DHX9 se correlaciona con un estado avanzado del cáncer de

próstata y se asocia con un mal pronóstico de los pacientes y determinan un nuevo rol en el control de la transcripción del receptor de andrógenos (112).

También en este mismo año, Xiao, L., *et al.* 2022. describieron que un RNA largo no codificante (LncRNAs) PCAT19 es inducido por un factor de transcripción llamado SP1 y actúa como un oncogen en el cáncer gástrico que competitivamente une a miR429 aumentando la expresión de DHX9 (113).

No solo se ha observado la sobreexpresión de DHX9 en cáncer, también se ha relacionado con una mala prognosis, por ejemplo, en uno de los cánceres analizados con una alta expresión de DHX9 como lo es el LIHC (carcinoma hepatocelular de hígado), en donde Chen, X., *et al.* 2022, ha mostrado que altos niveles de expresión de 6 RNA helicasas se encuentran asociadas a una mala prognosis en LIHC, dentro de las cuales se encuentra DHX9 (114).

Como se ha reportado, DHX9 está involucrada en varios cánceres como oncogen, aunque también se ha visto su función como supresor de tumores, por ejemplo, Yan, X., *et al.* 2019. demostró que la sobreexpresión de DHX9 en cáncer de pulmón (LUAD) tiene una prognosis favorable en los pacientes y una disminución de la expresión en LUAD promueve la proliferación celular e invasión (115).

Con respecto a los demás cánceres analizados con una alta expresión de DHX9 (LGG, GBM, CHOL, DLBC, THYM) no se reportan estudios relacionados con esta proteína por lo que es un campo que se pudiera abordar, ya que para

esta helicasa no se conoce totalmente su función y participación en diferentes cánceres

Como los mecanismos relacionados con DHX9 en cánceres no son totalmente claros, tampoco hay estudios con su relación con SOCE, ya que SOCE también tiene una relevancia importante en la progresión del cáncer (92) al igual que esta proteína.

8. CONCLUSIONES

El marcaje molecular por proximidad con biotina por Split-TurboID se ha demostrado que es una buena herramienta para la identificación de proteínas en SOCE. Dentro de las proteínas biotiniladas detectadas en el complejo STIM1/SARAF se detectó la proteína DHX9. Se determinó que DHX9 co-inmunoprecipita con SARAF en células HEK293 WT y HEK293^{kctd5^{-/-}}, pero es necesario realizar más experimentos para determinar si existe una interacción directa o es más bien transitoria o débil. Por otro lado, la sobreexpresión de DHX9 provoca una reducción de SOCE y por tanto afecta la entrada de Ca²⁺ a la célula. Además, se evidenció que presenta una alta expresión en ciertos cánceres y que se relaciona con una menor supervivencia de los pacientes.

9. PERSPECTIVAS

Las proteínas biotiniladas por el marcaje molecular por proximidad con biotina en SOCE, pueden ser identificadas por espectrometría de masa y determinar los proteomas asociados a las condiciones de reposo y en las uniones RE-MP y determinar nuevas proteínas reguladoras de SOCE, que puedan utilizarse como blanco terapéutico en patologías en donde SOCE se encuentre desregulado como en el cáncer.

Bajo este mismo concepto, se debe profundizar los estudios de DHX9 y su relación con SOCE, determinando con qué entidad molecular interactúa en específico, y si es parte de un complejo proteico o es una interacción transitoria, así como también su translocación fuera del núcleo.

Como se ha descrito, DHX9 tiene una relevancia en el cáncer, por lo que se puede caracterizar la implicancia de DHX9 tanto en líneas celulares cancerígenas como en aquellos tumores donde presenta una sobreexpresión, como en glioblastoma o cáncer de timo y desarrollar estrategias para el estudio de esta proteína como blanco terapéutico y estudiar su relación con SOCE en estas células cancerígenas.

10. ANEXOS

En paralelo con esta tesis, se participó en el trabajo presentado en la conferencia:
NCCR TransCure Final Conference, the University of Bern, Bern, Suiza.

KCTD5 is a novel regulator of Store Operated Calcium Entry via SARAF ubiquitination.

Pablo Cruz, Diego Maureira, Boris Lavanderos, Hans Moldenhauer, Ian Silva, Joaquín López, **Rodrigo Santos**, Rosario Ibáñez, Daniel Henríquez, Diego Varela, Mónica Cáceres, Oscar Cerda.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Jie, Z., *et al.* 2015. Calcium ion as cellular messenger. *Sci China Life Sci.* 58: 1-5.
2. Feske, S., *et al.* 2010. Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clin. Immunol.* 135: 169-182.
3. Helmeste, D. M., *et al.* 1998. The role of calcium in the etiology of the affective disorders. *Jpn. J. Pharmacol.* 77: 107-116.
4. Brown, E. M., *et al.* 2013. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best practice & research Clin Endocrinology & Metabolism.* 27: 333-343.
5. Putney, J. W. y Tomita, T. 2012. Phospholipase C signaling and calcium influx. *Adv. Biol. Regul.* 52(1): 152-164.
6. Prakriya, M. y Lewis, R. S. 2015. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol rev.* 95: 1383-1436.
7. Hoth, M., *et al.* 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The J. of Physiol.* 465: 359-386.
8. Prakriya, M., *et al.* 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nat.* 443: 230-233.
9. Srikanth, S. y Gwack, Y. 2013. Molecular regulation of the pore component of CRAC channels, Orai1. *Current Topics in membranes.* 71: 181-209.
10. Humer, C., *et al.* 2022. Highlighting the Multifaceted Role of Orai1 N-Terminal- and Loop Regions for Proper CRAC Channel Functions. *Cells.* 11(371): 1-24.
11. Cai, X., *et al.* 2016. The Orai1 Store-Operated calcium Channel functions as a hexamer. *The J of Biol Chem.* 291: 25764-25775.
12. Palty, R., *et al.* 2017. Sequential steps of CRAC channel activation. *Cell reports.* 19: 1929-1939.
13. Srikanth, S., *et al.* 2013. Regulation of CRAC channels by protein interactions and post-translational modification. *Channels.* 7(5): 354-363.
14. Srikanth, S., *et al.* 2010. A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nat. Cell. Biol.* 12: 436–446.

15. Willoughby, D., *et al.* 2012. Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling. *Sci. Signal.* 5: ra29.
16. Kar, P., *et al.* 2021. The N terminus of Orai1 couples to the AKAP79 signaling complex to drive NFAT1 activation by local Ca²⁺ entry. *PNAS.* 118(19): 1-11.
17. Yu, F., *et al.* 2010. Constitutive recycling of the store-operated Ca²⁺ channel Orai1 and its internalization during meiosis. *J. Cell. Biol.* 191: 523–535.
18. Mullins, F. M., *et al.* 2009. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *PNAS.* 106: 15495-15500.
19. Miao, Y., *et al.* 2013. An essential and NSF independent role for α -SNAP in store-operated calcium entry. *Elife.* 2: e00802.
20. Sharma, S., *et al.* 2013. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of Store-operated Ca²⁺ entry. *Nat.* 499: 238-242.
21. Albarran, L., *et al.* 2018. EFHB is a novel cytosolic Ca²⁺ sensor that modulates STIM1-SARAF interaction. *Cell Physiol and Biochem.* 51: 1164-1178.
22. Zhang, W., *et al.* 2020. The Penta-EF-Hand ALG-2 Protein Interacts with the Cytosolic Domain of the SOCE Regulator SARAF and Interferes with Ubiquitination. *Int. J. Mol. Sci.* 21(17): 1-21.
23. Jing, J., *et al.* 2015. Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx. *Nat Cell. Biol.* 17: 1339–1347.
24. Walsh, C. M., *et al.* 2010. Evidence for an interaction between Golli and STIM1 in Store-operated calcium entry. *Biochem J.* 430: 453-460.
25. Carreras-Sureda, A., *et al.* 2013. ORMDL3 modulates Store-operated calcium entry and lymphocyte activation. *Hum. Mol. Genet.* 22: 519-530.
26. Srikanth, S., *et al.* 2012. Junctate is a Ca²⁺ sensing structural component of Orai1 and stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA.* 109: 8682–8687.
27. Lee, S. K., *et al.* 2022. Metastasis enhancer PGRMC1 boosts store-operated Ca²⁺ entry by uncoiling Ca²⁺ sensor STIM1 for focal adhesion turnover and actomyosin formation. *Cell. Report.* 38: 1-14.
28. Yeung, P. S. W., *et al.* 2017. Pore opening mechanism of CRAC channels. *Cell. Calcium.* 63: 14-19.
29. Dong, H., *et al.* 2019. Toward a model for activation of Orai Channel. *Iscience.* 16:356-367.

30. Novello, M. J., *et al.* 2018. Structural element of stromal interaction molecule function. *Cell. calcium.* 73: 88-94.
31. Luik, R. M., *et al.* 2009. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature.* 454(7203): 538-542.
32. Stathopoulos, P. B., *et al.* 2008. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of Store-operated calcium Entry. *Cell.* 135: 110-122.
33. Johnson, J., *et al.* 2022. Control of STIM1 and Orai1 function by post-translational modifications. *Cell. Calcium.* 103: 1-12.
34. Yuan, J. P., *et al.* 2009. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate the Orai channels. *Nat. Cell. Biol.* 11(3): 337-343.
35. Lopez-guerrero, A. M., *et al.* 2017. Store-operated calcium entry is dispensable for the activation of ERK1/2 pathway in prostate cancer cells. *Cell. Signalling.* 40: 44-52.
36. Lunz, V., *et al.* 2019. STIM1 activation of Orai1. *Cell calcium.* 77: 29-38.
37. Park, C. Y., *et al.* 2009. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell.* 136: 876-890.
38. Ma, G., *et al.* 2020. Optogenetic engineering to probe the molecular choreography of STIM1-mediated cell signaling. *Nat. Commun.* 11(1039):1-15.
39. Schober, R., *et al.* 2019. Sequential activation of STIM1 links Ca²⁺ with luminal domain unfolding. *Science Signaling.* 12: 1-16.
40. Lee, S. K., *et al.* 2019. IDstim Helps STIM1 Keep Inactive via Intramolecular Binding to the Coiled-Coil Domain in a Resting State. *J. Cell. Sci.* 133: 1-15.
41. Wang, Y., *et al.* 2009. STIM protein coupling in the activation of Orai channels. *PNAS.* 106(18): 7391-7396.
42. Soboloff, J., *et al.* 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat. rev. mol. Cell. Biol.* 13(9): 549-565.
43. Niu, L., *et al.* 2020. STIM1 interacts with termini of Orai channels in a sequential manner. *J. of Cell Sci.* 1-30.
44. Palty, R., *et al.* 2012. SARAF inactivates the Store operated calcium Entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell.* 149: 425-438.

45. Kimberlin, C. R., *et al.* 2019. SARAF luminal domain structure reveals a novel domain-swapped β -Sandwich fold important for SOCE modulation. *J. of Mol. Biol.* 431: 2869-2883.
46. Albarran, L., *et al.* 2016. Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry. *Scientific Reports.* 6: 24452.
47. Albarran, L., *et al.* 2016. Store-operated Ca^{2+} entry-associated regulatory factor (SARAF) plays an important role in the regulation of Arachidonate-regulated Ca^{2+} (ARC) channels. *The J. of Biol. chem.* 291: 6982-6989.
48. Dai, F., *et al.* 2018. Overexpression of SARAF Ameliorates pressure overload-Induced cardiac Hypertrophy through suppressing STIM1-Orai1 in mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 47: 817-826.
49. Zomot, E., *et al.* 2021. Bidirectional regulation of calcium release-activated calcium (CRAC) channel by SARAF. *J. Cell. Biol.* 220(12): 1-18.
50. Dagan, I., *et al.* 2021. Regulation of Store-Operated Ca^{2+} Entry by SARAF. *Cells.* 10: 1-18.
51. Jardín, I., *et al.* 2018. Fine-tuning of store-operated calcium entry by fast and slow Ca^{2+} -dependent inactivation: Involvement of SARAF. *BBA-Molecular Cell Research.* 1865: 463-469.
52. Li, X., *et al.* 2017. Calmodulin dissociated the STIM1-Orai1 complex and STIM1 oligomers. *Nat. Commun.* 8: 1042.
53. Maleth, J., *et al.* 2014. Translocation between $\text{PI}_{(4,5)}\text{P}_2$ -poor and $\text{PI}_{(4,5)}\text{P}_2$ rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating. *Nat. Commun.* 5: 584.
54. Korzeniowski, M.K., *et al.* 2009. Dependence of STIM1/Orai1-Mediated Calcium Entry on Plasma Membrane Phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 284: 21027–21035.
55. López, J. J., *et al.* 2016. Molecular modulators of store-operated calcium entry. *Biochim. et Biophysical Acta.* 1863: 2037-2043.
56. Quintana, A., *et al.* 2015. TMEM110 regulates the maintenance and remodeling of mammalian ER plasma membrane junctions competent for STIM-ORAI signaling. *PNAS.* 112: E7083–E7092.
57. Hung, V., *et al.* 2016. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc.* 11(3): 456-475.

58. Schopp, I. M. *et al.* 2017. Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat. Commun.* 111:1-14.
59. Choi-Rhee, E. *et al.* 2004. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Science.* 13:3043-350.
60. Roux, K. J. *et al.* 2012. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 196:801-810.
61. Cronan, J. E. 2005. Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant *Escherichia coli* biotin protein ligase. *J. of Nutri. Biochem.* 16:416-418.
62. Mehta, V., Trinkle-Mulcahy L. 2019. Recent advances in large-scale protein interactome mapping. *F1000 Research.* 5:782-792.
63. Samavarchi-Tehrani, P., *et al.* 2020. Proximity dependent biotinylation: Key enzymes and adaptation to proteomics approaches. *Mol. & Cell. Proteomics.* 19: 757-773.
64. Chapman-Smith, A., *et al.* 2001. The C-terminal domain of biotin protein ligase from *E. coli* is required for catalytic activity. *Protein Science.* 10:2608-2617.
65. Chapman-Smith, A., Cronan J.E. 1999. Molecular Biology of biotin attachment to proteins. *American Society for Nutritional Sciences.* 22: 477-484.
66. Rees, J. S., *et al.* 2015. Protein neighbors and proximity proteomics. *Mol. & cell. proteomics.* 14.11: 2848-2856.
67. Li, P., *et al.* 2017. Proximity labeling of interacting proteins: Application of BioID as a discovery tool. *Proteomics.* 17: 1700002-1700012.
68. Kim, D. *et al.* 2014. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *PNAS.* 10:2453-2461.
69. Firat-Karalar, E. 2020. Proximity mapping of the microtubule plus-end tracking protein SLAIN2 using the BioID approach. *Turkish J. of Biol.* 44: 61-72.
70. Fredriksson, K., *et al.* 2015. Proteomic analysis of proteins surrounding occludin and claudin-4 reveals their proximity to signaling and trafficking networks. *PLOS ONE.* 10.1371: 1-35.
71. Dingar, D. *et al.* 2015. BioID identifies novel c-MYC interacting partners in cultured cells and xenograft tumors. *J. of Proteomics.* 118:95-111.

72. Branon, T. C., *et al.* 2018. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat. biotech.* 36(9): 880-899.
73. Cho, K. F., *et al.* 2020. Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *PNAS.* 117(22): 12143-12154.
74. Cerda, O., *et al.* 2015. Casein kinase-mediated phosphorylation of serine 839 is necessary for basolateral localization of the Ca²⁺-activated non-selective cation channel TRPM4. *Pflugers Arch.* 467(8): 1723-1732.
75. Cáceres, M., *et al.* 2015. TRPM4 is a novel component of the adhesome required for focal adhesion disassembly, migration and contractility. *PLoS ONE* 10(6): e0130540.
76. Stadler, C. *et al.* 2013. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nat. Methods.* 10:315-325.
77. Rivas, J., *et al.* 2020. KCTD5, a novel TRPM4-regulatory protein required for cell migration as a new predictor for breast cancer prognosis. *The FASEB J.* 34 (6): 7847-7865.
78. Blanco, C., *et al.* 2019. EB1- and EB2-dependent anterograde trafficking of TRPM4 regulates focal adhesion turnover and cell invasion. *The FASEB J.* 33: 9434-9452.
79. Canales, J., *et al.* 2020. K⁺ Channel Tetramerization Domain 5 (KCTD5) Protein Regulates Cell Migration, Focal Adhesion Dynamics and Spreading through Modulation of Ca²⁺ Signaling and Rac1 Activity. *Cells.* 9: 1-24.
80. Pryor, P. R. 2015. Isolation of Nuclei. En: *Subcellular Fractionation A Laboratory Manual.* United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pp.211-219.
81. Debacq-Chainiaux, F., *et al.* 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Protocol.* 4(12): 1798- 1806.
82. González-Avendaño, M., *et al.* 2021. PPI-MASS: An Interactive Web Server to Identify Protein-Protein Interactions From Mass Spectrometry-Based Proteomics Data. *Frontiers in Mol. Biosc.* 8: 701477.
83. Ramazi, S., Zahiri J. 2021. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *DATABASE.* 00: 1-20.

84. Ingaramo, M., *et al.* 2011. Biotinylation, a Post-translational Modification Controlled by the Rate of Protein-Protein Association. *The J. of biol. Chem.* 286(15): 13071–13078.
85. Ali, R., *et al.* 2018. Optimizing fluorescent protein expression for quantitative fluorescence microscopy and spectroscopy using herpes simplex thymidine kinase promoter sequences. *FEBS Open Bio.* 8: 1043-1060.
86. Cruz, P., *et al.* In preparation. KCTD5 is a novel regulator of Store Operated Calcium Entry vía SARAF ubiquitination.
87. Kozak, J. A. y Putney, J. W. 2017. Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells. Boca Raton, FL, USA. CRC Press. p327.
88. Lee, T., Pelletier, J. 2016. The Biology of DHX9 and its potential as a therapeutic target. *Oncotarget.* 7(27): 42716-42739.
89. Gulliver, C., *et al.* 2020. The enigmatic helicase DHX9 and its association with the hallmarks of cancer. *Future Sci. OA.* FSO650: 1-16.
90. Guo, F., Xing, L. 2021. RNA helicase A as co-factor for DNA viruses during replication. *Virus Research.* 291: 1-7.
91. Ullah, R., *et al.* 2022. DEAD/H-box helicases: Anti-viral and pro-viral roles during infections. *Virus Research.* 309: 1-15.
92. Xie, J., *et al.* 2016. SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives. *Int. J. Cancer.* 138: 2067-2077.
93. Anderson, S. F., *et al.* 1998. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Neture genetics.* 19: 254-256.
94. Yoshida, K., Miki, Y. 2004. Rol of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 95(11): 866-871.
95. Shi, F., *et al.* 2021. High expression of DHX9 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Lab. Anal.* 35: 1-11.
96. Chakraborty, P., Him, K. 2021. DHX9-dependent recruitment of BRCA1 to RNA promotes DNA end resection in homologous recombination. *Nat. Comun.* 12: 1-18.
97. Weisstein, Eric W. 2022. «Exponential Decay». [En línea]. <<https://mathworld.wolfram.com/ExponentialDecay.html>>. [Consulta: 01 de diciembre de 2022].

98. Circu, M., *et al.* 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biol. & Med.* 48: 749–762.
99. Chu, L., *et al.* 2012. Multiple myeloma–associated chromosomal translocation activates orphan snoRNA ACA11 to suppress oxidative stress. *The J. of Clin. Investigation.* 8(122): 2793-2806.
100. Chatel-Chalx, L., *et al.* 2013. A Host YB-1 Ribonucleoprotein Complex Is Hijacked by Hepatitis C Virus for the Control of NS3-Dependent Particle Production. *J. of Virol.* 21(87): 11704-11720.
101. Karmakar, S., *et al.* 2010. A multiprotein complex necessary for both transcription and DNA replication at the b-globin locus. *The EMBO J.* 29: 3260-3271.
102. Zang, B., *et al.* 2021. Metabolomic Characterization Reveals ILF2 and ILF3 Affected Metabolic Adaptions in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Front. Mol. Biosci.* 8(721990): 1-13.
103. Napoli, I., *et al.* 2008. The Fragile X Syndrome Protein Represses Activity-Dependent Translation through CYFIP1, a New 4E-BP. *Cell.* 134: 1042-1054.
104. Gunawardana, C., *et al.* 2015. The Human Tau Interactome: Binding to the Ribonucleoproteome, and Impaired Binding of the Proline-to-Leucine Mutant at Position 301 (P301L) to Chaperones and the Proteasome. *Mol. & Cell. Proteomics.* 14(11): 3000-3014.
105. Brayshaw, L., *et al.* 2019. Lanthanides compete with calcium for binding to cadherins and inhibit cadherin-mediated cell adhesion. *Metallomics.* 11: 914-924.
106. He, C., *et al.* 2021. The DDX39B/FUT3/TGF β R-I axis promotes tumor metastasis and EMT in colorectal cancer. *Cell Death & disease.* 12(74): 2-12.
107. Feng, M., *et al.* 2021. YBX1 is required for maintaining myeloid leukemia cell survival by regulating BCL2 stability in an m6A-dependent manner. *Blood.* 1(38): 71-85.
108. Aratani, S., *et al.* 2006. The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin-alpha3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3:340(1): 125-133.
109. Xing, L., *et al.* 2014. Helicase associated 2 domain is essential for helicase activity of RNA helicase A. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1844: 1757-1764.

110. Fuller-Pace, F. 2006. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research*. 15(34): 4206-4215.
111. Zhang, S., *et al.* 1997. Domain Structure of Human Nuclear DNA Helicase II (RNA Helicase A). *The J. of Biol. Chem.* 17(272): 11487-11494.
112. Chellini, L., *et al.* 2022. The DNA/RNA helicase DHX9 contributes to the transcriptional program of the androgen receptor in prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 41(178): 2-15.
113. Xiao, L., *et al.* 2022. LncRNA PCAT19 induced by SP1 and acted as oncogene in gastric cancer competitively binding to miR429 and upregulating DHX9. *J. of Cancer.* 13(1): 102-111.
114. Chen, X., *et al.* 2022. High Levels of DEAH-Box Helicases Relate to Poor Prognosis and Reduction of DHX9 Improves Radiosensitivity of Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Oncology.* 12(900671): 1-14.
115. Yan, X., *et al.* 2019. DHX9 inhibits epithelial-mesenchymal transition in human lung adenocarcinoma cells by regulating STAT3. *Am. J. Transl. Res.* 11(8): 4881-4894.