

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



STIM1 a jeho úloha v buněčné signalizaci

Bakalárska práca

Martin Machyna
Školitel: RNDr. Petr Dráber, DrSc.

Praha 2007

Obsah

Obsah	1
Abstrakt.....	2
Kľúčové slová.....	3
1 Úvod.....	4
1.1 Úloha vápnika v bunkovej signalizácii	4
1.2 Dopĺňovanie endoplazmatických vápnikových zásob.....	4
1.3 Mechanizmus aktivácie SOCE.....	6
1.4 Hľadanie SOC kanálov	7
2 Nový kľúčový hráči v regulácii SOCE	8
2.1 STIM1 a jeho génová rodina.....	8
2.2 Orai1 (CRACM1) a jeho génová rodina	11
2.3 Ďalší potenciálny hráči v SOCE.....	11
3 Lokalizácia STIM1 v bunke.....	12
4 Od štruktúry k funkcii STIM1.....	16
4.1 Úloha EF-hand a SAM domény.....	16
4.2 Úloha coiled-coil (ERM) domény.....	17
4.3 Úloha lyzín bohatej oblasti.....	19
4.4 Úloha prolín bohatej oblasti	19
5 Interakčný partneri STIM1	20
5.1 STIM2 negatívne reguluje STIM1	20
5.2 STIM1, Orai1 a aktivácia I_{CRAC}	21
5.3 STIM1 a TRPC	24
5.4 STIM1 a ARC kanály.....	26
6 Prehľad mechanizmu signalizácie.....	28
7 Záver	29
8 Poďakovanie	31
Zoznam skratiek.....	32
Zoznam použitej literatúry	33

Abstrakt

Signálna dráha vedúca od aktivácie receptora na povrchu bunky k uvoľneniu vápnikových zásob z endoplazmatického retikula je známa už viac než 25 rokov. Výsledky výskumu v posledných dvoch rokoch však odhalili nové mechanizmy dopĺňania týchto zásob a tiež kľúčových hráčov v tomto procese, medzi ktorých patrí aj STIM1 (Stromal interaction molecule 1). Po poklese intraluminálnej koncentrácie vápnika dochádza k vytváraniu zhlukov STIM1 v blízkosti plazmatickej membrány z jeho pôvodne homogénnej distribúcie. To spôsobí zhlukovanie vápnikových kanálov v plazmatickej membráne nasledované vtokom extracelulárneho vápnika. V tejto práci sú sumarizované nové poznatky o fungovaní STIM1 a niektorých ďalších molekúl v regulácii intracelulárneho vápnika. Zvýšená pozornosť je venovaná doposiaľ ešte stále nevyjasneným skutočnostiam transportu STIM1 do plazmatickej membrány následkom vyčerpania vápnikových zásob a udržovania pomeru STIM1 v plazmatickej membráne a endoplazmatickom retikule. Rovnako sa málo vie o mechanizmoch sprevádzajúcich tvorbu, lokalizáciu zhlukov STIM1, ich udržovanie pod plazmatickou membránou a tiež ich vnútornej dynamike. Tieto zhluky sa nachádzajú presne pod zhlukmi Orai1 alebo TRPC1 (Canonical transient receptor potential 1) v plazmatickej membráne, a tak sa usudzuje, že by STIM1 mohol s týmito proteínmi priamo interagovať a spúšťať vstup extracelulárneho vápnika. Stále však neexistuje presná odpoveď na to, či je táto interakcia priama alebo sprostredkovaná a ako je táto interakcia tvorená. Nejasné je aj to, či spôsobuje otváranie vápnikových kanálov už samotná agregácia ich podjednotiek alebo je potrebná aj dodatočná konformačná zmena týchto podjednotiek. Úplne neznáma pôda je fosforylácia molekuly STIM1. Doteraz nie sú známi žiadny fosforylační, defosforylační či iní interakční partneri a ani mechanizmus, ktorý fosforyláciu reguluje. Bližšie poznanie týchto skutočností prispeje k lepšiemu pochopeniu fungovania vápnikovej signalizácie. Okrem iného je tu tiež možnosť, že STIM1 funguje v plazmatickej membráne niektorých špeciálnych typoch buniek ako senzor extracelulárneho vápnika, podobne ako je tomu aj u CaSR (Calcium sensing receptor), a prispieva tak k extracelulárnej vápnikovej signalizácii a regulácii množstva extracelulárneho vápnika.

Abstract

The signal pathway leading from plasma membrane receptor activation to calcium store release from endoplasmic reticulum is known for more than 25 years. Scientific results in past two years revealed unknown mechanisms of refilling these stores and also key players in this process, mainly STIM1 (Stromal interaction molecule 1). After intraluminal calcium concentration decrease, STIM1 aggregates start to form near the plasma membrane from its initially homogenous distribution. This leads to creation of functional calcium channels in the plasma membrane followed by extracellular calcium influx. In this work are summarised latest findings about STIM1 and other molecules functioning in intracellular calcium regulation. Increased attention is paid to still unexplained mechanisms of STIM1 transport to the plasma membrane after store depletion, and maintenance of STIM1 ratio between plasma membrane and endoplasmic reticulum. Also less is known are mechanisms which follow the creation of STIM1 aggregates of STIM1 underneath the plasma membrane, and their internal dynamic. These aggregates are localised precisely under Orai1 or TRPC1 (Canonical transient receptor potential 1) aggregates in plasma membrane so it is assumed that STIM1 could directly interact with these proteins and thus trigger the extracellular calcium influx. The answer to the question whether this interaction is direct or mediated and how is this interaction being created still doesn't exist. It is also unclear what causes calcium channel opening; whether aggregation of subunits alone or additional conformational changes of subunits. Completely unknown land is STIM1 molecule phosphorylation. Up to now there aren't known any phosphorylation, dephosphorylation or other interaction partners, neither mechanism which regulates phosphorylation. Further knowledge of these facts will contribute to better understanding of the role of calcium in intracellular signaling. There also remains an interesting possibility that STIM1 functions in the plasma membrane of some special cell types as a sensor of extracellular calcium, in analogy to CaSR (Calcium sensing receptor) and so it contributes to extracellular calcium signalisation and regulation of extracellular calcium amount.

Kľúčové slová

| STIM1 | Orai1 | vápnik | vápniková signalizácia | vápnikové zásoby | CRAC | SOC | SOCE | TRPC |

1 Úvod

1.1 Úloha vápnika v bunkovej signalizácii

Vápnik, okrem toho že je dôležitý pre správne zbaľovanie proteínov v endoplazmatickom retikule, správnu funkciu kadherínov v bunkovej adhézii a pre spúšťanie apoptózy, je aj dôležitý druhý posol v bunkovej signalizácii. Na to, aby mohla vápniková signalizácia fungovať, musí byť vápnik v cytosole buniek nachádzajúcich sa v kľudovom stave neustále aktívne udržiavaný na nízkej koncentrácii okolo 0,1 – 0,2 μM . To je dosahované pomocou jeho transportu za spotreby energie vo forme ATP (adenozíntrifosfát) vápnikovými ATPázami. A to jednak do extracelulárneho priestoru, ale tiež do endoplazmatického retikula a mitochondrií, kde sa jeho koncentrácia pohybuje okolo 1 – 2 mM. Medzi mitochondriami a endoplazmatickým retikulom, ktoré slúžia bunke ako zásobníky vápnikových iónov a cytoplazmou je tak drastický koncentračný rozdiel, ktorý je využívaný na rýchlu signalizáciu. Vápniková signalizácia je spúšťaná naviazaním agonistu na niektorý receptor na bunkovom povrchu spojený s trimérnymi G proteínmi alebo tyrozínovými kinázami. To vedie k aktivácii niektorej z izoforiem fosfolipázy C (PLC), ktorá katalizuje štiepenie v plazmatickej membráne prítomného fosfatitylozitol-4,5-bisfosfátu (PIP_2) na dvoch druhých poslov, diacylglycerol (DAG) a inozitol-1,4,5-trisfosfát (IP_3). IP_3 difunduje cez cytoplazmu, až dosiahne membránu endoplazmatického retikula, kde sa viaže na IP_3 receptor (IP_3R), ktorý slúži ako vápnikový kanál a nasleduje rýchle uvoľnenie Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, čo môže vyvolať až 10 000 násobný nárast jeho koncentrácie v cytosole. To však spôsobí okamžitú aktiváciu SERCA (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase), ktoré ho ihneď transportujú späť do lúmen endoplazmatického retikula a tiež aktiváciu Ca^{2+} ATPáz v plazmatickej membráne, ktoré ho transportujú von z bunky do extracelulárneho priestoru. To spôsobuje, že vápnikový signál je rýchly a silný, ale jeho trvanie je časovo obmedzené na krátky interval. Aj toto prechodné zvýšenie koncentrácie však stačí na spustenie niektorých bunkových dejov, ako napríklad aktivácia exocytózy či aktivácia transkripčných faktorov NF- κB (nuclear factor kappa B) a c-Jun.

1.2 Dopĺňovanie endoplazmatických vápnikových zásob

Mechanizmus dráhy uvoľnenia vápniku z endoplazmatického retikula je veľmi dobre známy už asi 25 rokov. No ešte pred 2 rokmi sa vedelo o tom, ako sa zásoba vápnika v endoplazmatickom retikule obnovuje, len veľmi málo. Mnoho bunkových dejov, ako

napríklad aktivácia transkripčného faktoru NF-AT (nuclear factor of activated T-cells), však vyžaduje pre svoje spustenie dlhotrvajúce zvýšenie cytosolickej koncentrácie vápnika. Keďže je však vápnik z cytosolu rýchlo transportovaný Ca^{2+} ATPázami v plazmatickej membráne do extracelulárneho priestoru, musí logicky po určitej dobe dôjsť k úplnému vyčerpaniu zásob vápnika v endoplazmatickom retikule. Aby k dlhodobej vápnikovej signalizácii mohlo vôbec dôjsť a aby spolu s krátkodobou signalizáciou mohli byť aktivačné deje spúšťané opakovane, vyvinul sa u buniek mechanizmus nazývaný CCE (capacitative calcium entry) alebo tiež aj SOCE (store-operated calcium entry), ktorý zabezpečuje vstup dodatočného vápnika z extracelulárneho priestoru cez plazmatickú membránu [1;2].

Po poklese koncentrácie zásoby vápnika v lúmen endoplazmatického retikula je táto skutočnosť zaregistrovaná receptorom a prenesená ku plazmatickej membráne, kde dôjde k aktivácii a otvoreniu hypotetických vápnikových kanálov, nazývaných SOC (store-operated calcium) kanály. Nasleduje vtok vápnika do cytosolu, ktorý vytvára vápnikový prúd nazývaný I_{SOC} (store-operated calcium current). SOC však nie sú jediné kanály priepustné pre vápnik nachádzajúce sa v plazmatickej membráne. Okrem nich existujú aj iné typy ako napríklad napäťovo ovládané vápnikové kanály (VOC), receptorom ovládané kanály (ROC) alebo kanály ovládané druhým poslom (SMOC). SOC sú tak len jeden z možných typov kanálov, ktoré umožňujú vstup extracelulárneho vápnika do bunky. Sú však unikátne v tom, že sú otvárané špecificky iba pri poklese alebo úplnom vyčerpaní vápnikových zásob v endoplazmatickom retikule. Tento pokles či vyčerpanie môžu byť spôsobené prirodzeným mechanizmom, tak ako tu už je popísané, alebo môžu byť aj umelo navodené pomocou chelátorov ako EGTA alebo BAPTA, ionoforov ako ionomycin alebo inhibítorom SERCA púmp, thapsigarginom. SOC sami o sebe nie sú tvorené jediným typom kanálov ale naopak, zdá sa, že nielen medzi bunkami ale aj v rámci jednej bunky existuje niekoľko rôznych typov týchto kanálov. Prvým objaveným a v súčasnosti aj najviac známym a charakterizovaným SOC je hypotetický vápnikový kanál pomenovaný CRAC (calcium release-activated calcium) kanál. Bol objavený u žírnych buniek a je prítomný aj v niektorých ďalších bunkách, hlavne hematopoetickej línie. Vápnikový prúd, ktorý po jeho otvorení vzniká sa nazýva I_{CRAC} (calcium release-activated calcium current) a vyznačuje vysokou selektivitou pre Ca^{2+} ióny, nezávislosťou na napäťovom ovládaní, výraznou orientovanosťou prúdu smerom do bunky a pomerne malou veľkosťou voči iným prúdom [1;2].

1.3 Mechanizmus aktivácie SOCE

Na to, aby mohol SOCE fungovať, musí byť pokles intraluminálnej koncentrácie vápnika nejakým spôsobom zaregistrovaný. Následne musí byť generovaný signál, ktorý je prenesený od endoplazmatického retikula ku SOC kanálom v plazmatickej membráne, ktoré sú následne otvorené a umožnia tak vtok extracelulárneho vápnika do bunky. Sú teda potrebné tri komponenty: vápnikový receptor v endoplazmatickom retikule, signálna dráha od endoplazmatického retikula ku plazmatickej membráne a SOC kanály.

Model SOCE (resp. CCE) prvýkrát predstavil Putney asi pred 20 rokmi. Model vtedy predpokladal, že SOC kanály sú nejakým spôsobom bezprostredne napojené na distálne časti endoplazmatického retikula a umožňujú tak priamy vstup vápnika z extracelulárneho priestoru do endoplazmatického retikula. O niečo neskôr však Putney svoj model upravil a podľa tejto verzie vápnik najskôr vstupuje do cytosolu, kde je však okamžite vychytávaný a transportovaný do endoplazmatického retikula SERCA pumpami. Keďže SERCA majú za normálnych okolností vyššiu kapacitu prenosu vápnika ako je rýchlosť jeho vstupu cez SOC, nie je nárast cytosolickej koncentrácie vápnika bežnými metódami detekovateľný. Pokiaľ však dôjde k výraznejšiemu poklesu intraluminálnej hladiny vápnika alebo je použitý inhibítor SERCA púmp, thapsigargin, dochádza k masovému otvoreniu SOC kanálov a funkčné SERCA nie sú schopné rýchlo odoberať vápnik z cytoplazmy a dochádza tak k detekovateľnému nárastu jeho cytosolickej koncentrácie [1;3]. Túto skutočnosť podporujú aj najnovšie výsledky, ktoré zahŕňajú aj účasť mitochondrií pri vychytávaní vápnika, ktorý SERCA nestíhajú z cytoplazmy odoberať [4]. Upravený Putneyho model v podstate platí až doteraz a okrem iného dal podnet pre vznik niekoľko ďalších modelov, ktoré sa snažia vo väčších detailoch popísať mechanizmus signálnej dráhy, ktorá vedie od detekcie poklesu hladiny vápnika ku otvoreniu kanálov v plazmatickej membráne.

Tieto modely môžeme rozdeliť vzhľadom na charakter prenosu signálu na tie, ktoré predpokladajú účasť a) difuzibilného posla (diffusible messenger), b) priameho spojenia endoplazmatického retikula a plazmatickej membrány (direct coupling) a c) vezikulárnej fúzie (vesicular fusion) [1;2].

Model difuzibilného posla predpokladá, že sa po zaregistrovaní poklesu intraluminálnej koncentrácie vápnika začne tvoriť signálna látka neznámej povahy, nazývaná CIF (calcium influx factor), ktorá následne difunduje smerom ku plazmatickej membráne a spôsobí otvorenie SOC. Podľa niektorých hypotéz CIF spôsobuje odstránenie inhibičného kalmodulínu a tým aktivovanie Ca^{2+} iPLA₂ (inducible phospholipase A₂), ktorá začne tvoriť

z fosfolipidov lyzofosfolipidy, ktoré zjavne bez účasti kyseliny arachidonovej aktivujú SOC. Najväčší problém však spôsobuje, že aj keď po použití mnohých purifikačných krokov bol z bunkového lyzátu získaný produkt o hmotnosti asi 700 Da, ktorý bol schopný aktivovať SOC, jeho chemická podstata nebola nikdy identifikovaná [3].

V modeli priameho spojenia sa usudzuje, že v bunke existuje trvalé spojenie medzi plazmatickou membránou a okrajovými časťami endoplazmatického retikula. Spojenie je udržiavané interakciou SOC a nejakej komponenty endoplazmatického retikula, ktorá slúži aj ako senzor poklesu vápnika. Keďže takéto usporiadanie by zodpovedalo krátkemu času potrebnému na aktiváciu SOC od okamihu vyčerpania vápnikových zásob, bol navrhnutý odvodený model indukovaného spojenia (induced coupling), v ktorom spojenie týchto dvoch membrán nie je trvalé, ale vzniká pohybom okrajových častí endoplazmatického retikula ku plazmatickej membráne. Tento pohyb je indukovaný poklesom koncentrácie vápnika v endoplazmatickom retikule a je zodpovedný za oneskorenú aktiváciu SOC [1].

V modeli vezikulárnej fúzie sa predpokladá, že SOC nie sú v kludovom stave v membráne, ale sú v membránových váčkoch tesne pod plazmatickou membránou a po poklese intraluminálnej koncentrácie vápnika sú exocitované a inkorporované do plazmatickej membrány čím je spustený I_{SOC} . Ide teda o mechanizmus, ktorý je známy u glukózových transportérov GLUT4 [1].

1.4 Hľadanie SOC kanálov

Iná časť výskumu sa zamerala na hľadanie potenciálnych SOC kanálov alebo ich súčastí. Prvým úspechom sa zdalo byť objavenie proteínu TRP (transient receptor potential), ktorý tvorí vápnikový kanál v svetlocitlivých bunkách oka *D. melanogaster*. Hľadanie po cicavčích homológoch bolo úspešné a boli nájdené TRP proteíny, ktoré sa podľa podobnosti delia do troch skupín. Je to sedem kanonických TRP (TRPC1-7), ktoré sa najviac podobajú svojmu drozofiliemu predkovi, melastatinu príbuzné TRP (TRPM) a vaniloidným receptorom príbuzné TRP (TRPV). Všetky tieto proteíny prechádzajú šesť krát cez membránu, pričom N aj C koniec je orientovaný smerom do cytosolu. Hydrofóbná oblasť, dôležitá pre tvorbu póru, sa nachádza medzi piatym a šiestym helixom a TRP celkovo svojou topológiou pripomínajú napät'ové kanály. Vo štvrtom transmembránovom segmente im však chýbajú pozitívne nabité zbytky zodpovedné za vnímanie napätia [2].

Najviac pozornosti sa venovalo práve TRPC, pretože práve tie vykazovali vlastnosti, ktoré naznačovali, že by sa mohlo jednať o dlho hľadané SOC. Na svojich intracelulárnych častiach

nesú niekoľko konzervovaných ankyrinových homologických sekvencií, ktoré by mohli slúžiť na interakciu s cytoskeletom. Iónový kanál je pravdepodobne vytvorený po asociácii štyroch TRPC proteínov do tetraméru, či už homotetraméru ale predpokladá sa aj možnosť rôznych kombinácií TRPC za vzniku heterotetramérov [2;5].

Výsledky mnohých štúdií však ukázali byť dosť rozporuplné. Mnohé TRPC sa síce javili ako SOC, ale iba pri nízkej expresii príslušného génu. Po zvýšení expresie vlastnosti SOC stratili a začali prejavovať vlastnosti ROC. Putney vysvetľuje výskyt takýchto výsledkov ako dôsledok toho, že TRPC potrebujú na to, aby mohli fungovať ako SOC, ešte aspoň dva rôzne faktory, s ktorými interagujú v stechiometrickom pomere 1:1. Nadprodukciou TRPC sa táto stechiometria poruší a TRPC tak nemôžu fungovať ako SOC. Dokonca sa zdá, že aj samotný materský drozofilí TRP nefunguje in vivo ako SOC, ale je pravdepodobne aktivovaný DAG vzniknutým po štiepení PLC [5].

TRPC kanály môžu byť zložené rôznym spôsobom v rôznych bunkách a tvoriť kanály rôznych vlastností a priepustností pre ióny. Pravdepodobne tak môžu za správneho podjednotkového zloženia tetraméru alebo správneho molekulárneho aparátu konkrétneho bunkového typu fungovať ako SOC. Prípadne môžu zastávať v bunke obidve funkcie SOC aj ROC [2;5].

2 Nový kľúčový hráči v regulácii SOCE

2.1 *STIM1* a jeho génová rodina

STIM (stromal interaction molecule) bol pôvodne objavený v rámci hľadania nových molekúl interagujúcich s pre-B bunkami ako povrchová molekula zúčastňujúca sa rastu a prežívania pre-B lymfocytov [6]. Nezávislou štúdiou bol objavený a pomenovaný ako GOK. Bolo zistené, že jeho gén leží v ľudskom chromozomálnom úseku 11p15.5 a bola mu prisúdená úloha tumorsupresorového génu [7]. Významný prielom v hľadaní funkcie STIM1 ale hlavne v hľadaní po mechanizme fungovania SOCE bolo dosiahnuté vďaka dvom nezávislým štúdiám, ktoré využili mechanizmu RNAi (RNA interferencia) na skrining génov, ktoré by sa potenciálne mohli zúčastňovať SOCE. V prvej štúdií bolo použitím siRNA (krátke interferujúce RNA) postupne umlčovaných 170 drozofilích génov, a takéto bunky boli testované na prítomnosť I_{CRAC} po následnom ošetrení inhibítorom SERCA [8]. V paralelnej štúdií bola použitá siRNA na umlčanie až 2 304 ľudských génov, ktoré mali po svojom umlčaní a následnom receptorom aktivovanom uvoľnení Ca^{2+} zabrániť aktivácii transkripčného faktoru NF-AT, ktorý vyžaduje na svoju aktiváciu dlhodobý vápnikový signál

[9]. Obidva výskumy jasne identifikovali STIM1 ako komponentu, bez ktorej nedochádza k aktivácii SOC. Druhý z nich navyše vyjadril domnienku, že STIM1 by mohol fungovať v endoplazmatickom retikule ako vápnikový senzor [9].

Okrem STIM1 bol identifikovaný aj jeho cicavčí homológ STIM2, zatiaľ čo u *D. melanogaster* bol identifikovaný iba jeden homológny gén dSTIM (STIM z *D. melanogaster*), z ktorého pravdepodobne divergovali obidva cicavčie gény. U jednobunkových eukaryot ako *S. cerevisiae* nebol dosiaľ nájdený podobný homológ. Jedná sa o transmembránové proteíny typu Ia, čo znamená, že prechádzajú jedenkrát cez membránu a ich N-koniec je orientovaný do cytosolu, zatiaľ čo C-koniec je prítomný v intraluminálnom respektíve extracelulárnom priestore [10].

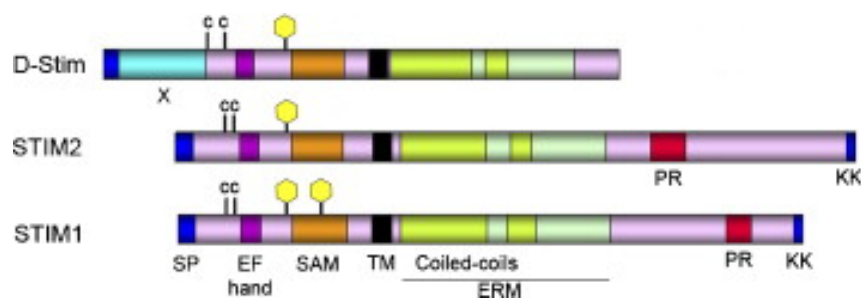
STIM1 je po odštiepení 22 aminokyselín dlhej signálnej sekvencie, smerujúcej ho do membrány, dlhý 663 aminokyselín, relatívnu hmotnosť asi 90 kDa [10] a obsahuje dve N-viazané glykozylácie na N131 a N171, pričom tretie potenciálne miesto pre glykozyláciu N658 ostáva nevyužitú kvôli jeho cytosolickej orientácii. Aj napriek tomu, že glykozylácie nie sú v plne maturovanej forme, čo bolo dokázané ich senzitivitou ku štiepeniu endoglykozidázou H, ich prítomnosť je dôležitá pre povrchovú expresiu a inhibíciou ich vzniku je zabránené transportu do plazmatickej membrány [11].

STIM2 je prekladaný zo svojej mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) od neklasického štart-kodónu UUG a po odštiepení 14 aminokyselínovej signálnej sekvencie vzniká finálny proteínový produkt dlhý 732 aminokyselín. Na rozdiel od STIM1 však obsahuje iba jednu N-glykozyláciu na N135.

dSTIM je podobne ako STIM2 jedenkrát N-glykozylovaný a bez 23 aminokyselín dlhého signálneho peptidu je tvorený 570 aminokyselinami [12].

Analýza štruktúry tejto génovej rodiny viedla k odhaleniu viacerých motívov a domén. Hneď za odštiepenou signálnou sekvenciou sa nachádza pár cysteínových zbytkov. Za nimi nasleduje nepárová EF-hand doména. Jedná sa o štruktúru obsahujúcu helix-loop-helix motív schopnú viazať Ca^{2+} [12] a pravdepodobne sa jedná o časť registrujúcu pokles intraluminálnej koncentrácie vápnika a zodpovednú za funkciu STIM1 ako senzoru vyčerpania vápnikových zásob [9]. V intraluminálnej respektíve extracelulárnej časti molekuly sa ešte nachádza SAM (sterile alpha motif) doména štruktúrne tvorená kľbkom piatich alfa helixov. V proteínoch, v ktorých bola doteraz identifikovaná, sprostredkováva homo alebo heterotypickú interakciu s inými proteínmi obsahujúcimi SAM doménu. Preto sa predpokladá, že by mohla podobnú

funkciu plniť aj v molekulách rodiny STIM. Unikátne v prípade molekúl STIM je, že vyššie spomínané dve glykozylácie v STIM1 a jedna glykozylácia v prípade STIM2 a dSTIM sa nachádzajú práve v SAM doméne. Jedná sa tak o historicky prvý prípad, kedy bola zistená prítomnosť glykozylácie v SAM doméne a zároveň je to aj prvá SAM doména nachádzajúca sa v extracelulárnom priestore [11]. Nasleduje vysoko konzervovaná transmembránová oblasť a za ňou sa nachádzajú dva coiled-coil úseky, ktoré podobne ako SAM doména môžu sprostredkovať homodimerizáciu alebo heterodimerizáciu. Tieto coiled-coil úseky ležia v rámci oblasti, ktorá vykazuje homológiu s ERM (ezrin/radixin/moesin) doménami [13]. ERM proteíny sprostredkovávajú spojenie cytoskeletu ku plazmatickej membráne a ERM homológne domény boli nájdené u proteínov, u ktorých sa predpokladá funkcia pri ukotvovaní proteínových komplexov ku membráne pomocou proteín-proteínových interakcií. ERM proteíny za normálnych okolností existujú v inaktívnej forme, kedy je väzobné miesto maskované intramolekulárnymi interakciami typu head-to-tail v rámci domény ERM. Do aktívneho stavu sa dostávajú po zmene konformácie, napríklad fosforyláciou [14]. Ďalej smerom ku C-koncu STIM1 a STIM2 sa nachádza na prolín bohatá oblasť, v rámci ktorej sa nachádza niekoľko potenciálnych serínových a treonínových fosforylačných miest, ktoré môžu byť substrátom pre prolín-smerované kinázy. Mnohé z týchto zbytkov sú in vivo naozaj fosforylované, čoho dôkazom je aj výskyt dvoch distinktných hmotnostných variantov STIM2, odpovedajúcich jeho fosforylovanej a nefosforylovanej forme. Na C-konci sa ešte nachádza krátka oblasť bohatá na lyzín obsahujúca u STIM1 päť lyzínov a u STIM2 deväť lyzínov [12].



Obrázok 1. Diagramatické znázornenie štruktúry STIM1, STIM2 a drozofilieho dSTIM (D-STIM): signálny peptid (SP), EF-hand doména (EF), SAM doména (SAM), transmembránový úsek (TM), coiled-coil domény (coiled-coils), ERM doména (ERM), prolín bohatá oblasť (PR), lyzín bohatá oblasť (KK), pár cysteínových zbytkov (cc), N-glykozylácie (šesťuholníky), dSTIM špecifická sekvencia (X).

(Dziadek, M.A. and Johnstone L.S. (2007))

2.2 Orai1 (CRACM1) a jeho génová rodina

Nadšenie z úspešného objavenia proteínov rodiny STIM vyústilo v hľadanie ďalších potenciálnych hráčov v aktivácii SOCE. Analýzou rodokmeňa pacientov trpiacich formou SCID (ťažká kombinovaná imunodeficiencia), kedy majú ich bunky poruchu v SOCE, poukázal na proteín Orai1, ktorý oproti svojej divokej forme nesie jednoaminokyselinovú zámenu arginínu za tryptofán na pozícii 91. Dodatočný skrining 21 000 drozofilých génov dôležitých pre spustenie I_{CRAC} a následnú translokáciu NF-AT do jadra využitím RNAi mechanizmu, viedlo rovnako k objaveniu drozofilej formy dOrai (Orai z *D. melanogaster*). Prehľadávaním známych sekvencií boli objavené tri ľudské homológy. Medzi nimi už známy Orai1 a dva nové gény Orai2 a Orai3. Vnesenie divokej formy Orai1 do T-lymfocytov a fibroblastov nesúcich SCID fenotyp obnovilo vtok vápnika, čo dokazuje, že Orai1 je naozaj nevyhnutný pre I_{CRAC} [15]. Podobne ako u STIM1, aj v prípade Orai1 prebehla paralelná štúdia, ktorá preverila technikou umlčovania 23 000 génov *D. melanogaster* a objavila dva gény CRACM1 a CRACM2 (CRAC modulator). U CRACM2 neboli zistené žiadne ľudské homológy, zatiaľ čo CRACM1 sa vzťahuje k dOrai a jeho trom ľudským homológom [16].

Celá trojčlenná rodina Orai proteínov sa vyznačuje svojou lokalizáciou v plazmatickej membráne a prítomnosťou štyroch transmembránových segmentov. Ide teda o transmembránové proteíny typu III, pričom aj N aj C koniec sú v cytoplazme. Práve nimi by mohli Orai proteíny interagovať medzi sebou alebo s inými molekulami napríklad STIM1 [17].

Orai1 je 45 kDa ťažký proteín a je exprimovaný v širokom spektre buniek. Ako jediný z Orai rodiny je glykozylovaný na asparagíne N223 v extracelulárnej slučke medzi 3 a 4 transmembránovým segmentom. Po odstránení glykozylácie je jeho hmotnosť redukovaná na 33 kDa. Na jeho C-terminálnom konci bola predikovaná malá coiled-coil doména [18]. Orai2 má hmotnosť 28 kDa a je hlavne exprimovaný v obličkách, pľúcach a slezine a Orai3 je široko exprimovaný, no ako jediný je vo zvýšenej miere exprimovaný v mozgu a jeho hmotnosť je približne 32,5 kDa [17].

2.3 Ďalší potenciálny hráči v SOCE

Objavenie Orai1 a STIM1 ako kľúčových hráčov v SOCE vyústilo v ďalšie a ešte širšie testovanie génov na ich účasť v jeho spúšťaní. Po viacnásobnom testovaní bolo identifikovaných päť drozofilých génov. Okrem už známych dSTIM a dOrai to boli aj gény Ca-P60A, sec61alpha, Syx5. Sec61alpha je podjednotka translokónu v endoplazmatickom

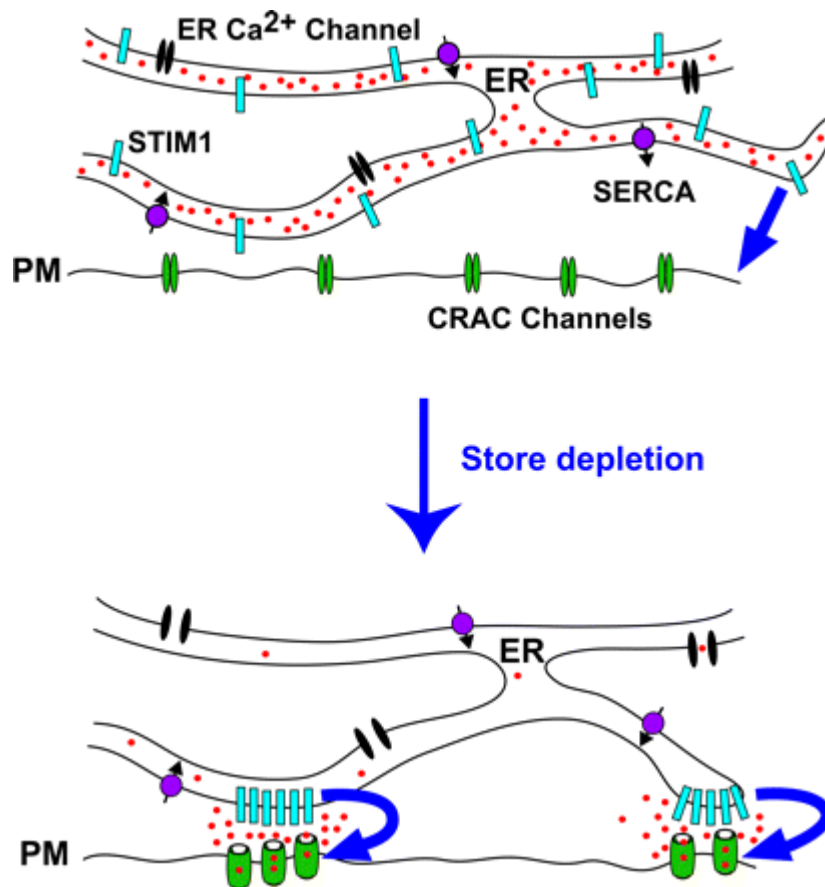
retikule a je možné, že zastavením jeho expície je znemožnená translokácia dôležitých komponentov ako napríklad STIM1 alebo Orai1 do membrány. Syx5 kóduje proteín Syntaxín5, ktorý je jeden zo SNARE proteínov dôležitých pre fúziu membránových váčkov. Jeho vypnutím je pravdepodobne zastavený transport súčastí dôležitých pre SOCE do plazmatickej membrány. Ca-P60A je gén pre SERCA pumpu, no nie je však jasné, či je naozaj dôležitý pre funkciu CRAC kanálov, alebo sa len jedná o ich inhibíciu zvýšenou bazálnou hladinou intracelulárneho vápnika v dôsledku jeho nedostatočného odstraňovania [18].

3 Lokalizácia STIM1 v bunke

Aj keď bol STIM1 objavený ako povrchový proteín [6;10], v priebehu výskumu sa objavili protichodné výsledky. Jednak to boli práce, ktoré potvrdzovali jeho povrchovú lokalizáciu pomocou protilátok proti jeho extracelulárnej časti a tiež biotínlačnej eseje, kedy boli všetky povrchové proteíny nabiotinilované a následne vyzolované [8;13;19-21]. Jednak sa ale objavilo aj niekoľko prác, ktoré využívali STIM1 sfúzovaný s niektorým fluorescenčným proteínom alebo inou detekčnou značkou, a ktoré naopak neboli schopné detegovať ani najmenšiu prítomnosť STIM1 na povrchu buniek [9;22-25]. O vyriešenie týchto rozporov sa podľa mňa postarala práca testujúca nový druh fluorescenčnej sondy špecifickej proti His-tag epitopu. Z výsledkov vyplýva, že použitie peptidovej značky fúzovanej s N-koncom STIM1, či už sa jedná o GFP, EYFP, HRP, FLAG alebo HA, znemožňuje transport maturovanej formy STIM1 z endoplazmatického retikula do plazmatickej membrány ale ostatné fyziologické funkcie ako schopnosť aktivovať I_{CRAC} alebo distribúcia v rámci endoplazmatického retikula ostala zachovaná. Oproti tomu použitie peptidovej značky fúzovanej s C-koncom, alebo použitie His-tagu nijako neovplyvňuje povrchovú expresiu STIM1 [26]. Všetky štúdie, ktoré neboli schopné zistiť STIM1 na povrchu používali práve STIM1 fúzovaný N-koncom, čo bol dôvod takýchto výsledkov. Nakoniec dôkazom membránovej lokalizácie a dôležitosti STIM1 je aj pokus, v ktorom použitie protilátky proti EF-hand motívu STIM1 na intaktné bunky, spôsobilo značnú inhibíciu CRAC kanálov [19;27].

V rámci tkanív je teda STIM1 exprimovaný v širokom spektre buniek a na bunkovej úrovni je prítomný hlavne v membráne endoplazmatického retikula a asi z 15 – 25 % na povrchu plazmatickej membrány [10;28]. Pokiaľ je bunka v kludovom stave a jej vápnikové zásoby sú naplnené, STIM1 vykazuje homogénnu distribúciu po celom endoplazmatickom

retikule. Po tom, čo hladina vápnika poklesne, začína sa STIM1 zhľukovať do bodov, ktoré sú vo vzdialenosti 10 – 25 nm pod plazmatickou membránou, čo je dostatočná vzdialenosť aby mohol priamo interagovať s CRAC kanálmi [29]. Tieto zhľuky vznikajúce po vyčerpaní zásob sa objavujú aj pri absencii extracelulárneho vápnika, a tak bolo hneď od začiatku zrejmé, že vytvorenie týchto zhľukov podmieňuje a je nevyhnutné pre otvorenie CRAC kanálov [9]. Z kinetiky ich vzniku od poklesu hladiny zásob po otvorenie CRAC vyplýva, že čas potrebný na ich sformovanie je približne zhodný s dobou potrebnou na aktiváciu SOCE [9]. Pokus o kvantifikáciu týchto blízkyh spojení medzi endoplazmatickým retikulom a plazmatickou membránou poskytol výsledky, ktoré hovoria, že po vyčerpaní zásob sa STIM1 hromadí v 1/3 novovytvorených spojení a v asi 2/3 starých už vopred vyformovaných [23]. Navyše inhibícia polymerizácie aktínu spôsobuje zníženie počtu zhľukov, ale zároveň aj zväčšenie ich priemeru [29]. Podľa mňa vysvetlenie tohto javu by mohlo byť v tom, že pre tvorbu nových spojení je potrebná účasť aktínu, a tak sa STIM1 po znemožnení tvorby nových spojení hromadí v už existujúcich spojeniach, čo má za následok zníženie počtu zhľukov a zároveň aj zväčšenie ich plochy.



Obrázok 2. Aktivácia CRAC kanálov pomocou STIM1: V stave naplnenosti vápnikových zásob (červená) je STIM1 (modré obdĺžniky) homogénne distribuovaný po celom

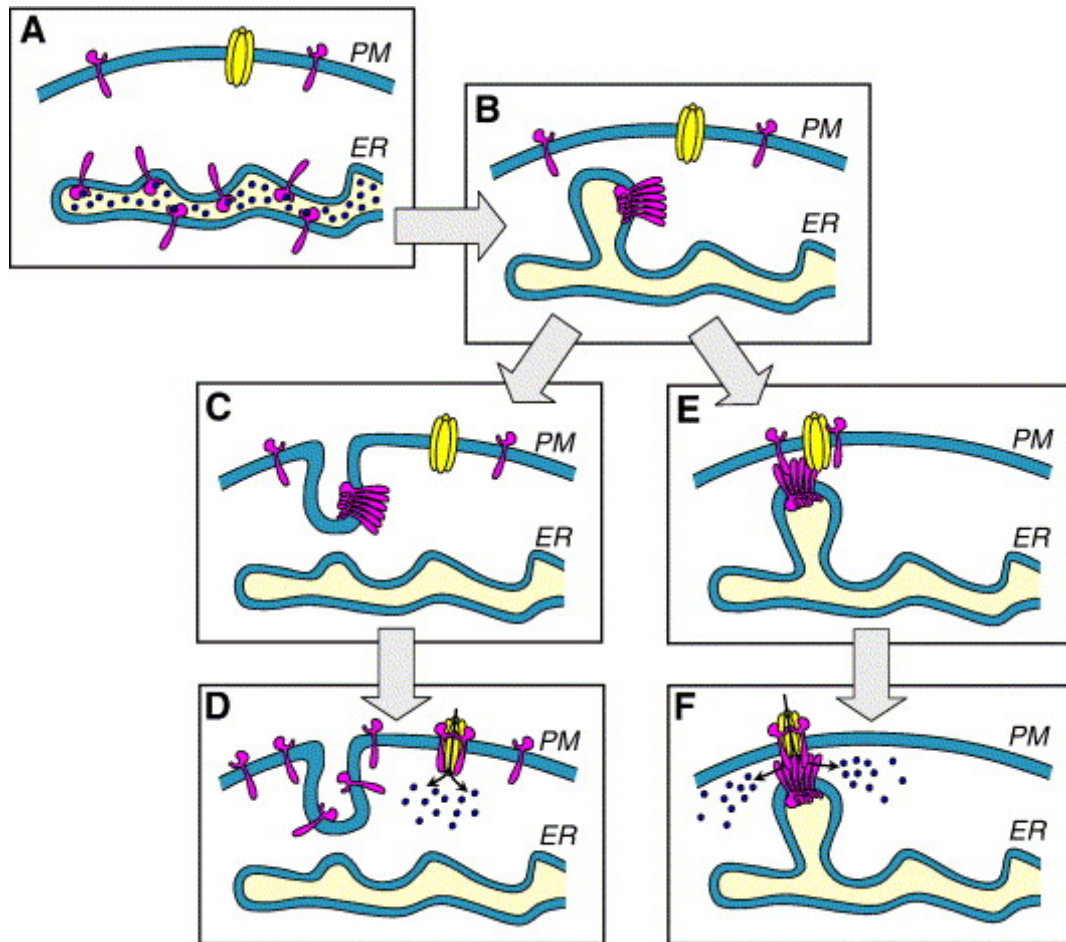
endoplazmatickom retikule (ER). Po ich vyprázdnení sa STIM1 začína zhlukovať v miestach endoplazmatického retikula v tesnej blízkosti plazmatickej membrány (PM), alebo sa niektoré takéto blízke spojenia začnú dodatočne vytvárať. Zhlukovanie STIM1 podnieti aj zhlukovanie CRAC kanálov (zelená), ktoré sa v miestach takýchto blízkych kontaktov otvárajú a umožňujú vstup extracelulárneho vápnika.

(Luik, R.M. et al. (2006))

Dve práce však zaznamenali úplne iné výsledky. Podľa nich je STIM1 po vyčerpaní zásob transportovaný do plazmatickej membrány, kde aktivuje CRAC kanály [19;20]. Protichodné výsledky poskytla okrem štúdií, ktoré používali N-koncové fúzované konštrukty STIM1 a teda sa nedajú považovať za relevantné, aj jedna práca, ktorá síce potvrdzuje povrchovú lokalizáciu STIM1, no použitím biotínlačnej eseje nezistila žiaden nárast STIM1 v cytoplazmatickej membráne [21]. Aj keď v ohľade inzercie STIM1 do plazmatickej membrány po poklese hladiny zásob vápnika nie je jasne rozhodnuté, z predchádzajúcich výsledkov jasne vyplýva, že ak by sa aj STIM1 do plazmatickej membrány inzeroval, na funkciu SOCE to nemôže mať žiaden vplyv. Použitie fúzovaných STIM1 konštruktov, ktoré jasne zabraňovali transportu STIM1 do plazmatickej membrány, nemalo totižto žiaden vplyv na spustenie ani priebeh I_{CRAC} . A dodatočne, pokus o umelé zabránenie povrchovej exprese mutovaním aminokyselín kritických pre N-glykozyláciu nespôsobilo žiadny signifikantný pokles v I_{CRAC} [28]. V tomto prípade však nebolo možné verifikovať, že STIM1 sa nenachádza na povrchu a v prípade fluorescenčného značenia bolo použitím vysoko-citlivého pHluorinu zistené, že aj v prítomnosti N-koncového značeného STIM1 je malá frakcia o veľkosti asi 2 % stále prítomná v plazmatickej membráne [22]. Pre dôkaz, že toto zbytkové množstvo nehrá úlohu v aktivácii CRAC kanálov, navrhujem vnesenie endoplazmatickej lokalizačnej sekvencie (KKXX) podobne ako je tomu u napríklad u STIM2 [21], prípadne kombináciu tohto postupu s mutáciou aminokyselinových zbytkov dôležitých pre glykozyláciu. Jednalo by napríklad o mutácie génu pre STIM1 v oblastiach homologických ku endoplazmatickej lokalizačnej sekvencii v STIM2 a tiež mutácie spôsobujúce zmenu asparagínu na aminokyselinu neumožňujúcu tvorbu N-glykozylácie. K N-koncu by sa tiež pripojila His-tag značka a po vložení do vhodného vektora by nasledovalo vnesenie do buniek s umlčanou expresiou STIM1 alebo najlepšie úplne odstránený pôvodný gén pre STIM1. Detekcia STIM1 v plazmatickej membráne by prebiehala pomocou už spomínanej fluorescenčnej sondy špecifickej pre His-tag epitop alebo pomocou fluorescenčne označenej protilátky špecifickej pre N-koncovú časť STIM1. V prípade, že sa preukáže neprítomnosť

STIM1 na povrchu a zároveň nezmenené vlastnosti I_{CRAC} , môžeme z takýchto výsledkov vyvodit', že STIM1 v plazmatickej membráne nie je dôležitý pre aktiváciu I_{CRAC} a teda ani jeho prípadná dodatočná inkorporácia do membrány po poklese zásob nie je pre tento dej podstatná.

Otázka inkorporácie STIM1 do plazmatickej membrány však môže byť dôležitá z hľadiska existencie mechanizmu, ktorý síce nie je podstatný pre spustenie I_{CRAC} , ale môže hrať úlohu v jeho regulácii či regulácii iných dejov spojených so vstupom extracelulárneho vápnika.



Obrázok 3. Dva diskutované modely aktivácie SOC pomocou STIM1: (A) Ružové molekuly predstavujúce STIM1 sú v stave naplnenia vápnikových zásob homogénne distribuované v endoplazmatickom retikule (ER) ale malá časť sa nachádza aj v plazmatickej membráne (PM). SOC kanály (žltá) sú uzavreté. (B) Po vyprázdnení zásob sa STIM1 začína zhľukovať v blízkosti plazmatickej membrány. (C)(D) Podľa inzerčného modelu je STIM1 následne transportovaný do plazmatickej membrány, kde jeho zvýšená hladina aktivuje SOC kanály. (E)(F) V interakčnom modeli STIM1 ostáva v endoplazmatickom retikule a interaguje so SOC kanálmi, čo spôsobí ich otvorenie.

(Soboloff, J. et al. (2006))

4 Od štruktúry k funkcii STIM1

4.1 Úloha EF-hand a SAM domény

V čase, kedy bola objavená účasť STIM1 na aktivácii SOCE, sa začalo uvažovať, že by mohol tvoriť zložku SOC a CRAC kanálov [8]. Alternatívny názor bol, že jeho EF-hand doména by mohla byť schopná viazať voľný vápnik v endoplazmatickom retikule a pri poklese jeho koncentrácie by mohla byť vyvolaná zmena konformácie celej molekuly, ktorá by viedla k zhluknutiu do miest tesne pod plazmatickou membránou a aktivovaniu CRAC kanálov. STIM1 by tak fungoval ako akýsi receptor alebo senzor koncentrácie intraluminálneho vápnika a zároveň aj aktivátor CRAC kanálov [9].

Snaha overiť hypotézu, že STIM1 dokáže vnímať intraluminálnu koncentráciu vápnika práve cez EF-hand doménu, viedlo k testovaniu STIM1 molekuly in vivo s mutovanými kyslými zbytkami, ktoré boli predpovedané ako kritické pre väzbu Ca^{2+} do EF-hand domény (D76A [9;13;21;25], D76N [25], D78A [20;21], D78N [25], E87A [21;27], E87Q [20;25]). Všetky varianty okrem D76N vykazovali trvalé usporiadanie do zhlukov spojené s konštitutívnym vtokom extracelulárneho vápnika cez plne otvorené SOC aj za stavu naplnených intraluminálnych zásob, čo malo za následok zvýšenie kľudovej intracelulárnej koncentrácie vápnika. Dodatočné vyprázdnenie zásob tak nespôsobilo žiadnu zmenu v lokalizácii STIM1 ani ďalšie zvýšenie I_{SOC} . Pri koexpresii mutovaného STIM1 a divokej formy STIM1 viedlo vyprázdnenie zásob k pohybu divokej formy STIM1 do už vytvorených zhlukov mutovanej formy a k následnej kolokalizácii oboch foriem v týchto zhlukoch [9]. Tieto výsledky pomerne jasne naznačovali, že STIM1 naozaj dokáže vnímať hladinu vápnika v endoplazmatickom retikule a po jej poklese vytvára zhluky na jeho periférii.

Schopnosť EF-hand domény viazať vápnik bola finálne potvrdená v rozsiahlej štúdií, v ktorej bol použitý úsek STIM1 obsahujúci iba EF-hand a SAM doménu, rekombinantne exprimovaný v *E. coli*. Ca^{2+} sa k fragmentu viazal v stechiometrickom pomere 1:1 a pomerne slabou afinitou vyjadrenou vo forme disociačnej konštanty 0,2 – 0,6 mM. Táto hodnota je jednak porovnateľná s hodnotami nameranými pre iné vápnik viažuce proteíny (napr. calreticulin), a jednak je v rozsahu bežných koncentrácií vyskytujúcich sa v endoplazmatickom retikule (1 – 2 mM) a súhlasí s funkciou STIM1 ako senzoru koncentrácie intraluminálneho vápnika. Pri veľmi vysokej afinite by STIM1 zaregistroval nedostatok vápnika až pri jeho veľmi nízkej intraluminálnej koncentrácii. Nízka afinita zabezpečuje jeho schopnosť zaregistrovať aj veľmi mierny pokles koncentrácie. Bolo tiež

preukázané, že naviazanie vápnika stabilizuje takýto komplex energiou asi $3,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a že fragment EF-SAM sa nachádza v kompaktnej a pevne zvinutej terciárnej štruktúre. EF-SAM s naviazaným vápnikom sa preferenčne vyskytuje v monomérskej forme, čo súhlasí s jeho homogénnym difúznym rozložením v endoplazmatickom retikule pri dostatku vápnika. Naopak, bez naviazaného vápnika má EF-SAM v mierne rozvoľnenú terciárnu štruktúru. Zmena konformácie EF-hand pravdepodobne zasahuje aj SAM doménu a spôsobuje tiež zvýšenie povrchovej hydrofobicity EF-SAM, čo má zjavne za následok dimerizáciu až oligomerizáciu týchto fragmentov [30]. Úlohu SAM domény v oligomerizácii dokazuje neschopnosť STIM1 s odstránenou SAM doménou vytvárať zhluky po vyčerpaní zásob [24]. Tieto výsledky sú opäť v súlade s pozorovaniami in vivo, kedy sa po vyčerpaní vápnikových zásob STIM1 začína zoskupovať do bodov. EF-SAM úsek molekuly STIM1 tak s najväčšou pravdepodobnosťou plní úlohu senzora a spúšťača oligomerizácie STIM1. Bolo tiež navrhnuté, že oligomerizácia a vytváranie zhlukov sú po takomto vyviazaní vápnika z EF-hand domény samovoľné a termodynamicky preferované [30]. No tak či onak, nijako to nevysvetľuje počet a príčinu vytvárania týchto zhlukov iba v určitých miestach bunky a navyše v tesnej blízkosti plazmatickej membrány. Možným vysvetlením by mohlo byť, že zo začiatku vznikajúce menšie zhluky STIM1 sú postupne vychytávané a zadržiavané v blízkosti membrány pomocou interakcie STIM1 s CRAC kanálmi v plazmatickej membráne alebo inými interakčnými partnermi asociovaným s plazmatickou membránou.

4.2 Úloha coiled-coil (ERM) domény

Ako bolo už spomenuté, coiled-coil respektíve ERM doména slúži v mnohých proteínoch ako sprostredkovateľ proteín-proteínových interakcií. V pokuse dokázať, že cytosolický C-terminálny koniec (STIM1^{CT}), ktorého súčasťou je aj coiled-coil/ERM doména, bol použitý chimérický proteín STIM1, ktorého extracelulárny koniec bol nahradený časťou iného proteínu. Následná imunoprecipitácia chiméry ukázala, že spolu s ňou sa koprecipitovala aj pôvodná forma STIM1. Interpretácia týchto výsledkov ako postrádateľnosť SAM domény v tvorbe STIM1-STIM1 interakcií [11] alebo že STIM1 existuje in vivo pri plných zásobách vápniku vo forme dimérov [14], je podľa mňa unáhlená a pravdepodobne aj mylná. To, že tieto molekuly pri izolácii interagujú síce dokazuje, že STIM1^{CT} obsahuje sekvenciu, ktorá umožňuje zhlukovanie STIM1 aj bez vyčerpania vápnikových zásob, no neznamena to, že takéto interakcie sú prítomné aj in vivo v prostredí ostatných komponentov membrány. Pomôcť vyriešiť túto nejasnosť ohľadom stavu STIM1 v neaktivovanom stave by mohla

metóda FRET (fluorescence resonance energy transfer) pomocou koexpresie dvoch rôzne fluorescenčne značených STIM1.

Ďalšia snaha o rozlúštenie úlohy C-konca STIM1 a jeho domén viedla k pokusu o expresiu samotnej STIM1^{CT} časti. Bolo zistené, že STIM1^{CT} sa prejavuje podobne ako STIM1 mutovaný v EF-hand doméne (STIM1^{D76A}). Spôsobuje konštitutívny I_{CRAC}, translokáciu NF-AT do jadra a zvýšenú hladinu kľudovej koncentrácie intracelulárneho vápnika. Expresia STIM1^{CT} v bunkách s umlčaným STIM1 pomocou siRNA opäť umožnila transport NF-AT do jadra [13].

Odstránenie ERM domény zo STIM1^{CT} a STIM1^{D76A} (STIM1^{CT-ΔERM} a STIM1^{D76A-ΔERM}) viedlo k zrušeniu ich účinkov. Bol znemožnený transport NF-AT do jadra, znížená kľudová koncentrácia intracelulárneho vápnika a silno inhibovaný I_{CRAC}. Navyše STIM1^{D76A-ΔERM} v koexpresii s divokou formou STIM1 bráni jej zhlukovaniu po vyčerpaní vápnikových zásob. Divoká forma STIM1 bez ERM domény rovnako stráca schopnosť transportu NF-AT do jadra [13].

Výsledky teda naznačujú, že vďaka ERM doméne je STIM1 schopný aj bez stimulu tvoriť homooligoméry, no ich vytváranie je za bežných podmienok zabránené konformačným stavom EF-SAM časti s naviazaným Ca²⁺. Disociácia vápnika z EF-hand domény spôsobí konformačnú zmenu EF-SAM, čo spôsobí zmenu coiled-coil domén u dimérov STIM1 a tá umožní laterálnu agregáciu STIM1 dimérov do zhlukov [14].

Alternatívne v prípade, že STIM1 existuje za kľudových podmienok ako monomér, je prenos konformačnej zmeny cez membránu po proteíne, ktorý prechádza membránou iba raz, malá. Preto sa potom zdá byť pravdepodobnejšie, že to, čo udržiava molekuly STIM1 v monomérom stave, je konformačný stav EF-hand domény bez účasti SAM domény. To by podporoval aj výsledok, kedy STIM1 bez SAM domény nebol schopný po aktivácii tvoriť zhluky [24]. Vyviazanie Ca²⁺ z EF-hand spôsobí konformačnú zmenu, ktorá sa preniesie na SAM doménu, čím sa dostanú na povrch hydrofóbne motívy. Nastáva najskôr dimerizácia cez EF-SAM domény, čím sa dostanú coiled-coil úseky blízko ku sebe a spôsobia oligomerizáciu STIM1.

Výsledky pokusov so STIM1 s deletovanou EF-hand doménou by možno priniesli viac svetla ohľadom toho, či je konformačný stav EF-hand domény s naviazaným Ca²⁺ postačujúci na zabránenie zhukovania STIM1 v stave naplnených vápnikových zásob, alebo k tomu prispieva aj konformačný stav SAM domény.

4.3 Úloha lyzín bohatej oblasti

Lyzín bohatá oblasť je krátky úsek aminokyselín na C-konci STIM1 so zvýšeným obsahom lyzínových zbytkov. Bolo navrhnuté, že táto oblasť by mohla tvoriť helix s dvomi otáčkami, ktorý je na dvoch stranách lemovaný lyzínovými zbytkami. Následne boli testované dve varianty STIM1, v ktorých boli pozmenené všetky lyzíny z tejto oblasti. A to buď za alanín, kedy mala byť helikána štruktúra narušená, alebo za kyselinu glutámovú, kedy sa predpokladalo, že by mala byť helikálna štruktúra zachovaná. Obidve varianty však mali negatívny účinok na transport NF-AT do jadra [13].

Varianty STIM1^{CT} a STIM1^{D76A}, spôsobujúce konštitutívny vtok extracelulárneho vápnika, s odstránenou lyzínovou oblasťou rovnako ako aj divoká forma STIM1 (STIM1^{WT}) bez tejto oblasti, spôsobili úplnú alebo čiastočnú stratu schopnosti translokovať NF-AT do jadra. STIM1^{D76A} bez lyzín bohatej oblasti však nezabraňoval zhlukovaniu STIM1^{WT} po vyčerpaní zásob pri ich spoločnej koexpresii. Z toho sa usudzuje, že lyzín bohatá oblasť sa nezúčastňuje laterálnej agregácie STIM1 v endoplazmatickom retikule, ale skôr interakcie so SOC kanálmi v plazmatickej membráne a ich aktivácie [13].

4.4 Úloha prolín bohatej oblasti

Ako už bolo uvedené, prolín bohatá oblasť sa vyznačuje tým, že okrem iného obsahuje aj niekoľko serínových a treonínových zbytkov, ktoré môžu byť potenciálne fosforylované napríklad proteín kinázou C alebo kazeín kinázou II [27]. Výsledky pokusov ukazujú, že v molekule STIM1 tvorí z fosforylovaných zbytkov serín 95 %, kým zvyšných 5 % pripadá na treonín. Tyrozínová fosforylácia je nedetekovateľná. Niektoré takto fosforylované zbytky vytvárajú potenciálne väzobné miesta pre adaptorové proteíny alebo iné proteíny, ktoré sú súčasťou signálnych dráh. Napríklad 14-3-3 proteíny obsahujúce SH3 (Src homology 3) doménu [14] alebo GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) adaptorový proteín [10]. Doteraz však žiadna takáto väzba či už na fosfotyrozín, alebo fosfoserín/treonín, nebola dokázaná [10]. Prítomnosť takejto interakcie by mala veľký dopad na komplexitu signalizácie vyčerpania vápnika či už možnosťou regulácie samotnej dráhy takýmto spôsobom, alebo vetvením ku iným signálnym dráham. Doteraz nebola publikovaná žiadna práca, zaoberajúca sa touto témou, a tak nevyriešená tiež ostáva aj otázka, čo spôsobuje zmenu fosforylačného stavu molekúl STIM. Aké kinázy sa toho zúčastňujú a aké okolité faktory indukujú fosforylovanie STIM1 molekuly.

Zaujímavé je, že fosforylácie v prolín bohatej oblasti tvoria asi 70 % z celkového počtu. Zvyšných 30 % sa nachádza v C-terminálnej oblasti coiled-coil respektíve ERM doméne [14]. Takéto fosforylované aminokyselinové zbytky by mohli ovplyvňovať konformáciu ERM alebo aj celej C-terminálnej časti, a tým aj laterálnu agregáciu STIM1 alebo interakciu so SOC kanálmi.

5 Interakčný partneri STIM1

5.1 *STIM2* negatívne reguluje *STIM1*

STIM2 je druhý člen dvojčlenej rodiny STIM a zdieľa so STIM1 značnú časť svojej sekvencie. Rovnako ako STIM1 aj STIM2 sa nachádza v membráne endoplazmatického retikula, no naopak nie je prítomný v plazmatickej membráne. Táto skutočnosť je vysvetľovaná prítomnosťou sekvencie (KKSK), udržiavajúcou STIM2 v endoplazmatickom retikule, ktorá u STIM1 chýba. Jeho neprítomnosť v plazmatickej membráne sa nemení ani po vyprázdnení vápnikových zásob, čo nasvedčuje jeho konštitutívnej prítomnosti v endoplazmatickom retikule [21].

Už pomerne skoro sa prišlo na to, že STIM1 koprecipituje so STIM2 a naopak [12;21]. To nasvedčuje, že tieto dva príbuzné proteíny sú schopné v podmienkach *in vivo* tvoriť heterooligoméne komplexy. Význam tejto interakcie bol však poodokrytý až po prvých funkčných štúdiách proteínu STIM2. Pokusy o umlčanie expresie STIM2 dopadli rozporuplne, keď jeden tím zistil, že po umlčaní STIM2 nastala supresia SOCE [9]. Naopak, iný hlásili žiadnu zmenu v SOCE, a teda že STIM2 sa v jeho aktivácii nezúčastňuje [8;21;31]. Pri jeho nadprodukcii v bunke však dochádza k inhibícii I_{CRAC} , pričom jeho distribúcia v endoplazmatickom retikule ostáva stále rozptýlená. Dodatočné zvýšenie produkcie STIM1 spôsobí, že po vyčerpaní vápnikových zásob STIM1 a STIM2 kolokalizujú v spoločných zhlukoch, ale SOCE ostáva aj naďalej suprimovaný. STIM2 dokonca ruší účinok konštitutívne aktívnej formy STIM1^{D87A-E87A} a rovnako ako so STIM1^{WT} s ním kolokalizuje v zhlukoch blízko plazmatickej membrány. Ešte väčšia nadprodukcía STIM1 spôsobí obnovenie SOCE. Z týchto výsledkov teda vyplýva, že STIM2 negatívne reguluje SOCE svojou interakciou so STIM1 a že toto negatívne pôsobenie je závislé na momentálnom pomere oboch molekúl v bunke. A tiež, že STIM2 vytvára zhluky, iba keď môže interagovať so STIM1 a inak je jeho účinok na množstve vápnika nezávislý. Toto potvrdzuje pokus, kedy bola mutovaná EF-hand doména STIM2 na dvoch kritických aminokyselinových zbytkoch, ale ani tieto mutácie nemali vplyv na inhibíciu SOCE [21].

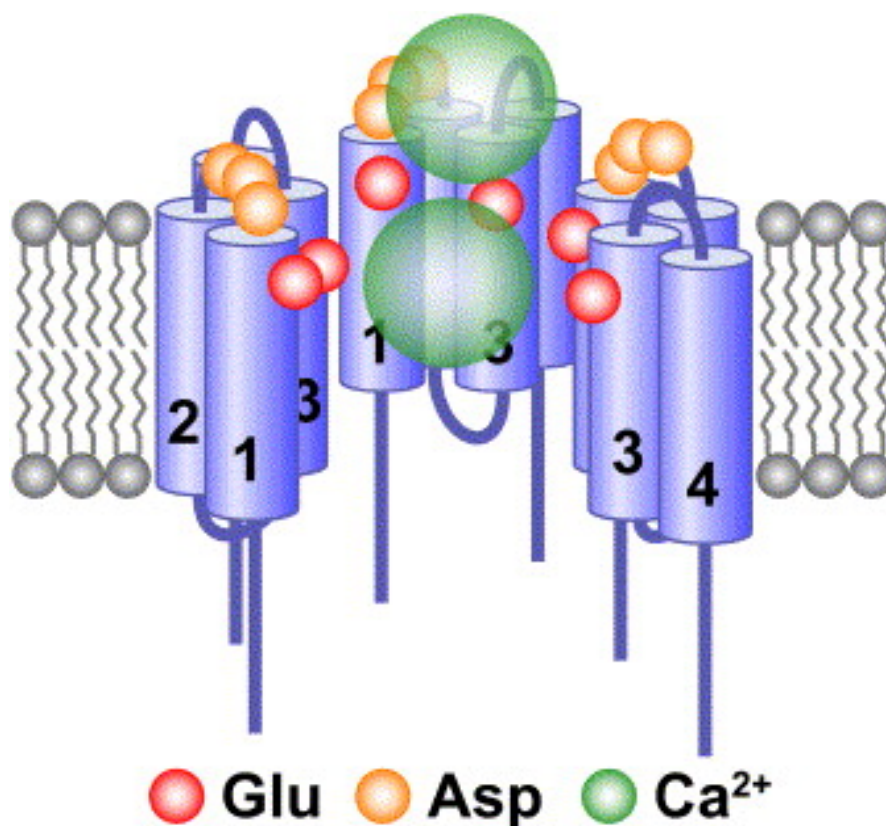
Ďalšie protichodné závery vyplynuli z pokusov koexprimovať STIM2 s Orai1, ktorý je pokladaný za potenciálnu podjednotku CRAC kanálu. V jednom prípade došlo ku supresii SOCE [25], no v druhom prípade paradoxne ku zvýšenému konštitutívnemu vstupu vápnika [32]. Vysvetľuje sa to tým, že prílišná nadprodukcia STIM2 vedie k jeho samovoľnému zhlukovaniu nezávisle na luminálnej hladine vápnika, čím sa mimikuje úloha STIM1 a dochádza tak k aktivácii SOCE [32]. Alternatívne podľa môjho názoru môže byť takáto rôznorodosť vo výsledkoch spôsobená odlišným fosforylačným stavom STIM2, kedy pravdepodobne dochádza k regulácii interakcií s jeho väzobnými partnermi (napríklad STIM1) fosforyláciou a tým aj regulácii SOCE.

To ako spolu STIM1 a STIM2 interagujú nie je zatiaľ známe, no predpokladá sa účasť coiled-coil domény. Na zistenie, ktoré časti molekuly sú dôležité pre interakciu STIM1 a STIM2 medzi sebou alebo medzi STIM2 a CRAC kanálmi a či vôbec medzi sebou interagujú, je potrebný ešte dodatočný výskum, zahŕňajúci napríklad aj mutácie či delécie v STIM2 molekule a analýzu pomocou metódy FRET.

5.2 STIM1, Orai1 a aktivácia I_{CRAC}

Ako už bolo spomenuté, Orai1 bol objavený na základe toho, že umlčanie jeho expresie viedlo k strate SOCE. Už v tom čase sa začalo uvažovať o tom, že Orai1 by mohol byť regulátor CRAC kanálov alebo dokonca samotnou podjednotkou CRAC kanálu [15;16]. Prvé potvrdenie hypotézy, že Orai1 je podjednotka CRAC kanálu, vyplynulo z pokusov s nadprodukciou Orai1 a STIM1. Zvýšenie produkcie STIM1 nevedlo k žiadnej zmene alebo len k miernemu nárastu v SOCE [18;20;21;25;27;32;33] a podobne u nadprodukcie Orai1 došlo k miernemu zvýšeniu alebo sa stav nezmenil [16;18;33]. No paradoxne vo väčšine prípadov bol dokonca zaznamenaný značný pokles v SOCE [17;25;32;33]. O najväčšie prekvapenie sa postarala koexpresia STIM1 a Orai1, kedy došlo k masívnemu až stonásobnému nárastu SOCE spojeného s niekoľkonásobným zväčšením hustoty prúdu a cytosolickej koncentrácie Ca^{2+} po jeho aktivácii [18;25;32;33]. To znamená, že aj keď sú STIM1 a Orai1 nevyhnutné pre SOCE, sami o sebe nie sú postačujúce na jeho spustenie. Ich kombinácia vo vhodnom pomere je však dostatočná na spustenie I_{CRAC} . Nárast SOCE po nadprodukcii samotného STIM1 alebo Orai1 tak mohol byť spôsobený prirodzenou prítomnosťou druhého partnera v nadbytku [33]. Najjednoduchšie vysvetlenie je, že kým STIM1 funguje ako senzor vápnika, Orai1 je kanál nachádzajúci sa v plazmatickej membráne a je otváraný kontaktom so STIM1.

Orai1 však neobsahuje žiadne doteraz známe kanálové sekvencie [34], a preto bolo potrebné zistiť, ktoré časti molekuly by sa mohli na tvorbe kanálového póru zúčastňovať. Analýzou sekvencií sa zistila prítomnosť dvoch konzervovaných glutamátových zbytkov E106 a E190 v ľudskej variante Orai1, nachádzajúcich sa v jeho prvom a treťom transmembránovom úseku. Kým jednoaminokyselinové zámény E190A, E190D nemali vplyv na SOCE, mutácie E106A, E106Q spôsobili úplnú inhibíciu SOCE. Najzaujímavejší prejav však mali varianty E106D a E190Q, ktoré síce čiastočne inhibovali vstup vápnika, no po detailnejšej analýze sa ukázalo, že spôsobili zníženie selektivity CRAC kanálov pre Ca^{2+} ióny [17;35-37]. Podobný účinok mali aj mutácie dvoch konzervovaných aspartátov D110 a D112 v extracelulárnej slučke medzi prvým a druhým transmembránovým úsekom. Bola teda vyslovená domnienka, že transmembránové úseky jedna a tri sa podieľajú na tvorbe steny póru a vyššie uvedené glutamátové a aspartátové zbytky sa podieľajú na tvorbe selektívneho hrdla kanálu a viažu dva ióny vápnika, podobne ako je tomu u napäťovo ovládaných vápnikových kanálov. Viazané vápnikové ióny majú slúžiť na blokovanie prechodu jednomocných katiónov cez pór. Pozmenenie týchto kritických aminokyselín zjavne narušilo väzbu vápnika a zvýšila sa tak priepustnosť pre sodíkové a céziové ióny [36].



Obrázok 4. Schématické znázornenie zostavenia Orai1 (CRAC) kanálu: Znázornené sú tri molekuly Orai1 (modrá). Molekula v popredí bola odstránená kôli lepšiemu znázorneniu

vnútra póru. Červené krúžky znázorňujú zbytky kyseliny glutámovej E106 a E190, ktoré sa ku sebe dostali vďaka usporiadaniu transmembránových častí do tvaru N. Spolu tvoria prstenec záporných nábojov vo vnútri póru, ktorý umožňuje väzbu Ca^{2+} iónu. Oranžové krúžky znázorňujú zbytky kyseliny asparágovej medzi prvým a druhým transmembránovým úsekom, ktoré tvoria druhé vazobné miesto pre Ca^{2+} .

(Vig, M. et al. (2006))

Pre funkciu kanála je dôležitá multimerizácia podjednotiek, ktoré spoločne vytvoria pór pre ióny. Koimunoprecipitácia ukázala, že Orai1 dokáže interagovať so sebou, a tak isto aj so svojimi dvoma homológmi Orai2 a Orai3. Orai1 je tak potenciálne schopný tvoriť homo aj heterooligoméry, ktoré by mohli byť dlho hľadaným CRAC kanálom [17;36].

Fluorescenčné značenie molekúl odhalilo, že po vyprázdnení zásob vápnika sa Orai1 v plazmatickej membráne zhlukuje a tieto zhluky presne kolokalizujú so zhlukmi tvorenými STIM1 v endoplazmatickom retikule. Pri expresii Orai1 bez STIM1 sa takéto zhluky po vyčerpaní vápnika netvoria, čo naznačuje, že zhukovanie Orai1 je podmienené predchádzajúcou agregáciou STIM1 [17;22]. To, že by STIM1 mohol v takýchto spoločných zhlukoch priamou interakciou s Orai1 aktivovať SOCE, naznačujú pokusy, v ktorých STIM1 a Orai1 spolu koprecipitujú a schopnosť koprecipitovať je dokonca zvýšená po vyprázdnení vápnikových zásob [36;37]. Treba však ja pripomenúť, že takáto interakcia nebola vždy potvrdená [17]. Bližšia analýza tejto interakcie ukázala, že by sa jej mohla zúčastňovať N-terminálna časť Orai1, ktorá na rozdiel od Orai2 a Orai3 obsahuje päť pozitívne nabitých arginínov, dve prolín bohaté oblasti a krátku coiled-coil sekvenciu. V štúdiu bol použitý Orai2, ktorého N-terminálna oblasť spolu s prvými dvomi transmembránovými úsekmi boli nahradené rovnakým úsekom z Orai1. Takáto chiméra na rozdiel od chiméry Orai1 s nahradeným rovnakým úsekom z Orai2 a divokej formy Orai2 zvyšovala SOCE a koprecipitovala so STIM1. Chiméra Orai2 s nahradeným samotným N-terminálnym úsekom Orai1 rovnako zväčšovala SOCE, no je až zarážajúce, prečo sa výskumný tím nepokusil aj o koprecipitáciu tejto formy pomocou STIM1, keď takýto výsledok by pomohol potvrdiť, že N-terminálny úsek Orai1 je naozaj zodpovedný za interakciu so STIM1 [38]. Otázkou však stále ostáva, ktorá časť tohto úseku Orai1 sa zúčastňuje interakcie. Na vyriešenie tohto problému bude pravdepodobne treba použiť delécie celých domén, podobne ako tomu bolo aj v prípade STIM1. Za kandidátnu doménu STIM1 dôležitú pre interakciu bola navrhnutá ERM doména, ktorá by mohla viazať pozitívne nabitú aminokyselinovú zbytku v tomto úseku [38]. Z predchádzajúcich štúdií (viď. kapitola 4.3) tiež vyplýva účasť lyzín bohatej oblasti. Keďže

sa táto oblasť nachádza v STIM1 a STIM2 stavovcov ale nie na dSTIM, jedná sa pravdepodobne o evolučnú novinku, ktorá nie je v celej živočíšnej ríši konzervovaná a je skôr zodpovedná za rozdiely v I_{SOC} u *D. melanogaster* a vyššími živočíchmi [13].

Výsledky týkajúce sa Orai2 a Orai3 sú do značnej miery rozporuplné. Umlčanie ich expresie nemalo žiadny vplyv na SOCE [17] ale v jednom prípade spôsobilo umlčanie Orai3 redukciu SOCE [38]. Pri koexpresii STIM1 s Orai2 alebo Orai3 jedna štúdia uvádza nárast SOCE v poradí Orai1>Orai2>Orai3 [25], no iná hovorí, že takéto koexpresie majú len minimálny vplyv na SOCE [38]. V pokuse o rekonštitúciu SOCE v bunkách s mutovaným variantom Orai1 z pacientov trpiacich na SCID vyšla úspešne jedine koexpresia STIM1 a Orai3. Koexpresia STIM1 a Orai2 ani expresia samotných Orai2 a Orai3 nevykázala žiadny efekt [17]. Dôvod takéhoto nesúladu výsledkov je ťažko vysvetliteľný a na zistenie presnej úlohy Orai2 a Orai3 bude potrebný ešte ďalší výskum.

5.3 STIM1 a TRPC

Pomerne veľký rozruch vyvolali správy o zistení interakcie STIM1 s proteínmi rodiny TRPC [13;19], ktoré už dlhší čas ležali mimo hlavný prúd výskumu. Koimunoprecipitácia ukázala, že STIM1 môže potenciálne interagovať s TRPC1, 2, 4, 5 ale nie s TRPC3, 6, 7 a že pre túto interakciu je dôležitá C-terminálna časť STIM1, konkrétne ERM doména [13]. Bol však zaznamenaný rozpor či vyprázdnenie zásob túto interakciu medzi STIM1 a TRPC1 zväčšuje [19;39], alebo naň nemá vplyv [13]. Bola tiež zistená interakcia medzi Orai1 a TRPC1 [39] a tiež Orai1, 2, 3 a TRPC 3, 6 [40]. Interakcia Orai1 s TRPC1 bola navyše zosilnená po vyprázdnení vápnikových zásob [39]. Kým väzba Orai1 sa viaže na N aj C-koniec s preferenciou k C-koncu TRPC proteínov [40], STIM1 sa viaže na N-koniec TRPC1 [39].

Fluorescenčná detekcia odhalila zvýšenú kolokalizáciu zhlukov STIM1 v endoplazmatickom retikule s Orai1 a TRPC1 v plazmatickej membráne po poklese intraluminálneho vápnika. Umlčanie expresie hociktorého z týchto proteínov viedla k zastaveniu I_{SOC} , čo dokazuje dôležitosť každej z týchto troch komponent pre funkčnosť SOCE. Podobne ako v predchádzajúcich štúdiách, STIM1^{CT} a STIM1^{D76A} spôsobili konštitutívne aktívny SOCE. Rovnako, zvýšená expresia Orai1 alebo STIM1 nespôsobila žiadnu zmenu, kým expresia TRPC1 mala za následok zvýšenie SOCE. Zaujímavé výsledky priniesol tiež pokus exprimovať TRPC1 v RBL (rat basophilic leukemia) bunkách, ktoré vykazujú typický I_{CRAC} a len veľmi malú produkciu TRPC1. Expresia TRPC1 a jeho

mutovaných foriém viedla k zmene niektorých vlastností I_{CRAC} smerom ku I_{SOC} a dokonca niektoré mutanty spôsobili aj jeho čiastočnú supresiu. Umlčanie TRPC1 v RBL bunkách nemalo na I_{CRAC} žiaden vplyv, z čoho plynie, že TRPC1 sa nezúčastňuje tvorby I_{CRAC} , ale má potenciál interagovať so STIM1 a Orai1 a tým tento prúd modifikovať. Výsledky tiež ukazujú, že CRAC kanály a iné SOC kanály môžu mať spoločné komponenty (STIM1 a Orai1) a byť regulované podobným mechanizmom [39].

Pozoruhodné výsledky poskytla nadprodukcia TRPC3 a TRPC6 v HEK-293 (human embryonic kidney) bunkách, ktoré exprimujú TRPC3 a TRPC6 prirodzene iba minimálne. Takáto nadprodukcia viedla v oboch prípadoch ku vzniku samovoľného neselektívneho kationového prúdu, ktorý nie je prítomný v HEK bunkách bez TRPC3 a TRPC6. Expresia Orai1 v takýchto bunkách nielen že potlačila takýto prúd za podmienok vyčerpania vápnikových zásob, ale dokonca aj udelila schopnosť odpovedať na vyčerpanie vápnika spustením SOCE [40].

Boli predstavené štyri možnosti spolupôsobenia Orai1 a TRPC. Prvá možnosť je, že Orai1 a TRPC tvoria samostatné kanály v spoločných zhlukoch. Táto možnosť sa však zdá byť nepravdepodobná, pretože umlčanie TRPC1 nevedlo k žiadnemu zbytkovému I_{CRAC} v dôsledku reziduálnej prítomnosti Orai1. Druhá možnosť je, že STIM1 a TRPC tvoria jeden spoločný kanál, no nie je však jasné, ako by mohol byť tvorený štvortransmembránovými a šesťtransmembránovými podjednotkami zároveň. Ďalej je tu možnosť, že Orai1 tvorí pór, kým TRPC tvoria jeho regulačné podjednotky. Túto variantu by podporovali predchádzajúce výsledky ukazujúce vplyv mutácií v Orai1 na charakter I_{CRAC} . Posledná možnosť je, že pór je tvorený TRPC a Orai1 je ich regulačnou podjednotkou. Tento variant sa zdá byť pravdepodobnejší v prípade výsledkov koexpresie Orai1 a TRPC3 a TRPC6 [41].

TRPC svojou schopnosťou interagovať medzi sebou majú potenciál vytvárať rôzne homo a heterooligoméry. Z rôznych kombinácií však boli najčastejšie zaznamenané interakcie v rámci dvoch skupín, TRPC1/TRPC4/TRPC5 a TRPC3/TRPC6/TRPC7 ale boli pozorované aj zmiešané interakcie. Toto rozdelenie kopíruje aj schopnosť TRPC interagovať so STIM1, kedy TRPC1, 2, 4, 5 so STIM1 interagujú, kým TRPC3, 6, 7 nie. Je teda možné, že TRPC3, 6 a 7 tvoria za normálnych okolností rôzne kationové kanály no ich interakcia s Orai1 alebo prípadne s niektorým TRPC z druhej skupiny (napr. TRPC1), ktoré sú schopné interagovať so sensorom vápnika STIM1, mení tak ich kanálové vlastnosti a udeľuje im schopnosť odpovedať na vyčerpanie vápnikových zásob aktiváciou SOCE a I_{SOC} [41]. Podľa mňa je tu teda možnosť, že Orai1 funguje v niektorých bunkách ako CRAC kanál, no v iných spojením

s napríklad TRPC3 a 6 funguje ako regulačná podjednotka SOC kanálu alebo ako podjednotka zmiešaného TRPC-Orai SOC kanálu, ktorá mu dodáva selektivitu pre Ca^{2+} a schopnosť odpovedať na pokles vápnikových zásob. Naskytá sa však tiež možnosť, že Orai1 je regulačnou podjednotkou aj v SOC aj v CRAC kanáloch ale jeho interakčný partner, ktorý tvorí pór CRAC kanálu nebol ešte objavený. V takom prípade by však musel byť v bunke vo veľmi veľkom nadbytku, pretože spoločná nadprodukcia Orai1 a STIM1 viedla až ku stonásobnému nárastu I_{CRAC} a jeho množstvo by bolo v opačnom prípade limitujúce pre takéto spustenie SOCE.

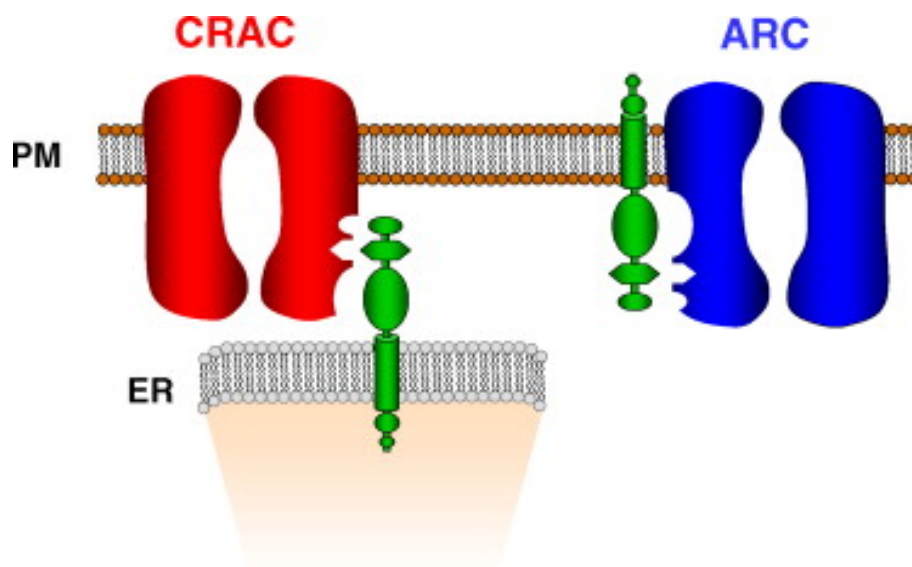
5.4 STIM1 a ARC kanály

ARC (arachidonate-regulated calcium) kanály alebo inak kanály ovládané arachidonovou kyselinou sú rovnako ako CRAC vysoko selektívne kanály pre vápnik nachádzajúce sa v plazmatickej membráne. Ako však ich názov napovedá, nie sú otvárané vplyvom vyprázdnenia vápnikových zásob ale vplyvom kyseliny arachidonovej z intracelulárnej strany membrány. Aj keď je mechanizmus aktivácie ARC od CRAC a SOC kanálov odlišný, nedávna vedecká práca poukázala na nový spoločný prvok. Týmto spoločným prvkom je práve molekula STIM1 [28].

Bolo zistené, že umlčanie produkcie STIM1 vedie k supresii prúdov prechádzajúcich cez ARC aj CRAC kanály, zatiaľ čo jeho nadprodukcia viedla naopak k zosilneniu oboch prúdov. Z toho jasne vyplýva, že STIM1 je nevyhnutný pre funkciu oboch kanálov. ARC kanály sú však nezávislé na hladine vápnika v endoplazmatickom retikule, čo bolo potvrdené použitím formy STIM1 mutovanej v EF-hand doméne, ktorá vytvárala konštitutívny I_{CRAC} , ale na aktivitu ARC kanálov nemala vplyv. Na ARC nemá teda vplyv STIM1 nachádzajúci sa v endoplazmatickom retikule, ale práve STIM1 v plazmatickej membráne, ktorého úloha bola doteraz neznáma. To bolo preukázané pomocou mutácií STIM1, ktoré zabraňovali jeho glykozylácii. Glykozylácia STIM1 bola už dávnejšie zistená ako kritická pre jeho povrchovú expresiu (vid'. kapitola 2.1). Nepodarilo sa síce overiť, že expresiou takto upraveného STIM1 bolo naozaj zabránené jeho transportu do plazmatickej membrány, no bol však zaznamenaný významný pokles aktivity ARC kanálov bez zmeny funkčnosti CRAC kanálov. Podobné výsledky boli dosiahnuté extracelulárnym použitím protilátky špecifickej proti N-terminálnej časti STIM1 [28].

Týmto závažným zistením povstali mnohé otázky týkajúce sa mechanizmu aktivácie ARC kanálov a úlohy STIM1 v tomto procese. Logicky sú možné dve varianty. Buď sa kyselina

arachidonová najskôr viaže na STIM1 a tento komplex následne aktivuje ARC kanál, alebo sa oba viažu na ARC kanál nezávisle a prispievajú k jeho aktivácii. Ďalším nejasným bodom je spôsob akým je zabezpečovaná špecificita interakcií. Prečo STIM1 v endoplazmatickom retikule po vyprázdnení vápnikových zásob špecificky aktivuje iba CRAC kanály, ale ARC kanály už nie, a prečo STIM1 v plazmatickej membráne dokáže aktivovať ARC kanály, ale nemá žiaden vplyv na CRAC? Jedným z možných vysvetlení je vplyv orientácie STIM1 na jeho interakciu s týmito dvomi typmi kanálov. STIM1 nachádzajúci sa v plazmatickej membráne a v endoplazmatickom retikule sú voči sebe otočené o 180° a teda aj potenciálne interakčné domény majú vymenené poradie, čo by mohlo spôsobovať neschopnosť viazať sa do miesta určeného pre opačnú orientáciu molekuly STIM1 [42]. Je tiež možné, že kým CRAC kanály interagujú s C-terminálnou časťou STIM1, ktorá je v cytosole, ARC kanály interagujú s extracelulárnou časťou STIM1 molekuly. Jedná sa teda o akúsi kompartmentalizáciu aktivačného signálu.



Obrázok 5. Schéma ilustrujúca hypotézu aktivácie dvoch rôznych kanálov v závislosti na orientácii STIM1: STIM1 (zelená) v plazmatickej membráne a endoplazmatickom retikule majú voči sebe presne opačnú orientáciu, vďaka čomu je pravdepodobne zabezpečená špecificita interakcie s CRAC (červená) a ARC (modrá) kanálmi.

(Shuttleworth, T.J. et al. (2007))

Je potrebné si však uvedomiť, že molekulárna identita ARC kanálu nebola doteraz určená, a tak nie je možné podrobiť ho kolokalizačnej štúdii so STIM1 a rovnako nie je možné zistiť, v ktorej jeho oblasti sa nachádzajú potenciálne miesta pre interakciu so STIM1. Odstraňovaním úsekov STIM1 však je možné zistiť, ktoré časti sú dôležité pre aktiváciu ARC

kanálov. Vyskytla sa dokonca aj domnienka, že vzhľadom na veľmi podobné fyziologické vlastnosti CRAC a ARC kanálov, by mohli tieto kanály zdieľať časť svojich molekulárnych komponentov, konkrétne členov rodiny Orai [42]. Zo súčasných poznatkov tiež nie je jasné, aký je fyziologický význam STIM1 vo vzťahu ku ARC. Isté je len, že je dôležitý pre funkčnosť kanálov, no nie je jasné, či hrá úlohu senzora kyseliny arachidonovej alebo regulátora kanálu.

Aj napriek veľkému množstvu nevyjasnených okolností predstavuje tento objav významný krok vpred. Ukazuje, že STIM1 má univerzálnejšiu úlohu vo vápnikovej signalizácii, než sa doteraz myslelo. Nezastáva tak len funkciu senzora a aktivátora SOC a CRAC kanálov, ale je aj aktivátorom na vápnikovej zásobe nezávislých kanálov ARC. Vystávajú teda špekulácie, že STIM1 by mohol hrať úlohu v aktivácii aj ďalších typov vápnikových kanálov.

6 Prehľad mechanizmu signalizácie

Ako teda celá signalizačná dráha pravdepodobne funguje v celku? V kľudovej nestimulovanej bunke je trvale nízka hladina cytosolického vápnika a vysoká hladina vápnika v endoplazmatickom retikule. Vápnik je viazaný v EF-hand doméne STIM1, čím je zabránené jeho oligomerizácii, a preto je homogénne distribuovaný v membráne endoplazmatického retikula. Po aktivácii niektorého z receptorov spriahnutých s aktiváciou PLC, je generovaný IP_3 , ktorý väzbou na IP_3R uvoľní nahromadený vápnik v endoplazmatickom retikule do cytosolu. Jeho zvýšená koncentrácia v cytosole je zaznamenaná SERCA a ATPázami v plazmatickej membráne, ktoré ho okamžite začnú transportovať späť do endoplazmatického retikula a von z bunky. V tej dobe však už dôjde k rapídному poklesu koncentrácie vápnika v periférnych častiach endoplazmatického retikula [43], čo spôsobí vyviazanie vápnika z EF-hand domény STIM1. To má za následok konformačnú zmenu jeho N-terminálnej časti obsahujúcej aj SAM doménu. Zvýšenie povrchovej hydrofobicity tejto časti v dôsledku konformačnej zmeny spôsobí iniciáciu oligomerizácie a za účasti coiled-coil domény začne STIM1 vytvárať zhluky v oblastiach endoplazmatického retikula, ktoré sú tesne pod plazmatickou membránou. Do týchto zhlukov putuje aj STIM2, ktorý celú signalizáciu zatiaľ neznámym spôsobom negatívne reguluje. Zhlukovanie STIM1 podnieti agregáciu Orai1 a podľa najnovších údajov aj TRPC1, ktoré vytvárajú podobné zhluky v plazmatickej membráne presne nad zhlukmi STIM1 v endoplazmatickom retikule. STIM1 práve v týchto miestach s najväčšou pravdepodobnosťou priamou interakciou s Orai1 a TRPC1, ktoré sú podjednotkami vápnikových kanálov, aktivuje tieto kanály a umožní tak vstup

extracelulárneho vápnika do bunky. Vstup vápnika je tak úzko lokalizovaný iba do tých miest plazmatickej membrány, kde sa nachádzajú zhluky Orai1 [29], TRPC1 a pod nimi STIM1. Vápnik, ktorý sa v týchto miestach dostáva do cytosolu je okamžite transportovaný do endoplazmatického retikula SERCA pumpami, takže jeho koncentrácia v cytosole sa zmení iba minimálne. K detekovateľnému nárastu hladiny intracelulárneho vápnika dochádza iba pri masovom otvorení SOC kanálov, kedy SERCA nestíhajú vápnik odstraňovať alebo pri ich inhibícii thapsigarginom [4]. Je tiež možné, že časť STIM1 molekúl putuje z retikula do plazmatickej membrány, no aj keď je táto záležitosť stále nevyriešená, je pravdepodobné, že jeho úloha v plazmatickej membráne nie je aktivovať vstup vápnika vplyvom vyčerpania endoplazmatických zásob. Recentné práce ukazujú, že jeho úloha v plazmatickej membráne by mohla spočívať v regulácii ARC vápnikových kanálov, ktoré sú nezávislé na množstve vápnika v endoplazmatickom retikule. Po doplnení vápnikových zásob, je vápnik opäť viazaný do EF-hand domény, ktorá zjavne zmenou konformácie spôsobí rozpad STIM1 oligomérov a tým aj zastavenie vápnikového prúdu.

STIM1 teda plní funkciu vápnikového senzoru, prenášača signálu z endoplazmatického retikula na plazmatickú membránu, aktivátora SOC a CRAC kanálov a tiež regulátora ARC kanálov.

7 Záver

Od objavenia úlohy STIM1 v regulácii intracelulárnych vápnikových zásob bolo vďaka intenzívnemu výskumu získané množstvo poznatkov, odkrývajúcich mechanizmus fungovania tejto signalizácie. Aj keď je hrubý náčrt dráhy hotový, stále ostáva zodpovedať mnohé nejasnosti.

Je tu jednak stále nevyriešená otázka transportu STIM1 z endoplazmatického retikula a jeho inkorporácia do plazmatickej membrány po vyčerpaní zásob. Je možné, že takýto mechanizmus prebieha iba v určitých bunkách a za špecifických podmienok, kým v iných nie je prítomný, čo mohlo spôsobiť spomínané rozporuplné výsledky. Viac svetla by mohol priniesť plošný skrining viacerých typov buniek použitím rôznych detekčných metód povrchových molekúl, či už biotínlačnej eseje alebo použitie histidínovej značky na N-konci, ktorá neinterferuje s transportom STIM1 na povrch bunky alebo funkčné štúdie s použitím STIM1 s vnesenou sekvenciou pre lokalizáciu v endoplazmatickom retikule (KKXX). Nie je tiež jasné, ako je udržiavaný pomer STIM1 v plazmatickej membráne a v membráne endoplazmatického retikula. A tiež, ako je STIM1 v prípade jeho inkorporácie do

plazmatickej membrány z nej spätne odstraňovaný a aké bunkové mechanizmy sa toho zúčastňujú.

Pomerne nediskutovanou vecou je aj reálna interakcia STIM1 so STIM2, Orai a TRPC1. Ich interakcia bola dokázaná v koprecipitačných pokusoch. To ale neznamená, že takáto interakcia sa naozaj vyskytuje aj v podmienkach *in vivo*. Je teda tiež možné, že kontakt medzi STIM1 v endoplazmatickom retikule a kanálmi v plazmatickej membráne nie je priamy, ale je napríklad sprostredkovaný inými zatiaľ neznámymi adaptorovými proteínmi [44]. Pomôcť by mohlo použitie FRET, za využitia rôzne fluorescenčne označených STIM1 a Orai alebo TRPC. Je tiež možné, že v tejto interakcii, či už priamej alebo sprostredkovanej adaptorovými proteínmi, hrá významnú úlohu fosforylácia STIM1. No aj napriek tomu, že STIM molekuly sú preukázateľne fosforylované, doteraz žiadna práca nepodala vysvetlenie, ktoré kinázy alebo fosfatázy túto fosforyláciu regulujú. Nie je tiež jasné, či sa stav tejto fosforylácie v čase mení a aké signály vedú k tejto zmene.

Podľa mňa tiež nebol doteraz jasne vysvetlený spôsob aktivácie SOC a CRAC kanálov pomocou STIM1. Nie je totižto zrejmé, ktorý dej spôsobí aktiváciu kanálov. Je to konformačná zmena podjednotiek kanálu, vyvolaná kontaktom so STIM1 alebo je postačujúce priblíženie týchto podjednotiek ku sebe do zhlukov, pravdepodobne vďaka pôsobeniu STIM1? Nie je tiež jasné, čo udržuje zhluky STIM1 práve o takej veľkosti, počte a práve v miestach blízkeho kontaktu endoplazmatického retikula s plazmatickou membránou. Tento jav býva vysvetľovaný ako výsledok zachytenia zhlukujúcich sa STIM1 molekúl kanálmi v plazmatickej membráne. Na druhú stranu však treba povedať, že náhodné pohyby proteínov v bunke sú len veľmi zriedkavé a za ich pohyb sú zodpovedné dômyselné bunkové transportné mechanizmy. To, či sa transportu zhlukov a ich udržania na mieste zúčastňuje niektorý z týchto mechanizmov, je stále len vecou dohadov. Sú tu však isté náznaky úlohy aktínu v tomto procese. Zaujímavý by mohol byť tiež pohľad na dynamiku týchto zhlukov pomocou metódy FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching). STIM1 môže byť v jednom zhluku prítomný počas celého trvania signalizácie až do jeho rozpadu v dôsledku odznenia signálu. Môže však tvoriť aj akúsi dynamickú rovnováhu, kedy jednotlivé molekuly zo zhlukov odchádzajú a iné sa znovu pridávajú. Zhluky teda tvoria akési kryštalizačné centrum STIM1 molekúl.

STIM1 plní úlohu vápnikového senzoru a aktivátoru CRAC kanálov, no objavením jeho interakcie s TRPC proteínmi a úlohy v aktivácii ARC kanálov, padli jeho hranice promiskuity. Ukazuje sa, že STIM1 je aktivátorom nie len CRAC, ale aj iných SOC kanálov a

dokonca aktivátorom kanálov, ktoré nie sú ovládané stavom vápnikových zásob. Vystávajú tak špekulácie, či by sa nemohol zúčastňovať aktivácie iných vápnikových kanálov alebo regulácie iných vápnikových dejov. Ako bolo už povedané, rozmedzie koncentrácií extracelulárneho vápnika je v zásade porovnateľné s koncentráciou vápnika v endoplazmatickom retikule a keďže EF-hand doména STIM1 v plazmatickej membráne je orientovaná do extracelulárneho priestoru, nič teoreticky nebráni tomu, aby STIM1 dokázal vnímať pokles extracelulárnej koncentrácie vápnika. To, že táto myšlienka nie je úplne zavrnutiahodná, dokazuje objav CaSR (calcium sensing receptor). Ide o člena rodiny receptorov spojených s trimérnymi G-proteínmi, ktorý však dokáže vnímať extracelulárnu koncentráciu vápnika. Jeho prítomnosť bola potvrdená v bunkách štítnej žľazy, prištítnych teliesok, obličiek, astrocytov, osteoblastov, osteoklastov, monocytov a iných typoch buniek. Vďaka jeho objaveniu tak bolo zistené, že vápnik okrem svojej intracelulárnej role druhého posla môže plniť aj rolu extracelulárneho prvého posla respektíve hormónu. CaSR tak hrá úlohu v regulácii plazmatickej koncentrácie vápnika a odbúravaní a regenerácií kostnej hmoty [45]. Na mieste je teda otázka, či STIM1 nemôže v niektorých bunkách tiež zastávať funkciu senzoru extracelulárnej koncentrácie vápnika. V membráne astrocytov, ktoré svojimi masívnymi zásobami vápnika pravdepodobne pomáhajú udržiavať stále iónové prostredie v mozgu, by napríklad mohol po poklese vápnika v okolitom prostredí v dôsledku činnosti neurónov [46] agregovať do zhlukov, podobne ako je tomu v endoplazmatickom retikule. Následne by mohol modulovať aktivitu niektorého zo známych alebo dosiaľ neobjavených vápnikových kanálov. Podobne by mohol fungovať aj v osteoklastoch, ktoré odbúrávajú kostnú hmotu alebo aj v iných bunkách, pre ktoré je vnímanie extracelulárneho vápnika potenciálne dôležité, napríklad aj tkanivové formy leukocytov ako makrofágy alebo žírne bunky.

8 PodĎakovanie

Chcel by som poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Petrovi Dráberovi, DrSc. za pomoc pri výbere témy a záverečných korekciách mojej práce. Ďalej by som rád poďakoval svojim rodičom, blízkej rodine a Zuzke Varadínovej za morálnu podporu.

Zoznam skratiek

ARC	„Arachidonate-regulated calcium“
ATP	Adenozíntrifosfát
CaSR	„Calcium sensing receptor“
CCE	„Capacitative calcium entry“
CRAC	„Calcium release-activated calcium“
CIF	Calcium influx factor
DAG	Diacylglycerol
dOrai	Orai z <i>D. melanogaster</i>
dSTIM	STIM z <i>D. melanogaster</i>
ERM	Ezrin/radixin/moesin doména
FRAP	„Fluorescence recovery after photobleaching“
FRET	„Fluorescence resonance energy transfer“
GRB2	„Growth factor receptor-bound protein 2“
HEK	„Human embryonic kidney“
I _{CRAC}	„Calcium release-activated calcium“
I _{SOC}	„Store-operated calcium current“
IP ₃	Inozitol-1,4,5-trisfosfát
IP ₃ R	Inozitol-1,4,5-trisfosfátový receptor
iPLA ₂	Inducibilná forma fosfolipázy typu A ₂
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NF-AT	„Nuclear factor of activated T-cells“
NF-κB	„Nuclear factor kappa B“
PIP ₂	Fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfat
PLC	Fosfolipáza C
RBL	„Rat basophilic leukemia“
RNAi	RNA interferencia
ROC	„Receptor operated channel“
SAM	„Sterile alpha motif“ doména
SCID	Ťažká kombinovaná imunodeficiencia
SERCA	„Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase“
SH3	„Src homology 3“ doména

siRNA	Krátke interferujúce RNA
SOC	„Store-operated calcium“
SOCE	„Store-operated calcium entry“
STIM	„Stromal interaction molecule“
STIM1 ^{CT}	„C-terminálna časť STIM1“
STIM1 ^{WT}	„Divoká forma STIM1“
TRP	„Transient receptor potential“
TRPC	„Canonical transient receptor potential“

Zoznam použitej literatúry

1. Parekh AB, Putney JW. Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews* 2005; **85**: 757-810.
2. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell Biology* 2002; **4**: E263-E272.
3. Bolotina VM, Csutora P. CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 2005; **30**: 378-387.
4. Jousset H, Frieden M, Demaurex N. STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca²⁺ channels located close to SERCA pumps silently refill the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2007.
5. Putney JW. The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends in Cell Biology* 2004; **14**: 282-286.
6. Oritani K, Kincade PW. Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol* 1996; **134**: 771-782.
7. Parker NJ, Begley CG, Smith PJ, Fox RM. Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics* 1996; **37**: 253-256.

8. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *Journal of Cell Biology* 2005; **169**: 435-445.
9. Liou J, Kim ML, Heo WD et al. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Current Biology* 2005; **15**: 1235-1241.
10. Manji SSM, Parker NJ, Williams RT et al. STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 2000; **1481**: 147-155.
11. Williams RT, Senior PV, Van Stekelenburg L, Layton JE, Smith PJ, Dziadek MA. Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1596**: 131-137.
12. Williams RT, Manji SSM, Parker NJ et al. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochemical Journal* 2001; **357**: 673-685.
13. Huang GN, Zeng W, Kim JY et al. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I_{crac} and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 1003-1010.
14. Dziadek MA, Johnstone LS. Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium* 2007.
15. Feske S, Gwack Y, Prakriya M et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; **441**: 179-185.
16. Vig M, Peinelt C, Beck A et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* 2006; **312**: 1220-1223.
17. Gwack Y, Srikanth S, Feske S et al. Biochemical and functional characterization of Orai family proteins. *J Biol Chem* 2007.
18. Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XHF et al. Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel

activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; **103**: 9357-9362.

19. Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *J Biol Chem* 2006; **281**: 28254-28264.
20. Zhang SYL, Yu Y, Roos J et al. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 2005; **437**: 902-905.
21. Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T et al. STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca^{2+} Entry. *Curr Biol* 2006; **16**: 1465-1470.
22. Xu PY, Lu JZ, Li ZZ, Yu XQ, Chen LY, Xu T. Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; **350**: 969-976.
23. Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS. Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 2006; **174**: 803-813.
24. Baba Y, Hayashi K, Fujii Y et al. Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 16704-16709.
25. Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT et al. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* 2006; **281**: 24979-24990.
26. Hauser CT, Tsien RY. A hexahistidine-Zn²⁺-dye label reveals STIM1 surface exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 3693-3697.
27. Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, Gill DL. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 4040-4045.

28. Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ. STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels without store-depletion or translocation to the plasma membrane. *J Physiol* 2006.
29. Luik RM, Wu MM, Buchanan J, Lewis RS. The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* 2006; **174**: 815-825.
30. Stathopoulos PB, Li GY, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M. Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* 2006; **281**: 35855-35862.
31. Peel SE, Liu B, Hall IP. A key role for STIM1 in store operated calcium channel activation in airway smooth muscle. *Respir Res* 2006; **7**: 119.
32. Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006; **281**: 20661-20665.
33. Peinelt C, Vig M, Koomoa DL et al. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nature Cell Biology* 2006; **8**: 771-U231.
34. Parekh AB. A CRAC current tango. *Nature Cell Biology* 2006; **8**: 655-656.
35. Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 2006; **443**: 230-233.
36. Vig M, Beck A, Billingsley JM et al. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 2006; **16**: 2073-2079.
37. Yeromin AV, Zhang SYL, Jiang WH, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 2006; **443**: 226-229.
38. Takahashi Y, Murakami M, Watanabe H et al. Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem Biophys Res Commun* 2007.

39. Ong HL, Cheng KT, Liu X et al. Dynamic assembly of TRPC1/STIM1/Orai1 ternary complex is involved in store operated calcium influx: Evidence for similarities in SOC and CRAC channel components. *J Biol Chem* 2007.
40. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 4682-4687.
41. Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay B, Cheng KT. TRPC1: The link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* 2007.
42. Shuttleworth TJ, Thompson JL, Mignen O. STIM1 and the noncapacitative ARC channels. *Cell Calcium* 2007.
43. Ong HL, Liu X, Tsaneva-Atanasova K et al. Relocalization of STIM1 for activation of store-operated Ca^{2+} entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum Ca^{2+} store. *J Biol Chem* 2007.
44. Draber P, Draberova L. Lifting the fog in store-operated Ca^{2+} entry. *Trends in Immunology* 2005; **26**: 621-624.
45. Brown EM. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *American Journal of Medicine* 1999; **106**: 238-253.
46. Lian XY, Stringer JL. Astrocytes contribute to regulation in the rat cerebral cortex of extracellular calcium and potassium during spreading depression. *Brain Research* 2004; **1012**: 177-184.