

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Toxicología y Farmacología



**REGULACIÓN MITOCONDRIAL DE LOS CANALES
CA²⁺ CRAC EN LINFOCITOS T**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Gema Beatriz Montalvo Mimbrero

Bajo la dirección de los doctores
Juan Antonio Gilabert Santos y Antonio Rodríguez Artalejo

Madrid, 2009

• ISBN: 978-84-692-1024-6

©Gema Beatriz Montalvo Mimbrero, 2008



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Departamento de Toxicología y Farmacología

Regulación mitocondrial de los canales de Ca^{2+} CRAC en linfocitos T

TESIS DOCTORAL

GEMA BEATRIZ MONTALVO MIMBRERO

Madrid, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Toxicología y Farmacología

**Regulación mitocondrial de los canales de Ca²⁺ CRAC
en linfocitos T**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por:
GEMA BEATRIZ MONTALVO MIMBRERO

Bajo la dirección de:
Prof. Dr. Juan Antonio Gilabert Santos
Prof. Dr. Antonio Rodríguez Artalejo

Madrid, 2008



*Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Dpto. de Toxicología y Farmacología*

D. JUAN ANTONIO GILABERT SANTOS, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

D. ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO, Catedrático de Universidad del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **Dña. Gema Beatriz Montalvo Mimblero**, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado **“Regulación mitocondrial de los canales de Ca²⁺ CRAC en linfocitos T”** para alcanzar el Grado de Doctor, el cual reúne los requisitos de originalidad y contenido exigidos, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Madrid, a 23 de Abril de 2008.

Fdo. Juan Antonio Gilabert Santos

Fdo. Antonio Rodriguez Artalejo

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

Integración de la mitocondria en la señal celular de Ca^{2+} y su papel modulador en células excitables y no excitables (BFI2002-01101). 2002-2005. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Investigador principal: Juan Antonio Gilabert Santos.

Papel de los microdominios de membrana (lipids rafts) en la regulación de la corriente capacitativa de Ca^{2+} I_{CRAC} en linfocitos T (GR/SAL/0522/2004). 2005. Comunidad Autónoma de Madrid. Investigador principal: Juan Antonio Gilabert Santos.

Análisis ultraestructural de la distribución mitocondrial y de su relevancia en el proceso de activación en linfocitos T (PR45/05-14162). 2006 Universidad Complutense de Madrid-Comunidad de Madrid. Investigador principal: Juan Antonio Gilabert Santos.

“El que la sigue la consigue”
Refranero popular español

AGRADECIMIENTOS

Las primeras palabras de esta tesis van dirigidas a expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de una manera u otra a su realización.

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Antonio Gilabert Santos, director de esta Tesis Doctoral, por la formación que me ha ofrecido, la confianza que puso en mi, su rigor científico y sentido crítico, además del trato amistoso que me ha brindado durante estos años.

Al Dr. Antonio Rodríguez Artalejo, también director de esta Tesis, por permitirme desarrollar este trabajo, así como por sus comentarios científicos y por compartir sus amplios conocimientos y experiencia.

Al Departamento de Toxicología y Farmacología por haberme permitido participar en las actividades docentes, impartiendo algunas de sus clases prácticas.

A la Dra. Raquel Castejón del Laboratorio de Inmunología Tumoral del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid por su colaboración en la realización de los experimentos de citometría de flujo.

Al Dr. Francisco José Iborra por acogerme en su laboratorio en la Unidad de Hematología Molecular (The Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford), por su asesoramiento para llevar a cabo la transfección de células T Jurkat y los experimentos de microscopia confocal y por la amabilidad con la que me trató durante mi estancia.

A la Dra. Teresa Encinas, su amistad y apoyo tanto en temas científicos y administrativos como personales. Gracias por su gran capacidad para escuchar y por encontrar siempre la palabra oportuna para dar ánimos.

Al Dr. Antonio González de Bulnes por su preocupación en el desarrollo de esta Tesis, por su apoyo logístico cuando fue necesario y por su mensaje de confianza y ánimo.

A todos aquellos que he tenido la oportunidad de conocer a lo largo de la elaboración de esta tesis y que me han brindado su amistad.

A mis familiares y amigos, por contribuir con vuestra alegría y confianza desde fuera del laboratorio y por mantenerme en contacto con el "mundo exterior".

A Alberto por su paciencia, comprensión y palabras de ánimo cuando más lo necesitaba. Muchas de las horas invertidas en este trabajo se las he robado a él y, a pesar de ello, siempre me ha prestado el apoyo y cariño necesarios que sólo una gran persona puede dar.

A todos los que han estado a mi lado y que de una u otra forma han puesto su granito de arena, contribuyendo a la realización de este trabajo, reitero mi más sincero agradecimiento.

A Alberta

A mi madre

En memoria de mi querido padre

ÍNDICE

ABREVIATURAS	26
INTRODUCCIÓN	32
1.- LA SEÑAL DE Ca^{2+} CITOSÓLICA EN LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T	34
2.- LA ENTRADA DE Ca^{2+} DEPENDIENTE DE DEPÓSITO: EL CANAL CRAC	37
3.- ACTIVACIÓN DE LOS CANALES CRAC	41
3.1.- Hipótesis del mensajero difusible	42
3.2.- Hipótesis del acoplamiento conformacional	43
3.3.- Hipótesis de la fusión vesicular	44
4.- COMPONENTES MOLECULARES DE LOS CANALES CRAC	44
4.1.- Canales TRP	44
4.2.- Proteína de interacción estromal (STIM)	46
4.3.- ORAI1/CRACM1	47
5.- NUEVA HIPÓTESIS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CRAC: PAPEL DE STIM y ORAI	49
6.- INACTIVACIÓN DE LOS CANALES CRAC	50
6.1.- Inactivación dependiente de Ca^{2+}	51
6.1.1.- <i>Inactivación rápida</i>	51
6.1.2.- <i>Inactivación lenta</i>	52
6.2.- Otros mecanismos reguladores	53
7.- FLUJOS IÓNICOS EN EL LINFOCITO T Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA SEÑAL DE Ca^{2+}	55
7.1.- El retículo endoplásmico en la homeostasis del Ca^{2+}	56
7.1.1.- Receptores de IP_3	57
7.1.2.- Receptores de rianodina	59
7.1.3.- Receptores de NAADP	60
7.2.- Canales de potasio de la membrana plasmática	60
7.2.1.- Canales de potasio dependientes de voltaje (<i>Kv1.3</i>)	61
7.2.2.- Canales de potasio dependientes de calcio (<i>IK</i> y <i>SK</i>)	61
7.3.- Canales de cloro y control del volumen celular	62
7.4.- Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática	63
7.5.- Intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática	64
7.6.- Canales MagNum/MIC de la membrana plasmática	65
7.7.- Otros canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática	66
8.- LA MITOCONDRIA Y SU PAPEL REGULADOR DE LA SEÑAL DE Ca^{2+} CITOSÓLICA	67
9.- REGULACIÓN MITOCONDRIAL DE LOS CANALES CRAC	74
9.1.- Regulación mitocondrial de la activación de los canales CRAC	74
9.2.- Regulación mitocondrial de la inactivación de los canales CRAC	76
9.3.- Papel de la localización subcelular de las mitocondrias en la regulación de los canales CRAC	77
10.- BALSAS LIPÍDICAS o <i>LIPID RAFTS</i>	79
OBJETIVOS	88

MATERIALES Y MÉTODOS	92
1.- CULTIVO CELULAR	94
2.- REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE CORRIENTES IÓNICAS	95
2.1.- La técnica de <i>patch clamp</i>	95
2.2.- Registro de I_{CRAC}	97
2.3.- Materiales y soluciones utilizados	98
2.4.- Protocolos de trabajo y equipo utilizado	100
2.5.- Análisis cinético de la corriente CRAC	102
2.6.- Análisis estadístico de los datos	103
3.- TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS JURKAT CON EL VECTOR pEYFP-Mito	104
3.1.- Expansión clonal del vector pEYFP-Mito.....	105
3.2.- Técnicas utilizadas para realizar la transfección de las células Jurkat	107
- <i>Inmunoporación</i>	107
- <i>Electroporación</i>	108
- <i>Transfección empleando Effectene</i>	108
- <i>Transfección empleando FuGENE 6</i>	109
4.- MEDIDAS DE FLUORESCENCIA.....	109
4.1.- Equipos utilizados para la detección de fluorescencia.....	110
4.1.1.- <i>Microscopía de epifluorescencia convencional</i>	111
4.1.2.- <i>Microscopía de fluorescencia confocal</i>	112
4.1.3- <i>Citometría de flujo</i>	113
5.- ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIONES INTRACELULARES LIBRES DE QUELANTES.....	115
6.- MODELOS MATEMÁTICOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA $[Ca^{2+}]_i$	116
RESULTADOS	118
1.- CARACTERIZACIÓN DE LA CORRIENTE CRAC EN CÉLULAS T JURKAT	120
2.- EFECTOS DE LA PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE UN QUELANTE DE Ca^{2+} SOBRE LA ACTIVACIÓN DE I_{CRAC}	122
3.- EFECTOS DE LA PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE UN QUELANTE DE Ca^{2+} SOBRE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}	123
4.- ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS MICRODOMINIOS DE Ca^{2+} EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE DOS QUELANTES DE Ca^{2+} (EGTA o BAPTA).125	
5.- PARTICIPACIÓN DE LA INACTIVACIÓN RÁPIDA DE I_{CRAC} EN LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES	126
6.- EFECTOS DEL CÓCTEL MITOCONDRIAL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE I_{CRAC}	128
7.- EFECTOS DEL CÓCTEL MITOCONDRIAL SOBRE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC} .129	
8.- LA REDUCCIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC} EN PRESENCIA DEL CÓCTEL MITOCONDRIAL ES DEBIDA A LA POTENCIACIÓN DE LA MITOCONDRIA	131
9.- VALORACIÓN DEL ESTADO METABÓLICO MITOCONDRIAL.....	133
10.- EL ATP LIBERADO DESDE LAS MITOCONDRIAS REGULA LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}	134
11.- ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS MICRODOMINIOS DE Ca^{2+} EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE ATP	137

12.- EFECTO DEL ATP EXÓGENO SOBRE LA INACTIVACIÓN LENTA DE I_{CRAC}	138
13.- EFECTO DEL ATP EXÓGENO SOBRE LA INACTIVACIÓN RÁPIDA DE I_{CRAC}	142
14.- EFECTO DEL ATP ENDÓGENO SOBRE LA INACTIVACIÓN LENTA DE I_{CRAC} ...	143
15.- ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS MITOCONDRIAS	146
15.1.- Eficiencia de diferentes métodos de transfección de células T Jurkat	146
15.2.- Análisis de la localización de las mitocondrias en células transfectadas	147
16.- ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA Ca^{2+} -ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA (PMCA) EN LA REGULACIÓN DE I_{CRAC}	149
17.- CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN LA REGULACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}	151
18.- EFECTO DEL CONTENIDO DE COLESTEROL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}	152
DISCUSIÓN	158
1.- ELECCIÓN DEL MÉTODO EXPERIMENTAL.....	160
2.- CARACTERIZACIÓN DE I_{CRAC} : Efecto de dos quelantes de Ca^{2+}	161
3.- REGULACIÓN MITOCONDRIAL DE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}	164
4.- LOCALIZACIÓN Y SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS MITOCONDRIAS EN LOS LINFOCITOS T.....	166
5.- MECANISMOS MITOCONDRIALES DE REGULACIÓN DE LA INACTIVACIÓN LENTA DE I_{CRAC}	169
5.1.- Recaptación de Ca^{2+} por el uniportador mitocondrial.....	169
5.2.- Liberación de ATP por la mitocondria	171
6.- OTROS COMPONENTES CELULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE I_{CRAC}	174
6.1.- Papel de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática en la regulación de I_{CRAC}	174
6.2.- Modulación de I_{CRAC} por la proteína quinasa C	175
6.3.- Función de las balsas lipídicas en la regulación de I_{CRAC}	176
CONCLUSIONES	178
BIBLIOGRAFÍA	182
ANEXO	204

ABREVIATURAS

Para una mayor claridad se incluyen entre paréntesis el significado en lengua inglesa de las abreviaturas más comúnmente utilizadas en este texto.

2-APB:	2- Aminoetoxidifenil borato (2-Aminoethoxydiphenyl Borate)
A:	Antimicina (<i>Antimycin</i>)
ADN:	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ADPRc:	ADP ribosa cíclica (<i>Cyclic ADP Ribose</i>)
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico (<i>Adenosine Monophosphate cyclic</i>)
ANT _m :	Transportador de nucleótidos de adenina mitocondrial (<i>Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase</i>)
APC:	Célula presentadora de antígeno (<i>Antigen-Presenting Cell</i>)
ATP:	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
ATPasa:	Adenosina trifosfatasa (<i>Adenosine Triphosphatase</i>)
Atr:	Atractilósido (<i>Atractyloside</i>)
BA:	Ácido bongkrékico (<i>Bongkrekic Acid</i>)
BAPTA:	Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (<i>1,2-Bis-(o-Aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid</i>)
Bis:	Bisindolilmaleimida (<i>Bisindolylmaleimide</i>)
Ca ²⁺ :	Calcio (<i>Calcium</i>)
[Ca ²⁺] _i :	Concentración intracelular o citosólica de Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _m :	Concentración de Ca ²⁺ mitocondrial
CaMK:	Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina (<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase</i>)
CCCP:	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (<i>Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone</i>)
CICR:	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺ (<i>Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release</i>)
CIF:	Factor difusible que activa la entrada de Ca ²⁺ a través de canales dependientes de depósito (<i>Ca²⁺ Influx Factor</i>)
CkII:	Cóctel (<i>Cocktail</i>)
CRAC:	Entrada de Ca ²⁺ activada por la liberación de Ca ²⁺ de los depósitos intracelulares (<i>Ca²⁺-Release Activated Ca²⁺</i>)
Cyt c:	Citocromo c (<i>Cytochrome c</i>)
DAG:	Diacilglicerol (<i>Diacylglycerol</i>)
EGTA:	Ácido etilen glicol-bis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N' tetraacético (<i>Ethyleneglycolbis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid</i>)
EYFP:	Proteína fluorescente amarilla mejorada (<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>)
F:	Faradio
FBS:	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
GFP:	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GMPC:	Guanosín monofosfato cíclico (<i>Guanosine Monophosphate cyclique</i>)
HEPES:	Ácido N-(2-hidroxiethyl) piperazina N'-(2-etanosulfónico) (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-Ethanesulfonic Acid))
HPβC:	Hidroxipropil- β- ciclodextrina (<i>Hydroxy-Propyl- β- Cyclodextrin</i>)
I _{CRAC} :	Corriente de Ca ²⁺ activada por la liberación de Ca ²⁺ de los depósitos (<i>Ca²⁺-Release Activated Ca²⁺ Inward current</i>)
IKCa1:	Canal de K ⁺ activado por Ca ²⁺ de conductancia intermedia (<i>Intermediate-Conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel</i>)
IL-2:	Interleucina 2 (interleukin 2)
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trifosfato (<i>Inositol 1,4,5-Triphosphate</i>)
InsP ₃ :	Inositol 1,4,5-trifosfato (<i>Inositol 1,4,5-Triphosphate</i>)
IP ₃ R:	Receptores de IP ₃ (<i>IP₃ Receptors</i>)
IP ₄ :	Inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato (<i>Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate</i>)
ITAM:	Motivo de activación de inmunoreceptor basados en tirosina (<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>)
JC-1:	Ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-. 1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina (5, 5', 6, 6' - tetrachloro - 1, 1', 3, 3' -tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide)
K _D :	Constante de disociación
K _{on} :	Constante cinética de unión
MagnNum:	Canal regulado por nucleótidos de Mg ²⁺ (<i>Mg²⁺ Nucleotide-regulated Metal channel</i>)
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIC:	Canal cationico inhibido por Mg ²⁺ (<i>Mg²⁺-Inhibited Cation</i>)
MPTP:	Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial (<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>)
MβCD:	Metil -β- Ciclodextrina (<i>Methyl- β- cyclodextrin</i>)
NAADP:	Ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (<i>Nicotinic Acid-Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NCX:	Intercambiador de Na ⁺ /Ca ²⁺ (<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)

NFAT:	Factor nuclear de los linfocitos T activados (<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i>)
NFκB:	Factor nuclear κB (<i>Nuclear Factor-kappaB</i>)
O:	Oligomicina (<i>Oligomycin</i>)
pEYFP-Mito:	Proteína fluorescente amarilla mejorada dirigida a mitocondrias (<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein targeted to mitochondria</i>)
PKC:	Proteína quinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
PLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂ independiente de Ca ²⁺ (<i>Ca²⁺-independent phospholipase A₂</i>)
PLC-γ1:	Fosfolipasa C- γ1 (<i>phospholipase C- γ1</i>)
PMA:	Ester de forbol mirístico (<i>Phorbol Myristate Acetate</i>)
PMCA:	Bomba de Ca ²⁺ Ca ²⁺ -ATPasa de la membrana plasmática (<i>Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase</i>)
RBL:	Células de leucemia basofílica de ratas (<i>Rat Basophilic Leukemia cells</i>)
RE:	Retículo endoplásmico (<i>Endoplasmic Reticulum</i>)
Rh 123:	Rodamina 123 (<i>Rhodamine 123</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RR:	Rojo de rutenio (<i>Ruthenium Red</i>)
Ru360:	Rutenio 360 (<i>Ruthenium 360</i>)
RyR:	Receptores de rianodina
SCID:	Inmunodeficiencia combinada severa (<i>Severe Combined Immune Deficiency</i>)
SEM:	Error estándar de la media (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SERCA:	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo sarco(endo)plásmico (<i>Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i>)
S:	Siemens
SI:	Sinapsis inmunológica
SOC:	Canales operados por depósitos (<i>Store-Operated Channels</i>)
Sta:	Estaurosporina (<i>Staurosporine</i>)
STIM:	Molécula de interacción estromal (<i>Stromal Interaction Molecule</i>)
TCR:	Receptor de la célula T (<i>T Cell Receptor</i>)
t _{max} :	Tiempo en alcanzarse la amplitud máxima de la corriente
TRITC:	Isotiocianato de tetrametilrodamina (<i>Tetramethylrhodamine Isothiocyanate</i>)
TRP:	Potencial de receptor transitorio (<i>Transient Receptor Potencial</i>)
V _h :	Potencial de holding
V _r :	Potencial de reversión
ΔΨ _m	Potencial de membrana mitocondrial
τ _{off} :	Constante de tiempo de inactivación
τ _{on} :	Constante de tiempo de activación
Ω:	Ohmios

INTRODUCCIÓN

1.- LA SEÑAL DE Ca^{2+} CITOSÓLICA EN LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T

El ion calcio (Ca^{2+}) funciona como un segundo mensajero en prácticamente todas las células eucarióticas, incluyendo las células del sistema inmune. Así, se ha descrito que cambios en la concentración libre de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), consecuencia de la unión de antígeno a los receptores de antígeno de células T y B (TCR y BCR) o de complejos antígeno-anticuerpo a los receptores Fc de mastocitos, monolitos, macrófagos, células dendríticas y células *natural killer*, desempeñan un papel decisivo en su activación y diferenciación, así como en diferentes funciones efectoras propias de cada tipo celular.

En el linfocito T, en particular, estas funciones abarcan desde la formación de sinapsis estables entre las células T y las células presentadoras de antígeno (APCs) y su activación con la expresión específica de determinados genes tras el reconocimiento del antígeno o en otros procesos como la motilidad o la exocitosis de vesículas de las células T citotóxicas.

Las APCs son las responsables de capturar macromoléculas y procesarlas en fragmentos peptídicos (antígenos) que se asocian con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), propias de las APCs, para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T y así generar una respuesta inmune. Los linfocitos T poseen un conjunto de proteínas de membrana denominado complejo del receptor de célula T (TCR) que es capaz de reconocer antígenos extraños presentes en el complejo MHC. Además, el complejo TCR lleva asociado un conjunto de proteínas de membrana llamado colectivamente CD3, cuya función es transmitir la señal de reconocimiento al interior celular para inducir la activación de los linfocitos T.

Tras el reconocimiento del antígeno por el complejo TCR del linfocito T se produce una rápida activación de diversas enzimas con actividad tirosina quinasa. Entre ellas se encuentran Lck y Fyn, que son capaces de fosforilar residuos de tirosina en las secuencias ITAM (motivo de activación de inmunoreceptor basados en tirosina). Las secuencias ITAM fosforiladas constituyen sitios de acoplamiento y activación de una tirosina quinasa de la familia syk denominada ZAP-70. Este conjunto de proteínas quinasas catalizan la fosforilación de diferentes sustratos entre los que se encuentran SLP-76 (proteína de leucocitos que contiene dominios SH2) y LAT (proteína adaptadora de células T activadas) (Myung y cols., 2000). La fosforilación de LAT, una proteína integral de membrana asociada a los lípidos de las balsas lipídicas, crea sitios de unión para proteínas con dominios SH2. Proteínas como PLC- γ 1 (fosfolipasa C- γ 1) y GADS (una proteína adaptadora con dominios SH2 y SH3) se unen a LAT fosforilada. SLP-76 también es reclutado a todo este complejo por su unión al dominio SH3 de GADS (Liu y cols., 1999). A su vez a SLP-76 se puede unir otra serie de proteínas como PLC- γ 1 (Yablonski y cols., 2001) y la tirosina quinasa Itk (Bunnell y cols., 2000), implicada en la activación de la PLC- γ 1.

De manera análoga, la activación del receptor de quimocina acoplado a proteínas G resulta en la activación de PLC β . Ambas fosfolipasas poseen la capacidad de hidrolizar el fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP₂) de la membrana plasmática generando inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Chan y cols., 1994; Premack y Gardner, 1992).

El aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ es la señal primaria necesaria para iniciar la activación del linfocito T. El IP₃ generado va a desencadenar una respuesta bifásica en la [Ca²⁺]_i debido, inicialmente a la liberación transitoria al citosol desde el retículo endoplásmico de grandes cantidades de Ca²⁺ a través de los receptores de IP₃ (IP₃R) y, posteriormente, a la entrada sostenida de Ca²⁺ desde el exterior a través de una clase específica de canales dependientes de depósito situados en la membrana plasmática, conocidos como canales CRAC. La apertura de estos canales es activada por el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ a través de la proteína de interacción estromal (STIM1) (ver más adelante, Figura 1).

El Ca²⁺ es retirado del citoplasma por la acción de Ca²⁺-ATPasas situadas en el RE y en la membrana plasmática (SERCA y PMCA, respectivamente) o por la acción del uniportador de Ca²⁺ mitocondrial. En algunas células, intercambiadores Na⁺/Ca²⁺ (NCX) de la membrana plasmática contribuyen a mantener los bajos niveles de la [Ca²⁺]_i en reposo (típicamente 70-100 nM) comparados con los 1-2 mM de Ca²⁺ extracelular.

Bajo condiciones fisiológicas normales, los canales CRAC permanecen abiertos durante que el antígeno está presente y los depósitos son repletados, permitiendo un incremento sostenido en la [Ca²⁺]_i, resultado del equilibrio entre la entrada de Ca²⁺ y su extrusión hacia el RE, la mitocondria o el espacio extracelular principalmente.

Este incremento sostenido de la [Ca²⁺]_i del linfocito T activado (alrededor de 1 μ M) va a estimular a la enzima serina/treonina quinasa calmodulina, la cual activa a la fosfatasa calcineurina. La calcineurina cataliza la defosforilación del factor nuclear de los linfocitos T activados (NFAT), que reside en el citoplasma en células no estimuladas. La acción de la calcineurina permite la translocación al núcleo de NFAT, siendo entonces transcripcionalmente activo, proporcionando así un vínculo entre la señalización de Ca²⁺ y la expresión génica (Hogan y cols., 2003). El NFAT activo se asocia con AP-1 y otros factores de transcripción, dando lugar a un complejo que activa la lectura de los genes asociados a la producción de varias interleucinas, entre ellos el que codifica la citocina interleucina 2 (IL-2). La IL-2 secretada autoestimula a los linfocitos T y activa a los linfocitos B estimulando su proliferación.

Por otro lado, la activación de otra serina/treonina quinasa llamada quinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII) provoca la inhibición de la transcripción del gen de la IL-2 en las células T. Por el contrario la activación de la quinasa CaMKIV aumenta la transcripción del gen de la IL-2. Los efectos

opuestos entre CaMKII y IV sobre la IL-2 se atribuyen a la inhibición o activación respectivamente del factor de transcripción CREB que está implicado en la regulación del promotor de c-fos, proteína que, junto con c-jun forma el complejo AP-1. Por otro lado, el factor de transcripción NFκB se encuentra en el citoplasma del linfocito T inactivo asociado a una proteína inhibidora denominada IκB. Cuando el linfocito T se activa, el factor de transcripción NFκB es fosforilado por las denominadas IκB quinazas (IKK), disociándose de su inhibidor y translocándose al núcleo para activar la transcripción de citocinas.

Además, las cascadas de señalización que se activan como consecuencia de la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ implican otras proteínas moduladoras activadas como consecuencia de la acción de la proteína quinasa C (PKC) y de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). La tipología de la señal de Ca^{2+} influenciará en patrón genético activado ya que, como se ha observado en células T Jurkat, los factores NFAT, AP-1 y NFκB se activan diferencialmente en respuesta a diferentes patrones de transcripción de la señal de Ca^{2+} (Dolmetsch y cols., 1997; Li y cols., 1998).

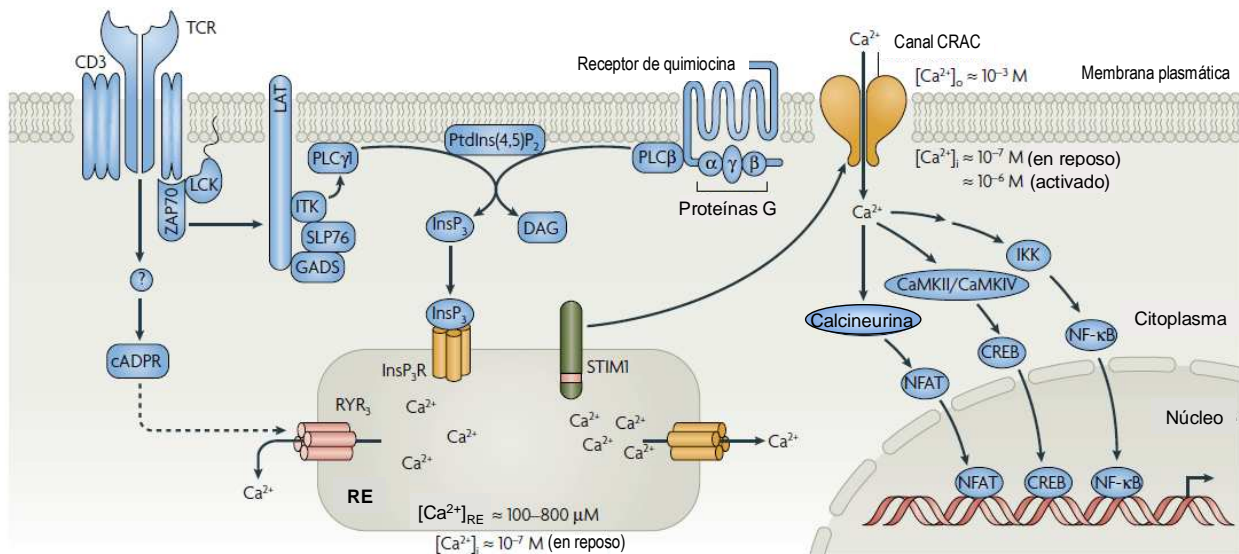


Figura 1. Cascada de señales originada como consecuencia de la activación del receptor de la célula T tras su unión al complejo MHC-antígeno de las células presentadoras (ver descripción más detallada en el texto). TCR: Receptor de la célula T; Lck: Proteína de la familia Src de proteínas tirosina quinazas; ZAP-70: Proteína de la familia Syk de proteínas tirosina quinazas de 70 kD asociada a la cadena Z del receptor de las células T; LAT: Proteína adaptadora de células T activadas; ITK: tirosina quinasa implicada en la activación de la PLC-γ1; SLP-76: Proteína de leucocitos que contiene dominios SH2; GADS: Proteínas adaptadoras con dominios de unión SH2 y SH3; PLC-γ1: Fosfolipasa C-γ1; ADPRc: ADP ribosa cíclica; RYR: receptor de rianodina; PtdIns(4,5)P₂: fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato; InsP₃: Inositol trifosfato; InsP₃R: Receptor de IP₃; DAG: Diacilglicerol; RE: retículo endoplásmico; STIM1: Molécula de interacción estromal de tipo 1; PLCβ: Fosfolipasa C-β; CaMK: Proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina; IKK: IκB quinasa; NFAT: Factor nuclear de los linfocitos T activados; CREB: Factor de transcripción activado por AMPc; NFκB: Factor nuclear Kb. Figura modificada de Feske, 2007.

La respuesta del linfocito T tras su activación es compleja y dependerá no sólo de la interacción del antígeno con el TCR, sino también de las señales accesorias que recibe el linfocito T a través de la APC y de otras células del SI (citocinas), es decir, del contexto en el que son estimulados. Además, estas señales van así a determinar que el linfocito T prolifere, muera por apoptosis (como consecuencia de la selección clonal) o pase a un estado de anergia (con incapacidad para responder al mismo antígeno en el futuro).

Las células T presentan un canal iónico dependiente de depósito muy selectivo para Ca^{2+} denominado CRAC (corriente de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos) cuya actividad es esencial para que se produzca la expresión de genes de citocinas y una respuesta inmune eficaz (Lewis, 2001; Prakriya y Lewis, 2003). En ausencia de una entrada de Ca^{2+} sostenida a través de canales CRAC, la activación, proliferación y funciones de los linfocitos son gravemente comprometidas, como demuestra la existencia de diversas inmunodeficiencias humanas relacionadas con una defectuosa entrada de Ca^{2+} (Partiseti y cols., 1994; Feske y cols., 2005). En células T provenientes de estos pacientes se ha constatado que la defectuosa actividad de los canales CRAC conlleva una pérdida de las señales de Ca^{2+} mediadas por el reconocimiento del antígeno lo cual redundará en una reducción de la producción de interleucina 2 (IL-2) y de la proliferación de las células T *in vitro* (Weiss y cols., 1984) y en una respuesta inmune mediada por células T deficiente *in vivo* (Partiseti y cols., 1994; Feske y cols., 2005; Feske y cols., 2006). Además, una defectuosa señalización de Ca^{2+} ha sido asociada con procesos fisiopatológicos en varios trastornos autoinmunes como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (Feske, 2007).

Sin embargo, recientemente se ha descrito que este proceso de activación de linfocitos T dependiente de una elevación sostenida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sería más dependiente de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares a través de receptores de IP_3 (IP_3R) y/o de los receptores de rianodina (RyR) que, de su entrada desde el exterior a través de canales CRAC (Dadsetan y cols., 2008); apuntando a que estos receptores, podrían ser de interés como potenciales dianas para la manipulación de funciones dependientes de Ca^{2+} en linfocitos T.

2.- LA ENTRADA DE Ca^{2+} DEPENDIENTE DE DEPÓSITO: EL CANAL CRAC

El concepto de entrada de Ca^{2+} dependiente de depósitos fue propuesto por Putney en 1986 (Putney, 1986) al observar que la cantidad de Ca^{2+} presente en los depósitos intracelulares controlaba a su vez, la cantidad de Ca^{2+} que entraba a la célula desde el exterior. Este proceso recibió originalmente el nombre de entrada capacitativa de Ca^{2+} , en analogía al comportamiento de un condensador en un circuito eléctrico, por el que sólo circula corriente

cuando cambia el voltaje entre sus placas. De forma similar, la corriente sólo se activaría cuando se modifica el contenido de Ca^{2+} de los depósitos.

Originalmente, Putney propuso que el vaciamiento de los depósitos inducía la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular directamente a los depósitos y, desde éstos, al citosol (Putney, 1986). Sin embargo, múltiples evidencias posteriores indicaron que los depósitos se rellenaban desde el citosol y no desde el medio extracelular, lo que llevo a Putney a revisar su hipótesis inicial. En el nuevo modelo, actualmente todavía vigente, el vaciamiento de los depósitos induce una señal que abre canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, produciendo un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el consiguiente rellenado de los depósitos que, lo a su vez, conduce al cierre de los canales de la membrana plasmática (Putney, 1990). Según este modelo, la señal que abre los canales de Ca^{2+} de la membrana no es la activación del receptor ni la generación de IP_3 per se, sino el propio vaciado de los depósitos de Ca^{2+} .

Las primeras medidas electrofisiológicas de una corriente de Ca^{2+} operada por depósito fueron llevadas a cabo en mastocitos de rata (Hoth y Penner, 1992). Esta corriente, que se denominó corriente de Ca^{2+} activada por liberación de Ca^{2+} (I_{CRAC}) es la mejor estudiada de todas las corrientes de Ca^{2+} dependientes de depósito. I_{CRAC} se caracteriza por presentar un mecanismo de apertura independiente de voltaje con una relación I/V (relación entre la corriente a través del canal y el potencial de membrana) característica. Así, cuando se emplean rampas de voltaje desde potenciales muy negativos o hiperpolarizados (ej: -100 mV) hasta potenciales muy positivos o despolarizados (ej: $+100$ mV), I_{CRAC} manifiesta una marcada rectificación de entrada y un potencial de reversión por encima de $+50$ mV, indicativo de una elevada selectividad para Ca^{2+} que entra a favor de gradiente electroquímico (Parekh y Putney, 2005).

En ausencia de iones divalentes en el medio extracelular, la corriente se vuelve más selectiva a iones monovalentes (Na^+) y es unas diez veces más grande que la corriente de Ca^{2+} pero se inactiva más rápidamente (aproximadamente un 80% después de unos 20 segundos). Aprovechando esta relación en la conductancia de iones monovalentes y divalentes, y debido a que la conductancia unitaria de Ca^{2+} a través de los canales CRAC es demasiado pequeña para ser detectable, se ha estimado la conductancia unitaria para el Na^+ . Kerschbaum y Cahalan, usando medidas de I_{CRAC} en canal único en presencia de una solución extracelular e intracelular sin iones divalentes estimaron una conductancia para Na^+ de 36-40 pS (Kerschbaum y Cahalan, 1999). Sin embargo, en ausencia de Mg^{2+} intracelular, otra corriente denominada MagNum podría activarse confundándose con I_{CRAC} . Por ello, en un trabajo más reciente, la inhibición de I_{MagNum} por Mg^{2+} intracelular fue usada para estudiar la corriente de Na^+ a través de cada canal CRAC, observando que la conductancia unitaria para Na^+ era demasiado pequeña para ser detectada e indicando que la conductancia monovalente de 40 pS

previamente atribuida a canales CRAC era incorrecta (Prakriya y Lewis, 2002). En este trabajo las corrientes de Na^+ en registros de célula entera indican una conductancia de unos 0,2 pS obtenida mediante análisis de ruido (mucho menor que la estimada por Kerschbaum y Cahalan), conductancia que es unas 10 veces mayor que para el Ca^{2+} . Así, la conductancia unitaria de I_{CRAC} para Ca^{2+} se ha estimado en unos 20 fS.

Por otro lado, no existen inhibidores específicos de I_{CRAC} . Los diversos compuestos que han sido usados hasta la fecha como inhibidores de I_{CRAC} presentan los inconvenientes de una pobre especificidad, un efecto dependiente del tipo celular y efectos no deseados como la inhibición de otras conductancias y/o la movilización de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Incluso los más utilizados y potentes, entre los que destacan el econazol y el SK&F-96365, tienen valores de IC_{50} en el rango micromolar y no son específicos (Franzius y cols., 1994). También se ha observado que la corriente CRAC puede ser suprimida por lantánidos (La^{3+} , Gd^{3+}) de manera reversible y con una IC_{50} de 0,77 μM (Delles y cols., 1995). Otros de los inhibidores más recientemente descritos son el MRS 1845 (Harper y cols., 2003), dihidropiridina con una IC_{50} de 1,7 μM y el BTP2 (Zitt y cols., 2004), un inhibidor más específico y potente de los canales CRAC con una IC_{50} alrededor de 10 nM. Por otro lado, el canal CRAC se potencia por bajas concentraciones (3-5 μM) de 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB) (Parekh y Putney, 2005).

Como ya se ha comentado, estos canales son altamente selectivos para Ca^{2+} . Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se ha apuntado que en la selectividad del canal CRAC podrían participar residuos cargados negativamente, tal y como ya ha sido descrito en varios canales de Ca^{2+} , incluyendo canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y algunos tipos de canales TRP (Potencial de receptor transitorio), donde residuos de glutamatos cargados negativamente forman parte de su filtro de selectividad y proporcionan sitios de unión a Ca^{2+} (Feske, 2007).

Desde su descubrimiento en los mastocitos, I_{CRAC} ha sido descrita en diversos tipos celulares como células de leucemia basofílica de rata (RBL), células T Jurkat, células acinares pancreáticas de rata, ovocitos de *Xenopus*, megacariocitos, células renales caninas Madin-Darby (MDCK), hepatocitos y células dendríticas (Tabla 1).

Sin embargo, I_{CRAC} no es la única corriente descrita que se activa por el vaciamiento de los depósitos intracelulares. Así, en los últimos años se han descrito otras corrientes activadas por vaciamiento de los depósitos denominadas genéricamente SOC (canales operados por depósito), algunas de las cuales no son tan selectivas para Ca^{2+} como I_{CRAC} y presentan propiedades biofísicas diferenciadas (Tabla 1), que probablemente son reflejo de la heterogeneidad molecular entre los diferentes canales (Parekh y Putney, 2005).

Se estima que la selectividad de los canales CRAC por Ca^{2+} respecto a Na^+ es 1000:1, similar a la encontrada en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Sin embargo, existen otras corrientes dependientes de depósito menos selectivas para Ca^{2+} , como ocurre en células endoteliales donde la razón de permeabilidad para $\text{Ca}^{2+}:\text{Na}^+$ de los canales dependientes de depósito es de 10:1 (Vaca y Kunze, 1994).

Por otro lado, se ha observado que tanto células T Jurkat como células T humanas de sangre periférica expresan otro tipo de canales dependientes de depósito que no son selectivos para Ca^{2+} y que han sido denominados como canales CRANC (canales catiónicos no selectivos activados por liberación de Ca^{2+}). Estos canales pueden ser activados por taspigargina, ionomicina, ADP-ribosa e IP_3 . La relación I/V de estas corrientes muestran una ligera rectificación de salida y podrían ser responsables de la entrada de Na^+ en estas células (Su y cols., 2005).

Tabla 1. Propiedades biofísicas de los canales de Ca^{2+} operados por depósito

Corriente	Conductancia*	Selectividad	Tipo celular	Referencia		
I_{CRAC}	0,02pS (110 Ca^{2+})	$\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} >> \text{Mg}^{2+}$	Mastocitos	Hoth y Penner, 1992		
			Células RBL	Fasolato y cols., 1993		
			Células T Jurkat	Zweifach y Lewis, 1993		
			Células acinares pancreáticas	Bahnsen y cols., 1993		
			Ovocitos de Xenopus	Parekh y cols., 1993		
			Megacariocitos	Somasundaram y cols., 1995		
			Células MDCK	Delles y cols., 1995		
			Hepatocitos	Rychkov y cols., 2001		
			Células dendríticas	Hsu y cols., 2001		
			I_{SOC}	11pS (10 Ca^{2+})	$\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$	Células endoteliales
1pS (100 Ca^{2+})	$\text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+} >> \text{K}^+$	Epidérmicas A431				Kaznacheeva y cols., 2000
2pS (160 Ca^{2+})	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$	Epidérmicas A431				Lückhoff y Clapham, 1994
2,7pS (90 Ca^{2+})	$\text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+} = \text{Na}^+$	Miocitos aórticos				Trepakova y cols., 2001
2,3pS (1.5 Ca^{2+})	$\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$	Miocitos de vena porta				Albert y Large, 2002
5,4pS (20 Ca^{2+})	?	Miocitos de arteria pulmonar				Golovina y cols., 2001
0,7pS (90 Ca^{2+})	?	Células mesangiales				Ma y cols., 2001
43pS (1.3 Ca^{2+})	$\text{Na}^+, \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+}$	Células acinares pancreáticas				Krause y cols., 1996

* Entre paréntesis concentración extracelular de Ca^{2+} empleada en los distintos experimentos

Como se ha comentado anteriormente, la señal única y necesaria para que se produzca la activación de los canales CRAC es el vaciamiento de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) (más concretamente de los depósitos sensibles a IP_3), por lo que todas aquellas maniobras que resulten en el vaciado del RE permitirán la activación de la corriente. Para obtener experimentalmente la máxima activación de I_{CRAC} disponemos de métodos que provocan el vaciamiento de los depósitos de manera activa o de manera pasiva, que en la práctica suelen combinarse. Entre los mecanismos activos se encuentra la

diálisis con concentraciones supramáximas de IP_3 (>10 mM; Iwai y cols., 2007) para activar la salida de Ca^{2+} a través del IP_3R del RE. Por otra parte, los mecanismos pasivos aprovechan la pérdida de Ca^{2+} a través de un canal de fuga (*leak*) desde el depósito, mientras inhiben su relleno, de manera que los depósitos de Ca^{2+} acaban vaciándose de un modo independiente de la apertura de los IP_3R . Para ello, se puede recurrir a inhibidores específicos de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del RE (SERCA) como la taspigargina, el ácido ciclopiazónico o la tert-butil-benzohidroquinona (TBQ), la permeabilización de la membrana del RE con ionóforos de Ca^{2+} como ionomicina o a la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la diálisis con altas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} , como el EGTA o el BAPTA y/o a la simple incubación en medio extracelular libre de Ca^{2+} .

3.- ACTIVACIÓN DE LOS CANALES CRAC

Hasta la fecha, el mecanismo que relaciona el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} con la activación de los canales CRAC se desconoce. Si bien el mecanismo más sencillo implicaría una entrada de Ca^{2+} inducida directamente por el aumento global de la $[Ca^{2+}]_i$, producido por la salida del Ca^{2+} del RE, existen varios argumentos que permiten descartarlo. En primer lugar, I_{CRAC} puede ser activada por IP_3 y taspigargina (Hoth y Penner, 1992) en células dializadas con altas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} , que impedirían la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$; por el contrario, la inclusión en la pipeta de registro de concentraciones de Ca^{2+} en el rango micromolar no es capaz de activar por sí sola la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC (Fierro y Parekh, 2000); además, la presencia de TPEN, un quelante de cationes divalentes que atraviesa las membranas celulares reduciendo el contenido de Ca^{2+} en el RE sin inducir la liberación de Ca^{2+} al citosol, es suficiente para activar I_{CRAC} (Hofer y cols., 1998). Estos resultados demuestran que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ no es suficiente *per se* para activar la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales.

Por tanto, debe existir una señal intermediaria que permita transmitir la información del contenido de Ca^{2+} del RE a los canales CRAC de la membrana plasmática. Este mecanismo requiere de la existencia de un sensor de Ca^{2+} capaz de detectar la reducción en el contenido de Ca^{2+} intraluminal y, posteriormente, generar una señal que comunique esta información a la membrana plasmática. A continuación, se presentan los modelos que han sido propuestos para explicar la activación de los canales operados por depósito: la hipótesis de un mensajero difusible, la hipótesis del acoplamiento conformacional y la hipótesis de la fusión vesicular (Figura 2). Hasta el momento las evidencias obtenidas no han validado ninguna de estas hipótesis de un modo universal, aplicable a los distintos tipos de canales dependientes de depósito y a la mayoría de los distintos tipos celulares. Por consiguiente, cabe la posibilidad de que existan múltiples modos de activación de la corriente de

Ca^{2+} dependiente de depósito y que incluso puedan coexistir en la misma célula. Por otro lado, en los últimos años han sido descubiertas unas proteínas denominadas STIM (molécula de interacción estromal) y ORAI implicadas en el mecanismo de activación de estos canales, cuyo papel será también comentado.

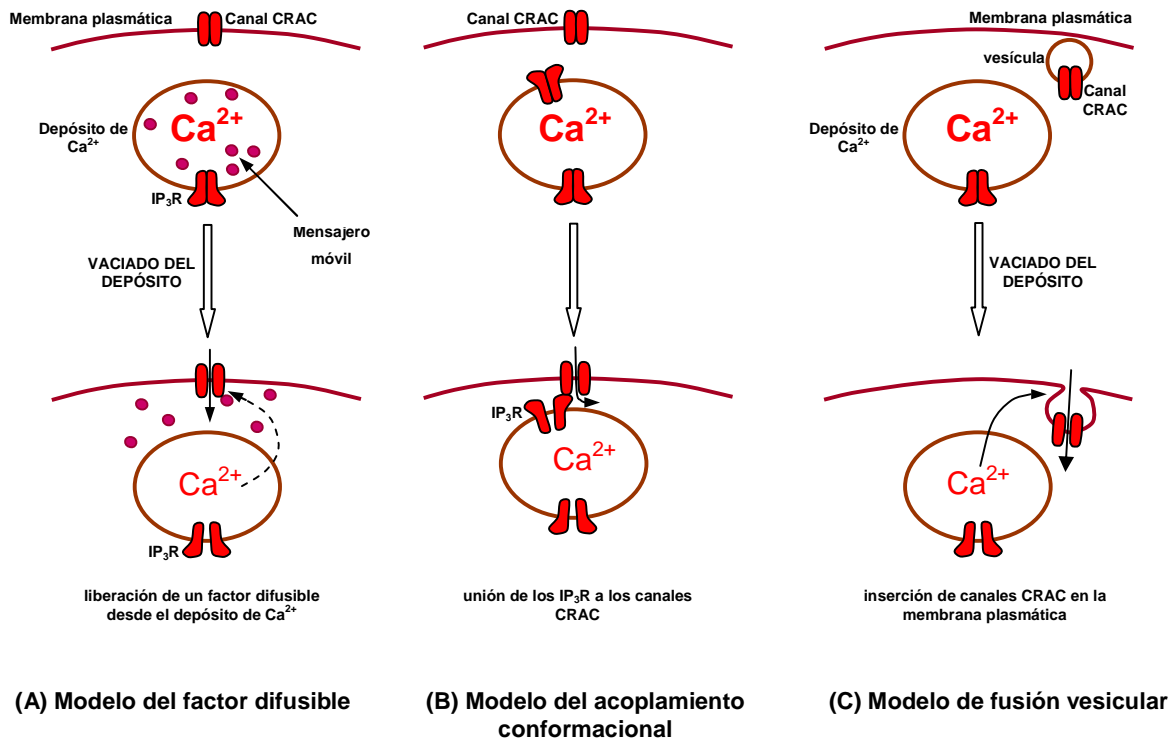


Figura 2. Esquemas de las principales hipótesis explicativas de la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de depósito. (A) Modelo del factor difusible. (B) Modelo de acoplamiento conformacional. (C) Modelo de inserción de canales mediante fusión vesicular. Figura modificada de Parekh, 2003.

3.1.- Hipótesis del mensajero difusible

En 1990 se propuso que el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} conllevaría también la liberación de un factor o mensajero con capacidad para difundir en el medio intracelular y promover la apertura de los canales dependientes de depósito. En consecuencia, esta hipótesis otorga el papel principal en la comunicación entre el contenido de Ca^{2+} del depósito y los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática a un mensajero móvil distinto del Ca^{2+} (Putney, 1990). Dicho mensajero podría ser almacenado en el interior del RE y liberado al citosol tras el vaciamiento de Ca^{2+} del depósito o podría ser generado de novo en el citosol al producirse el vaciamiento del depósito.

Randriamampita y Tsien (1993) caracterizaron parcialmente un compuesto lipofílico y de bajo peso molecular (factor de entrada de Ca^{2+} o

CIF) capaz de activar la entrada de Ca^{2+} en células T Jurkat tras la liberación de Ca^{2+} del RE.

Asimismo, existen evidencias que apuntan a que CIF abriría los canales de Ca^{2+} dependientes de depósito de manera indirecta, a través del reclutamiento de la fosfolipasa $\text{A}_2\beta$ ($\text{PLA}_2\beta$). En condiciones de reposo, la $\text{PLA}_2\beta$ se encuentra unida a calmodulina, lo cual mantiene a la $\text{PLA}_2\beta$ en un estado inactivo. La demostración de que la presencia de $\text{PLA}_2\beta$ es necesaria para la activación de los canales dependientes de depósito y de que la aplicación extracelular de lisofosfolípidos es capaz de activar esta corriente, ha dado lugar a proponer un modelo en el que, el CIF liberado, tras el vaciamiento de los depósitos, desplazaría a la calmodulina de su unión a $\text{PLA}_2\beta$ que, a su vez, generaría lisofosfolípidos capaces de activar la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito (Smani y cols., 2004).

Las balsas lipídicas podrían jugar un papel importante en este proceso de manera que la PLA_2 y los canales dependientes de depósito podrían estar localizados juntos en las balsas lipídicas, esto permitiría a los lípidos producidos interactuar y activar a los canales rápida y localmente, sin alterar el conjunto de la membrana plasmática (Bolotina y Csutora 2005).

Otros compuestos, como el inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato (IP_4), diversos metabolitos del complejo del citocromo P-450 o el guanósín monofosfato cíclico (GMPc) también han sido propuestos como mensajeros intracelulares capaces de activar la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito en algunos tipos celulares, si bien se desconoce si lo hacen actuando directamente sobre los canales dependientes de depósito y si ejercen este papel en la mayoría de la células.

3.2.- Hipótesis del acoplamiento conformacional

Justificándose en la existencia en el músculo esquelético de una conexión física entre los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico y los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, Irvine (1990) propuso que existiría una interacción directa entre el IP_3R del RE y los receptores de IP_4 de la membrana plasmática que funcionarían como canales de Ca^{2+} . Según este modelo, un cambio de conformación del receptor de IP_3R como consecuencia de la depleción de Ca^{2+} del RE, activaría los receptores de IP_4 , promoviendo la entrada de Ca^{2+} extracelular.

Este modelo fue posteriormente revisado por Berridge (1995), quien sustituyó los receptores de IP_4 por la noción más amplia de canales dependientes de depósito. Según Berridge los IP_3Rs del RE se encuentran asociados físicamente a los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, de manera que el vaciamiento de los depósitos por la unión de IP_3 , provocaría un cambio conformacional en los receptores de IP_3 , capaz de transmitirse rápidamente a los canales de Ca^{2+} dando lugar a su activación.

Sin embargo, los canales CRAC se activan lentamente tras el vaciamiento de los depósitos, requiriendo de 10 a 100 segundos para que tenga lugar (Hoth y Penner, 1993; Zweifach y Lewis, 1993; Parekh y Penner, 1997), lo cual no concuerda con la cinética de un sistema análogo al del músculo esquelético, en el que el acoplamiento estímulo-contracción ocurre en milisegundos. En consideración a estas diferencias cinéticas el modelo fue nuevamente revisado, proponiéndose que los IP₃R del RE y los canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática no formarían complejos estables, sino que interaccionarían como consecuencia de un movimiento de aproximación del RE a la membrana plasmática tras el vaciamiento de los depósitos (Patterson y cols., 1999). Este movimiento sería lo suficientemente lento para explicar el curso temporal de la activación de los canales dependientes de depósito.

3.3.- Hipótesis de la fusión vesicular

Esta hipótesis propone que los canales dependientes de depósito no se encuentran en la membrana plasmática en estado de reposo, sino que residen en vesículas intracelulares similares a los gránulos o vesículas de secreción y, que al producirse el vaciamiento de los depósitos de Ca²⁺, se insertan en la membrana a través de un mecanismo de exocitosis regulada dependiente de Ca²⁺. Así, se ha observado que la primaquina, un compuesto químico capaz de inhibir el transporte y fusión vesicular, también afecta al desarrollo de I_{CRAC} en megacariocitos (Somasundaram y cols., 1995).

En el modelo de fusión vesicular la señal de activación sería la elevación de la [Ca²⁺]_i, lo cual como ya ha sido expuesto entraría en conflicto con algunos resultados experimentales. Además, este modelo no precisa si los canales se encuentran constitutivamente abiertos en las vesículas o son activados una vez que se incorporan a la membrana plasmática. Por tanto, no ha sido establecido su posible papel en la entrada de Ca²⁺ dependiente de depósito.

4.- COMPONENTES MOLECULARES DE LOS CANALES CRAC

4.1.- Canales TRP

En las células fotorreceptoras de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), la absorción de un fotón por la rodopsina desencadena una cascada de eventos que da lugar a la estimulación de fosfolipasa C con la consiguiente formación de IP₃ que a su vez induce la entrada de Ca²⁺ y un cambio sostenido del potencial de membrana.

El descubrimiento del mutante TRP (potencial receptorial transitorio) que presentaba cambios transitorios del potencial de membrana, acompañados de alteraciones en la entrada de Ca²⁺ y en la fototransducción, sugirió que el gen

TRP era esencial para la entrada de Ca^{2+} (Hardie y Minke, 1992). El gen TRP codifica para un canal de Ca^{2+} con una topología similar a la de los canales dependientes de voltaje pero carente de la zona que sirve de sensor de voltaje, por lo que podría participar en la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito (Hardie y Minke, 1993).

Desde el hallazgo original de los TRP en *Drosophila* se han descubierto un amplio número de homólogos en vertebrados, lo que ha llevado al establecimiento de la superfamilia de canales TRP. Actualmente, esta familia de proteínas engloba siete subfamilias que son separadas en dos grupos en base a sus diferencias de secuencia y topológicas. El grupo 1 consta de 5 subfamilias (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN y TRPA) que presentan mayor homología de secuencia con el gen TRP de *Drosophila* mientras que el grupo 2 está formado por dos subfamilias (TRPP y TRPL) que, a diferencia de los miembros del grupo 1 presentan un gran bucle extracelular que separa el primer y el segundo dominio transmembrana (Venkatachalam y Montell, 2007).

Se cree que los canales TRP están formados por homo o heterotetrámeros de subunidades que contendrían 6 segmentos transmembrana localizados entre unos extremos N y C intracelulares, con los segmentos 5 y 6 delimitando el poro iónico (Clapham, 2003). Varios grupos han examinado el posible papel de los TRP en la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito. Este tipo de estudios han consistido generalmente en experimentos de sobreexpresión génica de TRPs, en el uso de ARN de interferencia o de apagamiento génico (*knock down*), los cuales sugieren que algunos miembros de la familia TRPC podrían formar parte de los canales dependientes de depósito debido a su apertura dependiente del vaciamiento del depósito, a su selectividad por Ca^{2+} y/o a sus propiedades electrofisiológicas similares a CRAC. Sin embargo, por cada trabajo que propone que un TRP en particular es o participa en la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito, existe otro que afirma lo contrario (Clapham, 2003). Aunque algunos canales TRPs parecen ser activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , esto no ha sido demostrado en experimentos controlando el potencial de membrana y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, de manera que el vaciamiento del depósito despolarizaría la membrana de las células intactas, afectando a las cascadas de señalización intracelulares. Por esta razón, a pesar de las evidencias que apuntan que los canales TRP son regulados por factores controlados o influenciados por el vaciamiento de los depósitos ninguno de ellos ha podido ser definido inequívocamente como dependiente de depósito (Ramsey y cols, 2006). Así, incluso TRPV6, cuyas propiedades pueden asemejarse más a las de los canales CRAC, manifiesta algunas características distintivas de I_{CRAC} (sensibilidad a agentes que provocan el vaciamiento del depósito, rectificación de entrada en ausencia de cationes divalentes, permeabilidad relativa a Na^+ y Cs^+ , efecto de 2-APB o voltaje-dependencia de la unión de Mg^{2+}) (Voets y cols., 2001).

4.2.- Proteína de interacción estromal (STIM)

La línea celular S2 de *Drosophila* (*Schneider's Drosophila Line 2*) presenta una entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito con propiedades electrofisiológicas muy similares a las de los canales CRAC, por lo que es un modelo frecuentemente utilizado para investigar los genes involucrados en la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito. Empleando este modelo, Roos y cols. (2005) descubrieron, mediante el uso de ARN de interferencia, que uno de los genes implicados en la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito codifica la llamada proteína de interacción estromal (STIM). En mamíferos existen dos homólogos de STIM, STIM1 y STIM2. Mientras que, en un primer momento, STIM2 no parecía implicado en la actividad de estos canales, STIM1 era descrito como un componente de la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito. Es de destacar que STIM1 podría ser el sensor del contenido de Ca^{2+} del RE, lo cual representa un paso decisivo para el esclarecimiento del mecanismo de activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de depósito (Roos y cols., 2005).

STIM1 puede formar homo- o heteromultímeros consigo mismo y con STIM2 (Manji y cols., 2000). Tras la oligomerización tiene lugar la formación de agrupaciones de STIM1 en zonas puntuales, como resultado de su redistribución local a lo largo de la membrana del retículo endoplásmico (Liou y cols., 2007).

Aunque STIM1 y STIM2 muestran un alto grado de homología de secuencia, especialmente en sus dominios funcionales (Williams y cols., 2001), la reducción de la expresión de STIM2, al contrario de lo que ocurría con STIM1, no parecía tener efecto sobre la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de depósito en células HeLa (Liou y cols., 2005) o en células HEK293 (células renales embrionarias humanas 293) (Roos y cols., 2005).

Sin embargo, STIM2 mostraba ser un potente inhibidor de los canales dependientes de depósito cuando es expresado en células T Jurkat, HEK293, PC12 o A7r5. Así, en mutantes donde STIM1 está acoplado a los canales en la membrana plasmática para activar constitutivamente I_{CRAC} , se ha observado que STIM2 colocaliza con STIM1 y bloquea la función de estas proteínas de manera independiente del vaciado del depósito. Por lo tanto, mientras que STIM1 es un mediador necesario para la activación de los canales CRAC, STIM2 parece actuar como un inhibidor de este proceso, interfiriendo con la activación de CRAC mediada por STIM1 (Soboloff y cols., 2006a). Además, la supresión específica tanto de STIM1 como de STIM2, da lugar a un fenotipo linfoproliferativo y una disminución del número de células T reguladoras, indicando que STIM1 y STIM2 participan en la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito y son necesarias para el desarrollo y función de células T reguladoras (Oh-Hora y cols., 2008).

En cuanto a cual era la localización de STIM1 tras su redistribución en un estudio se sugería, basándose en el aumento de la expresión de STIM1 en la

superficie celular como respuesta al vaciado del depósito, que STIM1 en condiciones de reposo se encontraría localizado predominantemente en el RE, si bien el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} del depósito provocaría la traslocación de STIM1 hacia zonas concretas de la superficie celular, donde tendría lugar la entrada de Ca^{2+} (Zhang y cols., 2005). Aquí, esta proteína podría activar los canales CRAC a través de un mecanismo desconocido que podría involucrar una interacción directa con alguna de las subunidades que forman el poro del canal, un acoplamiento conformacional a través de la interacción con proteínas localizadas en el RE o facilitar el ensamblaje funcional de los canales CRAC.

Sin embargo, después de presentarse esta propuesta, han surgido evidencias en contra de la hipótesis de la traslocación de STIM1 dependiente de depósito a la membrana plasmática (Mercer y cols., 2006, Soboloff y cols., 2006b). Así, mientras que STIM1 parece tener un papel funcional en la membrana plasmática, su translocación tras el vaciado de los depósitos intracelulares parece improbable. Se ha demostrado también que STIM1 se encuentra distribuido de manera uniforme por todo el RE cuando el depósito está lleno de Ca^{2+} , pero el vaciamiento del depósito provoca una redistribución intracelular de STIM1 hacia zonas puntuales del RE cercanas a la membrana plasmática (Liou y cols., 2005). Por ello, se ha propuesto un modelo en el que el acoplamiento para activar canales dependientes de depósito ocurre a través de la proteína STIM1 del RE interaccionando directamente con componentes de la membrana plasmática (Spasova y cols., 2006).

Recientemente, se ha observado que una reducida expresión génica (*knock-down*) o la sobreexpresión de STIM1 dan lugar respectivamente, a la reducción o amplificación de la producción de CIF, un mensajero difusible que podría ser liberado del RE a la membrana plasmática para activar los canales CRAC, indicando que STIM1 podría desencadenar la producción de CIF como consecuencia de un cambio conformacional tras el vaciamiento de Ca^{2+} del RE (Csutora y cols., 2008).

4.3.- ORAI1/CRACM1

El segundo componente proteico de los canales SOC/CRAC que ha sido identificado ha recibido los nombres de ORAI1 (Feske y cols., 2006), CRACM1 (Vig y cols., 2006) y TMEM142A (Prakriya y cols., 2006). ORAI1/CRACM1 es una proteína de 33 kdalton con cuatro dominios transmembrana y con extremos N y C terminales citoplasmáticos, presente en la membrana plasmática. Se ha observado que el producto de la expresión del gen *Orai1* es capaz de restaurar la actividad del canal CRAC hasta niveles normales en células procedentes de pacientes con una forma de inmunodeficiencia hereditaria denominada SCID (inmunodeficiencia combinada severa).

Las células de pacientes con SCID presentan una entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito defectuosa debido a la disfunción de los canales CRAC. Los enfermos con SCID son homocigóticos para una mutación *missense* (cambio de sentido) en ORAI1, habiéndose observado que la expresión del gen salvaje en las células T de estos enfermos restituye la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito (Feske y cols., 2006).

La sobreexpresión combinada de ORAI1 y STIM1 (o ORAI y STIM en las células de *Drosophila*) en células HEK293, células RBL-1 y células T Jurkat provoca un marcado aumento de I_{CRAC} (Yeromin y cols., 2006; Soboloff y cols., 2006b; Peinelt y cols., 2006). Sin embargo, estos experimentos no han permitido determinar si ORAI1 resulta esencial para la interacción entre STIM y el canal CRAC o es una proteína de la membrana plasmática reguladora del canal o una subunidad del poro del canal CRAC.

Varios grupos han estudiado el efecto de mutaciones en ORAI1 sobre propiedades del canal CRAC como la selectividad iónica, algunas de las cuales inducen una reducción en la entrada de Ca^{2+} y un aumento de la corriente de iones monovalentes, lo cual proporciona fuertes evidencias de que ORAI1 es una subunidad del poro del canal CRAC y podría constituir el filtro de selectividad para el Ca^{2+} (Prakriya y cols., 2006, Yeromin y cols., 2006).

Además de ORAI1, otros dos miembros de la familia ORAI, ORAI2 y ORAI3, son también expresados en mamíferos, por lo que la combinación heteromérica de esas proteínas podría dar lugar a canales con propiedades distintas. La sobreexpresión de ORAI3, pero no de ORAI2, en células T deficientes en ORAI1 restablece parcialmente la entrada de Ca^{2+} (Gwack y cols., 2007), mientras que la expresión combinada de ORAI1 o de ORAI2 (pero no de ORAI3) y STIM1 aumentaba notablemente la entrada de Ca^{2+} en células HEK293 (Mercer y cols., 2006). Estos datos indican que ORAI2 y ORAI3 podrían por sí mismos formar canales iónicos permeables a Ca^{2+} , ya que su expresión es capaz de restituir la actividad de los canales dependientes de depósito.

Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión de ORAI1 en células sanas provoca una disminución en la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de depósito (Soboloff y cols., 2006b). Este resultado podría ser explicado asumiendo que al menos un sensor de Ca^{2+} (STIM1) debe interactuar con cada subunidad del canal, de manera que una expresión excesiva de ORAI1 comparada con la del sensor del sensor podría interferir con el correcto acoplamiento entre ambos, produciendo una reducción en la activación de los canales dependientes de depósito.

Cabe mencionar que la expresión de TRPC1 en células HEK293 induce un pequeño incremento en la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito que se veía aumentada tras su coexpresión con STIM1. Esta corriente ocurre a través de canales catiónicos no selectivos dependientes del vaciamiento de depósito, los cuales, sin embargo, al igual que los canales CRAC, son dependientes de la

presencia de ORAI1, ya que su apagamiento génico provocaba una reducción de esta corriente (Cheng y col., 2008).

5.- NUEVA HIPÓTESIS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CRAC: PAPEL DE STIM y ORAI

Las propiedades funcionales de STIM1 y ORAI1 podrían dar cuenta de los requisitos para la activación de los canales operados por depósito: la existencia de un sensor de Ca^{2+} en el RE, la transducción de la señal del vaciamiento del depósito a la membrana plasmática y la apertura de canales de Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática (Lewis, 2007).

El esquema de la figura 3 representa un modelo de activación en que STIM1 es capaz de sentir el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y como consecuencia, agregarse en zonas contiguas a la membrana plasmática, lo cual se vería favorecido también por el desplazamiento de porciones del RE hacia la periferia celular, análogamente a la idea planteada por Patterson y colaboradores (ver apartado de hipótesis del acoplamiento conformacional). Además, el vaciamiento de los depósitos provoca que ORAI1 se concentre en la membrana plasmática en zonas contiguas a STIM1. STIM1 interactúa directamente con la proteína ORAI1, activando el canal. Este modelo es apoyado por experimentos de co-inmunoprecipitación que demuestran la interacción entre las proteínas ORAI1 y STIM1, que a su vez se incrementa tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Yeromin y cols., 2006).

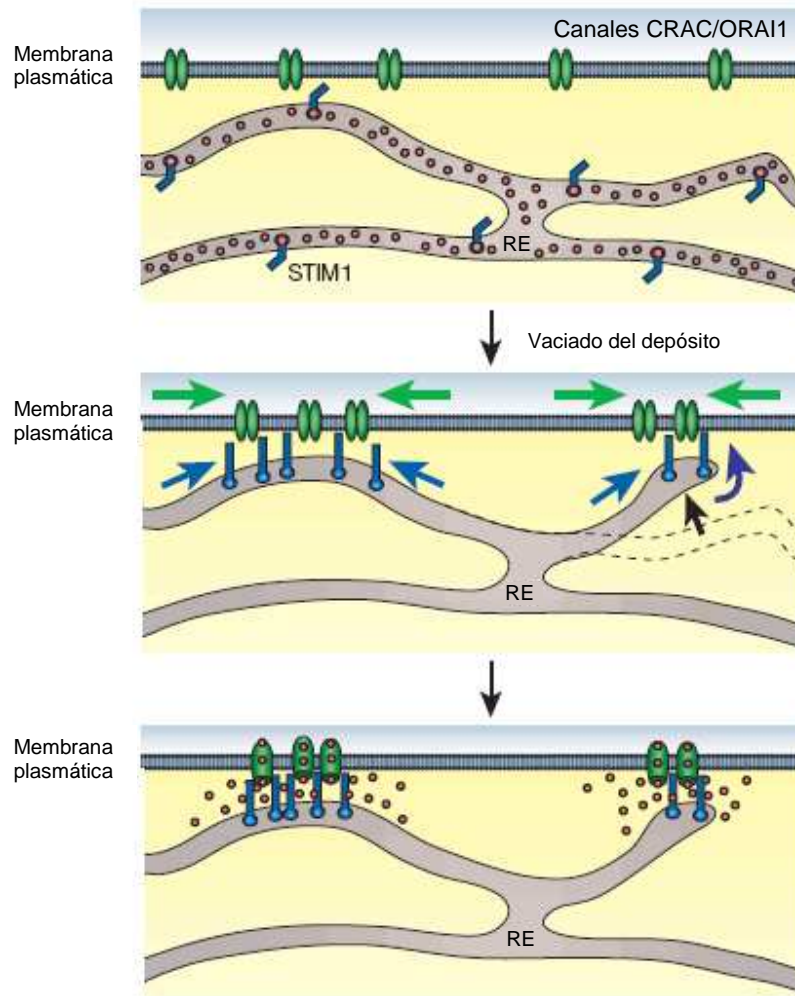


Figura 3. Participación de STIM1 y Orai1 en el proceso de activación de los canales operados por depósito. En las células en estado basal (con los depósitos llenos de Ca^{2+} panel superior), STIM1 y Orai1 se encuentran dispersas en el RE y la membrana plasmática, respectivamente. El vaciamiento del depósito (panel central) ocasiona que STIM1 se acumule en localizaciones donde el RE se encuentra en aposición a la membrana plasmática, a la que en ocasiones el propio RE también se aproxima, favoreciendo la comunicación entre ambas estructuras (flecha negra). Simultáneamente, Orai1 se acumularía en regiones de la membrana plasmática enfrentadas a los agregados de STIM1. La colocalización de STIM1 y Orai1 induce la activación de los canales dependientes de depósito y la entrada de Ca^{2+} (panel inferior). Esquema modificado de Lewis, 2007.

6.- INACTIVACIÓN DE LOS CANALES CRAC

Los canales CRAC están regulados por diferentes mecanismos inhibitorios directos e indirectos que pueden operar en una escala de tiempo de milisegundos a minutos.

6.1.- Inactivación dependiente de Ca^{2+}

Al igual que ocurre con otros canales de Ca^{2+} , como los canales dependientes de voltaje, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ actúa como regulador negativo de los canales CRAC. Los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ operan sobre los canales CRAC de acuerdo a patrones temporal y espacialmente distintos.

6.1.1.- Inactivación rápida

La inactivación rápida puede ser fácilmente visualizada mediante la aplicación de pulsos a voltajes hiperpolarizantes (> -60 mV) y presenta una cinética biexponencial con unas constantes de tiempo de 10 y 100 milisegundos (Zweifach y Lewis, 1995a; Parekh y Putney, 2005). Típicamente, la inactivación rápida se abole mediante la aplicación de altas concentraciones de BAPTA (12 mM) intracelulares, mientras que otros quelantes de Ca^{2+} con una cinética de unión a Ca^{2+} más lenta, como el EGTA, apenas afectan a este proceso. Estos resultados apoyan un modelo de inactivación en el que el Ca^{2+} actuaría en la vecindad de la boca del canal o incluso en el propio canal (Zweifach y Lewis, 1995a). Sin embargo, esta dependencia de Ca^{2+} de la inactivación rápida determina que una disminución en la amplitud de la corriente, debida a la reducción de la concentración de Ca^{2+} extracelular o a la aplicación de pulsos de voltaje a potenciales menos negativos, reduzca el grado de inactivación rápida de los canales CRAC, minimizando las diferencias observadas entre ambos quelantes de Ca^{2+} .

Por otro lado, también se ha observado que el piruvato, un sustrato necesario para que tenga lugar la respiración mitocondrial, podría ser capaz de reducir la inactivación rápida de los canales CRAC, incrementando por tanto, la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales. Estos datos indican que existe una conexión entre el metabolismo energético de la mitocondria y la regulación de los canales CRAC (Bakowski y Parekh, 2007).

La inactivación rápida de los canales CRAC es un proceso dependiente de Ca^{2+} , por lo que también se ha estudiado el papel de la calmodulina, observando que, al menos en parte, es responsable de este proceso en células hepáticas. Así, se observaba que mientras que el uso de inhibidores de la calmodulina no causaba ningún efecto sobre el proceso de inactivación rápida, la expresión de mutantes de calmodulina no funcionales causaba una reducción del 30% del componente rápido de la inactivación. Esto último sugiere, que la calmodulina podría estar unida al canal de manera que se encontrase protegida de la acción de sus inhibidores, aunque esta hipótesis no ha sido confirmada (Litjens y cols., 2004).

Recientes estudios indican que los elementos estructurales que determinan la selectividad para Ca^{2+} de los canales CRAC podrían estar también implicados en la regulación de su actividad. Esto se fundamenta en el

hallazgo de que la alteración, mediante mutagénesis, de determinados aminoácidos presentes en ORA11 altera la permeabilidad del canal, disminuyendo la selectividad para Ca^{2+} y aumentándola para Cs^{+} , junto con la disminución la inactivación rápida de los canales mutantes (Yamashita y cols., 2007).

6.1.2.- Inactivación lenta

Existe, además, un proceso de inactivación lenta dependiente de un aumento global de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que cursa a lo largo de decenas de segundos (Zweifach y Lewis, 1995b). En la inactivación lenta se pueden distinguir dos componentes: dependiente e independiente del rellenado del depósito.

Debido a que el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares es el responsable de la activación de la entrada de Ca^{2+} sería de esperar que el rellenado de los mismos provocase también su inactivación. Esta idea se basa, entre otras evidencias, en la capacidad de la tapsigargina, que previene el rellenado de los depósitos, para reducir la inactivación de I_{CRAC} en células dializadas con bajas concentraciones de EGTA (1,4 mM). Sin embargo, el hecho de que el tratamiento con tapsigargina sólo reduzca el porcentaje de inactivación de los canales CRAC, pero no lo suprima completamente, sugiere la existencia de otro mecanismo de inactivación, independiente del rellenado de los depósitos. Este mecanismo adicional de inactivación lenta podría ser el resultado de una reducción en la señal de activación de los canales CRAC, de la producción de alguna molécula efectora capaz de inhibir los canales o incluso de un cambio en los propios canales (Zweifach y Lewis, 1995b).

Las mitocondrias han sido propuestas como moduladoras de este tipo de inactivación. Esto puede deberse a su capacidad para la reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante la captación de Ca^{2+} a través de su uniportador (Hoth y cols., 1997). Sin embargo, se ha descrito que la presencia de mitocondrias funcionales es necesaria para mantener la actividad de los canales CRAC mediante la prevención de la acumulación local de Ca^{2+} en zonas cercanas a sitios implicados en su regulación (Hoth y cols., 2000; Gilabert y Parekh, 2000). Asimismo, se ha sugerido que el efecto regulador de la mitocondria también estaría relacionado con la liberación al citoplasma de algún factor capaz de modificar de la actividad de los canales CRAC (Parekh, 2003).

El Ca^{2+} intracelular tiene un efecto dual sobre I_{CRAC} ya que es capaz tanto de facilitar su activación como de modular su inactivación. El efecto modulador positivo sobre la activación parece mediado por calmodulina y que ocurre en condiciones fisiológicas. Así, se ha observado que la inhibición de calmodulina reduce la activación de I_{CRAC} en presencia de bajas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} . En este sentido, la calmodulina podría actuar de manera indirecta, al aumentar la actividad del uniportador mitocondrial y, por tanto, la capacidad quelante de la mitocondria necesaria para que I_{CRAC} se active en

condiciones de baja concentración de quelantes de Ca^{2+} , o de manera directa, estimulando los canales (Moreau y cols., 2005). En este trabajo también se estudia la participación de la calmodulina en el proceso de inactivación lenta de I_{CRAC} con procedimientos análogos a los utilizados por Litjens y colaboradores (Litjens y cols., 2004) para estudiar su participación en la inactivación rápida. Sin embargo, la calmodulina no parecía tener efecto sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} , a pesar de que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el mensajero encargado de modular este proceso (Moreau y cols., 2005).

6.2.- Otros mecanismos reguladores

También han sido descritos mecanismos reguladores de la actividad de los canales CRAC en los que el Ca^{2+} no intervendría de manera directa (Parekh y Putney, 2005).

Entre las moléculas que han sido implicadas en éstos cabe citar la esfingomielinasa (Breitthmayer y cols., 1994; Törnquist y cols., 1999), la esfingosina (Breitthmayer y cols., 1994) y diversas ceramidas (Törnquist y cols., 1999), que son capaces de reducir la entrada de Ca^{2+} inducida por taspigargina, lo que indicaría que la ruta de la esfingomielina podría estar implicada en la regulación de los canales CRAC. Además, la vía del GMPc a través de la activación de la proteína quinasa G (PKG) es capaz de estimular la recaptación de Ca^{2+} en los depósitos por lo que podría esperarse que un aumento en los niveles de GMPc inactivara la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito. Sin embargo, en plaquetas y endotelio vascular bovino el GMPc no es capaz de inactivar la entrada de Ca^{2+} por medio de la estimulación del relleno de los depósitos (Dedkova y Blatter, 2002; Trepakova y cols., 1999). En células de músculo liso vascular se ha observado que el GMPc inactiva la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito a través de la estimulación de la PKG (Moneer y cols., 2003). Sin embargo, el GMPc carece de efecto sobre la inactivación de I_{CRAC} en células RBL-1 (Parekh y Penner, 1995), células acinares pancreáticas (Gilon y cols., 1995) o en los linfocitos T (Bian y cols., 1996). Así, es probable que la modulación a través de GMPc sea específica del tipo celular.

El ácido araquidónico también ha sido propuesto como inhibidor de la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito (Luo y cols., 2001). Sin embargo, el ácido araquidónico podría actuar mediante la estimulación de la óxido nítrico (NO) sintasa III, con el consiguiente aumento del NO, que activaría la vía de la guanilato ciclasa/PKG (Moneer y cols., 2003). Por otro lado, el ácido araquidónico induce una corriente de Ca^{2+} independiente de depósito que parece mostrar un antagonismo mutuo con la entrada dependiente de depósito, de manera que el ácido araquidónico activa la entrada de Ca^{2+} independiente de depósito, por medio de la generación de NO, al mismo tiempo que inhibe la entrada dependiente de depósito en una franja de tiempo similar (Moneer y cols., 2003). El IP_4 también ha sido descrito como regulador de la

entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito sobre la que ejerce un efecto dual. Así, el IP_4 inhibe la fosfatasa de IP_3 , un enzima importante en la ruta catabólica que metaboliza el IP_3 , aumentando los niveles de IP_3 y, por ello, facilita la activación de I_{CRAC} . El IP_4 también actuaría como inhibidor de la liberación de Ca^{2+} dependiente de IP_3 (Hermosura y cols., 2000). Por tanto, los efectos potenciadores debidos a la inhibición de la fosfatasa son compensados por la reducción en la capacidad del IP_3 para vaciar los depósitos.

Bajo la denominación genérica de proteína quinasa C (PKC) se encuadra una amplia familia de proteínas serina/treonina quinasas que juegan papeles importantes en una variedad de funciones celulares y que también han sido relacionadas con el control de I_{CRAC} . Se conocen 10 isotopos descritos que han sido clasificados en tres grupos según su estructura y los cofactores que emplean. Estas 10 isoenzimas se clasifican en tres grupos atendiendo a su estructura y a los cofactores que emplean. El primer grupo está formado por las PKCs convencionales (cPKC: α , β I, β II y γ) que dependen de Ca^{2+} y DAG y son activadas por fosfolípidos (fundamentalmente fosfatidilserina) y ésteres de forbol. Las isoenzimas del segundo grupo, o PKCs nuevas (nPKC: δ , ϵ , η y θ), se activan por DAG, fosfolípidos y ésteres de forbol pero son insensibles al Ca^{2+} . El tercer grupo está constituido por las PKCs atípicas (aPKC: ζ , λ (t)), que son activadas por fosfolípidos pero son insensibles al Ca^{2+} , al DAG y a los ésteres de forbol (Breitkreutz y cols., 2007).

La activación de la PKC generalmente implica su translocación desde el citosol a la membrana, proceso que es favorecido por la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las formas dependientes de Ca^{2+} (Quest, 1996). En la membrana, las PKC convencionales interaccionan con lípidos, particularmente con la fosfatidilserina, siendo activadas por el DAG, que aumenta la afinidad de la quinasa por el Ca^{2+} . No obstante, la interacción de la PKC con la membrana parece más compleja que la mera unión del enzima con algún lípido de la misma, habiéndose descrito la existencia de proteínas llamadas receptores para PKC activada (RACK) (Mochly-Rosen y cols., 1995), que podrían mediar la interacción, proporcionando especificidad a la misma (Quest, 1996).

Tras el reconocimiento de un antígeno por el receptor de la célula T se produce la hidrólisis de fosfatidilinositol difosfato generando IP_3 y DAG. En presencia de fosfatidilserina y/o Ca^{2+} , el diacilglicerol puede activar a la PKC. La PKC ejerce sobre la corriente CRAC un efecto de retroalimentación negativa en diversos modelos celulares como las células RBL-1 (Parekh y Penner, 1995) y las células T Jurkat (Dellis y cols., 2002).

Se ha descrito que las células T expresan las isoenzimas α , β I, β II, δ , ϵ , η , ζ , θ , λ (t) (Hug y Sarre, 1993; Bauer y cols., 2000). Dellis y cols. (2002) encontraron que la PKC aceleraba el proceso de inactivación de I_{CRAC} en células T Jurkat. En sus experimentos observaron que la exposición de las células a la proteína gp 160 liberada por el virus HIV-1 reducía la amplitud de I_{CRAC} , lo cual podía ser prevenido por inhibidores de la PKC. Mediante *western blot* se reveló que la

proteína gp 160 alteraba la distribución de las isoformas α y β I, sugiriendo que estas isoformas son las implicadas en la regulación de I_{CRAC} (Dellis y cols., 2002).

Además se ha descrito que, tras la activación celular, aumentan los niveles de PKC α y de PKC β I en la fracción insoluble a triton que se corresponde con las balsas lipídicas (Nixon y McPhail, 1999), indicando que estas isoformas podrían intervenir en la señalización celular que da lugar a una correcta respuesta inmune.

Esta familia de enzimas participa además en la regulación de la expresión de genes implicados en la activación de los linfocitos T. Así, se ha observado que la activación de los factores de transcripción NFAT-1, NF κ B y AP-1 (proteína activadora 1) varía con la expresión diferencial de las isoenzimas α , ε y ζ de PKC (Genot y cols., 1995).

También se ha observado que la PKC θ regula varios factores de transcripción (NF κ B, AP-1 y NFAT) esenciales para la expresión de IL-2 y que PKC ζ y PKC ι son capaces de modular la actividad de PKC θ en la ruta de activación de NF κ B. Además, la estimulación del TCR aumenta la colocalización del complejo PKC ζ / ι - θ a las balsas lipídicas (Gruber y cols., 2008).

7.- FLUJOS IÓNICOS EN EL LINFOCITO T Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA SEÑAL DE Ca²⁺

Como se ha indicado anteriormente, las células eucariotas pueden aumentar su [Ca²⁺]_i mediante la liberación de Ca²⁺ desde depósitos intracelulares como el RE o la mitocondria o bien mediante la entrada Ca²⁺ desde el medio extracelular.

Existe una amplia variedad de canales permeables a Ca²⁺ que pueden coexistir en las membranas de diferentes tipos celulares (Figura 4). Los canales de Ca²⁺ operados por voltaje (VOC) constituyen una familia de canales muy selectivos para Ca²⁺ que se abren en respuesta a una despolarización de la membrana y consiguientemente se localizan en células excitables, como las neuronas y las células musculares. Existen canales que se abren en respuesta a cambios en ciertos parámetros físicos (temperatura, fuerzas mecánicas, etc), las cuales son a menudo miembros de la familia TRP. Por su parte, los canales operados por receptor (ROC) se abren como consecuencia de la interacción de un ligando (ej. glutamato, ATP, dopamina, etc) con su receptor que incluye un canal iónico, algunos de los cuales también forman parte de la familia TRP. Los canales operados por segundos mensajeros (SMOC) se abren tras la unión de segundos mensajeros como el AMPc, el IP₃, diversos mensajeros derivados del metabolismo lipídico, como el DAG, el ácido araquidónico y sus metabolitos o el propio Ca²⁺. Como ya se ha comentado, los canales operados por depósitos (SOC) se abren tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ y constituyen la principal vía de entrada de Ca²⁺ en células no excitables

como los linfocitos T. La entrada de Ca^{2+} también puede producirse en algunas situaciones mediante los intercambiadores $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ (NCX) operando en modo reverso.

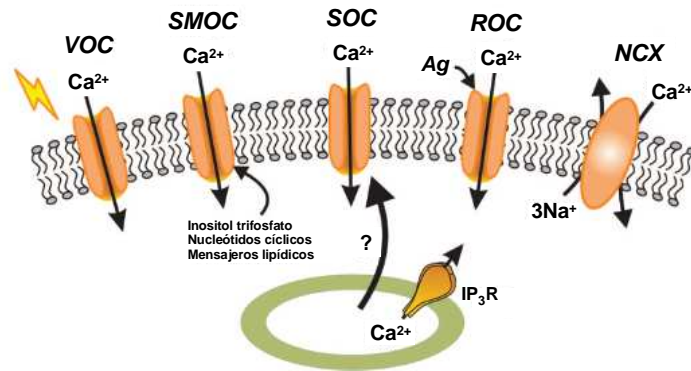


Figura 4. Vías de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. El Ca^{2+} puede entrar en las células a través de varios tipos de canales como los canales operados por voltaje (VOC), los canales operados por segundos mensajeros (SMOC), los canales dependientes de depósito (SOC), los canales operados por receptor (ROC) y los intercambiadores $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ (NCX) funcionando en modo reverso. Ag: Agonistas.

Por otra parte, las células cuentan con sistemas que transportan activamente el Ca^{2+} desde el citosol al medio externo (Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, PMCA), a los depósitos (Ca^{2+} -ATPasa de la membrana del RE, SERCA) o al interior de la mitocondria (uniportador de Ca^{2+}). La mayor parte del Ca^{2+} de las células es almacenado en el interior del RE o de las mitocondrias, uniéndose a sitios de baja afinidad en el lumen del RE o en la matriz mitocondrial. El papel de la mitocondria en la homeostasis celular del Ca^{2+} y en la regulación de los canales CRAC será tratado posteriormente con mayor detalle.

7.1- El retículo endoplásmico en la homeostasis del Ca^{2+}

El RE presenta en su membrana bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP y Mg^{2+} (SERCA) responsables de la captación de Ca^{2+} desde el citosol y que pueden ser inhibidas por compuestos como el ácido ciclopiazónico, la tapsigargina o la TBQ. Además, el RE posee una proteína, la calreticulina, que tiene una alta capacidad para unir Ca^{2+} y constituye un efectivo sistema de tamponamiento del Ca^{2+} intraluminal. De esta manera, el RE es capaz de almacenar grandes cantidades de Ca^{2+} en su interior y de intercambiarlo de manera rápida con el citosol. La concentración total de Ca^{2+} en el RE ha sido estimada en 5-50 mM (Meldolesi y Pozzan, 1998). La mayoría de este Ca^{2+} se encuentra unido con baja afinidad ($K_d = 1\text{-}4$ mM) a la calreticulina y a otras

proteínas capaces de unir Ca^{2+} como las chaperonas. El alto contenido de Ca^{2+} y la alta capacidad pero baja afinidad de los quelantes intrareticulares sugiere que la concentración de Ca^{2+} libre en el RE debe estar en el rango micromolar (300-800 μM , dependiendo del tipo celular) (Álvarez y cols., 1999).

Además, en la membrana del RE se han identificado SMOC, receptores de IP_3 (IP_3R) y receptores de rianodina (RyR), que permiten la liberación de Ca^{2+} al citosol junto al canal de fuga o *leak* que permite la salida pasiva de Ca^{2+} al citoplasma.

7.1.1.- Receptores de IP_3

Los IP_3Rs son canales permeables a Ca^{2+} de estructura tetramérica que pertenecen a la superfamilia de canales iónicos con seis dominios transmembrana cuya apertura esta regulada por dos segundos mensajeros, IP_3 y Ca^{2+} , pero también por fosforilación, proteínas accesorias o ATP (Mikoshiba, 2007). Estos canales provocan el vaciamiento de los reservorios de Ca^{2+} del RE y, consecuentemente, la activación de los canales CRAC de la membrana plasmática.

La probabilidad de apertura de los IP_3Rs está modulada de forma dual por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que a valores por debajo de 300 nM favorece el efecto del IP_3 mientras que lo antagoniza a valores superiores (Iino, 1990). Estos efectos del Ca^{2+} posibilitan el control de la liberación de Ca^{2+} desde el RE mediante mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que están implicados con fenómenos como la propagación citosólica de señales de Ca^{2+} relacionadas con el reclutamiento de IP_3R vecinos o la conveniencia de evitar la depleción completa de Ca^{2+} del RE con el consiguiente estrés reticular y la posible puesta en marcha de procesos de muerte celular (Steinmann y col., 2008).

Otro factor regulador de los IP_3R es la fosforilación del receptor. Así, el receptor del IP_3 se regula por la proteína quinasa C, por la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII) (Ferris y cols., 1991), por la proteína quinasa G (Komalavilas y Lincoln, 1994) y por la proteína quinasa A (Supattapone y cols., 1988). Esto sugiere que el IP_3R actúa como intermediario entre la señal de Ca^{2+} y la fosforilación.

Por otro lado, la concentración de Ca^{2+} dentro del RE también podría modular al IP_3R (Irvine, 1990). Así, altas concentraciones de Ca^{2+} intraluminales facilitarían la activación del IP_3R , mientras que bajas concentraciones disminuirían la liberación de Ca^{2+} , dificultando con ello una depleción completa de los depósitos.

La liberación de Ca^{2+} a través de IP_3R es un fenómeno de tipo "cuantal" (Muallem y cols., 1989), en el que por cada molécula de IP_3 se liberan 20 iones de Ca^{2+} (Berridge e Irvine, 1984). Si la liberación desde los depósitos fuera gradual, pequeñas concentraciones de IP_3 actuando durante suficiente tiempo

vaciarían completamente los depósitos de Ca^{2+} , si la SERCA estuviera inhibida y el gradiente electroquímico de Ca^{2+} fuera favorable a su salida. Además, pequeños incrementos en la concentración de IP_3 deberían producir liberaciones de Ca^{2+} progresivamente mayores. Sin embargo, ninguno de estos dos hechos es cierto; así, para un rango de concentraciones de IP_3 , la liberación de Ca^{2+} ocurre en forma de "cuantos" o cantidades relativamente fijas, y es necesario usar concentraciones supramáximas de IP_3 para vaciar los depósitos de forma efectiva (Berridge, 2007).

Se han identificado cinco genes codificantes de otros tantos IP_3Rs . De los tipos 4 y 5 no se conoce su secuencia completa, siendo los tipos IP_3R 1, 2 y 3 los mejor caracterizados (Blondel y cols., 1993; Iwai y cols., 2005). Éstos difieren en estructura química, afinidad por IP_3 y modulación por Ca^{2+} y fosforilación (Sudhof y cols., 1991; Iwai y cols., 2007).

Los linfocitos T expresan diferentes isoenzimas del IP_3R ; células T Jurkat y células B DT40 expresan IP_3R 1, 2 y 3, mientras que timocitos y esplenocitos expresan sólo IP_3R 2 y 3 (Sugiyama y cols., 1994). Se ha observado que los IP_3R 1 son fosforilados en residuos tirosina, lo cual incrementa su probabilidad de apertura, tras la activación de la célula T por medio del reconocimiento antigénico por el receptor de célula T (TCR) (Harnick y cols., 1995).

Es de destacar, la observación de algunos autores de que los IP_3R se pueden expresar en la superficie externa de la membrana de células T y B. En las células T, se ha descrito su asociación con el complejo TCR-CD3 durante su activación dependiente de antígeno (Khan y cols., 1992), por lo que muchos autores, si bien es una afirmación muy cuestionada, consideran su participación en la entrada de Ca^{2+} y en la señalización mediada por TCR (Jayaraman y cols., 1995).

En células dializadas con bajas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} (0,1 mM) y en ausencia de inhibidores de la SERCA del RE se ha observado que concentraciones supramáximas de IP_3 son incapaces, por si solas, de activar la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de depósito (Bakowski y Parekh, 2001). Sin embargo, se ha descrito que cuando las mitocondrias se encuentran en un estado energizado, inducido por la presencia de sustratos respiratorios exógenos, se reduce la cantidad de IP_3 necesaria para activar I_{CRAC} y aumenta la amplitud de corriente a iguales concentraciones de IP_3 , incrementando el rango dinámico de concentraciones en las cuales el IP_3 es capaz de estimular la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos y permitiendo que niveles más modestos de estimulación de los receptores de membrana sean capaces de activar I_{CRAC} (Gilabert y cols., 2001). Así, varios autores han observado que las mitocondrias participan en la modulación del patrón espacio-temporal de las respuestas de Ca^{2+} citosólicas inducidas por IP_3 sugiriendo que las mitocondrias van a condicionar el perfil de la señal de Ca^{2+} (Jouaville y cols., 1995; Hoth y cols., 1997).

7.1.2.- Receptores de rianodina

Los RyR son receptores de estructura homotetramérica que deben su nombre a la capacidad de la rianodina, un alcaloide presente en la planta *Ryanas speciosa*, para interactuar con ellos, con alta afinidad. La unión de rianodina al RyR estabiliza un subestado parcialmente abierto del canal, favoreciendo con ello la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Sorrentino y Volpe, 1993). Si bien los IP_3R y los RyR presentan una gran homología de secuencia y podrían derivar de una proteína ancestral común, responden primariamente a mensajeros distintos (Berridge, 1993).

Se han descrito tres tipos de RyR (Sorrentino y Volpe, 1993). El RyR1 se encuentra en el músculo esquelético, donde la señal de activación que libera el Ca^{2+} almacenado es la despolarización de la membrana plasmática. (Fleischer e Inui, 1989). En el músculo cardíaco predomina el RyR2, cuya apertura es inducida por el aumento súbito de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en su entorno inmediato (Valdeolmillos y cols., 1989). También se ha demostrado que la actividad de RyR2 puede ser modulada por otro segundo mensajero, la ADP ribosa cíclica (ADPRc) (Galione, 1992). Así, se ha observado que la ADPRc es capaz de activar los canales asociados a RyR2 en parches de membrana de retículo sarcoplásmico a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de reposo (Mészáros y cols., 1993) y que en células B pancreáticas la ADPRc también induce liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, cuya síntesis es estimulada por el aumento de la concentración de glucosa, por lo que se ha propuesto que podría estar implicada en el control de la secreción de insulina (Takasawa y cols., 1993). Por último, se ha identificado un RyR3 que es expresado ampliamente en muchos tipos celulares, incluidos los linfocitos T (Schwarzmann y cols., 2002). Sin embargo, la existencia de RyR2 y en menor medida de RyR1 también es observada en células T (Hosoi y cols., 2001). Los RyRs presentan pequeñas diferencias farmacológicas entre sí que dan lugar, por ejemplo, a la capacidad de la cafeína para activar selectivamente a los RyR1 y 2.

Una característica de los RyRs (y también de los IP_3Rs) es la de intervenir en el proceso denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) en virtud de la cual los RyRs se activan en respuesta a incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generados típicamente por la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje pero también como consecuencia de la apertura de los IP_3R y de los propios RyRs (Berridge, 1997). Este mecanismo resulta fundamental para la amplificación de la señal de Ca^{2+} iniciada por la actividad eléctrica (despolarización de la membrana celular) o por múltiples agonistas actuando sobre receptores acoplados a proteínas G (estimulación del metabolismo de los fosfoinosítoles), así como para la propagación de la misma en el interior de la célula. En la eficacia de estos procesos influye decisivamente la densidad local de los distintos tipos de canales de Ca^{2+} implicados (IP_3R , RyR y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje). Cada uno de los tipos de canales

de Ca^{2+} mencionados pueden concentrarse (formando agrupamientos o *clusters*) en determinadas zonas de las células, de manera que la activación simultánea origina incrementos locales y frecuentemente transitorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (zonas calientes, puffs o sparks). Dependiendo de la magnitud de estos incrementos locales y de la proximidad de estructuras celulares (RE, mitocondrias o membrana plasmática) con capacidad para modularlas (bien por secuestro, amortiguación, extrusión fuera de la célula o amplificación por CICR), las células logran desarrollar un rico lenguaje de señalización intracelular de Ca^{2+} (ondas de Ca^{2+} , movimientos oscilatorios, etc) pero cuya descripción en detalle queda fuera de los objetivos de esta introducción.

Aunque el IP_3 es el mensajero clave en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los linfocitos T, el RyR también contribuye a la señal de Ca^{2+} citosólica en estas células del sistema inmune. A este respecto, se ha comprobado que la ADPRc puede producir liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y que la activación del TcR puede generar un aumento en los niveles citosólicos de ADPRc en células T (Guse y cols., 1999). Estos autores también han observado que la señal de Ca^{2+} citosólica generada por la ADPRc presenta un componente dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular, si bien no involucraría a los canales dependientes de depósito (Guse, 1998).

7.1.3.- Receptores de NAADP

El ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato (NAADP) también puede movilizar Ca^{2+} desde el interior celular y regular la señalización del mismo. El NAADP es sintetizado a partir de NADP por la acción de ADPRc (ADP ribosa cíclica). Su participación y papel exacto no se conocen pero existen evidencias de que moviliza Ca^{2+} a través de un receptor específico (NAADPR) cuya naturaleza aún es desconocida pero que parece ser distinto de los IP_3Rs y los RyRs (Patel y cols., 2001).

En células T Jurkat, ha sido descrito que esta movilización de Ca^{2+} por NAADP es necesaria para una correcta señalización mediada por el TCR (Berg y cols., 2000), ya que parece preceder en el tiempo a las acciones del IP_3 y la ADPRc, proporcionando el nivel suficiente de Ca^{2+} intracelular para facilitar la activación de IP_3R y RyRs.

7.2.-Canales de potasio de la membrana plasmática

Los canales de K^+ tienen la capacidad de modular la entrada de Ca^{2+} a través de canales CRAC al hiperpolarizar la membrana celular y así, aumentar la fuerza electromotriz para la entrada de Ca^{2+} . Esta dependencia indirecta de voltaje de las corrientes de Ca^{2+} determina la modulación de los canales CRAC por el potencial de membrana, mediada por los canales de K^+ en los linfocitos T.

Los canales de K^+ de las células T humanas incluyen los canales Kv1.3 dependientes de voltaje y los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de baja (SKCa2) e intermedia conductancia (IKCa1) (Lewis, 2001; Desai y cols., 2000).

7.2.1.- Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv1.3)

Los canales de Kv1.3 están formados por cuatro subunidades. Cada subunidad consta de seis segmentos transmembrana (S1–S6) con los extremos N- y C-terminales en el lado citosólico de la membrana. El segmento S4 forma el sensor de voltaje de los canales mientras que el poro y el filtro de selectividad están delimitados por los segmentos S5 y S6, por el bucle que los une y que se inserta en la bicapa lipídica por el lado exterior de la membrana plasmática (Panyi y cols., 2004b). Los cambios en el potencial de membrana inducen un cambio conformacional en las proteínas Kv1.3 que dan lugar a la apertura del canal.

La principal corriente de K^+ dependiente de voltaje presente en células linfoides está generada por canales Kv1.3. Este canal es el responsable del mantenimiento del potencial de membrana de los linfocitos T en unos valores que oscilan entre -50 a -60 mV. Su alta sensibilidad al voltaje le permite responder a pequeñas despolarizaciones de membrana y mantener así potenciales hiperpolarizantes que favorecen la entrada sostenida de Ca^{2+} a través de los canales CRAC (Verheugen y cols., 1995). Por el contrario, el uso de inhibidores específicos de canales de K^+ como la caribdotoxina, confirmaba que el bloqueo de las corrientes de K^+ inhibía la proliferación y síntesis de IL-2 en los linfocitos T (Price y cols., 1989). Además, el bloqueo de los canales Kv1.3 con inhibidores selectivos como margatoxina y noxiustoxina causa despolarización, reduce el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ e inhibe la activación *in vitro* de células T (Leonard y cols., 1992). Asimismo, existen trabajos en los que se demuestra que la inhibición específica de Kv1.3 es suficiente para bloquear la activación de los linfocitos T al impedir la correcta señalización por Ca^{2+} necesaria en este proceso (Huh y cols., 2007).

Tanto los canales Kv1.3 como los IKCa1 regulan la señalización de Ca^{2+} a través del control que ejercen sobre potencial de membrana. La entrada de Ca^{2+} a través de canales CRAC se va a ver reducida cuando la membrana se despolariza. Sin embargo, esta despolarización de la membrana y la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ provocarán la apertura de canales Kv1.3 y canales IKCa1 respectivamente, que repolarizan la membrana y, por tanto, favorecen la entrada sostenida de Ca^{2+} a través de I_{CRAC} (Chandy y cols., 2004).

7.2.2.- Canales de potasio dependientes de calcio (IK y SK)

A principios de los años 90 se describieron en linfocitos T dos tipos de canales de K^+ activados por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$: un canal de baja

conductancia iónica, que se encuentra principalmente en células T Jurkat, y un canal de conductancia intermedia expresado en células T humanas, de rata y de ratón, así como en linfocitos B (Grissmer y cols., 1992; Partiseti y cols., 1993). El gen IKCa1 codifica para los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de conductancia intermedia en los linfocitos humanos (Fanger y cols., 1999), mientras que los canales de baja conductancia en células T Jurkat son producto del gen SKCa2 (Cahalan y cols., 2001).

Estos canales son tetrámeros cuyas subunidades se encuentran formadas por seis segmentos transmembrana. La región del poro está formada por el bucle generado por la unión de los segmentos S5 y S6 de cada subunidad y contiene el filtro de selectividad iónica. Por su parte, el sensor de Ca^{2+} se encuentra en el extremo C terminal, que se localiza en la cara citoplasmática de la membrana. A diferencia de los canales Kv1.3, los canales dependientes de Ca^{2+} han perdido el sensor de voltaje, por lo que la apertura de este tipo de canales se produce como consecuencia de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. El umbral de activación de los canales se encuentra entre 200 y 300nM de $[Ca^{2+}]_i$, la activación media máxima ocurre entre 300 y 450nM de $[Ca^{2+}]_i$ y la máxima conductancia requiere 1 μ M de $[Ca^{2+}]_i$ (Grissmer y cols., 1993).

Los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , contribuyen al mantenimiento del potencial de membrana negativo, llegándose a valores de -80mV, por lo que, al igual que en caso de los canales Kv1.3, regulan positivamente la entrada de Ca^{2+} . Además, estos canales también pueden ser modulados farmacológicamente, de manera que también son sensibles a la caribdotoxina. Así, la margatoxina, la cual no tiene efecto sobre los canales KCa, es capaz de despolarizar la célula a valores similares a los que se consiguen con caribdotoxina (Leonard y cols., 1992), indicando que Kv1.3 es el principal responsable de mantener el potencial de membrana en estas células. Sin embargo, el uso de potentes inhibidores farmacológicos selectivos para canales KCa pero no de canales Kv, como TRAM-34, reducen la entrada de Ca^{2+} en células T y en células T Jurkat, indicando que los canales KCa juegan un importante papel en la señal de Ca^{2+} en células T (Fanger y cols., 2001).

7.3.- Canales de cloro y control del volumen celular

Los canales de cloro dependientes de volumen son muy abundantes en las células T y juegan un papel crucial en la regulación de los cambios de volumen producidos por diferencias de osmolaridad entre el medio intracelular y el extracelular, frecuentes durante la diapédesis o extravasación leucocitaria.

La recuperación de la homeostasis frente a cambios osmóticos en el medio se logra por la existencia de mecanismos que permiten el control del volumen celular y en los que participan diferentes canales iónicos. Así, en un medio hipoosmótico, en el que la célula incrementa su volumen, se activan mecanismos de compensación en los que intervienen flujos de salida de iones

Cl^- y K^+ acompañados de moléculas de agua, que permiten así a la célula reducir su volumen.

En este proceso, conocido como RVD (reducción reguladora de volumen) se abren inicialmente los canales de Cl^- , lo cual induce la despolarización de la membrana y secundariamente la activación de los canales $\text{Kv}1.3$ que regulan la salida de K^+ . Esta pérdida de iones intracelulares favorece la salida de agua, recuperándose el volumen original de la célula (Cahalan y cols., 2001). Así, se ha postulado que los canales $\text{Kv}1.3$ juegan un papel importante en este proceso regulador del volumen. Se ha podido comprobar que la expresión de $\text{Kv}1.3$ en líneas celulares del sistema inmunitario desprovistas de canales dependientes de voltaje es suficiente para dotar a estas células de un mayor control del volumen celular, reconstituyendo por tanto, su capacidad para regular su volumen (Deutsch y Chen, 1993).

Además, se ha observado que el bloqueo de los canales de Cl^- en linfocitos T estimulados con concanavalina A provocaba la inhibición de la entrada de Ca^{2+} , así como de la expresión de IL-2 y la proliferación celular, sugiriendo que existe una interacción entre los canales de Cl^- (posiblemente del tipo ClC-3) y los canales CRAC de la membrana plasmática durante la activación de linfocitos T (Wang y cols., 2006).

7.4.- Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática

En células T humanas, incluidas las células T Jurkat, la extrusión de Ca^{2+} al medio extracelular se lleva a cabo principalmente mediante la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP y Mg^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), aunque, como ya se ha comentado, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ también podría contribuir a este proceso (Lewis, 2001).

La PMCA deriva de una familia multigénica codificada por cuatro genes diferentes denominados PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4. Cada isoforma de la PMCA puede mostrar variabilidad estructural, la cual es generada por procesamiento alternativo de los transcritos primarios, originando al menos 26 isoformas distintas (Zylińska y Soszyński, 2000). La PMCA posee 10 segmentos que atraviesan la membrana plasmática, mientras que los extremos carboxilo y amino se localizan en la parte citoplasmática de ésta. En el lazo intracelular, limitado por los segmentos transmembrana 4 y 5, contiene el dominio catalítico, el cual incluye el sitio de unión del ATP, mientras que el largo extremo carboxilo terminal, donde se encuentra el sitio de unión a Ca^{2+} -calmodulina, constituye el principal dominio regulatorio de la PMCA (Penniston y Enyedi, 1998).

Los principales factores moduladores de la PMCA son el Ca^{2+} y la PKC. Así, después del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la velocidad de salida de Ca^{2+} a través de la PMCA también aumenta (Bautista y cols., 2002). Sin embargo, en células acinares pancreáticas se ha observado que cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es aproximadamente 200 nM, la velocidad de extrusión es la mitad de la

velocidad máxima mientras que a $[Ca^{2+}]_i$ superiores a 400 nM los mecanismos de extrusión se saturan, por lo que los mecanismos de extrusión parecen ser más importantes cuando la $[Ca^{2+}]_i$ es cercana a los niveles basales que con niveles altos (Camello y cols., 1996). Por otra parte, se ha observado que la isoforma presente en células T Jurkat contiene un dominio C-terminal citoplasmático autoinhibitorio, de manera que la unión a Ca^{2+} -calmodulina disipa lentamente la inhibición de la PMCA (Penniston y Enyedi, 1998). Asimismo, la fosforilación del dominio C-terminal por la PKC también disiparía la autoinhibición de la PMCA, lo cual podría explicar la reducción del contenido de Ca^{2+} en células T Jurkat provocado por los ésteres de forbol (Balasubramanyam y Gardner, 1995). Estos estudios sugieren que la modulación de la PMCA por múltiples rutas colabora en el procesamiento de la señal de Ca^{2+} en células T y, por tanto, contribuiría tanto a la dinámica como a la estabilidad de la señalización por Ca^{2+} en estas células.

7.5.- Intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} de la membrana plasmática

Además de la PMCA, la membrana plasmática de la mayoría de las células animales presenta el intercambiador de Na^{+}/Ca^{2+} , que también contribuye a la extrusión de Ca^{2+} cuando se eleva la $[Ca^{2+}]_i$. No obstante, el movimiento del Ca^{2+} mediado por el intercambiador puede cambiar de dirección durante el ciclo celular, con las variaciones del potencial de membrana y/o cuando se altera la concentración citosólica de Na^{+} o de Ca^{2+} (Annunziato y cols., 2004).

El intercambio Na^{+}/Ca^{2+} es electrogénico, pues su estequiometría es $3Na^{+}:1Ca^{2+}$ (Hilgemann y cols., 1991). Por lo tanto, se crea una corriente eléctrica hacia el citoplasma por el movimiento de una carga positiva neta. Además, el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} es sensible a cambios en el potencial de membrana y al gradiente de Na^{+} .

En algunos tipos celulares, como los mastocitos, se ha observado que al reducir la $[Ca^{2+}]_i$ el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} previene la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales de Ca^{2+} dependientes de depósito (Aneiros y cols., 2005). Sin embargo, múltiples estudios apuntan a que la contribución del intercambiador en el control de la $[Ca^{2+}]_i$ y, por tanto, en la regulación de los canales CRAC en linfocitos T y en células T Jurkat es mínima o inexistente. Así, la inhibición del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} , mediante el reemplazo del Na^{+} extracelular por Li^{+} , no parece afectar a la $[Ca^{2+}]_i$ en linfocitos T y células T Jurkat tratadas con tapsigargina (Donnadieu y col, 1992). Además, en experimentos realizados en presencia de tapsigargina, antimicina y oligomicina (para eliminar la contribución del RE y de la mitocondria en la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$) y en ausencia de Na^{+} extracelular, se observa que el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} no parece contribuir significativamente en la reducción de la concentración de Ca^{2+} en células T Jurkat (Bautista y cols., 2002).

7.6.- Canales MagNum/MIC de la membrana plasmática

En muchos tipos celulares, incluyendo células RBL-1 (Hermosura y cols., 2002), células T Jurkat (Prakriya y Lewis, 2002) y células HEK-293 (Nadler y cols., 2001), se ha observado la existencia de otra corriente catiónica regulada por Mg^{2+} y ATP.Mg, no dependiente de depósito y que puede activarse en paralelo con I_{CRAC} , contaminando sus registros. Estos canales fueron denominados inicialmente como MagNum (canal regulado por nucleótidos de Mg^{2+}) (Nadler y cols., 2001), aunque algunos autores también se refieren a ellos como MIC (canal catiónico inhibido por Mg^{2+}) (Prakriya y Lewis, 2002).

La actividad de los canales MagNum puede ser completamente suprimida mediante la inclusión en la pipeta de registro de ATP.Mg en el rango milimolar (1-2 mM) (Nadler y cols., 2001). Sin embargo, en ausencia de Mg^{2+} , la sal de Na^+ del ATP no es capaz de inhibir la corriente MagNum, indicando que el Mg^{2+} es un factor o cofactor necesario para que tenga lugar esta inhibición. En células HEK-293, 3 mM de Mg^{2+} libre es capaz de suprimir la corriente MagNum (Nadler y cols., 2001) incluso en ausencia de ATP, mientras que en células RBL-1, era suficiente con 1 mM de Mg^{2+} para producir el mismo efecto (Hermosura y col, 2002).

Durante muchos años la corriente MagNum/MIC, codificada por el gen TRPM7 (Nadler y cols., 2001), ha sido confundida con corrientes dependientes de depósito, debido a que las primeras eran obtenidas con soluciones intracelulares conteniendo bajas o nulas concentraciones de ATP.Mg, que han sido tradicionalmente usadas para estudiar I_{CRAC} .

Los canales MagNum/MIC comparten algunas características con los canales CRAC como una alta conductancia para iones monovalentes en ausencia de iones divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} . Por el contrario, los canales MagNum/MIC difieren de los canales CRAC en aspectos tan variados como el modo de activación, la selectividad y conductancia iónicas, la farmacología o su cinética.

Los canales MagNum/MIC no son activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y el relleno de los mismos no es capaz de inactivarlos. La corriente MagNum/MIC es suprimida por la presencia de Mg^{2+} o ATP.Mg intracelulares, circunstancia ésta que no afecta al mecanismo de apertura de los canales CRAC (Prakriya y Lewis, 2003).

La corriente MagNum/MIC se desarrolla muy lentamente, activándose alrededor de 100 segundos después de la diálisis con soluciones intracelulares libres de $MgCl_2$ y de ATP.Mg (Hermosura y cols., 2002). Esto puede provocar el solapamiento con la corriente CRAC cuando es activada mediante la depleción pasiva del RE y en ausencia de Mg^{2+} y ATP.Mg, lo cual puede ser fácilmente solucionado si es usado un método de vaciado activo como la diálisis con altas concentraciones de IP_3 o la aplicación de un ionóforo de Ca^{2+}

como ionomicina, provocando una rápida activación de I_{CRAC} que adquiere su máxima amplitud alrededor de 20 segundos después del tratamiento.

Los canales MagNum/MIC y CRAC difieren también en su selectividad iónica. Los canales MagNum/MIC son permeables tanto a Ca^{2+} como a Mg^{2+} a potenciales de membrana negativos (Nadler y cols. 2001), mientras que los canales CRAC son conocidos por su alta selectividad para Ca^{2+} respecto del resto de iones divalentes, incluyendo el Mg^{2+} (Prakriya y Lewis, 2002). Por otra parte, en ausencia de iones divalentes en el medio extracelular, la corriente de Na^+ a través de los canales CRAC es transitoria mientras que a través de los canales MagNum/MIC es sostenida (Prakriya y Lewis, 2002; Hermosura y col, 2002).

La corriente unitaria de Na^+ a través de los canales MagNum/MIC estimada mediante análisis de las fluctuaciones de las corrientes globales es de 40 pS mientras que para los canales CRAC es considerablemente más pequeña (alrededor de 0,2 pS) (Prakriya y Lewis, 2002).

También existen diferencias en cuanto a la permeabilidad para Cs^+ , que es muy superior en canales MagNum/MIC que en los canales CRAC. Así, se ha estimado que la relación de la razón de permeabilidad para Cs^+ y Na^+ (P_{Cs}/P_{Na}) es de 0,13 en los canales CRAC y de 1,2 en el caso de los canales MagNum/MIC (Prakriya y Lewis, 2002).

Asimismo, existen diferencias farmacológicas entre los canales CRAC y los MagNum/MIC. Por ejemplo, concentraciones micromolares de SKF 96365 bloquean eficazmente los canales CRAC pero carecen de efecto sobre los canales MagNum/MIC (Prakriya y Lewis, 2002). Análogamente, altas concentraciones (20–40 μM) de 2-APB son capaces de inhibir I_{CRAC} completa e irreversiblemente, mientras que sobre $I_{MagNum/MIC}$ sólo causan una moderada inhibición que es rápidamente reversible. Además, aunque bajas concentraciones de 2-APB (5 μM) aumentan I_{CRAC} , carecen de efecto sobre $I_{MagNum/MIC}$ (Prakriya y Lewis, 2001; Hermosura y col, 2002). Por otro lado, los canales MagNum/MIC son bloqueados por espermina y por $GTP\gamma S$, un análogo de GTP no hidrolizable, actuando desde la cara interna de la membrana celular de manera independiente de Mg^{2+} y de ATP. Sin embargo, los canales CRAC son insensibles a espermina y son bloqueados por $GTP\gamma S$ sólo cuando está presente antes del vaciado del depósito y de la activación de I_{CRAC} (Prakriya y Lewis, 2003).

7.7.- Otros canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática

Los canales CRAC no son los únicos canales de Ca^{2+} presentes en linfocitos T, sino que podrían coexistir con otros como los canales CRANC (canales catiónicos no selectivos activados por liberación de Ca^{2+}), anexina V, CD20 y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

Los canales CRANC constituyen otro tipo de canales dependientes de depósito que están presentes tanto en células T de sangre periférica como en células T Jurkat. Estos canales presentan mayor conductancia unitaria (18–27 pS) que los canales CRAC y no son activados cuando se produce la diálisis del citosol durante registros electrofisiológicos de célula entera, por lo que es posible que en su activación intervenga un factor soluble (CIF) del citosol celular como se ha comentado anteriormente (Su y col., 2001).

Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos (fosfatidil serina) dependientes de Ca^{2+} capaces de formar canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La anexina V (también llamada endonexina II) es expresada en linfocitos T y B donde se desconoce su función fisiológica (Kourie y cols., 2000). En linfocitos T se ha propuesto que anexina V está implicada en la entrada de Ca^{2+} inducida por H_2O_2 (Kubista y col., 1999), pero no se ha esclarecido si funcionaría como un activador de canales de Ca^{2+} o como un canal por sí mismo.

CD20 es una glicoproteína de la superficie de las células B normales y de algunas células B tumorales (Grafton y Thwaite 2001), que podría funcionar como canal de Ca^{2+} (Bubien y cols., 1993). Asimismo, se ha descrito una débil expresión del antígeno CD20 en un subconjunto de linfocitos T en sangre periférica (Hultin y col., 1993). La propuesta de que CD20 pudiera actuar como un canal de entrada de Ca^{2+} en linfocitos no es completamente aceptada y existe la posibilidad de que sea una subunidad reguladora de otro canal de Ca^{2+} en lugar de constituir un canal por sí mismo (Grafton y Thwaite, 2001).

Por último, se ha observado la presencia de proteínas que forman parte de canales dependientes de voltaje de tipo L en células T Jurkat. Sin embargo, la simple presencia de estas proteínas en linfocitos no implica que este tipo de canal se expresen ni que tenga algún papel funcional en este tipo celular como lo explica el hecho de que no se observen cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en linfocitos T despolarizados con una solución de alto potasio o en su proliferación inducida por concanavalina A tras el tratamiento con nifedipino (Grafton y Thwaite, 2001; Wang y cols., 2006).

8.- LA MITOCONDRIA Y SU PAPEL REGULADOR DE LA SEÑAL DE Ca^{2+} CITOSÓLICA

Las mitocondrias son organelas citoplasmáticas de aspecto filiforme con diámetros comprendidos entre 0,5 y 1 μm , que intervienen decisivamente en el abastecimiento energético a la célula mediante la producción de ATP, y en la regulación de los niveles de segundos mensajeros como el Ca^{2+} o de especies reactivas del oxígeno (ROS). Además, se ha observado que las mitocondrias participan en las fases iniciales del proceso de muerte celular programada o apoptosis (Stout y cols., 1998; Bernardi y cols., 1999). Su capacidad de asociación a los microtúbulos las convierte en orgánulos móviles, capaces de desplazarse activamente por el citoplasma.

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la homeostasis celular del Ca^{2+} al captar o liberar grandes cantidades de este catión cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se eleva o desciende respecto de determinados valores críticos. Estos valores críticos están en relación con las afinidades relativas de los sistemas de transporte iónico presentes en la mitocondria. Así, se ha observado el aumento concomitante del contenido de Ca^{2+} mitocondrial debido a la captación de Ca^{2+} por este orgánulo, al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la estimulación celular (Hajnoczky y cols., 1995). Este papel como reservorios intracelulares de Ca^{2+} está relacionado además con su función energética ya que existen tres deshidrogenasas mitocondriales, implicadas en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que son activadas por niveles micromolares de Ca^{2+} , con la consiguiente activación de la respiración celular y producción de ATP, a través del proceso de fosforilación oxidativa (Denton y McCormack, 1990; Jouaville y cols., 1999).

Al objeto de poder soportar el gradiente electroquímico necesario para desempeñar su función energética la membrana mitocondrial interna es especialmente impermeable a los iones, gracias a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina. Por el contrario, la membrana externa es más permeable y debido a la presencia de la porina, un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), permite el paso de metabolitos con pesos moleculares de hasta a 6.000 dalton (Figura 5A).

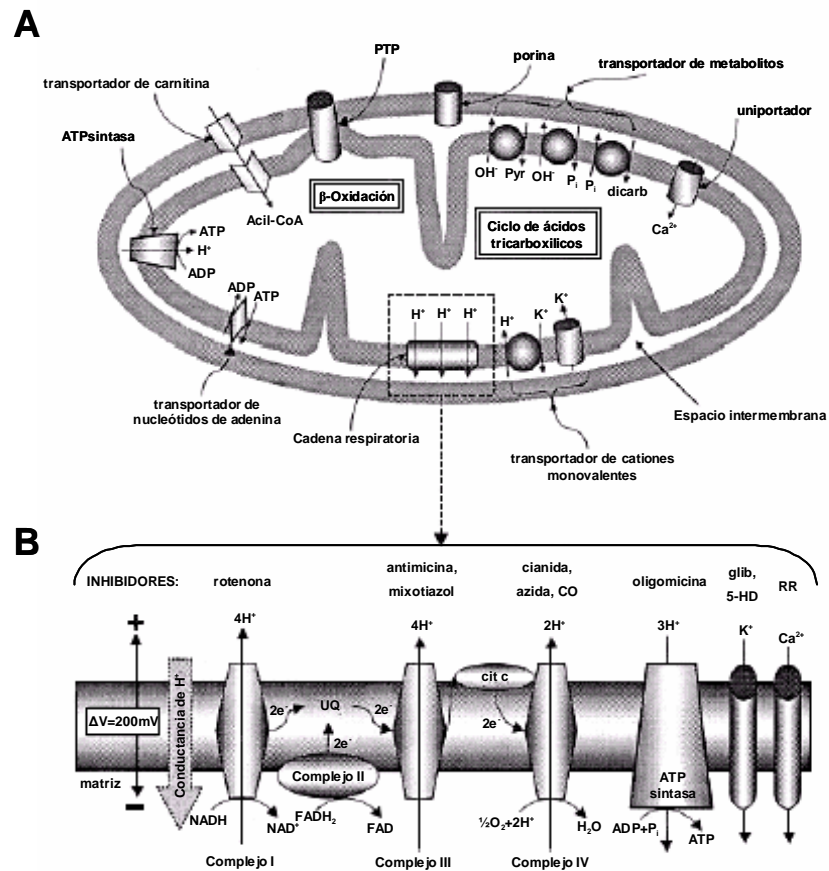


Figura 5. Esquema de la mitocondria y de los componentes moleculares implicados en el transporte de Ca^{2+} y la fosforilación oxidativa. (A) Representación esquemática de la mitocondria (ver texto). MPTP: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial; Pyr: piruvato; UQ: ubiquinona (coenzima Q); cit c: citocromo c; dicarb: dicarboxilato; 5-HD: 5-hidroxicanoato; Glib: glibenclamida; RR: rojo de rutenio. (B) Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial mostrando los sitios de acción de los fármacos inhibidores de los diferentes complejos que la forman. Por claridad algunos elementos relevantes han sido omitidos e incluidos en la figura 6.

En la membrana interna de la mitocondria tiene lugar el proceso metabólico de la fosforilación oxidativa, llevado a cabo por una serie de complejos enzimáticos (complejos I, II, III y IV) conocidos como cadena de transporte electrónico, los cuales catalizan una serie de reacciones redox a partir de moléculas como el NADH y FADH_2 , produciéndose la liberación de electrones que son transportados secuencialmente entre los diferentes complejos y la producción de protones que son liberados al espacio intermembrana. Esto genera un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial, cuya energía será utilizada por la ATP sintasa (o complejo V) para la síntesis de ATP.

En la cadena de transporte electrónico, cada uno de los cuatro complejos es capaz de catalizar la transferencia de electrones a través de una porción de la cadena. Los complejos I y II catalizan la transferencia de electrones procedentes del ciclo de Krebs a la ubiquinona a partir de dos donadores electrónicos diferentes: NADH (complejo I) y succinato (complejo II). El complejo III transporta electrones desde la ubiquinona al citocromo c, y el complejo IV completa la secuencia transfiriendo electrones desde el citocromo c al O₂ (Figura 5B). Este flujo de electrones hace posible el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna haciendo que la matriz sea alcalina con respecto al espacio intermembrana. Este gradiente de protones suministra la energía necesaria (fuerza protón-motriz) para la síntesis de ATP, por un complejo proteico de la membrana interna denominado ATP sintasa. De esta manera, la fosforilación oxidativa produce la mayor parte de ATP requerido por las células aerobias, el cual es liberado de la mitocondria mediante el translocador de nucleótidos de adenina (ANT_m) de la membrana interna mitocondrial (Figura 5A).

Como ya se ha mencionado, gracias a su capacidad para precipitar en su matriz Ca²⁺ en forma de fosfatos, las mitocondrias participan, junto con el RE y las bombas iónicas y canales localizados en la membrana celular, en la regulación de la [Ca²⁺]_i. Se han descrito tres sistemas de transporte implicados la entrada y salida de Ca²⁺ en las mitocondrias: el uniportador de Ca²⁺, el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y el intercambiador Ca²⁺/H⁺ (Figura 6).

El uniportador de Ca²⁺ es un transportador electrogénico que desplaza de forma selectiva Ca²⁺ al interior de la mitocondria con una baja afinidad y una alta capacidad (Gunter y cols., 1994). Se comporta como un canal iónico que deja pasar Ca²⁺ con una baja afinidad por el Ca²⁺ (K_m = 20 μM) (Palmero y cols., 1995) que determina que sea el sistema dominante de transporte sólo cuando las [Ca²⁺]_i se sitúan muy por encima (2-100 μM) de las alcanzadas durante la activación (alrededor de 1 μM) donde la PMCA y la SERCA son los principales sistemas de transporte de Ca²⁺ (Alonso y cols., 2006). El uniportador es inhibido selectivamente por Ru 360, y de forma no competitiva y escasa selectividad por el rojo de rutenio (Matlib y cols., 1998; Kirichok y cols., 2004).

El intercambiador Na⁺/Ca²⁺ impide que la mitocondria acumule cantidades excesivas de Ca²⁺ a pesar del elevado potencial negativo de la membrana mitocondrial, generado por la salida de protones a través de la cadena de transporte electrónico. El intercambiador Na⁺/Ca²⁺ media el transporte de Ca²⁺ al citosol con una estequiometría 3 Na⁺:1Ca²⁺. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los tejidos, donde se trata de un intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (salida dependiente de Na⁺), en el hígado la salida de Ca²⁺ tendría lugar independientemente de la presencia de Na⁺ en el citosol y ocurre a través del intercambiador Ca²⁺/H⁺ mitocondrial (Crompton y Heid, 1978; Crompton y cols., 1978).

Además de estos sistemas de transporte, en hígado de rata se ha descrito una vía rápida de captación de Ca^{2+} , conocida como RaM, que serviría como mecanismo de entrada adicional al del uniportador. Sin embargo, también existe la posibilidad de que el uniportador fuera capaz de secuestrar Ca^{2+} de dos formas distintas, la recaptura lenta descrita anteriormente y una captación rápida de Ca^{2+} que se activaría durante 1 segundo y a menores concentraciones de Ca^{2+} (171 nM frente a los ~ 400 nM necesarios para la recaptura lenta en hepatocitos), ya que ambos procesos pueden ser inhibidos por rojo de rutenio. La captación mitocondrial de Ca^{2+} se produce durante las elevaciones fisiológicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y permite que la célula pueda incrementar en paralelo su actividad metabólica (Sparagna y cols., 1995).

En algunas ocasiones, la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria puede producirse a través del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP). Así, en condiciones donde la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se encuentre sustancialmente elevada de forma sostenida, como ocurre en los procesos neurodegenerativos producidos por isquemia o excitotoxicidad, el uniportador se mantiene activo debido a su baja afinidad, permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, mientras que los sistemas responsables de la extrusión del Ca^{2+} mitocondrial se saturan. Dichas situaciones implican el aumento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial mediante la formación del MPTP, cuya apertura conlleva la disipación del potencial electroquímico mitocondrial, la liberación de sustancias, tanto de la matriz como del espacio intermembrana, y el desencadenamiento de programas de muerte celular o apoptosis. De esta manera, se ha propuesto que varios factores pro-apoptóticos, incluyendo miembros de la familia de proteínas Bcl-2 y especies reactivas de oxígeno (ROS), regulan la sensibilidad a Ca^{2+} de los IP_3Rs del RE y del MPTP de la mitocondria, facilitando la entrada en apoptosis de la célula (Hajnóczky y col., 2006).

Por otro lado, la transferencia local de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria permite la liberación de Ca^{2+} del RE y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, necesario para la activación del ciclo de Krebs y la generación de ATP, pero también la propagación de la señal de Ca^{2+} a la mitocondria también podría iniciar la muerte celular a través de la apertura del MPTP.

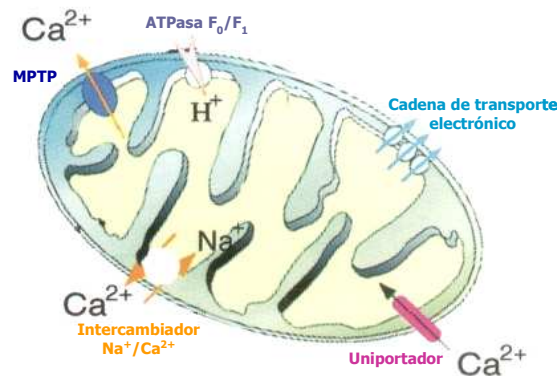


Figura 6. Mecanismos implicados en la regulación mitocondrial de la concentración de Ca^{2+} citosólico y en la generación de ATP. MPTP: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.

De lo que acabamos de describir se deduce que la concentración de Ca^{2+} mitocondrial ($[Ca^{2+}]_m$) depende del balance entre la entrada de Ca^{2+} a través del uniportador y la salida mediante el intercambiador Ca^{2+}/Na^+ o Ca^{2+}/H^+ . En un principio se pensó que, debido a la baja afinidad del uniportador por el Ca^{2+} , las $[Ca^{2+}]_i$ ($0,5-2\mu M$) alcanzadas durante la actividad celular normal eran insuficientes para activar una entrada masiva de Ca^{2+} en la mitocondria y que, por tanto, ésta era insensible a la señal de Ca^{2+} citosólica. Hoy se sabe que esto no es así y que la mitocondria participa eficazmente en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$. De esta forma, cuando la célula no es estimulada y, por tanto, la $[Ca^{2+}]_i$ basal está por debajo del nivel de afinidad del uniportador, la $[Ca^{2+}]_m$ presenta valores parecidos a los de la $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, cuando la $[Ca^{2+}]_i$ que rodea a la mitocondria se sitúa dentro del rango de afinidad del uniportador, el potencial electroquímico de la membrana mitocondrial favorece la entrada de Ca^{2+} y la elevación transitoria de la $[Ca^{2+}]_m$ (Gunter y cols., 1998; Rizzuto y cols., 1994). La mitocondria puede captar enormes cantidades de Ca^{2+} siempre que se generen microdominios de concentraciones Ca^{2+} capaces de activar el uniportador de Ca^{2+} . De hecho, el uso de sondas de Ca^{2+} basadas en proteínas (acuorinas) dirigidas a la mitocondria ha revelado que la mitocondria sufre cambios de la $[Ca^{2+}]_m$ en el rango milimolar (Montero y cols., 2000). Hay que destacar que existe una cierta colocalización entre las mitocondrias y los canales de Ca^{2+} tanto de la membrana plasmática como del RE. Se ha demostrado que las mitocondrias constituyen una red o entramado y que pueden estar muy cerca e incluso en contacto directo con la membrana del RE, quedando en consecuencia expuestas a los microdominios de Ca^{2+} generados por la liberación del mismo desde el IP_3R (Rizzuto y cols., 1993; Rizzuto y cols., 1998). Ello explica probablemente los resultados de un estudio reciente que sugiere que, en realidad, esencialmente todo el Ca^{2+} que entra por canales operados por voltaje en células cromafines bovinas sería captado por la mitocondria (Villalobos et al., 2002). Asimismo, en hepatocitos también existen

evidencias sobre la participación de las mitocondrias en la señal de Ca^{2+} , ya que se ha observado que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en estas células también provoca una elevación del contenido de Ca^{2+} mitocondrial, debido a la captación de Ca^{2+} por este orgánulo (Hajnóczky y cols., 1995). Esta elevada capacidad de transporte de Ca^{2+} y la proximidad entre las mitocondrias y el RE (Csordás y cols., 1999) determina también que la liberación de Ca^{2+} del RE induzca cambios más amplios en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ que en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Lin y cols., 2005).

Las interacciones entre el RE y la mitocondria son importantes en el control de la señal de Ca^{2+} y, por tanto, de aquellos procesos que dependen de esta señalización. La proximidad entre ambos orgánulos es necesaria para que el uniportador mitocondrial, con baja afinidad para el Ca^{2+} , sea capaz de acumular rápidamente en su interior el Ca^{2+} liberado por el RE, ya que de esta manera la mitocondria estaría expuesta a microdominios de alta $[\text{Ca}^{2+}]$ originados como consecuencia de la salida de Ca^{2+} a través de los canales presentes en el RE. Esta captura del Ca^{2+} mitocondrial tiene importantes efectos reguladores entre los que se pueden citar: (a) la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el espacio intermembrana, indistinguible de la presente en el citosol, modula la actividad de transportadores de metabolitos de la mitocondria, (b) el secuestro de Ca^{2+} por la mitocondria modula la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ local, y por tanto, regula la actividad de los canales de liberación de Ca^{2+} del RE, IP_3R y RyR , los cuales son modulados alostéricamente por Ca^{2+} y (c) la $[\text{Ca}^{2+}]$ intramitocondrial regula la actividad de tres enzimas deshidrogenasas que participan en el ciclo de Krebs (piruvato deshidrogenasa, NAD^+ -isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa) (Pizzo y Pozzan, 2007).

Por otro lado, como se ha comentado, el RE es capaz de desplazarse hacia la membrana plasmática facilitando el acoplamiento entre STIM1 del RE y ORAI1 de la membrana plasmática. El hecho de que la entrada de Ca^{2+} esté localizada en pequeños dominios de la superficie celular, allí donde tengan lugar las uniones entre el RE y la membrana plasmática, podría tener importantes consecuencias sobre la regulación y la persistencia de la señal de Ca^{2+} mediada por canales CRAC en células T y, por tanto, en el desarrollo de su activación (Luik y Lewis, 2007).

Como ya se descrito anteriormente, también existen señales subcelulares (*puffs*, *sparks*,...) que son unidades fundamentales de la señal de Ca^{2+} (Berridge, 2006) generadas a través de los canales intracelulares de Ca^{2+} , como los IP_3Rs o RyRs . Durante la apertura de los IP_3Rs en las zonas donde ocurren estas señales subcelulares, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta y puede producir cambios en procesos dependientes de Ca^{2+} de forma rápida y circunscrita a esa zona. Así, se ha observado que la activación sincronizada de los IP_3Rs produce aumentos de Ca^{2+} localizados en zonas de contacto mitocondria-RE que incluso pueden llegar a ser hasta 20 veces superiores a los aumentos globales. Esto produce una gran entrada de Ca^{2+} dentro de la mitocondria, además parece que cada lugar de entrada de Ca^{2+} mitocondrial está asociado a un grupo de IP_3R y que

los IP₃Rs y las mitocondrias pudieran estar estratégicamente situados permitiendo que cada lugar de entrada de Ca²⁺ se asocie con zonas de altas concentraciones de Ca²⁺. De esta forma, la activación sincronizada de cada grupo de IP₃Rs optimiza la entrada de Ca²⁺ mitocondrial. Estos estudios fueron realizados en células permeabilizadas y parece ser que con dosis supramáximas de IP₃ la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos se asocia con una entrada de Ca²⁺ mitocondrial, mientras que bajas dosis de IP₃ producen respuestas mitocondriales muy pequeñas. Esto podría deberse a que, durante una señal de Ca²⁺ elemental, se pueden activar señales de Ca²⁺ mitocondriales individuales, mientras que la activación sincronizada de estas señales elementales puede producir respuestas de Ca²⁺ mitocondriales de mayor amplitud que sí son capaces de responder adecuadamente ante el estímulo. De esta forma se entiende cómo los picos y oscilaciones de Ca²⁺ citosólico producidos por la activación periódica y sincronizada de los IP₃Rs, pueden llegar a ser unos eficaces moduladores de la cantidad de Ca²⁺ mitocondrial y, en definitiva, del metabolismo celular energético (Csordás y cols., 1999).

9.- REGULACIÓN MITOCONDRIAL DE LOS CANALES CRAC

Dado que la mitocondria es un componente clave en los mecanismos de regulación de la [Ca²⁺]_i es de esperar que influya sobre la regulación dependiente de Ca²⁺ de los canales CRAC de la membrana plasmática. Se ha podido determinar que la mitocondria es capaz de captar Ca²⁺ tras elevaciones de la [Ca²⁺]_i debidas a la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular tanto a través de canales de Ca²⁺ operados por voltaje (Montero y cols., 2000) como de los dependientes de depósito (Hoth y cols., 1997). Este hecho determina el efecto regulador de las mitocondrias sobre distintos tipos de canales de Ca²⁺, descrito tanto en células excitables como no excitables. A este respecto, cabe señalar que el estado metabólico de las mitocondrias determina si I_{CRAC} se activa o no, con qué amplitud y durante cuánto tiempo permanece activada. Ello implica que la mitocondria condiciona tanto los procesos de activación como de inactivación de I_{CRAC}.

9.1.- Regulación mitocondrial de la activación de los canales CRAC

En condiciones *cuasi* fisiológicas, ésto es en presencia de bajas concentraciones de quelantes exógenos de Ca²⁺ (<2 mM) y manteniendo la función de la SERCA, la diálisis intracelular de altas concentraciones de IP₃ o la estimulación de receptores de membrana acoplados a la PLC no es suficiente para que I_{CRAC} se active en la mayoría de las células, a menos que las mitocondrias sean mantenidas en un estado energizado mediante la administración de sustratos metabólicos (Broad y cols., 1999; Gilibert y Parekh, 2000).

Una posible explicación de estos resultados es que el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} no ocurre eficazmente sin la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente de la actividad mitocondrial, la cual induce un mayor vaciado de Ca^{2+} de los depósitos y, por tanto, una activación más eficaz de I_{CRAC} . Cuando el Ca^{2+} es liberado de los depósitos intracelulares y alcanza concentraciones citosólicas en el rango micromolar, potencialmente capaces de inhibir los IP_3Rs , la mitocondria captaría ese Ca^{2+} compitiendo favorablemente con la SERCA, manteniendo el depósito con bajas concentraciones intraluminales de Ca^{2+} y favoreciendo la activación sostenida de I_{CRAC} .

Además, en células dializadas con IP_3 , tapsigargina y una baja concentración (0,1 mM) de un quelante exógeno de Ca^{2+} (EGTA), la amplitud de I_{CRAC} es mayor cuando las mitocondrias están metabólicamente activas. Esto se corrobora cuando en ausencia de tapsigargina, I_{CRAC} sólo se activa en presencia de sustratos respiratorios que potencian la función mitocondrial. Además, ambos efectos fueron anulados de manera significativa tras el tratamiento con inhibidores mitocondriales (antimicina y oligomicina) (Gilabert y Parekh, 2000). Este hecho indica que existe una relación entre el RE y la mitocondria, principales orgánulos encargados de captar el Ca^{2+} citosólico y, por tanto, dependiendo de cual de los dos mecanismos prevalezca, variará el nivel de vaciamiento del RE y, consiguientemente, el grado de activación de los canales CRAC.

La potenciación de la función mitocondrial mediante la adición de sustratos metabólicos reduce la cantidad de IP_3 requerida para activar I_{CRAC} , incrementando así, el rango dinámico de concentraciones en las que el IP_3 es capaz de activar la corriente. Así, cuando las mitocondrias están energizadas, 3 μM de IP_3 , una concentración ineficaz en ausencia de sustratos respiratorios, es suficiente para activar I_{CRAC} (Gilabert y cols., 2001). La participación de las mitocondrias en la activación de I_{CRAC} se puede demostrar mediante el empleo de inhibidores específicos de la función mitocondrial. Así, se ha observado que, en presencia de bajas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} , el uso de inhibidores del complejo III de la cadena de transporte electrónico, como la antimicina, o de la ATPsintasa, como la oligomicina, previenen eficazmente la activación de I_{CRAC} en presencia de sustratos metabólicos (Gilabert y Parekh, 2000; Gilabert y cols., 2001).

Como se ha comentado, el piruvato también ha sido descrito como regulador de I_{CRAC} . Sin embargo, no parece tener efecto sobre la cinética de activación o la amplitud máxima de la corriente aunque sí reduce su inactivación rápida (Bakowski y Parekh, 2007).

9.2.- Regulación mitocondrial de la inactivación de los canales CRAC

La actividad mitocondrial es capaz de reducir la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales CRAC y, por tanto, de mantener activa la entrada de Ca^{2+} durante más tiempo. En linfocitos T y células RBL-1 a los que se les ha suministrado sustratos metabólicos para potenciar la función mitocondrial se observa que la amplitud de I_{CRAC} es mayor y se mantiene durante más tiempo activa (Hoth y cols., 2000; Gilabert y Parekh, 2000).

Debido a la capacidad de la mitocondria para competir con el RE en la recaptura del Ca^{2+} citosólico sería de esperar que el rellenado del RE fuera menor, reduciendo por tanto, la extensión de la inactivación dependiente de depósito y prolongando, por tanto, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de CRAC (Gilabert y Parekh, 2000). A esta reducción de la inactivación dependiente de depósito mediada por la capacidad quelante de la mitocondria se sumaría también la reducción de la inactivación independiente de depósito debida a la retirada por la mitocondria del Ca^{2+} subplasmalemal a medida que entra a la célula a través de los canales CRAC.

También en células acinares pancreáticas se han encontrado mitocondrias cercanas al área basolateral de la célula donde mantienen activa la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de depósito preferentemente por medio de la captación de Ca^{2+} a través del uniportador (Park y cols., 2001).

La inhibición de la captura de Ca^{2+} por la mitocondria (por CCCP o antimicina) reduce la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC. Sin embargo, en ausencia de estos inhibidores, tampoco es posible observar un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ global cuando el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la mitocondria es inhibido mediante la eliminación del contenido de Na^+ intracelular. Por tanto, para mantener activa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC son necesarios tanto los sistemas de captura de Ca^{2+} de la mitocondria como los de extrusión (Hoth y cols., 1997).

De esta manera, las mitocondrias podrían captar el Ca^{2+} de zonas cercanas a los canales CRAC, reduciendo su inhibición, y redistribuirlo a sitios distantes donde no pudiese inhibir I_{CRAC} , pero sí participar en la señal de Ca^{2+} celular (García y cols., 2006).

Por otro lado, recientes evidencias apoyan la posibilidad de que la mitocondria pueda mantener la actividad de los canales dependientes de depósito por mecanismos distintos a la captación de Ca^{2+} . Una posibilidad es que la mitocondria libere algún factor o factores que puedan modular directa o indirectamente la actividad de los canales CRAC (Glitsch y cols., 2002), de forma similar a como hacen las mitocondrias del músculo esquelético para abrir canales de Na^+ de la membrana plasmática (Ortenblad y Stephenson, 2003) (Figura 7). Entre los factores o mensajeros que pudieran liberarse por la

mitocondria cabe mencionar el glutamato (Maechler y Wollheim, 1999) y el ATP (Landolfi y cols., 1998; García y cols., 2006), aunque no se han obtenido evidencias experimentales directas de su participación en la modulación de los canales CRAC.

Por otro lado el ácido pirúvico, un sustrato necesario para el metabolismo mitocondrial, también es capaz de modular la actividad de los canales CRAC por medio de la reducción de su inactivación rápida. Esto incrementaría la cantidad de Ca^{2+} que entra en la célula y, por tanto, mantendría su elevación sostenida en el tiempo (Bakowski y Parekh, 2007). Por otro lado, en este trabajo se demuestra que otros metabolitos del ciclo de Krebs como succinato, oxaloacetato y α -cetoglutarato no parecen tener ningún efecto sobre I_{CRAC} , sugiriendo una regulación directa entre la entrada de Ca^{2+} y el metabolismo celular.

9.3.- Papel de la localización subcelular de las mitocondrias en la regulación de los canales CRAC

La capacidad de la mitocondria para captar el Ca^{2+} que entra a través de canales dependientes de depósito ha sido mostrada en varios modelos de células no excitables, observando que estos efectos reguladores ejercidos por las mitocondrias sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ están condicionados por su estado metabólico y distribución topológica con respecto a las fuentes de movilización de Ca^{2+} , como son la membrana plasmática o el retículo endoplásmico (Lawrie y cols., 1996).

Esta modulación de la entrada de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias, también se ha observado en una línea de células endoteliales (ECV304) en las que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_m$, lento y sostenido, depende totalmente del Ca^{2+} externo, y parece que es bastante insensible a la liberación de Ca^{2+} producida por IP_3 . Esto parece deberse a que en este tipo celular las mitocondrias no están asociadas específicamente a orgánulos intracelulares, observándose una localización preferente junto a la membrana plasmática. De esta manera, aproximadamente el triple de mitocondrias están localizadas cerca de la membrana plasmática frente al observado en la proximidad del RE, de manera que durante la entrada de Ca^{2+} a las células se produce una rápida captura de Ca^{2+} en las mitocondrias de esas zonas, no llegándose incluso a detectar aumento globalizado en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Lawrie y cols., 1996).

En la línea celular de endotelio, EA.hy926, se ha observado que en condiciones fisiológicas, la existencia de orgánulos (mitocondrias y RE) localizados cerca de la membrana plasmática son capaces de crear gradientes de Ca^{2+} opuestos, generando microambientes locales de alta y baja $[\text{Ca}^{2+}]$, de manera que se puede producir la activación simultánea de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y de canales de Ca^{2+} dependientes de depósito, a pesar de su opuesta sensibilidad al Ca^{2+} . En este tipo celular las mitocondrias

subplasmalemales son capaces de mantener baja la concentración de Ca^{2+} en esos sitios de manera que mantienen activa la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de depósito por medio de la reducción de la inactivación dependiente de Ca^{2+} que pueden sufrir esos canales (Malli y cols., 2003a). Además, el bloqueo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana mitocondrial interna, y por tanto, la inhibición de la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria reduce la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de depósito, lo cual sugiere que el flujo transmitocondrial es esencial para el mantenimiento de la actividad de estos canales (Malli y cols., 2003b; Hoth y cols., 1997).

Algunos autores han demostrado que, cuando se produce la entrada sostenida de Ca^{2+} a través de los canales CRAC, las mitocondrias son translocadas hacia la membrana plasmática y este movimiento es esencial para el mantenimiento de la actividad de los canales CRAC, debido a que reducirían la acumulación local de Ca^{2+} cerca de ellos, y por tanto, su inactivación (Quintana y cols., 2006). En este sentido, se ha propuesto que, además del TCR, las balsas lipídicas y las proteínas que participan en los procesos de transducción de señales, las mitocondrias también forman parte del complejo de señalización en la sinapsis inmunitaria (SI). Así, se ha observado que la redistribución de las mitocondrias se produce hacia zonas concretas de la membrana plasmática, donde se forma la SI, y que tras la estimulación de las células T, la distancia entre las mitocondrias y la SI se reduce hasta valores inferiores a 200 nm (Quintana y cols., 2007). Este íntimo acoplamiento reduce la acumulación de Ca^{2+} cerca de aquellos canales situados cerca o incluso formando parte de la SI, y por tanto, su inactivación. De esta manera, esta redistribución mitocondrial facilitaría una mayor y más duradera entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC, y por tanto, sería necesaria para que tenga lugar una adecuada activación de la células T (Quintana y cols., 2007).

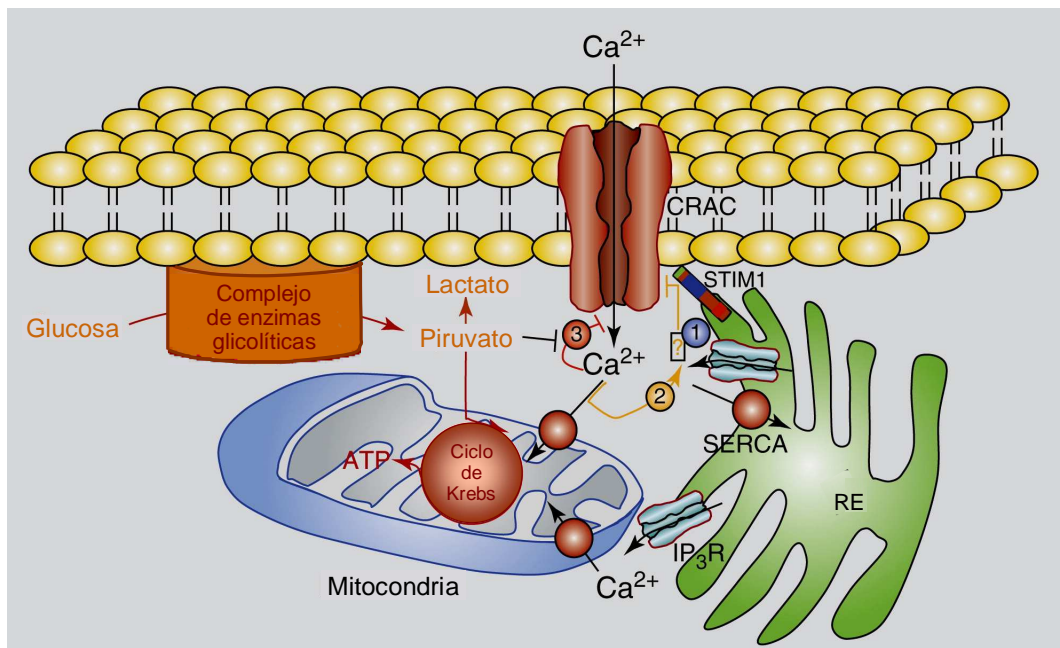


Figura 7. Regulación de los canales dependientes de depósito mediada por la mitocondria. La liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de los IP_3R conduce a la asociación del sensor de Ca^{2+} STIM1 con el canal CRAC y a la activación de I_{CRAC} (mecanismo 1 en azul). El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, debido a la liberación de Ca^{2+} desde el RE y a su entrada desde el medio extracelular a través de los canales CRAC media la inactivación lenta de I_{CRAC} (mecanismo 2 en naranja). Este tipo de inactivación es reducido por la recaptura de Ca^{2+} mitocondrial. Esta captura de Ca^{2+} por la mitocondria también facilita la activación de los canales CRAC al favorecer el vaciamiento del RE. Además, las mitocondrias energizadas podrían ser capaces de regular positivamente la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC por medio de la liberación de un factor difusible. El Ca^{2+} que entra a través del canal CRAC causa la inactivación rápida del mismo, probablemente por inhibición del poro del canal (mecanismo 3 en rojo). Esta inactivación rápida de I_{CRAC} es reducida por el efecto del piruvato. IP_3R : Receptor de IP_3 ; SERCA: Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico; RE: retículo endoplásmico. Figura modificada de Muallem, 2007.

10.- BALSAS LIPÍDICAS o LIPID RAFTS

Han transcurrido más de treinta años desde que Singer y Nicolson (1972) publicaron el modelo de organización de la membrana plasmática conocido como modelo del mosaico fluido. Este modelo propone la movilidad lateral y rotacional de los fosfolípidos así como una distribución al azar de los distintos componentes en la membrana plasmática. Sin embargo, hoy en día, sabemos que muchos de los componentes moleculares de las membranas biológicas no difunden libremente, por lo que cabe considerarlas como estructuras heterogéneamente dinámicas.

En la membrana plasmática existen zonas o microdominios ricos en glicoesfingolípidos y colesterol conocidos como balsas lipídicas o *lipid rafts* (Simons y Ikonen, 1997). Estos microdominios también han sido denominados GEMs (dominios de membrana ricos en esfingolípidos), DIGs (dominios ricos en

glicolípidos insolubles en detergentes), o DRM (membranas resistentes a detergentes) (Brown y London, 1997; Simons y Toomre, 2000).

El colesterol y los esfingolípidos altamente saturados de la monocapa externa de la membrana celular interactúan firmemente entre sí generando las balsas lipídicas, regiones menos fluidas y más estructuradas y ordenadas en términos moleculares (*liquid-ordered fluid phase*) que las regiones desordenadas o *no-rafts* formadas por esfingolípidos con cadenas insaturadas (*liquid disordered fluid phase*) (Brown y London, 2000). Los glicoesfingolípidos se asocian por sus largas cadenas aciladas formando agrupaciones muy compactas estabilizadas por puentes de hidrógeno que también se establecen entre sus cabezas azucaradas. El colesterol se intercala entre dichas cadenas hidrocarbonadas provocando una disminución de su flexibilidad y una compactación de la bicapa lipídica (Brown y London, 2000).

A diferencia de la monocapa extracelular, la monocapa citosólica es una zona pobre en esfingolípidos pero presenta un alto contenido en fosfolípidos de cadena saturada, lo que sugiere que también a este nivel es posible la formación de balsas lipídicas (Edidin, 2001). El colesterol, sin embargo, se encuentra uniformemente distribuido en ambas monocapas. De hecho, el colesterol es el elemento que mantiene unidas las dos caras de las balsas lipídicas, contribuyendo a dar rigidez al conjunto (Gri y cols., 2004). Este empaquetamiento elevado confiere de forma característica a las balsas lipídicas resistencia a la solubilización a baja temperatura (4°C) con detergentes no iónicos, como el Tritón X-100, y permite su aislamiento por centrifugación como complejos de baja densidad (Brown y Rose, 1992).

Las diferencias de fluidez en la membrana plasmática determinadas por las balsas lipídicas condicionan la existencia de compartimentos donde se acumulan diversas proteínas de manera constitutiva o tras procesos de activación y, de los que se excluye a otras según sus características fisicoquímicas (Thomas y cols., 2004). Estos agrupamientos proteicos parecen que pueden jugar un papel relevante en distintos procesos de comunicación intercelular y de señalización, al favorecer su agrupamiento espacio-temporal gracias a determinadas interacciones proteína-proteína o lípido-proteína (Simons y Toomre, 2000; Mañes y Viola, 2006).

Las proteínas incluidas en las balsas lipídicas pueden ser extracelulares, intracelulares o transmembrana. Entre las proteínas extracelulares residentes en las balsas lipídicas destacan las asociadas a glicosilfosfatidilinositoles (GPI). Las proteínas intracelulares y transmembrana asociadas a las balsas lipídicas presentan modificaciones postraduccionales como acilaciones dobles, que permiten la interacción con la monocapa citoplasmática -como ocurre con la quinasa Src- o palmitoilaciones, que favorecen la inserción transmembrana, o bien interaccionan directamente con el colesterol (Simons y Toomre, 2000).

La membrana plasmática de las células T, al igual que la de la mayoría de las células, contiene balsas lipídicas (Simons y Ikonen, 1997). Se ha estimado

que las balsas lipídicas representan el 40% de la membrana de las células del sistema inmune (Gidwani y cols., 2001). En las células en reposo, las balsas lipídicas aparecen como estructuras submicroscópicas muy dinámicas y con una baja presencia de proteínas (Simons y Toomre, 2000; Varma y Mayor, 1998). Como consecuencia de diferentes eventos celulares, entre los que cabe destacar el reconocimiento del antígeno por el receptor del linfocito T, las balsas lipídicas individuales pueden agruparse en estructuras más estables y frecuentemente unidas al citoesqueleto (Figura 8) (Janes y cols., 1999). Así, las balsas lipídicas podrían constituir centros activos de señalización que, a través de su agregación, podrían contribuir a la redistribución molecular en la SI que se establece entre las diferentes APCs y las células T (Janes y cols., 2000).

Por otro lado, parecen existir diferencias en el contenido de colesterol entre cultivos primarios de células T y sus líneas celulares, de manera que las líneas de células T presentan un alto contenido en colesterol mientras que los cultivos primarios de células T tienen menor cantidad de colesterol.

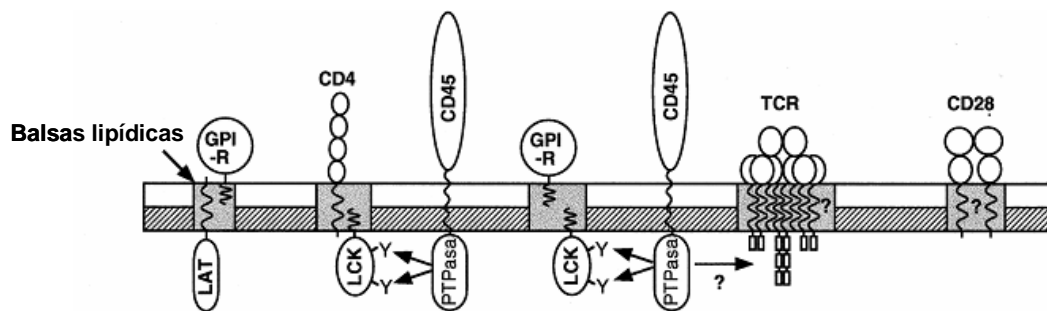
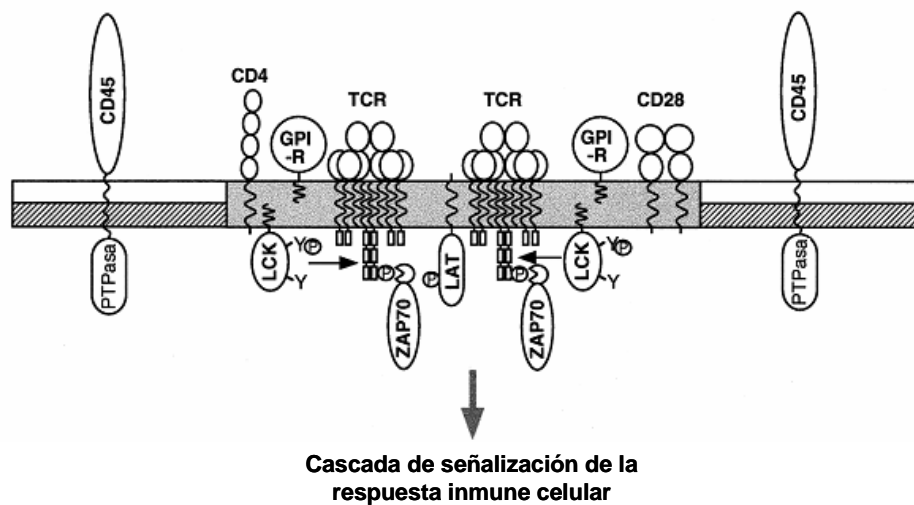
(a) Célula no estimulada**(b) Agregación de balsas lipídicas**

Figura 8. Modelo de la activación de la célula T mediante la agregación de las balsas lipídicas. (a) La célula T no estimulada contiene pequeñas y dinámicas balsas lipídicas, con un número reducido de moléculas asociadas (TCR y CD28). Debido al pequeño tamaño de las balsas lipídicas, el CD45 es capaz de desfosforilar las tirosinas reguladoras de Lck, inhibiendo su actividad quinasa. El CD45 puede también inhibir la señalización actuando sobre los ITAMs de los TCR o sobre otros sustratos de Lck. (b) La agregación de los TCRs por una APC provoca la asociación de las balsas lipídicas, así como de moléculas señalizadoras a ellas asociadas, con la exclusión de CD45. Ello conduce a la activación de Lck, el reclutamiento de ZAP-70 y la consiguiente fosforilación de tirosinas. GPI-R: Proteínas de anclaje a glicosilfosfatidilinositol; TCR: Receptor de la célula T; LAT: Proteína adaptadora de células T activadas; Lck: Proteína de la familia Src de proteínas tirosina quinasa; PTPasa: Tirosina fosfatasa; ZAP-70: Proteína de la familia Syk de proteínas tirosina quinasa de 70 kD asociada a la cadena Z del receptor de las células T. Modificación del esquema de Janes y cols., 2000.

Durante la formación de la SI se produce una redistribución de las proteínas en la célula en estructuras denominadas SMAC (complejos de activación supramolecular) y una agrupación de las balsas lipídicas en la zona de contacto entre las dos células (Burack y cols., 2002). Se ha demostrado que el TCR reside en muy baja proporción en balsas lipídicas en las células en reposo (Drevot y cols., 2002), pero cuando se produce la unión del TCR con el complejo MHC se produce un aumento de su presencia en ellas (Montixi y cols., 1998). Por

lo tanto, parece que es en estos dominios de membrana donde el complejo transductor de señales TCR/CD3 es ensamblado y desde donde se produce la señalización hacia el interior celular.

Algunas proteínas implicadas en las primeras fases de señalización del TCR residen constitutivamente en las balsas lipídicas, como es el caso de co-receptores como CD8 y CD4, de ciertas subunidades de transducción de tipo tirosina quinasa (Lck, Fyn) (Resh, 1994) y de proteínas con función adaptadora (LAT) (Zhang y cols., 1998). Así, la alteración de la localización de Lck y de LAT mediante la eliminación de sus anclajes acilados inhibe la transmisión de la señal estimuladora desencadenada por el TCR (Kabouridis y cols., 1997; Zhang y cols., 1998).

Por el contrario, otras proteínas son incluidas a las balsas lipídicas tras la activación celular, como es el caso de CD28 (Sadra y cols., 2004) y del propio complejo TCR/CD3 (Viola y cols., 1999). A este respecto se ha demostrado que la activación del co-receptor CD28 induce la co-localización del TCR con las balsas lipídicas en la SI y produce un aumento de la concentración de balsas lipídicas en la célula (Viola y cols., 1999). CD28 también se redistribuye a las balsas lipídicas tras la activación de la célula T, por lo que esta segregación es muy importante para su función y, por lo tanto, para la correcta activación de la célula (Sadra y cols., 2004). Además, una óptima señalización del TCR requiere que algunas moléculas con potenciales efectos reguladores negativos, como la tirosina fosfatasa CD45, sean excluidas de las balsas lipídicas y, por tanto, de las zonas de contacto entre la célula T y la APC (Janes y cols., 2000).

Algunos autores han propuesto que CD28 es necesario para la movilización de las balsas lipídicas hacia la SI durante la estimulación de los linfocitos T, así como para la reorganización del citoesqueleto de actina, y además parece estar implicado en la adquisición de moléculas de señalización con dominios de unión a actina en la SI (Tavano y cols., 2006).

Por otro lado, WAVE2 también es reclutada en la SI tras la estimulación celular. Esta proteína es necesaria para la reorganización del citoesqueleto de actina y participa en la comunicación entre los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, ya que es requerida para que, tras el vaciado del RE, se produzca la activación de los canales CRAC (Nolz y cols., 2006).

La organización específica de las proteínas presentes en las balsas lipídicas de la membrana plasmática tiene un papel clave en la activación de las células T. En este sentido, algunos autores apoyan que la incorporación de proteínas a las balsas lipídicas no es debida a las interacciones lípido-proteína sino a interacciones específicas proteína-proteína que condicionan el agrupamiento lipídico (Nichols, 2005; Harder y cols., 2007). *Curr Opin Immunol*, 19: 470-475.). Así, la introducción de mutaciones en los dominios de interacción proteína-proteína en LAT y Lck anulan la incorporación de las proteínas a las balsas lipídicas (Zhang y cols., 1998).

Por otro lado, la existencia de microdominios lipídicos sugiere que las interacciones lípido-proteína que se producen en su seno pueden también determinar la localización de canales iónicos en la membrana y su función. Uno de los canales cuya función se vería influenciada por su inclusión en esos dominios es el canal de K^+ dependiente de voltaje del tipo Kv1.3. Así, además de la redistribución en balsas lipídicas de las proteínas implicadas en la señalización del TCR y del propio TCR, tras el reconocimiento del antígeno, se ha descrito la existencia de otros componentes asociados a balsas lipídicas como los canales de K^+ dependientes de voltaje, Kv1.3 (Martens y cols., 2000). En linfocitos T, donde este canal es mayoritario, se ha demostrado que la manipulación del contenido de colesterol de la membrana altera la actividad de Kv1.3, lo que sugiere que este canal puede estar presente en las balsas lipídicas. Así, el aumento de colesterol en la membrana enlentece tanto la activación como la inactivación del canal, mientras que la extracción de colesterol no parece tener efecto sobre la activación aunque produce una aceleración de su inactivación (Hajdú y cols., 2003). Asimismo, la extracción de colesterol de las membranas provocaba que el potencial de membrana necesario para que tuviese lugar la activación e inactivación de los canales Kv1.3 fuese desplazado hacia potenciales más positivos (Pottosin y cols., 2007). En los linfocitos T también se ha comprobado la proximidad de los canales Kv1.3 con CD3, uno de los componentes de los receptores antigénicos (Panyi y cols., 2003). Por otro lado, la distribución de este canal está asociada a la formación de sinapsis inmunológicas entre linfocitos T citotóxicos y células diana, lo que sugiere que este canal podría estar implicado en la ejecución de muerte celular dirigida por estos linfocitos (Panyi y cols., 2004a).

Además, en células de glioma se ha observado que los canales BK, canales de K^+ de alta conductancia, también se encuentran asociados a balsas lipídicas y que esta asociación sirve para que los canales BK se localicen cerca de los IP_3Rs , de manera que tendrían una fuente de Ca^{2+} próxima. Esto demuestra que los canales BK se encuentran acoplados funcionalmente a la $[Ca^{2+}]_i$ a través de los IP_3Rs por medio de las balsas lipídicas (Weaver y cols., 2007).

En el caso de los linfocitos T se ha demostrado que Orai1 y STIM1 (el poro del canal CRAC y su activador, respectivamente) son reclutados a la SI entre las células T y las APCs, aumentando la entrada de Ca^{2+} en esa zona y, por tanto, la $[Ca^{2+}]_i$ en la vecindad de la SI (Lioudyno y col., 2008).

El papel que juegan estas balsas lipídicas en el caso de los canales no está claro, por un lado esta disposición podría ser un mecanismo de compartimentalización de la superficie celular ante determinados estímulos, donde los canales podrían interaccionar con proteínas reguladoras; por otro, la asociación a estos microdominios podría estar relacionada con el tráfico de los canales, bien a superficie o bien a rutas de degradación (Simons e Ikonen, 1997; Martens y cols., 2004).

Asimismo, se ha propuesto que la reorganización del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos juega también un papel importante en el adecuado reconocimiento y activación del linfocito T cuando se une a la APC. Por ello, además de la formación de la sinapsis inmunológica o SMAC y de la participación de las balsas lipídicas, el citoesqueleto de actina sería el tercer elemento que intervendría en la formación del complejo necesario para la correcta activación de los linfocitos T. Así, el reclutamiento del TCR en las balsas lipídicas es dependiente de un citoesqueleto de actina funcional, puesto que puede ser bloqueado con el inhibidor de la polimerización de actina citocalasina D (Krawczyk y cols., 2000; Wülfing y Davis, 1998).

Para que tenga lugar una eficiente activación y expansión clonal de linfocitos T es necesario un íntimo acoplamiento entre la mitocondria y la SI, el cual es mediado por el citoesqueleto de actina. Así, las mitocondrias se mueven activamente entre los microtúbulos desde donde son transferidas al citoesqueleto de actina y éste las transloca hacia la SI. La reducción de la distancia entre la SI y la mitocondria, tras la estimulación celular, será crítica para mantener activa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CRAC durante más tiempo y el elemento que parece coordinar la distancia entre ambos es el citoesqueleto de actina (Quintana y cols., 2007).

Las balsas lipídicas pueden influir en el citoesqueleto de actina. La activación del TCR causa la fosforilación de Lck y ZAP-70, lo cual inicia la polimerización de la actina. Por otro lado, la interacción de la APC con CD28 causa la activación de las GTPasas (como Rac-1 y CDC42), estimulando la polimerización de la actina por medio de la actividad de Vav-1, que está constitutivamente asociado con CD3. Esto estabiliza la agrupación de las balsas lipídicas alrededor del TCR. Además, durante la activación celular se ha observado que tanto la función de las balsas lipídicas para amplificar los mecanismos de señalización como la polimerización de la actina estabilizan la SI y permiten su completa formación (Meiri, 2005).

Asimismo, la activación de la célula T tras entrar en contacto con la APC, se acompaña por una reorganización dinámica de los filamentos de actina (Parsey y Lewis, 1993). Cuando la célula T entra en contacto con una APC y encuentra un complejo MHC específico envía las señales tempranas como es la movilización de Ca^{2+} . Esto es seguido por importantes cambios morfológicos, los cuales van a depender del citoesqueleto de actina. En este punto se produce una activa polimerización del citoesqueleto de actina produciéndose un aumento de la zona de contacto entre la célula T y la APC. Finalmente, la célula T se redondea y la zona de contacto se reduce, coincidiendo con la segregación y organización de las moléculas que formarán la SI madura (Acuto y Cantrell, 2000).

Parece, por tanto, que la función de las balsas lipídicas podría ser doble. En ausencia de estímulo, las balsas lipídicas serían de un tamaño muy pequeño y apenas contendrían moléculas de señalización. En esta fase su misión

consistiría en mantener aislados los diferentes componentes de la señalización con el fin de impedir una activación espontánea de las diferentes rutas. Tras la estimulación, se produciría la agregación de las balsas lipídicas con el consiguiente reclutamiento de moléculas de señalización y exclusión de fosfatasas. Ésto aumentaría la concentración local de estas moléculas de señalización y permitiría la combinación específica de algunas de ellas, haciendo más rápida, eficaz y selectiva la transducción de la señal (ver figura 8).

OBJETIVOS

La entrada sostenida de Ca^{2+} en las células T tras la interacción con las células presentadoras de antígeno, es crucial para su activación y, consecuentemente, la puesta en marcha de una adecuada respuesta inmune celular. Dicha entrada de Ca^{2+} se produce a través de un tipo de canales dependientes de depósito conocidos como CRAC (*Ca²⁺-release activated Ca²⁺ current*).

Los canales CRAC pueden ser modulados negativamente por microdominios subplasmalemales de Ca^{2+} , por lo que aquellos mecanismos capaces de modificar su tamaño y extensión, también influirán en el grado de activación de estos canales.

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar el papel regulador de diferentes elementos celulares –organelas, proteínas transportadoras de Ca^{2+} , balsas lipídicas,...- sobre la actividad de los canales CRAC y su relación con el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} .

Los objetivos específicos han sido:

1. Efectos de quelantes exógenos y endógenos de Ca^{2+} : Análisis del papel de las mitocondrias metabólicamente activas en la regulación de los canales CRAC.
2. Estudio de la contribución de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática y de la proteína quinasa C en la regulación de los canales CRAC.
3. Estudio del efecto de la composición lipídica de la membrana sobre la actividad de los canales CRAC: Implicación de las balsas lipídicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- CULTIVO CELULAR

En la realización de este trabajo se han utilizado linfocitos T humanos de la línea celular Jurkat (E6-1) (Figura 9). Se trata de una línea celular derivada de una leucemia linfoblástica aguda de tipo T, que fue establecida a finales de los años 70 por Schneider y cols. (1977) a partir de sangre periférica de un paciente de 14 años de edad.

Las células fueron mantenidas en fase logarítmica de crecimiento a una densidad de $0,5-1,5 \times 10^6$ células/ml mediante pases repetidos en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (2 mM), suero fetal bovino (FBS; 10%) inactivado por calor húmedo a 56°C durante 30 minutos y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina). Durante la fase de crecimiento se sembraban las células en frascos de 25 cm^2 (IWAKI brand Scitech Div., Japón) que eran mantenidos en un incubador (Heracell, Heraeus, Alemania) bajo una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% en aire a una temperatura de 37°C . Para evitar cambios en el pH del medio (pH 7,2 ajustado con NaOH) se añadió HEPES a una concentración final de 10 mM. Las concentraciones de glucosa y Ca^{2+} en el medio de cultivo fueron calculadas a partir de las especificaciones del fabricante siendo 11,1 mM y 0,43 mM, respectivamente. A excepción del FBS, que fue adquirido a BioWhittaker™, el medio de cultivo y el resto de los reactivos empleados en los cultivos celulares fueron obtenidos de Sigma.

Las células T Jurkat eran regularmente congeladas al objeto de poder utilizarlas con posterioridad. La congelación se realizó a -80°C en criotubos conteniendo 1 ml de una suspensión celular (2×10^7 células/ml) preparada en FBS conteniendo 10 % de DMSO (Sigma).

Todas las manipulaciones fueron realizadas en condiciones de esterilidad, en una cabina de flujo laminar vertical (Herasafe, Heraeus, Alemania) y empleando soluciones previamente filtradas (filtros de $0,20 \mu\text{m}$ de tamaño de poro; FILTER-LAB®).



Figura 9. Imagen de microscopía de linfocitos T humanos de la línea celular Jurkat. La barra de calibración equivale a $35 \mu\text{m}$.

2.- REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE CORRIENTES IÓNICAS

2.1.- La técnica de *patch clamp*

La técnica de fijación del parche de membrana o *patch clamp* fue inventada por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 para registrar las corrientes iónicas a través de canales individuales aislados en pequeños áreas de la membrana plasmática (Neher y Sakmann, 1976). Esta técnica fue posteriormente perfeccionada a partir del hallazgo de que las pipetas de vidrio podían formar sellos de alta resistencia eléctrica y mecánica con las membranas celulares, lo que conlleva un notable incremento de la relación señal/ruido (Hamill y cols., 1981). Esto permitió registrar la actividad de canales individuales, pero esta técnica puede ser empleada para el registro de la corriente global a través de un determinado canal, siendo una técnica versátil y de amplio uso entre las técnicas de registro electrofisiológico.

La técnica de *patch clamp* permite controlar el voltaje a través de la membrana celular y medir el flujo de iones en la célula (modo de fijación de voltaje o *voltage-clamp*). El movimiento de iones, hacia el interior o el exterior celular, puede ser cuantificado a partir de la cantidad de corriente eléctrica necesaria para mantener el potencial de membrana en un valor predeterminado. Resulta por tanto posible medir la conductancia de la membrana (g_m) que, de acuerdo a la ley de Ohm, cumple la siguiente relación $g_m = I / (V - V_r)$, donde I es la intensidad de corriente, V el potencial al que se fija la membrana y V_r el potencial de reversión de la corriente. La conductancia se expresa en siemens (inverso de ohmio).

Alternativamente, esta técnica puede ser empleada para la medida de los cambios en el potencial de membrana en respuesta a la inyección de pulsos de corriente (modo de fijación de corriente o *current-clamp*).

Los electrodos de medida o registro consisten en una pipeta de vidrio rellena con una solución salina que a su vez baña un filamento de plata clorurada. El extremo de la pipeta de vidrio, que entra en contacto con la membrana celular, presenta un orificio terminal de aproximadamente 1 μm de diámetro cuyo borde ha sido pulido con calor mediante la ayuda de un electrodo incandescente. La pipeta se posiciona con la ayuda de dispositivos de micromanipulación cerca de la célula de interés hasta establecer contacto con la membrana celular. La aplicación de presión negativa mediante una ligera succión da lugar a la formación de un sello hermético entre la membrana celular y la pipeta, de modo que la resistencia entre el interior de la pipeta y la solución externa alcanza del orden de gigaohmios ($10^9 \Omega$). Este sello de alta resistencia eléctrica y mecánica entre la célula y la pipeta asegura que la corriente eléctrica que fluye a través de la pipeta sea fundamentalmente la misma que fluye a través de los canales del parche de membrana que cubre el

extremo de la pipeta. Esta configuración de la pipeta y de la membrana celular se conoce con el nombre de *on-cell* o célula adherida (Figura 10).

La configuración *on-cell* permite registrar las corrientes unitarias generadas por la activación de un número reducido de canales en el parche de membrana. Si una vez establecido el sello entre la punta de la pipeta y la membrana se aplica de nuevo una pequeña succión a través de la pipeta, el parche de membrana se rompe, alcanzándose la configuración de célula completa (*whole-cell*), que permite cuantificar la corriente que atraviesa la práctica totalidad de la membrana de la célula. Si a continuación separamos la pipeta de la célula, se puede desprender un fragmento de la membrana en el que la cara externa de la misma sigue en contacto con la solución del baño. Se obtiene así, la configuración de parche escindido exterior hacia fuera (*outside-out*), que posibilita el registro de las corrientes iónicas que atraviesan los canales presentes en ese fragmento escindido de membrana. Por otra parte, si se procede a separar la pipeta de la célula desde la configuración de *on-cell* se puede conseguir escindir un parche de membrana cuya cara citoplasmática está expuesta a la solución del baño, accediendo a la configuración de parche escindido interior hacia fuera (*inside-out*) (Figura 10). Por último, se puede realizar el registro de la corriente en toda la célula incluyendo en la pipeta de registro ciertos antibióticos capaces de abrir pequeños poros en la membrana (*perforated-patch*).

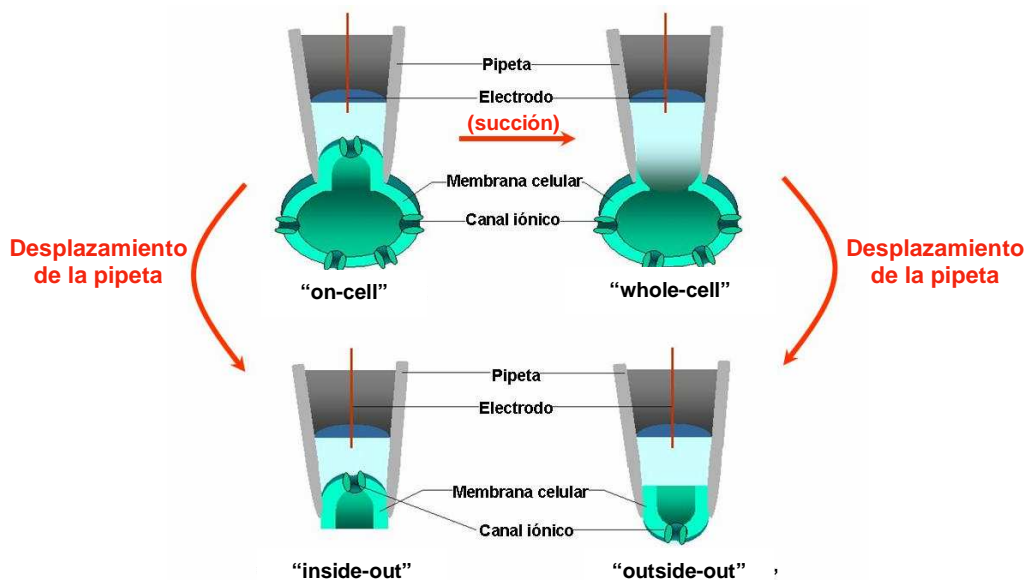


Figura 10. Configuraciones de la técnica de patch clamp. La configuración inicial de la técnica de patch clamp consiste en la formación de un sello de alta resistencia entre la punta de una pipeta de vidrio, que sirve como electrodo, y la membrana celular (configuración "on-cell"). A partir de esta configuración, se puede llegar a la de "whole-cell" aplicando una pequeña succión en el interior de la pipeta, y si desde esta configuración se desplaza la pipeta y se escinde un parche de la membrana se obtiene la configuración "outside-out". Por otra parte, si el desplazamiento de la pipeta se realiza desde la configuración de "on-cell", se obtiene un parche de membrana en la configuración "inside-out".

La configuración de célula completa, que ha sido empleada en este trabajo, permite obtener información de la corriente generada por el conjunto de los canales de una célula, posibilitando el análisis de sus propiedades cinéticas y de sus mecanismos de modulación. Por otra parte, las otras tres configuraciones hacen posible el registro de las corrientes unitarias y, consiguientemente el análisis del comportamiento "microscópico" de los canales iónicos. La configuración *on-cell* presenta la ventaja de preservar la integridad celular, la configuración de parche escindido *outside-out* resulta idónea para el estudio de los canales iónicos activados por ligando (fundamentalmente de la activación), mientras que el parche escindido en la configuración *inside-out* facilita el análisis de la modulación de los canales iónicos por segundos mensajeros intracelulares.

Independientemente de la configuración utilizada, siempre es necesario escoger cuidadosamente la composición de las soluciones de registro (extracelular e intracelular), así como la utilización de bloqueantes o moduladores farmacológicos, con el fin de aislar la corriente dependiente de la actividad del canal objeto de estudio.

2.2.- Registro de I_{CRAC}

Hemos utilizado la configuración de célula completa a temperatura ambiente (20-26°C) para medir la corriente a través de los canales CRAC en células T de la línea celular Jurkat (Figura 11). En esta configuración el contenido de la pipeta queda en contacto directo con el citoplasma, permitiendo estudiar la corriente iónica que fluye a través de toda la membrana celular, que dependerá del número de canales existentes en la célula, de su corriente unitaria y de la probabilidad de apertura de los mismos.

La configuración de célula completa permite el aislamiento de las corrientes iónicas mediante modificaciones del medio extracelular y/o intracelular, consistentes en el empleo de bloqueantes específicos de canales iónicos y de iones con elevada permeabilidad a través de los canales objeto de estudio. Al objeto de facilitar el registro de I_{CRAC} se procedió al bloqueo de las corrientes de K^+ mediante la sustitución de los iones K^+ de la solución intracelular por iones Cs^+ , y a elevar la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular hasta 10 mM para incrementar su entrada a favor de gradiente electroquímico.

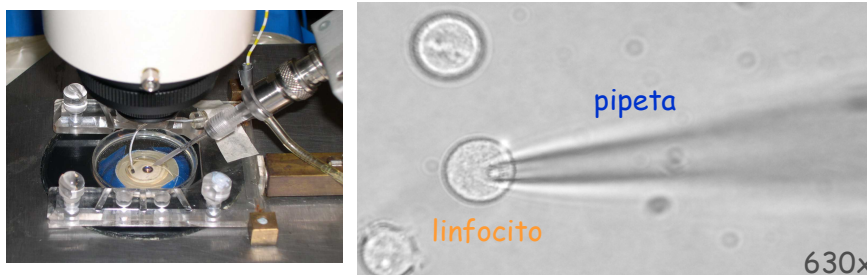


Figura 11. Imágenes ilustrativas de la técnica de “patch clamp”. A la izquierda se puede observar la cámara de perfusión sobre la que se coloca un cubreobjetos con células Jurkat y la micropipeta de vidrio conectada a un preamplificador de patch clamp. A la derecha se presenta la imagen microscópica de una célula Jurkat con una micropipeta de patch clamp en contacto con su membrana.

En la configuración de célula entera la solución de la pipeta es capaz de diluir el medio intracelular, por lo que debido a este fenómeno, denominado de *washout* o de lavado, algunos componentes celulares necesarios para la modulación intracelular o para la activación de un canal se podrían perder por la diálisis. Sin embargo, la configuración de *whole cell* nos ofrece algunas ventajas respecto de otras configuraciones que estudian la corriente global como la configuración de parche perforado. Por un lado, es importante señalar que la mayoría de los poros producidos por los antibióticos utilizados, son impermeables a moléculas de gran tamaño. En concreto, sustancias con peso molecular mayor de 200 kdalton, como nucleótidos cíclicos, péptidos, enzimas, sustancias quelantes (EGTA o BAPTA) o algunos indicadores fluorescentes. Este hecho, impedirá por tanto, introducir estas moléculas en la célula, lo que en nuestro caso representaba un problema ya que todos los experimentos llevados a cabo son en presencia de un quelante de Ca^{2+} . Además la configuración de parche perforado también tiene el inconveniente de presentar valores de resistencias en serie tres veces mayores que en la configuración de *whole-cell*, circunstancia que puede dar lugar a registros con escaso control de voltaje.

2.3.- Materiales y soluciones utilizados

Se han empleado micropipetas de vidrio elaboradas con un estirador de pipetas programable (modelo PP-830, Narishige, Japón) a partir de capilares de borosilicato (Kimax-51[®], Witz Scientific, EEUU) con diámetros interno y externo de 1,5 y 1,8 mm, respectivamente. Las puntas de las pipetas fueron cubiertas con cera y pulidas mediante calor con una microforja MF-830 (Narishige, Japón) y presentaron resistencias de 2,5 a 3,5 M Ω cuando se empleaban las soluciones estándar de registro. En la tabla 2 se detalla la composición básica de la solución interna utilizada en los experimentos de electrofisiología.

Además, en los experimentos en los que se mantenían las mitocondrias en un estado energizado se incluyó en la pipeta de registro un cóctel mitocondrial

cuya composición se precisa en la tabla 3. Asimismo, la composición de la solución extracelular estándar se detalla en la tabla 4.

Tabla 2. Composición de la solución interna estándar y proveedores de los distintos compuestos utilizados

Compuesto	Concentración (mM)	Proveedor
Glutamato de cesio	145	Sigma
NaCl	8	Fluka
MgCl ₂	1	Fluka
ATP.Mg	2	Sigma
HEPES	10	Sigma
CsOH (para ajustar el pH a 7,2)		Aldrich

Tabla 3. Composición del cóctel mitocondrial y proveedores de los compuestos utilizados

Compuesto	Concentración (mM)	Proveedor
ácido pirúvico	2	Sigma
ácido málico	2	Sigma
NaH ₂ PO ₄	1	Panreac

Tabla 4. Composición de la solución externa estándar y proveedores de los distintos compuestos utilizados

Compuesto	Concentración (mM)	Proveedor
NaCl	140	Fluka
KCl	2,8	Panreac
CaCl ₂	10	Fluka
MgCl ₂	2	Fluka
D-glucosa	10	Panreac
HEPES	10	Sigma
NaOH (para ajustar el pH a 7,4)		Panreac

Además de los citados, también se utilizaron otros fármacos o reactivos cuya actividad y procedencia aparecen recogidas en la tabla 5:

Tabla 5. Fármacos utilizados en los experimentos de *patch clamp*, con indicación de su actividad y de la casa comercial que los proporcionó

Producto	Actividad	Proveedor
EGTA	Quelante de Ca ²⁺	Fluka
BAPTA	Quelante de Ca ²⁺	Molecular Probes
IP₃	Se une al IP ₃ R del retículo endoplásmico, activando la salida de Ca ²⁺	Calbiochem
Tapsigargina	Inhibidor de la Ca ²⁺ -ATPasa del retículo endoplásmico	Calbiochem
Antimicina	Inhibidor del complejo III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial	Sigma
Oligomicina	Inhibidor de la ATPasa mitocondrial	Sigma
Rojo de rutenio	Inhibidor no selectivo del uniportador mitocondrial	Sigma
Ru360	Inhibidor del uniportador mitocondrial	Calbiochem
Atractilósido	Inhibidor del transportador de nucleótidos de adenina mitocondrial	Sigma
Ácido bongkrelico	Inhibidor del transportador de nucleótidos de adenina de la mitocondria	Calbiochem
ATP.Na	Sal sódica de ATP	Sigma
Ortovanadato sódico	Inhibidor de la Ca ²⁺ -ATPasa de la membrana plasmática	Aldrich
PMA	Activador de PKC	Sigma
Bisindolilmaleimida	Inhibidor de PKC	Calbiochem
Estaurosporina	Inhibidor de PKC	Calbiochem

2.4.- Protocolos de trabajo y equipo utilizado

Para el registro de corrientes iónicas con la técnica de *patch-clamp* se ha utilizado un amplificador EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania) controlado desde un ordenador Macintosh mediante el programa PULSE 9.7 (Heka Electronics, Lambrecht, Alemania). Una vez alcanzada la configuración de célula completa y fijado el potencial de membrana (V_h) a 0 mV, se procedía a la cancelación automática de los transientes capacitativos y de las resistencias en serie, que además, fueron monitorizados de forma continua a lo largo de cada experimento. Los valores medios iniciales de ambos parámetros fueron de $7,31 \pm 0,34$ pF ($n = 33$) y de $8,82 \pm 0,65$ M Ω ($n = 33$).

I_{CRAC} fue medida durante la aplicación de rampas de voltaje, desde -120 hasta $+60$ mV de 100 ms de duración, con una frecuencia de 0,5 Hz (Figura 12). La activación de I_{CRAC} fue inducida mediante el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺, provocado por concentraciones supramáximas de IP₃ (30 μ M) y de tapsigargina (2 μ M), para evitar el relleno de los mismos. Además, para una activación óptima de los canales CRAC, los experimentos fueron llevados a cabo en presencia de una alta capacidad quelante, que reduce tanto la recaptura de Ca²⁺ por los depósitos como la inactivación dependiente de Ca²⁺ de los canales CRAC.

Además, la primera o la segunda respuesta de corriente a una rampa de voltaje, obtenidas antes de que I_{CRAC} comenzara a activarse, fue tomada como representativa de la corriente de fuga (*leak*) y sustraída de todas las respuestas de corriente posteriores. El registro de las corrientes se prolongó hasta que la amplitud de las mismas alcanzaba un estado estacionario (350-600 segundos después de alcanzar la configuración de célula completa).

Los valores de corriente aparecen normalizados y expresados como densidades de corriente, obtenidas al dividir la amplitud máxima de la corriente, medida a -80 mV en cada rampa de voltaje, por el valor de la capacitancia de cada célula (en pF) (Figura 12).

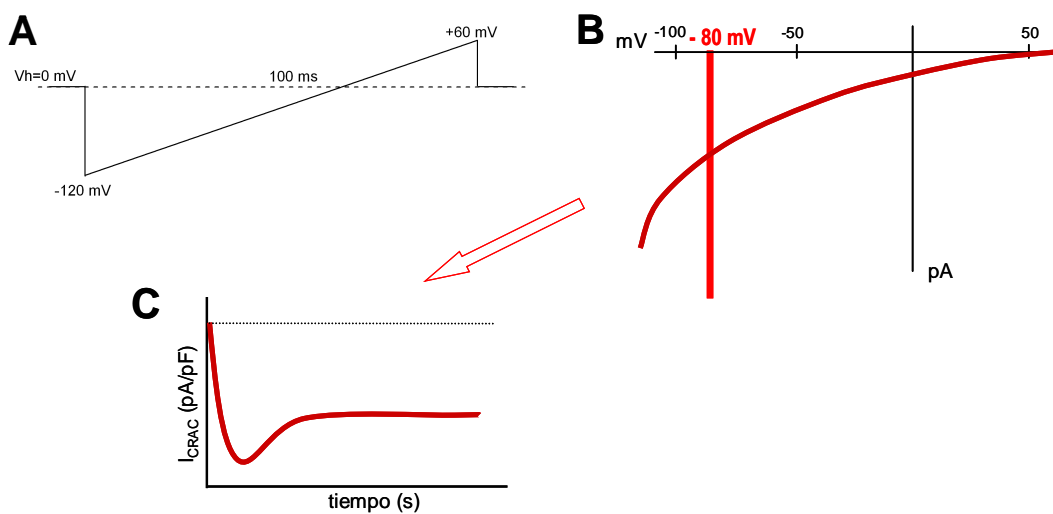


Figura 12. Protocolo utilizado para medir I_{CRAC} . (A) Características de la rampa de voltaje utilizada para medir I_{CRAC} . (B) Representación de la relación I-V de I_{CRAC} en el momento en el que alcanzaba su máximo, obtenida como resultado de la aplicación de la rampa de voltaje representada en A. (C) Curso temporal de I_{CRAC} resultante de graficar el valor obtenido a partir de la curva I-V a -80 mV frente al tiempo de registro. Para el cálculo de la densidad de corriente se consideró la amplitud de I_{CRAC} al potencial de -80 mV (barra vertical en B) y se dividió por el correspondiente valor de la capacitancia celular.

Se han empleado también protocolos de voltaje específicos para evaluar la extensión de la inactivación rápida de I_{CRAC} . Dichos protocolos consisten en la administración de pulsos de voltaje rectangulares hiperpolarizantes desde 0 hasta -80 mV ó -120 mV de 200 ó 250 ms de duración y a una frecuencia de 0,5 Hz (Figura 15).

Para la realización de los experimentos se emplearon cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH y Co. Alemania) tratados con D-pollisina (1 mg/ml, 30 minutos a temperatura ambiente) que se depositaron en el interior de placas Petri de 35 mm de diámetro (IWAKI Brand Scitech Div., Japón). Las células fueron sembradas sobre estos cubreobjetos, que son transferidos al incubador y, posteriormente, colocados sobre cámaras de perfusión

adaptadas para su colocación sobre la platina de un microscopio invertido Axiovert 100 (Zeiss, Alemania) al comienzo de los experimentos. El microscopio se encontraba ubicado dentro de una jaula de Faraday conectada a tierra para la reducción del ruido eléctrico. El equipo presenta un conjunto de micromanipuladores que permiten el movimiento por separado de la pipeta de registro, la cámara de perfusión y el sistema de administración de fármacos. Además el microscopio estaba situado sobre una mesa antivibratoria (TMC™, Technical Manufacturing Corporation, EEUU) para impedir la transmisión de vibraciones procedentes del suelo a la preparación (Figura 13).



Figura 13. Equipo de electrofisiología empleado en los experimentos reflejados en este trabajo.

2.5.- Análisis cinético de la corriente CRAC

La cinética de activación e inactivación de I_{CRAC} fue analizada estimando diferentes parámetros. La cinética de activación fue caracterizada mediante la constante de tiempo de activación (τ_{on}), obtenida a partir del ajuste de una función exponencial simple al curso temporal de la corriente, desde que comienza a activarse hasta que alcanza su amplitud máxima (I_{CRAC}), y el tiempo que tarda en alcanzarse (t_{max}). En algunos casos no era posible mantener el registro el tiempo suficiente para que I_{CRAC} alcanzara un estado estacionario y, así, poder medir inactivación, sin embargo, en algunos de estos registros se podía caracterizar el proceso de activación de la corriente por lo que fueron incluidos en el análisis de la activación. Por su parte, la cinética de inactivación fue caracterizada mediante la constante de tiempo de inactivación (τ_{off}), obtenida como resultado del ajuste de una función exponencial simple el curso temporal de la corriente desde I_{max} hasta donde alcanza el estado estacionario (t_{ss}) (Figura 14). Una célula fue considerada como inactivante cuando al alcanzar el estado estacionario la amplitud de

I_{CRAC} disminuyó al menos un 10% con respecto a I_{max} . El análisis de los distintos parámetros cinéticos fue realizado mediante el programa PULSE 9.7 mientras que la representación del curso temporal de la corriente se llevó a cabo con el programa Igor Pro 4.08 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR; EEUU).

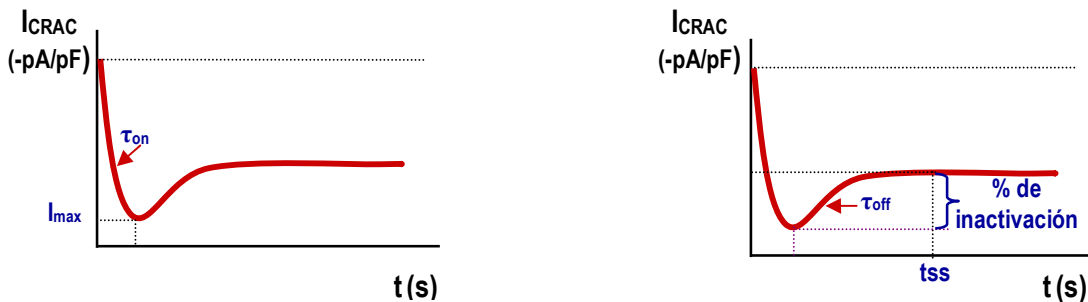


Figura 14. Análisis de los parámetros cinéticos de I_{CRAC} . Representación del curso temporal de I_{CRAC} mostrando los parámetros cinéticos de activación (I_{max} , τ_{on} , t_{max} ; panel izquierdo) y de inactivación lenta (% inactivación, τ_{off} y t_{ss} ; panel derecho).

El análisis de la inactivación rápida se realizó durante la fase de máxima activación de I_{CRAC} y cuantificada como porcentaje de inactivación, calculado mediante el cociente de la amplitud media de la corriente durante los últimos 10 ms del pulso hiperpolarizante y la corriente obtenida al comienzo del pulso. Esta última fue estimada como la media de la corriente durante 1 ms comenzando a medir 3 ms después del inicio del pulso con el objeto de minimizar la contribución de los transientes capacitativos insuficientemente cancelados (ver figura 15).

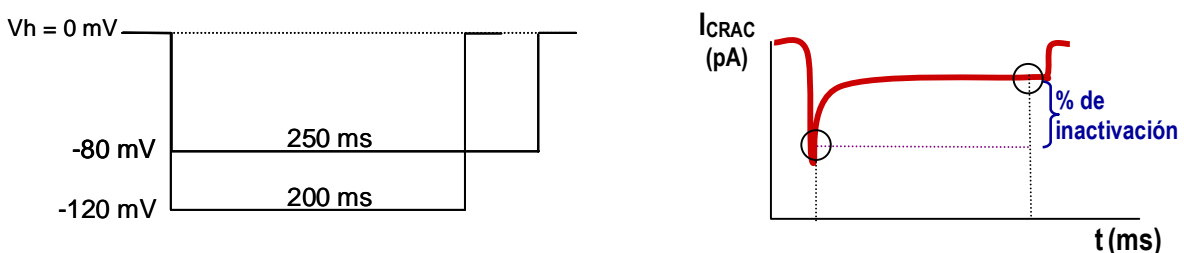


Figura 15. Protocolos de voltaje para la medida de la inactivación rápida de I_{CRAC} y análisis de la misma. Se representa a la izquierda los protocolos de voltaje utilizados y a la derecha un registro de I_{CRAC} durante la aplicación de estos pulsos de voltaje hiperpolarizantes mostrando los puntos entre los que se calcula la inactivación rápida (ver descripción detallada en el texto).

2.6.- Análisis estadístico de los datos

Los resultados son presentados como media \pm error estándar de la media (SEM) de los datos obtenidos de un determinado número (n) de experimentos pareados, usando el programa Igor Pro 4.08 (Wavemetrics, Oswego Lake, Or, EEUU). El análisis estadístico de estos resultados fue realizado con el programa

de análisis de datos Prisma v.4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). La significación estadística de las diferencias entre las medias fue estimada mediante el test de la *t* de Student. Se consideró un valor de $p \leq 0,05$ como límite para la significación estadística de manera que *ns* es no significativo, * corresponde con $p \leq 0,05$, ** con $p \leq 0,01$ y *** con $p \leq 0,001$.

3.- TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS JURKAT CON EL VECTOR pEYFP-Mito

Para el marcaje de las mitocondrias de las células T Jurkat hemos utilizado el vector pEYFP-Mito (Clontech, EEUU), que contiene una variante de una proteína fluorescente verde o GFP, fusionada a la subunidad VIII de la citocromo c oxidasa mitocondrial humana, lo cual permite su localización específica en la mitocondria. El gen EYFP (proteína fluorescente amarilla mejorada) contiene cuatro aminoácidos denominados GFP-10C que cambian la emisión del cromóforo desde el verde al amarillo-verde (Ormö y cols., 1996). La longitud de onda de excitación de EYFP es de 513 nm y presenta su pico de emisión a 527 nm (Figura 18). Además, el vector contiene el gen *Neo^r*, que codifica para la neomicina fosfotransferasa y que confiere resistencia al antibiótico G418 o geneticina, lo cual nos permitió realizar la selección positiva de las células que han sido transfectadas, y el gen *Kan^r*, de resistencia a kanamicina, que fue utilizado para seleccionar las bacterias transformadas con el vector (Figura 16). El uso del vector pEYFP-Mito permite marcar las mitocondrias de manera constitutiva y observarlas mediante el uso de microscopía de fluorescencia tanto en preparaciones fijadas como frescas.

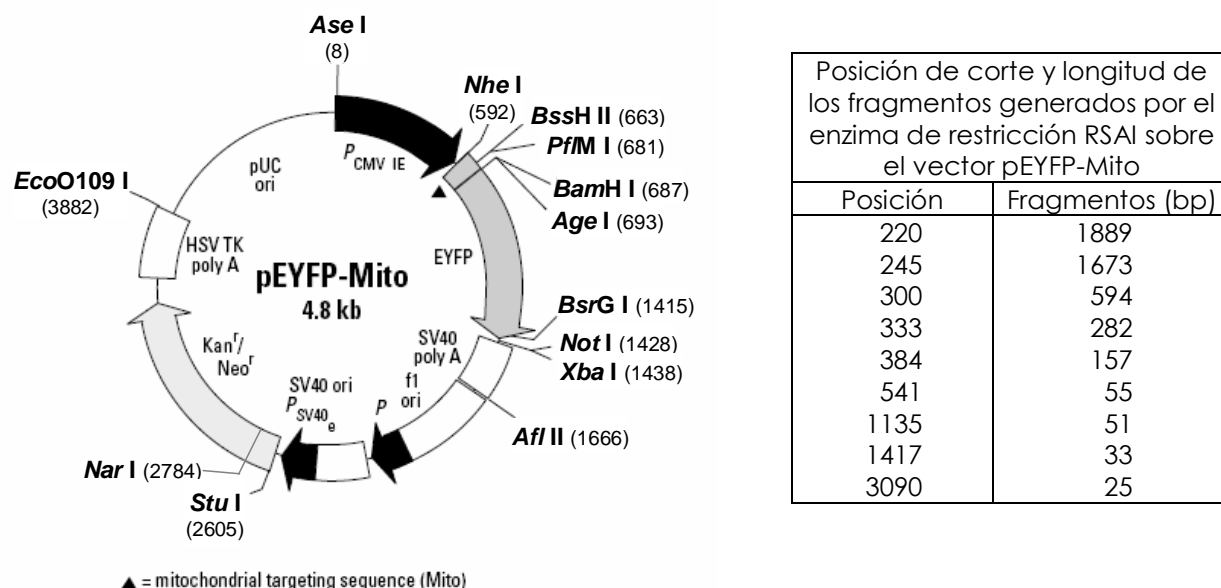


Figura 16. Esquema del vector pEYFP-Mito con indicación de los sitios donde se producen los cortes por distintas enzimas de restricción. RsaI corta el vector pEYFP-Mito en 9 fragmentos mientras que BamHI, NarI, NheI y NotI lo cortan en un único sitio de manera que linearizan el vector. Para claridad del esquema los sitios de corte de RsaI no se muestran en el vector sino en el panel adjunto a la derecha.

3.1.- Expansión clonal del vector pEYFP-Mito

Mediante la transformación de bacterias con plásmidos se introducen fragmentos de ADN en las bacterias y se aprovecha su alta tasa de replicación para la amplificación del ADN y el posterior aislamiento y purificación de los clones transformados. Este proceso se realizó por choque térmico y se utilizaron bacterias competentes de la cepa DH5- α de *E. coli* (Hanahan, 1983).

Al objeto de transformar estas bacterias con el vector pEYFP-Mito se añadieron 100 ng de ADN a 200 μ l de bacterias competentes y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación, se realizó un choque térmico a 42°C durante 3 minutos seguidos de incubación en hielo durante 2 minutos. Seguidamente se añadió 1 ml de medio de cultivo bacteriano Luria-Bertoni (medio LB), incubándose la suspensión de bacterias a 37°C con agitación durante 90 minutos. Posteriormente, se procedió a la siembra del cultivo bacteriano en placas de agar-LB conteniendo kanamicina (25 μ g/ml) a fin de seleccionar aquellas bacterias que hubieran incorporado el plásmido. Las placas se incuban a 37°C y 5% de CO₂ durante 24-48 horas.

Al cabo de este periodo de tiempo, se seleccionan varias colonias que se inocularon en 5 ml de medio LB en presencia de kanamicina (25 μ g/ml) a 37°C con agitación durante 3-4 h para expandir las colonias de bacterias seleccionadas. Una vez que las bacterias han proliferado se vuelven a inocular en 250 ml de medio LB suplementado kanamicina y se mantienen durante toda la noche a 37°C. A continuación, se realizó el aislamiento del ADN plasmídico y el análisis de secuencias. Para ello, se utilizó el kit *plasmid purification* para maxipreparaciones de ADN de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras obtener los plásmidos, se comprueba la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción apropiadas (Tabla 4) y posterior análisis y evaluación cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se empleó una concentración de agarosa al 2% en tampón *Tris/Borato/EDTA* (TBE) 1x. Las electroforesis se realizaron a un voltaje de 100 voltios durante un tiempo que osciló entre 2 y 5 horas.

En la figura 17 se muestran, en un gel de agarosa, los fragmentos correspondientes al vector pEYFP generados por el enzima de restricción RsaI (Roche, Suiza). Aunque RsaI genera 9 fragmentos al interaccionar con el vector pEYFP-Mito (de 1889, 1673, 594, 282, 157, 55, 51, 33 y 25 pares de bases) en las condiciones de electroforesis utilizadas sólo fue posible observar claramente los fragmentos de 1889, 1673 y 594 pares de bases. Posiblemente los fragmentos de tamaño más pequeño podrían haber sido resueltos aumentando el tiempo de electroforesis o aumentando la señal por medio de un incremento en la cantidad de ADN utilizada en estos geles. Sin embargo, el objetivo era únicamente comprobar que el ADN en cuestión había sido amplificado de manera correcta, lo cual era patente por la aparición de los tres primeros fragmentos

(1889, 1673 y 594). Además, también se reveló la presencia del ADN purificado mediante el uso de otras enzimas de restricción y otros marcadores, cuyos resultados confirmaban que el proceso de amplificación había sido llevado a cabo correctamente. Los enzimas de restricción y marcadores de ADN se muestran en las tablas 6 y 7, respectivamente, indicando para cada uno de ellos cual fue su proveedor.

Tabla 6. Enzimas de restricción empleadas en el control de la amplificación del vector pEYFP-Mito

Enzima de restricción	Proveedor
RsaI	Roche
BamHI	New England BioLabs
NarI	Roche
NheI	Roche
NotI	Roche

Tabla 7. Marcadores de ADN utilizados para el control de la amplificación del vector pEYFP-Mito

Marcador de ADN	Proveedor
Marker XIV, 100 bp ladder	Roche
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs
2-Log DNA Ladder	New England BioLabs
MassRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas

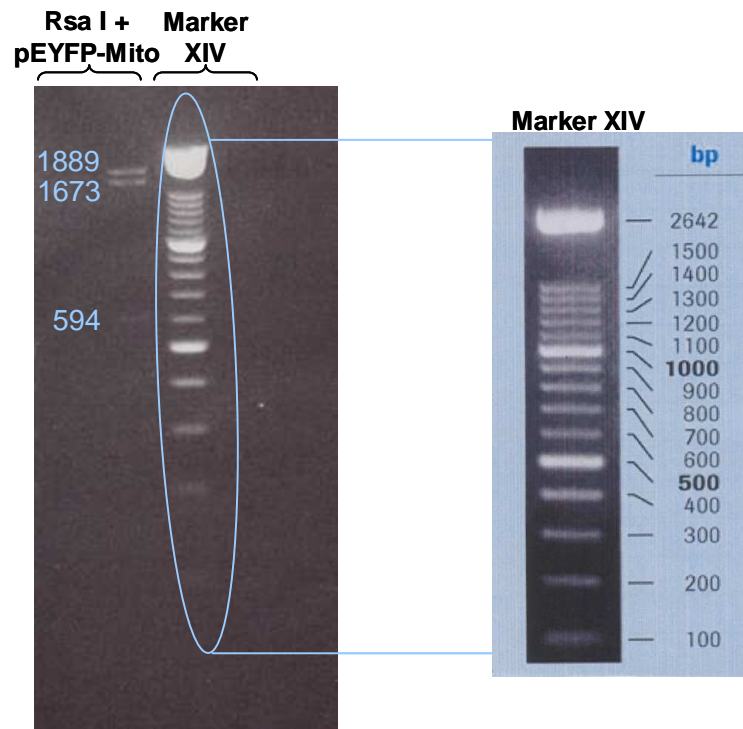


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del vector pEYFP-Mito tratado con el enzima de restricción *Rsa I*. En la calle izquierda del gel se distinguen tres bandas de ADN que por comparación con las bandas del patrón, Marker XIV de Roche (véase a la derecha el esquema provisto por la casa comercial, el el que se aprecia una diferencia de 100 pb entre cada dos bandas consecutivas) corresponden a fragmentos de ADN de 1889, 1673 y 594 pb. Para revisar todos los sitios de corte de *Rsa I* ver la figura 16.

Finalmente, el ADN purificado fue cuantificado mediante la medida de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro y almacenado a -20°C a concentraciones comprendidas entre $0,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $0,10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.2.- Técnicas utilizadas para realizar la transfección de las células Jurkat

En este trabajo se han empleado cuatro procedimientos de transfección de las células T Jurkat con el vector pEYFP-Mito: inmunoporación, electroporación y el uso de los reactivos comerciales Effectene® Transfection Reagent (Qiagen, EEUU) o FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche, Alemania).

- Inmunoporación

El método de inmunoporación empleado (*Immunoporation kit*; IPBio Sciences Ltd., Reino Unido) se basa en la unión de esferas cubiertas de anticuerpos a un antígeno específico de la superficie celular. La agitación continuada de la suspensión celular provoca el movimiento de las esferas y la

generación de poros transitorios en la membrana celular a través de los cuales el ADN puede pasar al interior celular.

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se mezclaron 4×10^6 esferas unidas al anticuerpo primario con 2×10^5 células y $0,3 \mu\text{g}$ del ADN en un volumen final de $0,5 \text{ ml}$ en el buffer de transfección para la inmunoporación, proporcionado en el kit empleado. Estos componentes eran mezclados en un agitador a 40 rpm a temperatura ambiente ($20\text{-}22^\circ\text{C}$) durante toda la noche (16 horas). Tras Ésto, las esferas eran separadas de las células con la ayuda de un separador magnético (IPBio Sciences Ltd., Reino Unido). Por ultimo, se procedía a realizar la siembra de las células a una densidad de 5×10^5 células/ml y a su incubación a 37°C para, tras unas 48 horas , comprobar la eficiencia de transfección mediante análisis mediante microscopía de fluorescencia.

- Electroporación

La electroporación consiste en la producción de poros nanométricos en la membrana plasmática mediante la aplicación a las células de descargas eléctricas de alto voltaje y corta duración. El diámetro de estos poros es lo suficientemente grande como para que macromoléculas como el ADN puedan pasar a su través. Cuando desaparece el campo eléctrico los poros vuelven a cerrarse, quedando el ADN atrapado en el citoplasma celular.

En los experimentos de electroporación se emplearon cantidades variables de ADN ($1 \mu\text{g}$, $2 \mu\text{g}$ y $6 \mu\text{g}$) para la transfección de $2,5 \times 10^6$ células en un volumen final de 1 ml de PBS (solución acuosa compuesta por 137 mM NaCl , $2,7 \text{ mM KCl}$, $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ y $2 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$). El equipo de electroporación utilizado fue el *Bio-Rad Gene Pulser*, escogiendo un voltaje de 250 Voltios y una capacitancia de $960 \mu\text{F}$. Inmediatamente después de la administración del pulso, se procedió a la siembra de las células a una densidad de 5×10^5 células/ml en placas Petri de 10 cm , conteniendo 4 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y se incuban a 37°C durante 48 horas . Este método también fue realizado linearizando el ADN mediante el uso de una enzima de restricción, *NarI* (Roche, Alemania), que realiza un único corte en el vector pEYFP-Mito.

- Transfección empleando Effectene

La transfección mediante el conjunto de reactivos *Effectene*[®] (Qiagen, EEUU) se fundamenta en el empleo de un vector no viral basado en lípidos catiónicos no liposomales junto con un agente que incrementa el empaquetamiento del ADN y un tampón optimizado. El agente empaquetador condensa las moléculas de ADN que son recubiertas con las micelas de lípidos catiónicos formando un complejo de ADN recubierto por lípidos que facilitan su transporte al interior celular. De acuerdo con el protocolo recomendado por la

casa comercial, se añadió 1 ml de medio completo a 180 µl de complejo de transfección (*Buffer EC, Enhancer solution y Effectene Reagent*) conteniendo 1 µg de ADN y la mezcla era incorporada a 4 ml de una suspensión de células (5×10^6 células/ml) en medio completo RPMI-1640, que se mantuvo en incubación a 37°C durante 48 horas.

- Transfección empleando FuGENE 6

Los diferentes tipos de linfocitos T son células consideradas difíciles de transfectar con bajos porcentajes de eficacia; el reactivo FuGene (Roche) apareció en el mercado como el primer reactivo que permite una transfección eficiente en linfocitos (www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/No1_99/b199scho.htm) por lo que nos decidimos por su uso.

El FuGENE 6 (Roche, Alemania) es una mezcla multi-lipídica de formulación no liposomal que forma complejos con el ADN y luego transporta dichos complejos al interior de las células.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, FuGENE se diluyó en medio fresco hasta un volumen final de 100 µl y a esta mezcla se le añadió el ADN (0,5 µg de DNA por pocillo) de interés de manera que la relación entre ambos era 3 ó 6 µl de FuGENE: 1 µg de DNA. Posteriormente, este conjunto se añadió a un volumen de 1 ml de células en cultivo (10^6 células/ml) que se mantuvieron en incubación a 37°C durante 48 horas.

Una vez transcurridas 48 horas de la transfección, al objeto de seleccionar una población homogénea y estable de células que expresaran el vector, se procedió a administrar geneticina (400 µg/ml; G418, Invitrogen) al medio de incubación.

4.- MEDIDAS DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un fenómeno molecular por el que una sustancia absorbe luz de una determinada longitud de onda (equivalente a una determinada energía) y, casi inmediatamente, emite luz de una longitud de onda mayor, ésto es, de menor energía. La intensidad y el color de la luz absorbida y emitida son propiedades características de cada molécula fluorescente o fluoróforo.

La fluorescencia resulta de un proceso que consta de tres etapas: excitación, pérdida de energía y emisión. Durante la etapa de excitación, la molécula absorbe un fotón procedente de una fuente de luz externa y, como consecuencia, pasa desde el estado fundamental a un estado excitado caracterizado por un superior nivel energético (etapa de excitación). Una vez excitada la molécula pasa rápidamente al modo vibracional o de menor energía del estado excitado, disipándose una determinada energía en forma

de calor (etapa de pérdida de energía). Posteriormente, la molécula tiende a pasar de nuevo al estado fundamental a través de un proceso de desexcitación en virtud del cual emite energía en forma de luz (etapa de emisión). Dado que durante el proceso hay pérdida de energía, la longitud de onda del fotón emitido (λ_{em}) es mayor que aquella del fotón absorbido (λ_{ex}). A esta diferencia en las longitudes de onda se la conoce como desplazamiento de Stokes.

Los fluoróforos son sustancias que, generalmente, presentan estructuras poliaromáticas o heterocíclicas con presentan enlaces o conjuntos de enlaces responsables de la absorción de luz.

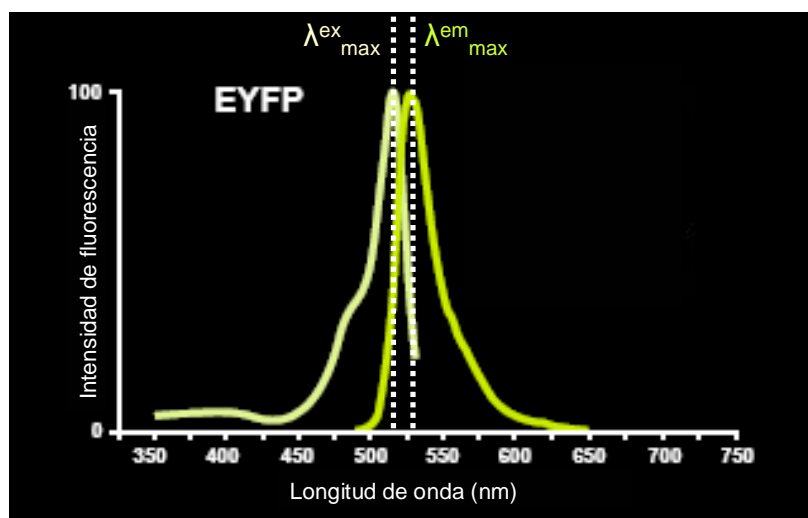


Figura 18. Espectro fluorescente del vector pEYFP-Mito. Espectros de excitación (amarillo) y de emisión (verde) de la proteína pEYFP-Mito utilizada en este trabajo. Se indican las longitudes de onda máximas de la luz para la excitación (λ_{ex_max}) y la emisión (λ_{em_max}).

Cada fluoróforo posee espectros característicos de excitación y de emisión. El espectro de excitación mide la intensidad de luz emitida al ir variando la longitud de onda con la que se ilumina la muestra (λ_{ex}) mientras que el espectro de emisión mide la intensidad de luz emitida a cada longitud de onda (λ_{em}), cuando se fija la longitud de onda con la que se ilumina.

4.2.- Equipos utilizados para la detección de fluorescencia

Los elementos requeridos para la detección de fluorescencia son fundamentalmente cuatro. En primer lugar, se requiere una fuente de luz para provocar la excitación de la muestra. En principio, la fuente más adecuada será aquella capaz de emitir luz exclusivamente con la longitud de onda que se requiera –habitualmente la correspondiente a λ_{ex_max} (longitud de onda de máxima excitación)–. Es necesaria, también, la presencia de un fluoróforo, así como de filtros para separar los fotones de emisión de los de excitación y, por último, un detector que capte la luz emitida y la transforme en una señal

eléctrica que pueda ser finalmente cuantificada y, eventualmente, representada mediante una imagen. En este trabajo hemos utilizado varios equipos de detección y de medida de fluorescencia, como el microscopio de epifluorescencia, el microscopio de fluorescencia confocal y el citómetro de flujo.

4.2.1.- Microscopía de epifluorescencia convencional

Este microscopio es similar al microscopio óptico convencional, a excepción de que la luz incidente, que procede de una potente fuente de luz halógena (lámpara de xenón o de mercurio), accede a la muestra a través del objetivo que actúa como condensador. Inmediatamente antes del objetivo y en el camino óptico dispone de un espejo dicróico que refleja la luz de excitación pero deja pasar la luz emitida. Además, la luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) ha de atravesar un filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

Existen disponibles comercialmente un gran número de juegos de filtros para la selección de las longitudes de onda de excitación y de emisión características de los diferentes fluoróforos, incluyendo conjuntos que permiten la observación simultánea de dos o más fluoróforos.

El equipo utilizado en nuestro trabajo consta de una lámpara de excitación de xenón (Cairn Research Ltd, Reino Unido), acoplada a través de una fibra óptica a un microscopio invertido de fluorescencia Eclipse TE2000-E (Nikon), dotado con un objetivo 40x de inmersión en aceite y apertura numérica de 1,3 y con un objetivo apocromático de 60x de inmersión en aceite y apertura numérica de 1,4 y equipado también con los filtros de fluorescencia UV-2A (330-380 nm), B-2A (450-490) y G-2A (510-560 nm). La luz emitida por la lámpara pasa a través de un monocromador Optoscan (Cairn Research Ltd, Reino Unido), emitiendo luz de la longitud de onda seleccionada. El módulo de detección consiste en una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics, Japón) mientras que los protocolos de adquisición y procesamiento de imágenes fueron elaboradas con la aplicación SimplePCI software v5.3 (Hamamatsu Photonics, Japón).

La microscopía de fluorescencia convencional junto con el análisis de imagen fue empleada en la evaluación del contenido y distribución de colesterol o la presencia de balsas lipídicas en la membrana plasmática de las células T Jurkat. Para el marcaje de las moléculas de colesterol se empleó filipina (0,05 mg/ml; Sigma), que se administró, durante 2 horas a temperatura ambiente, a preparaciones celulares dispuestas en placas Petri de 35 mm de diámetro cuya base es un vidrio de 0,17 mm de grosor (WillCo-dish™), previamente fijadas con paraformaldehído (solución acuosa al 3% en PBS suplementada con 2 mM MgCl₂ y 1,25 mM de EGTA) durante 1 hora. Para el marcaje de las balsas lipídicas se utilizó el conjunto de reactivos Vybrant® Alexa

Fluor 555 Lipid Raft (Molecular Probes) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Estos reactivos emplean la subunidad B de la toxina colérica (CT-B) marcada con Alexa Fluor 555 que se une a la cadena de pentasacárido del gangliósido G_{M1} , específico de las balsas lipídicas. Además, las balsas lipídicas marcadas con CT-B son agregadas con anticuerpos anti-CT-B al objeto de facilitar su visualización. Estos experimentos se llevaron a cabo sobre células a las que previamente se les había extraído o incorporado colesterol en sus membranas, así como sobre células control no tratadas. Para la extracción de colesterol se recurrió a la metil β ciclodextrina (M β CD; Sigma) a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (25 minutos a 37°C), mientras que para la incorporación de colesterol se utilizó una mezcla de colesterol (Sigma) y hidroxipropil β ciclodextrina (H β CD, Fluka; 25 minutos a 37°C). Esta mezcla se preparaba a partir de una solución de colesterol (25 mg/ml en etanol) y otra de H β CD (331,2 mg/ml en PBS). Ambas soluciones se mezclaron en una relación de 80 μl de la solución de colesterol por cada 920 μl de la solución de H β CD.

4.3.2.- Microscopía de fluorescencia confocal

La ventaja que ofrece el microscopio confocal respecto al microscopio de epifluorescencia convencional estriba en que recoge la luz procedente del objeto a nivel de su plano focal, eliminando la fluorescencia que viene de áreas fuera de foco.

El fundamento del microscopio confocal es, básicamente, el mismo al descrito anteriormente. Sin embargo, algunos de los componentes difieren en sus características. En primer lugar, la luz de excitación (en este caso, procedente de uno o varios láser) ilumina áreas muy precisas de la preparación. De este modo, se atenúa el fenómeno de blanqueamiento sufrido por las muestras cuando son excitadas durante un largo periodo de tiempo o a una intensidad lumínica muy elevada. En segundo lugar, la luz fluorescente emitida es conducida hacia un diafragma conocido como *pinhole*. Esta particularidad del equipo supone una gran ventaja, ya que el resto de luz no procedente del plano focal, no podrá atravesar este estrecho iris y como consecuencia no será detectada.

El equipo utilizado fue el Radiance 2000 (Bio-Rad Laboratories, EEUU) acoplado a un microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon UK Limited, Reino Unido), dotado con un objetivo de 60x de inmersión en aceite y apertura numérica de 1,4. La fuente de luz utilizada fueron tres láseres: de argón de 488 nm, *Green HeNe* de 543 nm y un *red laser diode* de 638 nm) bajo control con el programa LaserSharp 2000 (Bio-Rad, Reino Unido). Las señales fluorescentes obtenidas fueron procesadas y analizadas con la aplicación LaserPix (Bio-Rad, EEUU).

La microscopía confocal se empleó en la visualización de las mitocondrias en células T Jurkat transfectadas con el vector pEYFP-Mito. A tal

fin, las células con las mitocondrias marcadas fluorescentemente de manera constitutiva fueron sembradas en cubreobjetos y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y, posteriormente, permeabilizadas con Tritón X100 durante 5-10 minutos. A continuación, se llevó a cabo un doble marcaje con las sondas fluorescentes faloidina conjugada con tetrametilrodamina B isotiocianato (faloidina-TRITC; 0,1 μM durante 10 minutos; λ_{ex} 540-545 nm, λ_{em} 570-573 nm) y TO-PRO®-3 yoduro (10 μM durante 10 minutos; λ_{ex} 642 nm, λ_{em} 661 nm), para teñir F-actina y el núcleo celular respectivamente. Los cubreobjetos fueron finalmente montados en portas con Vectashield, una solución de montaje protectora de la fluorescencia.

4.3.3- Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite llevar a cabo un análisis multiparamétrico basado en el registro combinado de diversas características morfológicas, estructurales y funcionales de células incluidas en un flujo laminar de líquido isotónico. Los citómetros de flujo analizan células individuales en suspensión sobre las que incide enfocado un haz de luz láser. La interacción de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permiten diferenciar subpoblaciones celulares en la muestra analizada en función de su tamaño, granularidad o la presencia de un fluoróforo determinado. Las señales emitidas son recogidas por distintos detectores que las transforman en señales electrónicas para su posterior análisis (Figura 19).

Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea en cada célula son los siguientes:

- Señales de dispersión: Resultan de un cambio de dirección de la luz (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. La dispersión de la luz depende de características morfológicas de la célula como su tamaño y complejidad. En los citómetros de flujo se miden dos señales de dispersión: la luz dispersada en un ángulo agudo pequeño (0-10°), coincidente con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (componente de dispersión frontal) y que es proporcional al tamaño celular, y la luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (componente de dispersión lateral) y que está relacionada con la complejidad de la estructura interna de la célula (granularidad) (Figura 19B).

- Señales de fluorescencia: Proviene de fluoróforos capaces de reconocer componentes específicos de determinados componentes celulares. En el punto de interacción con el haz de luz, cada célula emite una señal fluorescente cuya intensidad es proporcional a la cantidad de moléculas de fluoróforos que porte. Los detectores recogen la fluorescencia emitida y transforman esta señal en pulsos eléctricos que una vez digitalizados son procesados por equipos informáticos (Figura 19A).

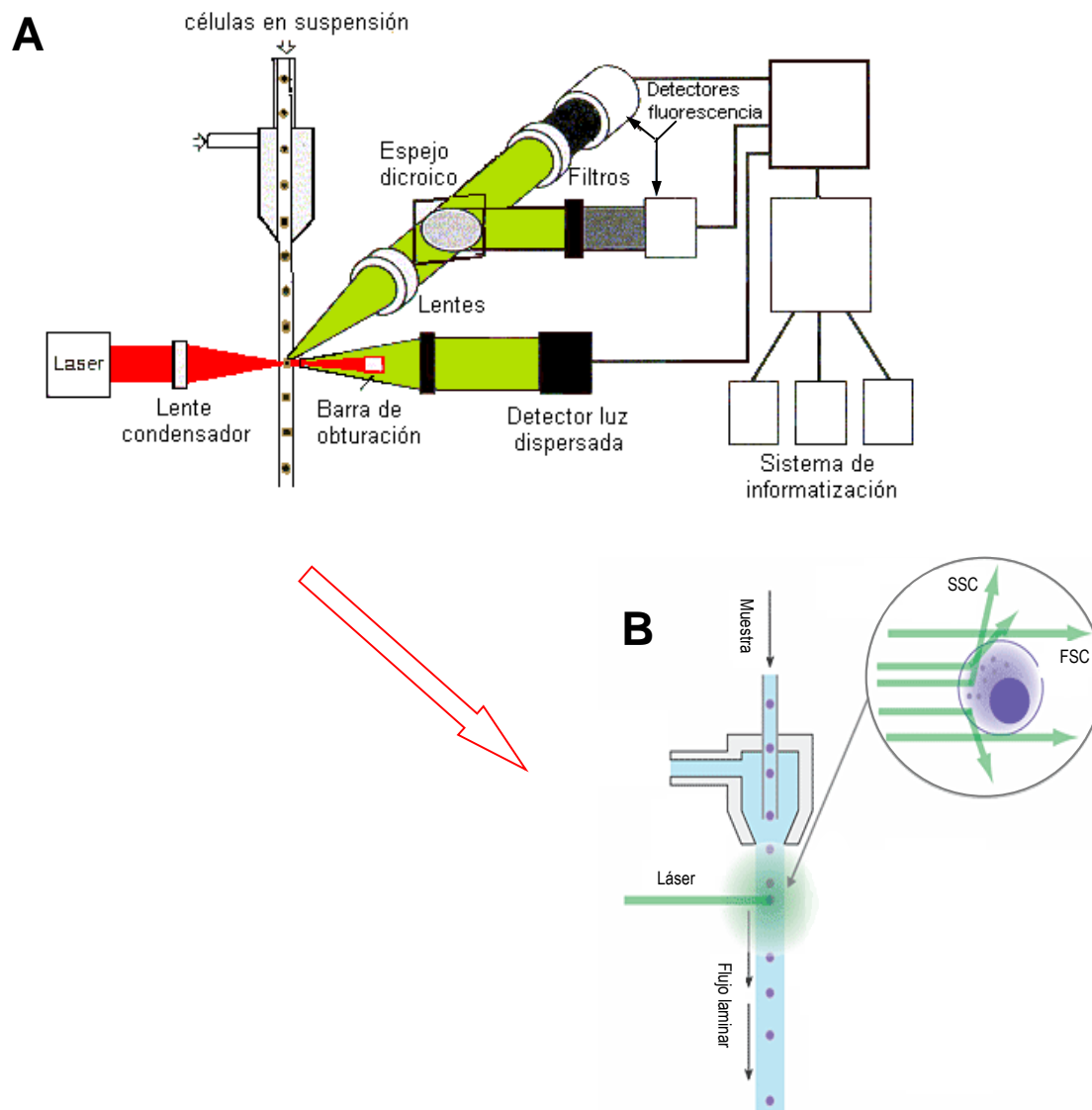


Figura 19. Representación esquemática del funcionamiento de un citómetro de flujo. Las células en suspensión entran en la cámara de flujo de una en una gracias al flujo laminar del líquido isotónico en el que se encuentran. Al pasar por delante del punto de enfoque de un haz de luz de láser emiten luz, dispersada y fluorescente, que son separadas de acuerdo a su dirección y longitudes de onda por diferentes juegos de filtros y espejos. Estas señales lumínicas son recogidas por detectores para posteriormente ser integradas y analizadas con un sistema informático. Por un lado, el citómetro de flujo detecta la fluorescencia emitida por las células tras ser iluminadas por el láser (A) y por otro recoge las señales de dispersión FSC y SSC recogidas por el citómetro de flujo (B).

En este trabajo se ha empleado un citómetro de flujo modelo FACSort™ controlado con la aplicación informática Paint-A-Gate™ (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU). La señal fluorescente correspondiente a 10.000 células era obtenida de una región previamente seleccionada en función del análisis de la luz dispersada (tamaño y granulosidad celulares) que excluía tanto las células fragmentadas como las que se encuentran formando grupos.

Para la medida del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo se emplearon dos indicadores fluorescentes, rodamina 123 (Sigma) y el JC-1 (Invitrogen), sobre células cuya función mitocondrial era potenciada o anulada, así como sobre células control no estimuladas.

La rodamina 123 es una molécula catiónica y lipofílica que se emplea comúnmente como indicador de la funcionalidad mitocondrial, ya que sólo se acumula en mitocondrias metabólicamente activas cuyo potencial de membrana es negativo. El JC-1 es un compuesto catiónico que se acumula en la membrana mitocondrial intacta y emite fluorescencia del verde (525 nm) al rojo (590 nm). A potenciales de membrana negativos, el JC-1 forma agregados (J-agregados) que emiten en el canal del rojo. A medida que la membrana mitocondrial se despolariza, se forman menos J-agregados y se desplaza la fluorescencia del rojo al verde.

Para llevar a cabo estos experimentos, las células T Jurkat fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 células/ml de medio fresco o de medio suplementado con el cóctel mitocondrial e incubadas durante 15 minutos a 37°C. Además, una fracción de las células incubadas con el cóctel fueron posteriormente tratadas con dos inhibidores de la función mitocondrial, la antimicina (5 µg/ml) y la oligomicina (5 µg/ml) durante 25 minutos a 37°C. Estas suspensiones de células T Jurkat en las distintas condiciones experimentales, tras ser lavadas con PBS, fueron utilizadas para llevar a cabo el marcaje de las mitocondrias mediante incubación con rodamina 123 (1 µM, 15 minutos a 37°C) o con JC-1 (2 µM, 25 minutos a 37°C) y posterior centrifugación (800 rpm, 10 minutos) y resuspensión en PBS, antes de ser incluidas en el citómetro de flujo para su análisis.

5.- ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIONES INTRACELULARES LIBRES DE QUELANTES

La aplicación informática MaxChelator es un conjunto de programas de libre disposición (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) desarrollados por el Dr. Chris Patton (University of Stanford, EEUU) para determinar las concentraciones de iones libres en presencia de distintos compuestos quelantes y también, para calcular la concentración de quelante libre en solución.

Hemos utilizado este programa para estimar las concentraciones de ATP libre en la solución interna estándar (tabla 2) suplementada con 10 mM de EGTA, 0,05 µg/ml de antimicina, 0,5 µg/ml de oligomicina, para evitar la producción de ATP endógeno, y distintas concentraciones de ATP.Na (0, 2, 5 y 10 mM). Los cálculos son realizados manteniendo fijos algunos parámetros como la temperatura (20 °C), el pH (7,2) y la fuerza iónica (0,16 N). En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para las distintas condiciones experimentales.

Tabla 8. Concentraciones de EGTA, Mg²⁺ y ATP libres estimadas mediante el programa Maxchelator para una solución interna estándar (ver composición en tabla 2) suplementada con EGTA y ATP.Na. Los cálculos se realizaron para una temperatura de 20°C y un pH de 7,2 asumiendo una fuerza iónica de la solución de 0,16. A/O es introducido para evitar la generación de ATP por la mitocondria.

Solución intracelular	EGTA		ATP		Mg ²⁺	
	Total	Libre	Total	Libre	Total	Libre
EGTA + A/O	10 mM	9,73 mM	2 mM	0,23 mM	3 mM	0,93 mM
EGTA + A/O + 2mM ATP.Na	10 mM	9,90 mM	4 mM	1,33 mM	3 mM	0,23 mM
EGTA + A/O + 5mM ATP.Na	10 mM	9,97 mM	7 mM	4,11 mM	3 mM	0,08 mM
EGTA + A/O + 10mM ATP.Na	10 mM	9,98 mM	12 mM	9,05 mM	3 mM	0,04 mM

6.- MODELOS MATEMÁTICOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA [Ca²⁺]_i

Para estimar la extensión y amplitud de los microdominios de Ca²⁺ generados en la vecindad de la boca interna de un canal CRAC usamos el programa Pore, desarrollado por el Dr. James Kenyon (University of Nevada) y que se encuentra disponible en la página web www.medicine.nevada.edu/physio/docs/default.htm. Este programa permite realizar el cálculo de la extensión de la concentración de Ca²⁺ en presencia de un quelante de Ca²⁺ mediante el empleo de la ecuación propuesta por Neher (Neher, 1986). El tamaño de este microdominio va a estar determinada por el flujo de Ca²⁺ a través de cada canal, el coeficiente de difusión del Ca²⁺ en el citoplasma celular, la concentración de quelante presente y la constante cinética de unión del quelante al Ca²⁺, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$[Ca^{2+}]_{cyt}(r) = [Ca^{2+}]_{\infty} + \frac{i_{CRAC}}{4\pi F D_{Ca} r} \exp(-r/\lambda) \quad (1)$$

donde [Ca²⁺]_{cyt}(r) representa la concentración de Ca²⁺ libre en el citoplasma en el estado estacionario como función de la distancia desde el canal, [Ca²⁺]_∞ es la concentración de Ca²⁺ libre en el conjunto de la célula (se asume 10⁻⁷ M), F es la constante de Faraday, D_{Ca} es el coeficiente de difusión para el Ca²⁺ en el citoplasma, r es la distancia desde el canal y λ es la distancia recorrida por el Ca²⁺ en forma libre antes de ser quelado.

A su vez, λ puede calcularse como

$$\lambda = \sqrt{D_{Ca} / (k_{on} \cdot [B])} \quad (2)$$

donde k_{on} es la constante cinética de unión del quelante a Ca^{2+} y $[B]$ es la concentración de quelante libre en la solución. La concentración de quelante libre $[B]$ viene determinada por:

$$[B] = \frac{[B]_{tot} \cdot K_D}{K_D + [Ca]_{\infty}} \quad (3)$$

donde $[B]_{tot}$ es la concentración de quelante total (libre más unido a Ca^{2+}) y K_D es la constante de disociación del complejo quelante- Ca^{2+} .

Con los valores introducidos y tras resolver las diferentes ecuaciones el programa elabora una representación gráfica de la concentración de Ca^{2+} intracelular en función de la distancia al canal CRAC en las distintas condiciones experimentales utilizadas (ver apartados 7.4. y 7.11. de los resultados).

RESULTADOS

1.- CARACTERIZACIÓN DE LA CORRIENTE CRAC EN CÉLULAS T JURKAT

Para la identificación de I_{CRAC} en células T Jurkat utilizamos la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula entera, que nos permite el control de la composición del medio intracelular. El registro electrofisiológico de la corriente CRAC fue llevado a cabo mediante la aplicación de rampas de voltaje, que permiten identificar I_{CRAC} en función de algunas de sus características distintivas, como son una marcada rectificación de entrada y un potencial de reversión por encima de +50 mV (Figura 20). Los registros fueron llevados a cabo en células dializadas con una concentración supramáxima de IP_3 (30 μ M) y en presencia de taspigargina (2 μ M).

La corriente CRAC suele medirse en presencia de una alta capacidad quelante capaz de reducir procesos dependientes de Ca^{2+} que provocan la inhibición de la corriente, principalmente el relleno de los depósitos y los fenómenos de inactivación.

Al objeto de comparar si existían diferencias relacionadas con el quelante utilizado procedimos al registro de la corriente en células dializadas con 10 mM de EGTA o 10 mM de BAPTA, dos quelantes con diferentes cinéticas de unión al Ca^{2+} . Mientras que EGTA y BAPTA presentan una afinidad por el Ca^{2+} similar ($K_D = 1,8 \times 10^{-7}$ M y $2,2 \times 10^{-7}$ M, respectivamente) difieren en su cinética de acomplejamiento al Ca^{2+} en dos órdenes de magnitud ($k_{on} = 2,5 \times 10^6$ M⁻¹s⁻¹ y 4×10^8 M⁻¹s⁻¹, respectivamente) (Naraghi y Neher, 1997).

La comparación de las corrientes obtenidas mostraba que, en la mayoría de los casos, la magnitud de la corriente fue mayor en células dializadas con BAPTA comparada con la de células dializadas con EGTA (Figura 20).

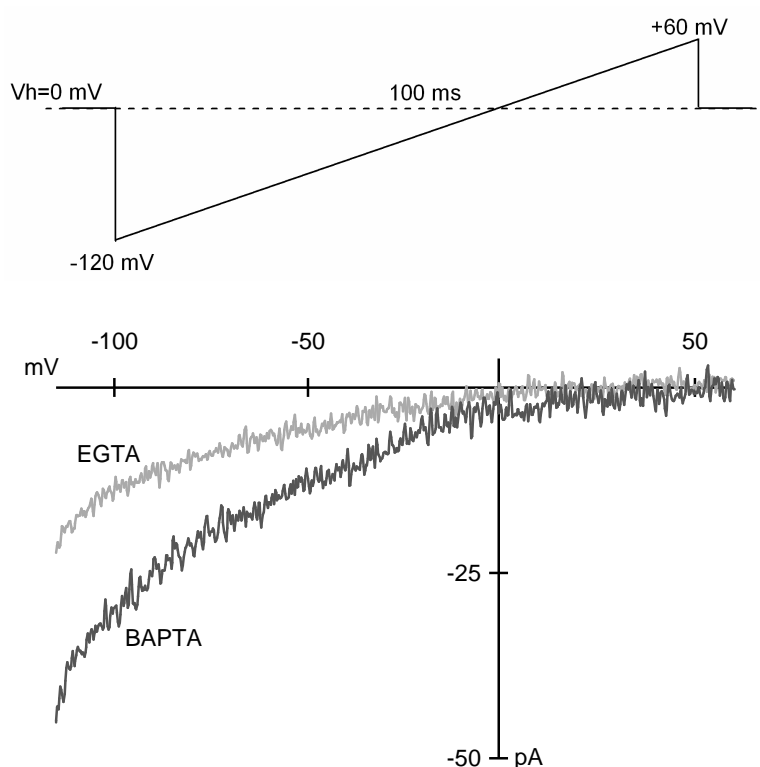


Figura 20. Relación corriente-voltaje (I-V) de I_{CRAC} en células T Jurkat dializadas con una alta concentración (10 mM) de dos quelantes de Ca^{2+} (EGTA o BAPTA). La solución intracelular contenía IP_3 (30 μM), taspigargina (2 μM) y 10 mM de EGTA o BAPTA. La corriente fue medida mediante la aplicación de una rampa de voltaje (panel superior). Los registros representados corresponden a dos células diferentes en el momento en que la corriente alcanzó su mayor amplitud (nótese que los valores de corriente no han sido normalizados en función del tamaño celular).

Al objeto de poder comparar los registros de corriente realizados en células distintas se procedió a medir la amplitud de I_{CRAC} a un potencial de -80 mV y dividirla por el valor de la capacitancia de la membrana de cada célula. La figura 21 representa los cursos temporales promedio de I_{CRAC} normalizada en función de la capacitancia celular, obtenidos de registros realizados en células dializadas con EGTA o BAPTA. En ella se observan diferencias tanto en la amplitud máxima de I_{CRAC} como en el valor de dicha corriente al final del registro entre las células dializadas con EGTA o BAPTA. Dado que ambos parámetros pueden ser indicativos de diferencias en los procesos de activación y de inactivación de I_{CRAC} , decidimos iniciar un análisis cinético detallado de los mismos.

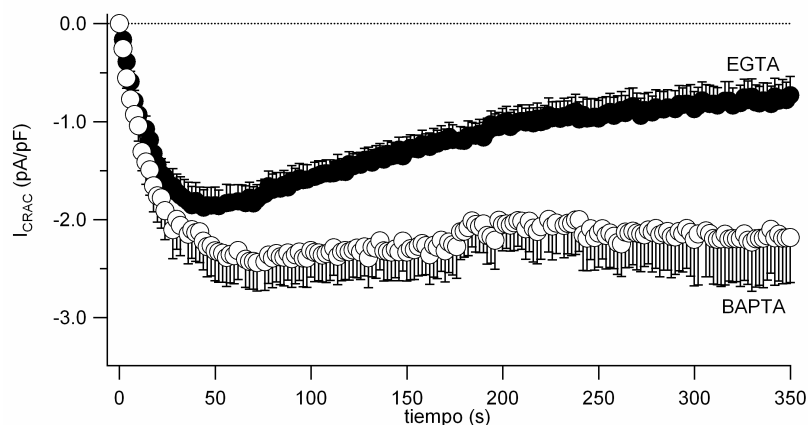


Figura 21. Curso temporal de I_{CRAC} en células Jurkat dializadas con altas concentraciones (10 mM) de dos quelantes exógenos de Ca^{2+} (EGTA o BAPTA). La gráfica representa la amplitud media de I_{CRAC} medida a -80 mV durante la aplicación de rampas de voltaje (vease figura 22) repetidas cada 2 segundos en células dializadas con 10 mM EGTA ($n = 12$) o 10 mM BAPTA ($n = 17$). Las corrientes fueron normalizadas dividiendo por el valor de la capacitancia de la membrana de cada una de las células y representadas frente a la duración de los registros.

2.- EFECTOS DE LA PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE UN QUELANTE DE Ca^{2+} SOBRE LA ACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

A pesar de que los resultados recogidos en la figura 23 apuntaban a una amplitud máxima de I_{CRAC} mayor en las células dializadas con BAPTA que en las dializadas con EGTA, la evaluación estadística de estas diferencias en un elevado número de células (22 células para BAPTA y 33 células con EGTA) no resultó ser significativa. Asimismo, tampoco se constataron diferencias significativas en el tiempo que se tarda la corriente alcanzar su amplitud máxima (t_{max}), ni en la constante cinética de activación (τ_{on}) (Figura 22).

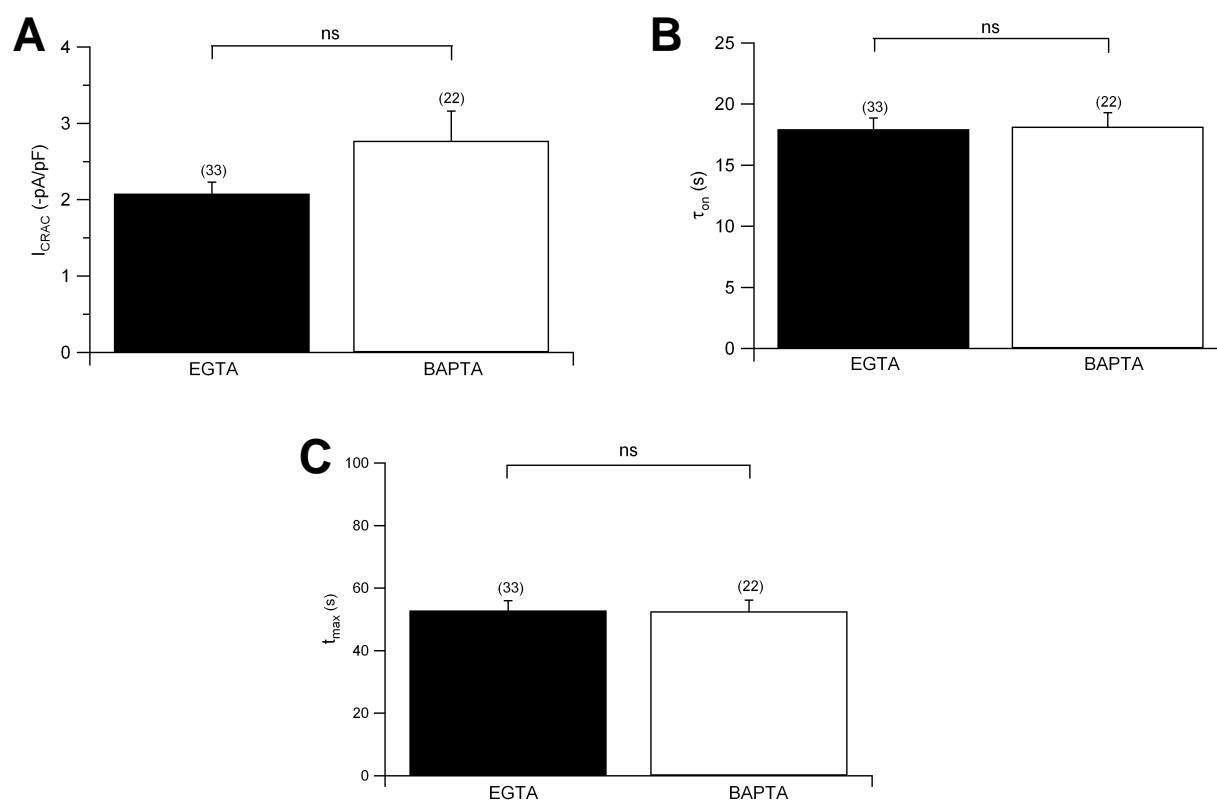


Figura 22. Parámetros cinéticos de la activación de I_{CRAC} en presencia de altas concentraciones de EGTA o BAPTA (10 mM). (A) Amplitud máxima de I_{CRAC} ; (B) constante de tiempo de activación, τ_{on} ; (C) tiempo que tarda en alcanzar su amplitud máxima, t_{max} .

3.- EFECTOS DE LA PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE UN QUELANTE DE Ca^{2+} SOBRE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

El análisis de los parámetros cinéticos de inactivación de I_{CRAC} reveló varias diferencias significativas relacionadas con este proceso entre las células dializadas con EGTA o con BAPTA. Así, la inactivación de I_{CRAC} se produce en la práctica totalidad de las células tratadas con EGTA (11 de 12 células; 95% de células inactivantes) pero sólo en una fracción muy inferior de las células tratadas con BAPTA (8 de 17 células; 45% de células inactivantes). Asimismo, el grado de inactivación observado en la correspondientes fracciones de células inactivantes fue significativamente mayor en las células tratadas con EGTA ($62,45 \pm 6,75\%$) que en las tratadas con BAPTA ($36,85 \pm 6,12\%$). Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la constante cinética de inactivación, τ_{off} (Figura 23).

A tenor de las diferencias existentes en la cinética de unión de Ca^{2+} entre el EGTA y el BAPTA, cabe pensar que los diferentes efectos que producen sobre la inactivación de I_{CRAC} dependiente de Ca^{2+} , estarían relacionados no tanto

con posibles diferencias en la concentración citosólica de Ca^{2+} en el equilibrio sino con diferencias transitorias en dicha concentración y circunscritas a regiones muy próximas a la cara interna de los canales CRAC o microdominios de Ca^{2+} . Dado que en la actualidad no es posible resolver experimentalmente los dominios de Ca^{2+} generados por la actividad de canales CRAC individuales o incluso de pequeños grupos de los mismos, decidimos investigar las posibles diferencias existentes entre los microdominios de Ca^{2+} generados por BAPTA y EGTA mediante la utilización de modelos matemáticos. La descripción de estos modelos y los resultados obtenidos con su aplicación aparecen recogidos en la sección siguiente.

A la luz de los resultados obtenidos en el análisis cinético de la activación de I_{CRAC} , cabría pensar que las diferencias observadas en la amplitud máxima de la corriente puedan ser debidas a un solapamiento de los procesos de activación e inactivación, que determinara, en presencia de EGTA, un mayor grado de inactivación e impidiese a I_{CRAC} alcanzar una mayor amplitud máxima.

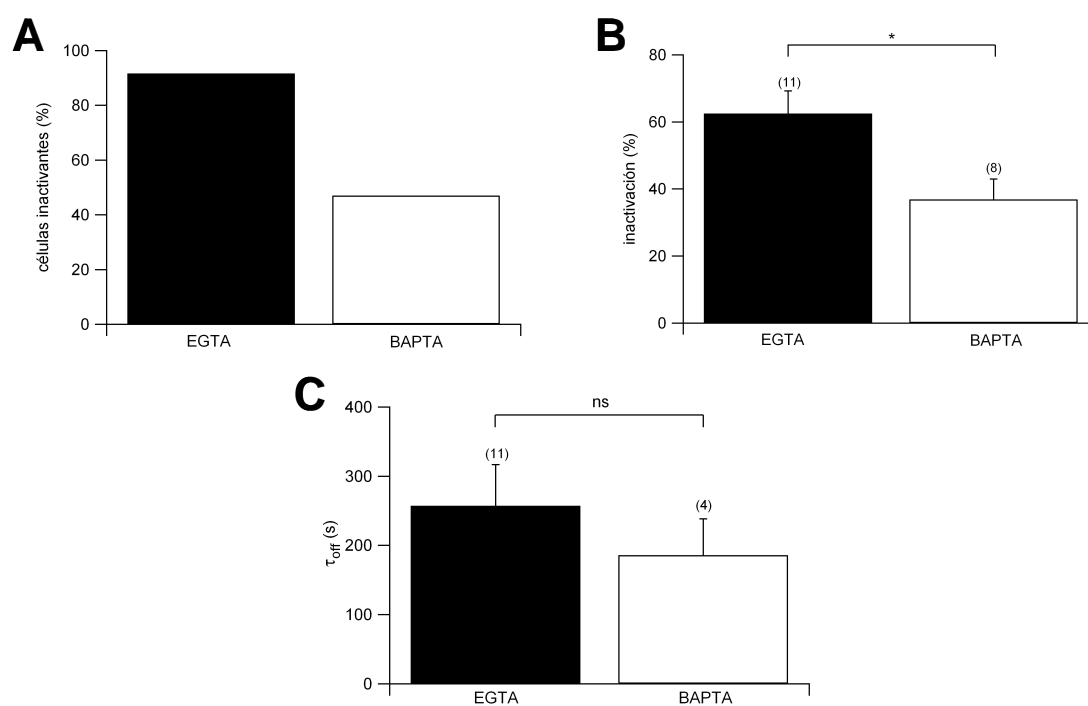


Figura 23. Parámetros cinéticos de la inactivación de I_{CRAC} en presencia altas concentraciones de EGTA o BAPTA (10 mM). (A) Porcentaje de células en la que se observa la inactivación de I_{CRAC} , células inactivantes (%); (B) Porcentaje de inactivación, inactivación (%); (C) Constante de tiempo de inactivación, τ_{off} .

4.- ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS MICRODOMINIOS DE Ca^{2+} EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE DOS QUELANTES DE Ca^{2+} (EGTA o BAPTA).

Como ya ha sido comentado las diferencias observadas en la inactivación de I_{CRAC} sugieren que el patrón espacio-temporal de la concentración de Ca^{2+} en la proximidad de los canales CRAC determina tanto la existencia como la extensión de la inactivación lenta de los mismos. Gracias al uso de modelos matemáticos de difusión se puede estimar la amplitud y la extensión de los microdominios de Ca^{2+} formados alrededor de los canales CRAC. En este trabajo hemos empleado el programa Pore (ver Materiales y Métodos) para calcular la amplitud de los microdominios de Ca^{2+} en la proximidad de un único canal CRAC, en función de la distancia a la boca del canal, en presencia de diferentes quelantes de Ca^{2+} .

Este programa está basado en la ecuación de difusión de Neher (Neher, 1986) en la que deben introducirse los valores correspondientes al coeficiente de difusión del Ca^{2+} en el citoplasma (D_{Ca} , $2,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$); la constante cinética de asociación, K_{on} , de los distintos quelantes de Ca^{2+} ($K_{\text{on, EGTA}} = 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $K_{\text{on, BAPTA}} = 4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y las correspondientes constantes de disociación del complejo quelante- Ca^{2+} ($K_{\text{D, EGTA}} = 1,8 \times 10^{-7} \text{ M}$; $K_{\text{D, BAPTA}} = 2,2 \times 10^{-7} \text{ M}$) (Naraghi y Neher, 1997).

Por otro lado, para estimar el valor de la corriente unitaria a través de cada canal CRAC (i_{CRAC}), procedimos a dividir la amplitud máxima de I_{CRAC} obtenida en registros de célula entera en cada condición experimental (EGTA o BAPTA) por el número de canales CRAC que presumiblemente se expresan en las células T Jurkat. Empleando el análisis de fluctuación del ruido de los registros en célula entera Zweifach y Lewis (1993) estimaron que la conductancia unitaria de los canales CRAC es de 24 fS y que una célula Jurkat expresa más de 10.000 canales CRAC. Por su parte, Kerschbaum y Cahalan (1999) registraron las corrientes unitarias de Na^+ a través de los canales CRAC en presencia de una solución extracelular sin iones divalentes y estimaron, basándose en la permeabilidad relativa de estos canales para Na^+ y Ca^{2+} , que cada célula Jurkat poseería entre 100 y 400 canales CRAC. Nosotros hemos tomado un valor de 1000 canales CRAC por célula de manera que obtenemos un valor de i_{CRAC} de 15,1 fA ó 19,8 fA en células dializadas respectivamente con EGTA o BAPTA.

El programa inicialmente cuantifica la distancia (λ) recorrida por el Ca^{2+} en forma libre en función de la concentración de cada quelante. Así, para una concentración de 10 mM de EGTA o de BAPTA los valores de λ fueron respectivamente de 95,5 y 7,5 nm. Asimismo, las concentraciones libres de EGTA y de BAPTA en células dializadas con estos quelantes fueron calculadas mediante el programa MaxChelator WEBMAXC Standard, obteniendo unos valores de 9,65 mM y de 9,73 mM para EGTA y BAPTA respectivamente.

Finalmente, el programa determina la concentración de Ca^{2+} libre en función de la distancia al canal. La representación gráfica de estos datos

permite evidenciar que en presencia de EGTA se forma un amplio microdominio que se extiende hasta unos 200 nm del canal. Sin embargo, cuando el quelante usado es BAPTA el microdominio de Ca^{2+} se circunscribe a los 50 nm más próximos al canal CRAC (Figura 24). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el BAPTA sería capaz de disminuir más eficazmente la inactivación de I_{CRAC} debido a la reducción del tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados alrededor de cada canal CRAC.

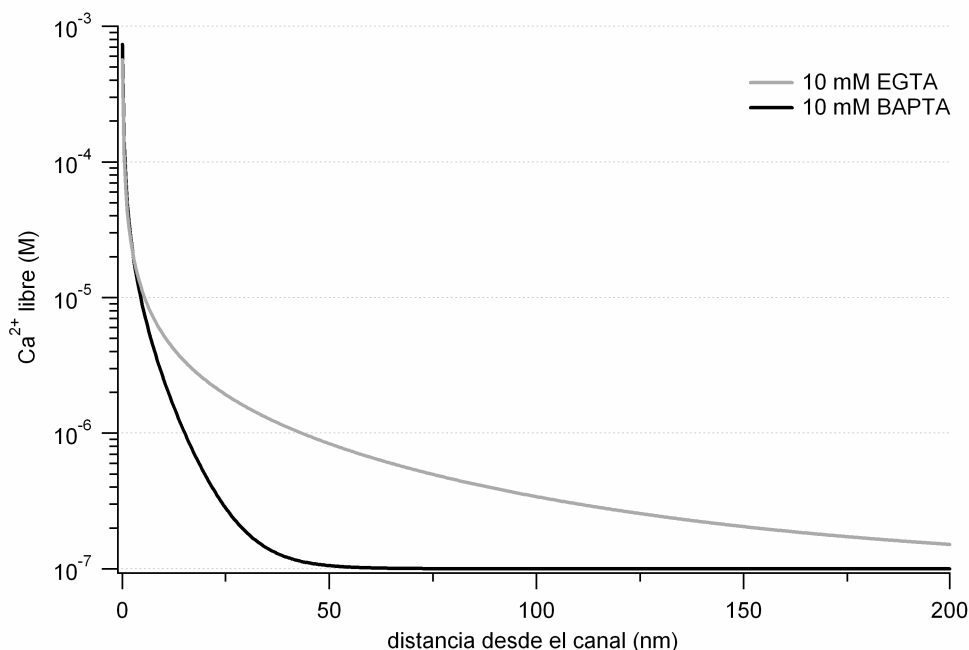


Figura 24. Estimación de la magnitud de los microdominios de Ca^{2+} formados alrededor de un canal CRAC en presencia de altas concentraciones (10 mM) de distintos quelantes exógenos de Ca^{2+} (EGTA o BAPTA). Véase la sección de “Materiales y Métodos” para una descripción detallada del modelo empleado.

5.- PARTICIPACIÓN DE LA INACTIVACIÓN RÁPIDA DE I_{CRAC} EN LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los resultados anteriores nos hicieron interesarnos por conocer si la inactivación rápida de I_{CRAC} se veía también afectada por la presencia de dos quelantes de Ca^{2+} exógenos con propiedades cinéticas distintas.

En la figura 25 se representan superpuestos dos registros de I_{CRAC} durante un pulso hiperpolarizante correspondientes a dos células dializadas con EGTA o con BAPTA. La mayoría de los registros obtenidos mostraban no solo la misma cinética sino también una similar amplitud de corriente en ambas condiciones experimentales por lo que al superponerlos se solapaban no pudiendo distinguir visualmente un registro del otro. Para evitarlo, en esta figura se eligieron dos registros con diferente amplitud de corriente. Se observa que, si bien la magnitud

de I_{CRAC} fue mayor en la célula dializada con BAPTA que con EGTA, la cinética de la respuesta fue enteramente superponible. Este último aspecto se ilustra con mayor precisión al ampliar la porción inicial (50 ms) de la respuesta de I_{CRAC} y ponerse de manifiesto un curso temporal biexponencial paralelo bajo las condiciones experimentales (Figura 25).

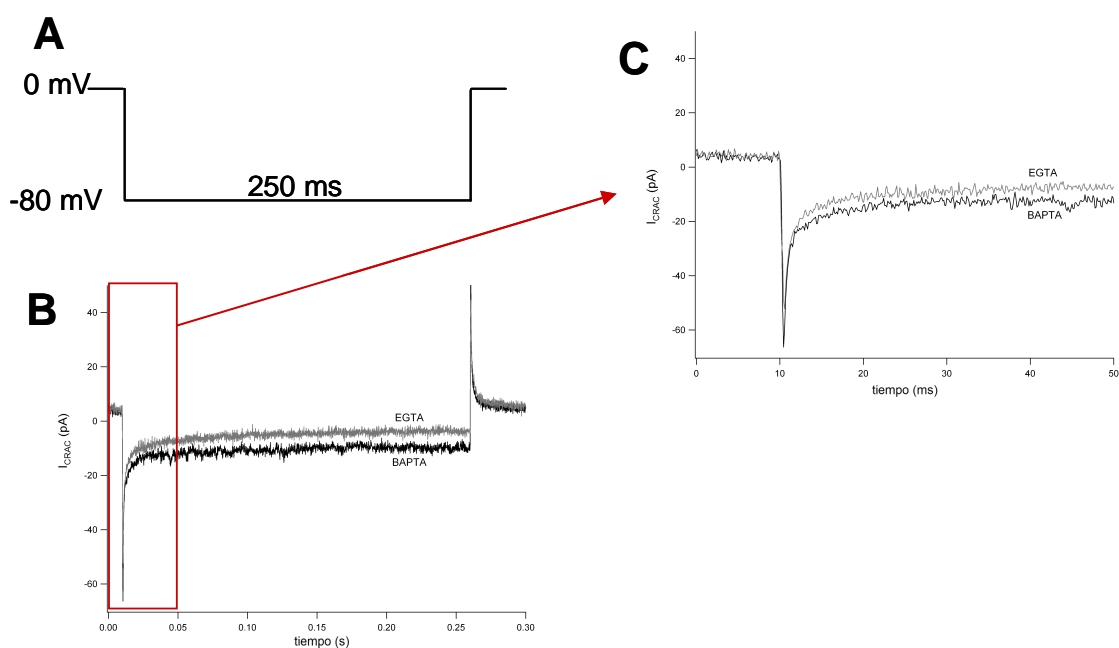


Figura 25. Registros para el análisis de la inactivación rápida de I_{CRAC} en células Jurkat dializadas con altas concentraciones (10 mM) de distintos quelantes exógenos de Ca^{2+} (EGTA o BAPTA). (A) Protocolo de voltaje utilizado para medir la inactivación rápida de I_{CRAC} y (B) respuesta de corriente durante el mismo en dos células dializadas con IP_3 (30 μM), taspigagina (2 μM) y EGTA o BAPTA (10 mM). (C) Respuesta de corriente durante los primeros 50 ms iniciales del pulso de voltaje (recuadro rojo en B). Nótese la cinética biexponencial del proceso de inactivación rápida.

El porcentaje de inactivación rápida se computó mediante el cálculo de la diferencia en la amplitud de I_{CRAC} al comienzo del pulso de voltaje y una vez alcanzado el estado estacionario y la posterior división por la amplitud inicial (ver apartado de Materiales y Métodos). Es de destacar que no pudieran destacarse diferencias significativas en la inactivación rápida en función de la presencia de uno u otro quelante de Ca^{2+} ($51,74 \pm 3,17$ y de $41,79 \pm 2,73$ en presencia de EGTA y BAPTA, respectivamente) (Figura 26).

En consecuencia, nuestros resultados apuntan a que el proceso de inactivación rápida no contribuye a las diferencias observadas en los cursos temporales de I_{CRAC} con el uso de los distintos quelantes de Ca^{2+} , que serían debidas exclusivamente a modificaciones en el componente lento de la inactivación.

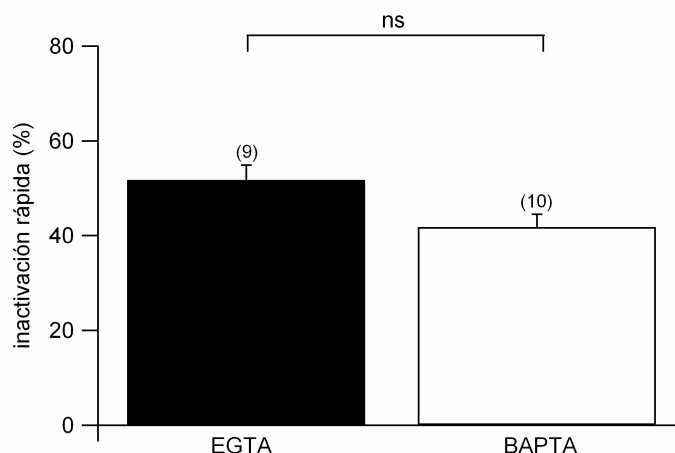


Figura 26. Inactivación rápida de I_{CRAC} en células Jurkat dializadas con altas concentraciones (10 mM) de dos quelantes de Ca^{2+} (EGTA o BAPTA). La inactivación rápida fue medida durante la aplicación de pulsos hiperpolarizantes rectangulares hasta -80 mV de 250 ms de duración.

6.- EFECTOS DEL CÓCTEL MITOCONDRIAL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

En función de las simulaciones realizadas de los microdominios de Ca^{2+} , las diferencias observadas en los resultados obtenidos con BAPTA y EGTA, serían el reflejo de sus efectos sobre los microdominios de Ca^{2+} creados en torno a los canales CRAC, los cuales serían de mayor extensión y amplitud en presencia de EGTA que de BAPTA. Estos microdominios formarían parte de los mecanismos reguladores del canal CRAC dependientes de Ca^{2+} pero también podrían ser modificados fisiológicamente por todos aquellos sistemas de transporte implicados en la homeostasis celular del Ca^{2+} .

Al objeto de conocer si la mitocondria podría ser capaz de modular la corriente CRAC las células fueron dializadas con un cóctel mitocondrial compuesto por sustratos de la respiración celular (piruvato, malato y bifosfato sódico) capaz de potenciar la función mitocondrial (Gunter y Pfeiffer, 1990; Villalba y cols., 1994; Gilabert y Parekh, 2000). Bajo estas condiciones experimentales y en presencia de EGTA intracelular, la amplitud máxima de I_{CRAC} y sus parámetros cinéticos de activación fueron muy similares a los obtenidos en células tratadas sólo con EGTA o sólo con BAPTA (Figura 27). Los valores absolutos de los parámetros relativos a la activación de I_{CRAC} se muestran en la tabla 9.

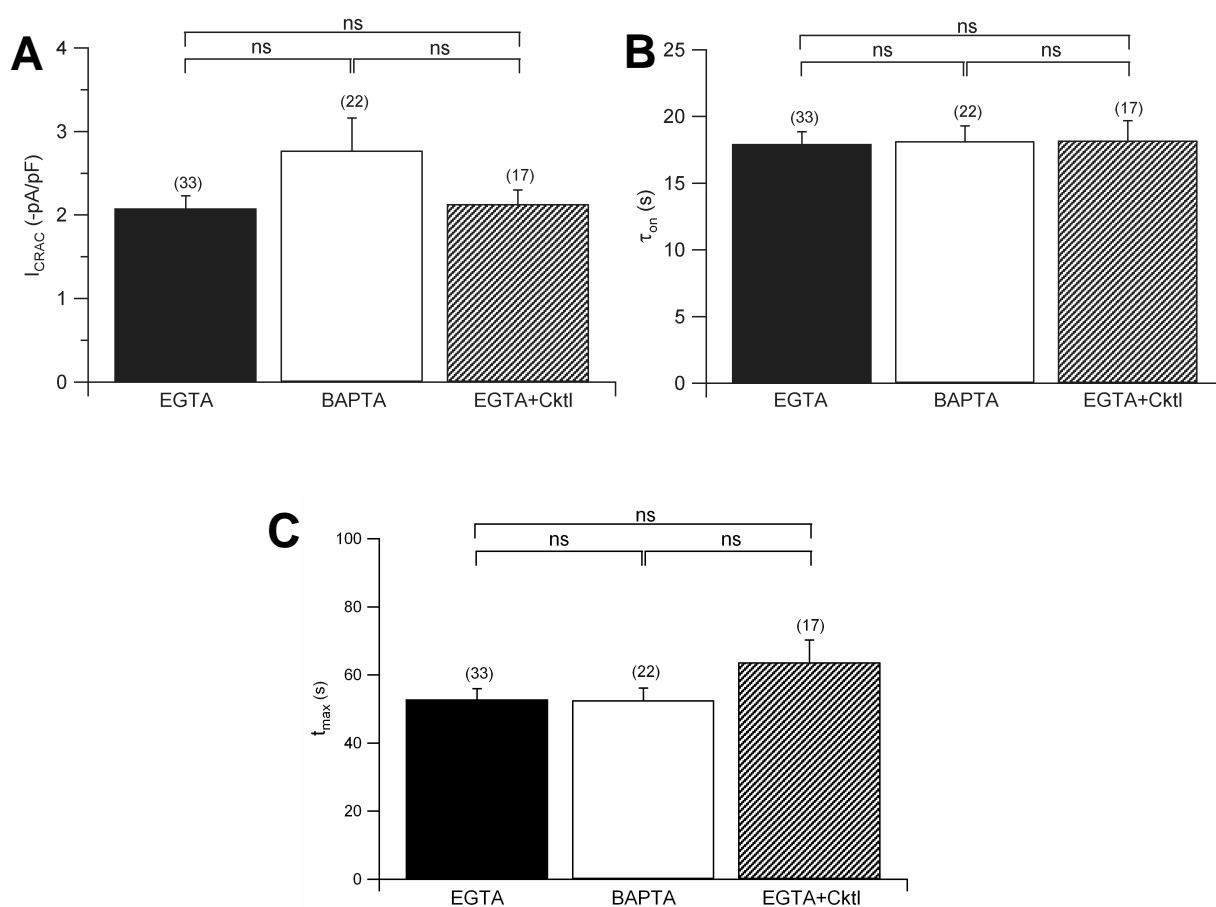


Figura 27. Parámetros cinéticos de la activación de I_{CRAC} en presencia EGTA, BAPTA o EGTA + cóctel mitocondrial (EGTA+Cktl). (A) Amplitud máxima de I_{CRAC} . (B) Constante de tiempo de activación, τ_{on} . (C) Tiempo que se tarda en alcanzar la amplitud máxima, t_{max} .

7.- EFECTOS DEL CÓCTEL MITOCONDRIAL SOBRE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

Por otro lado, el análisis de los parámetros cinéticos de la inactivación mostró que el porcentaje de células inactivantes y la extensión de su inactivación observado en las células tratadas con EGTA + cóctel mitocondrial se reduce significativamente respecto al observado en presencia de EGTA, mostrando valores similares a los obtenidos en las células tratadas con BAPTA (el porcentaje de células inactivantes fue de 37,5% y el porcentaje de inactivación de $30,23 \pm 6,14\%$; Figura 28A y 28B). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la constante de tiempo de inactivación en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas (Figura 28C). Estos resultados sugieren que el cóctel de sustratos de la respiración celular reduce la inactivación de I_{CRAC} por un mecanismo similar al empleado por el BAPTA. Además, cuando se añadió el cóctel mitocondrial a la solución intracelular que contenía BAPTA observamos que en el ninguna de las células se producía inactivación de I_{CRAC}

(0% de inactivación y de células inactivantes; 0/7 células) mientras que en sus células control tratadas solo con BAPTA observamos un $15,16 \pm 6,73\%$ de inactivación (42,85% células inactivantes; 3/7 células) y la amplitud de la corriente en presencia de BAPTA + cóctel mitocondrial ($1,96 \pm 0,20$ pA/pF; $n = 7$) no difería de la observada en presencia de sus controles con BAPTA sólo ($1,89 \pm 0,16$ pA/pF; $n = 7$) (gráfica no mostrada; ver tabla 9).

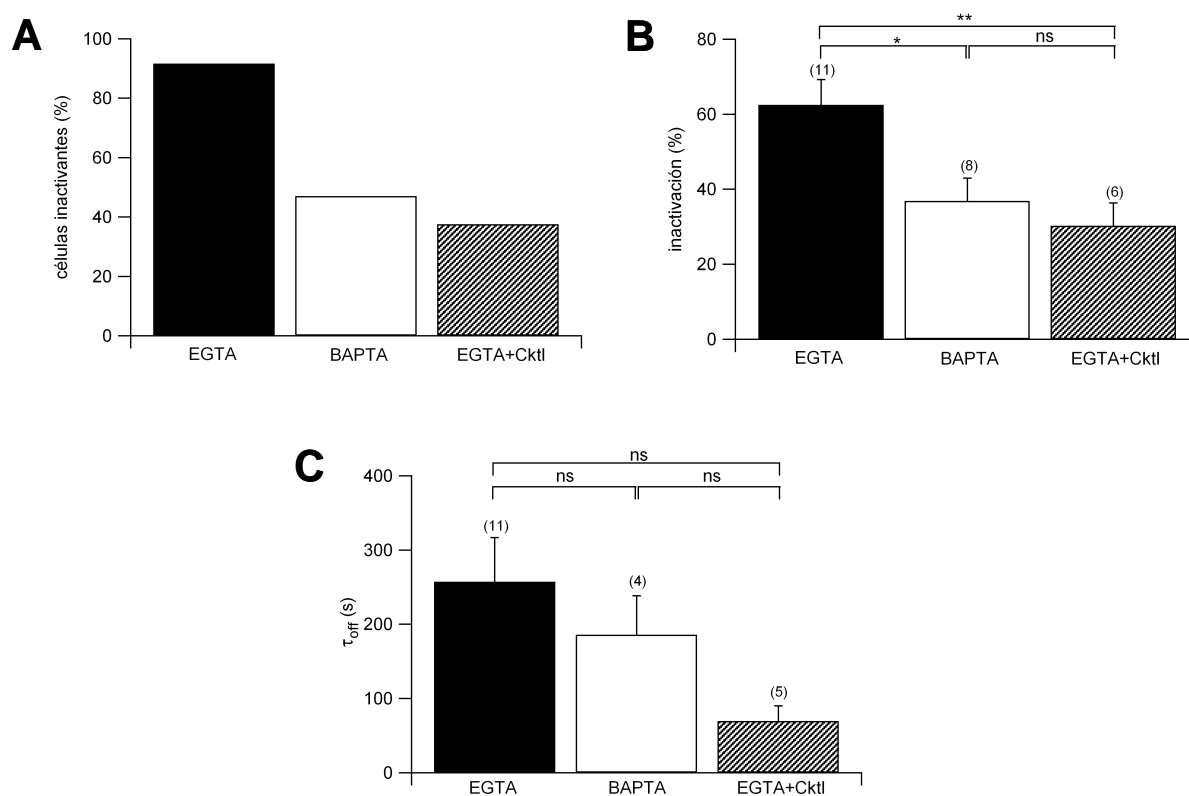


Figura 28. Parámetros cinéticos de la inactivación de I_{CRAC} en presencia de EGTA, BAPTA o EGTA + cóctel mitocondrial (EGTA+Cktl). (A) Porcentaje de células que muestran inactivación, células inactivante. (B) Porcentaje de inactivación. (C) Constante de tiempo de inactivación, τ_{off} .

En la tabla 9 se resumen los valores de los parámetros cinéticos de la activación (amplitud máxima de la corriente, I_{CRAC} , constante de tiempo de activación, τ_{on} , y tiempo que tarda en alcanzarse la amplitud máxima de la corriente, t_{max}) y de la inactivación (porcentaje de inactivación, % inactivación, porcentaje de células inactivantes, % inactivantes, y constante de tiempo de inactivación, τ_{off} , de I_{CRAC} en células dializadas con 10 mM de EGTA, 10 mM de BAPTA o 10 mM de EGTA + cóctel mitocondrial.

Tabla 9. Activación e inactivación de I_{CRAC} en células dializadas con 10 mM EGTA, 10 mM BAPTA o 10 mM EGTA + Cóctel mitocondrial (EGTA+Cktl). La τ_{off} del grupo dializado con BAPTA+Cktl no se pudo calcular debido a que no existían células inactivantes.

Solución intracelular	Parámetros de activación			Parámetros de inactivación		
	I_{CRAC}	τ_{on}	I_{max}	% inactivantes	% inactivación	τ_{off}
EGTA	2,08±0,15	17,94±0,92	52,82±3,10	91,67% (11/12)	62,45±6,75	257,20±59,75
BAPTA	2,77±0,39	18,15±1,16	52,57±3,58	47,06% (8/17)	36,85±6,12	185,77±52,63
EGTA+Cktl	2,13±0,17	18,20±1,50	63,74±6,55	37,5% (6/16)	30,23±6,14	69,51±20,64

8.- LA REDUCCIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC} EN PRESENCIA DEL CÓCTEL MITOCONDRIAL ES DEBIDA A LA POTENCIACIÓN DE LA MITOCONDRIA

Con el objetivo de confirmar si el efecto del cóctel mitocondrial sobre la inactivación de I_{CRAC} ocurrían a nivel mitocondrial o eran debidos a otro posible efecto de alguno de los componentes del cóctel mitocondrial adicionamos antimicina (A; 0,05 $\mu\text{g/ml}$) y oligomicina (O; 0,5 $\mu\text{g/ml}$) a la solución de diálisis compuesta por EGTA y cóctel mitocondrial. La antimicina es un inhibidor del complejo III de la cadena de transporte electrónico mientras que la oligomicina evita que la ATPasa mitocondrial actúe en reverso, con el consecuente consumo de ATP. La combinación de ambos fármacos provoca el colapso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y, en consecuencia, la pérdida de la función mitocondrial. En este ensayo las células fueron previamente incubadas en solución externa o solución externa suplementada con A/O durante 25 minutos a 37°C para el grupo control y el experimental respectivamente.

Algunos autores han indicado la posibilidad de que la oligomicina tuviera efectos inhibitorios directos sobre los canales dependientes de depósito (Cho y cols., 1997). Sin embargo, al igual que ocurre en el resto de nuestros experimentos no se producían diferencias significativas en la amplitud máxima de la corriente en presencia o ausencia de oligomicina a pesar de que las células eran preincubadas durante 25 minutos en dicho fármaco. Así, por ejemplo la amplitud máxima de I_{CRAC} en presencia de 10 mM de BAPTA era de $4,96 \pm 0,44$ pA/pF ($n = 5$), muy similar a la obtenida cuando las células son además incubadas en presencia de oligomicina $4,90 \pm 0,65$ pA/pF ($n = 5$) (gráfica no mostrada).

Los resultados mostraron que efectos del cóctel mitocondrial sobre la inactivación de I_{CRAC} fueron anulados en células tratadas con antimicina y oligomicina. Así, tanto el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} ($55,12 \pm 14,44\%$) como el porcentaje de células inactivantes (83,33%; 5/6) alcanzaron valores similares a los obtenidos en las células tratadas sólo con EGTA ($62,66 \pm 3,30\%$ de inactivación y 100% de células inactivantes, 8/8). Asimismo, el porcentaje de inactivación se reducía significativamente en ausencia de los inhibidores de la actividad mitocondrial cuando las células eran dializadas con EGTA + cóctel

mitocondrial, observando un porcentaje de inactivación de $18,73 \pm 12,33\%$ en tan sólo el 37,5% de células inactivantes (3/8) (Figura 29A). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ni en la extensión de la inactivación, ni en el porcentaje de células inactivantes en células dializadas con BAPTA+A/O en comparación con células tratadas sólo con BAPTA (Figura 29B). Así, el porcentaje de inactivación en presencia de BAPTA + A/O fue de $16,22 \pm 7,92\%$ y el porcentaje de células inactivantes del 60% (3/5). Para el grupo de células tratado sólo con BAPTA, el porcentaje de inactivación observado fue de $24,48 \pm 8,50\%$ con un porcentaje de células inactivantes del 80% (4/5). Estos resultados confirman que las mitocondrias funcionalmente activas son capaces de regular procesos dependientes de Ca^{2+} que ocurren a nivel de la submembrana, como es el caso de la inactivación de I_{CRAC} .

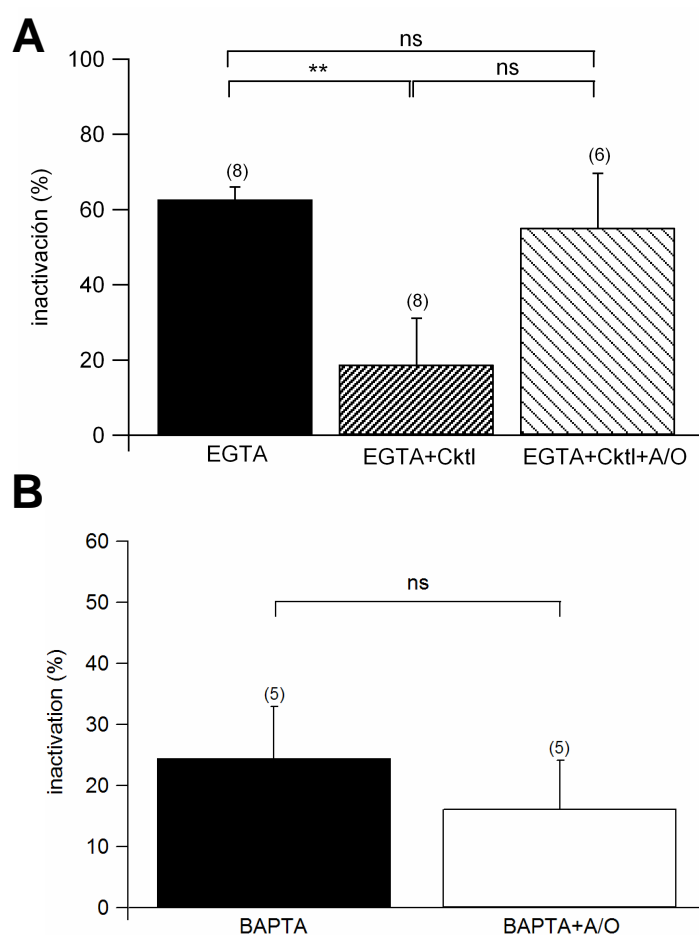


Figura 29. Los efectos reguladores sobre I_{CRAC} del cóctel mitocondrial ocurren a nivel mitocondrial. (A) Porcentaje de inactivación de I_{CRAC} en células dializadas con EGTA, EGTA + Cóctel mitocondrial (CktI) o EGTA + Cóctel mitocondrial + antimicina A (0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y oligomicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (A/O). (B) Porcentaje de inactivación de I_{CRAC} en presencia BAPTA o BAPTA + A/O. Las células fueron previamente incubadas en solución externa o solución externa suplementada con A/O durante 25 minutos a 37°C.

9.- VALORACIÓN DEL ESTADO METABÓLICO MITOCONDRIAL

La capacidad del cóctel mitocondrial para estimular la respiración mitocondrial fue directamente evaluada mediante el uso de técnicas de citometría de flujo en células incubadas con rodamina 123 (1 μ M). La rodamina 123 es una sonda fluorescente que atraviesa fácilmente la membrana plasmática y se acumula en la mitocondria cuando su potencial de membrana es negativo como consecuencia de la respiración mitocondrial, debido a la salida de protones de la mitocondria al citosol a través de la cadena de transporte electrónico. Para un correcto análisis de los datos de citometría de flujo es necesario realizar adecuadamente la selección de la región de interés a estudiar, conocida ventana de análisis (R1, figura 30A). Con el fin de excluir las células dañadas y los agregados celulares se dibujó una ventana de análisis en función de los valores de FSC (componente de dispersión frontal) y de SSC (componente de dispersión lateral) (Figura 30A). Como muestra la figura 32B, la señal fluorescente asociada a poblaciones viables y homogéneas de células T Jurkat aumentó cuando las células fueron incubadas en presencia del cóctel mitocondrial en comparación con la del grupo de células control, mientras que se redujo cuando las células fueron incubadas en presencia del cóctel junto con inhibidores de la función mitocondrial (Figura 30B). Estos resultados corroboran la capacidad de nuestro cóctel para mantener las mitocondrias en un estado energizado.

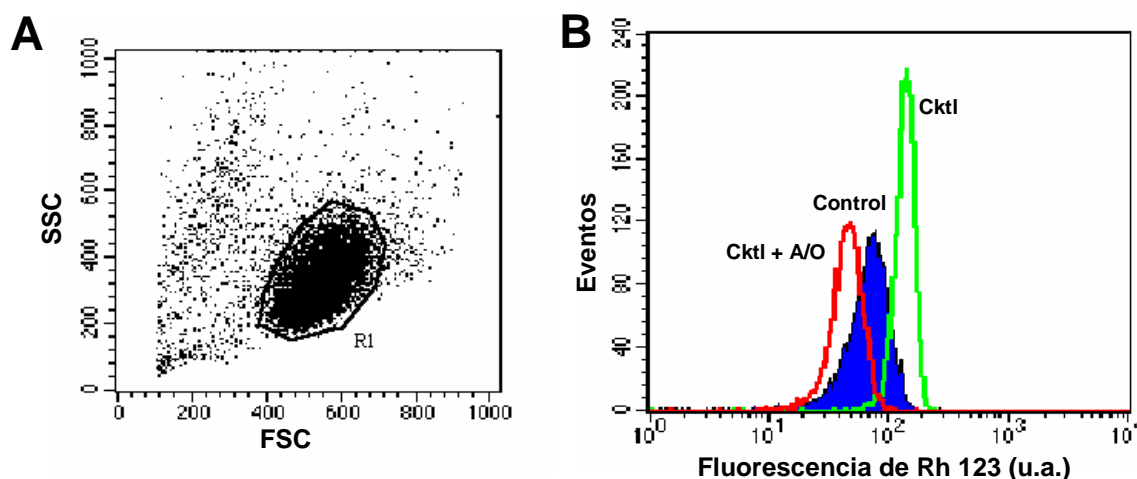


Figura 30. Efecto del "cóctel mitocondrial" sobre la función mitocondrial valorada mediante citometría de flujo en células cargadas con rodamina 123 (Rh 123). (A) Representación de tamaño (SSC) frente a complejidad celular (FSC) que muestra la región R1 seleccionada para el análisis de la señal de fluorescencia de células viables. (B) Distribución de la señal de fluorescencia en células incubadas en la solución extracelular (Control), solución extracelular suplementada con el "cóctel mitocondrial" (Cktl) o solución extracelular suplementada con el "cóctel mitocondrial" y con A/O (Cktl+A/O). Cada histograma de fluorescencia corresponde al análisis de 10.000 células.

10.- EL ATP LIBERADO DESDE LAS MITOCONDRIAS REGULA LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

Los resultados obtenidos mostraban que las mitocondrias energizadas eran capaces de reducir la inactivación lenta de I_{CRAC} , indicativo de su capacidad para regular la $[Ca^{2+}]_i$ próxima a la membrana plasmática, que puede ser atribuida tanto a la captación de Ca^{2+} a través del uniportador mitocondrial como a la liberación de ATP producido en la fosforilación oxidativa, el cual podría actuar como bien como quelante de Ca^{2+} , bien como molécula efectora de otros mecanismos reguladores o mediante ambos procesos.

Al objeto de dilucidar cuál de estos mecanismos estaría implicado en la modulación de los canales CRAC decidimos ensayar el efecto de inhibidores del uniportador mitocondrial (rojo de rutenio y Ru360) o inhibidores del transportador mitocondrial de nucleótidos de adenina (ANT_m) y encargado de exportar ATP desde la mitocondria al citosol (atractilósido y ácido bongkrékico), en células T Jurkat dializadas con una solución intracelular conteniendo EGTA y cóctel mitocondrial.

Se ha descrito que altas concentraciones de rojo de rutenio también inhiben la vía rápida de captación mitocondrial de Ca^{2+} o RaM y que la cantidad de rojo de rutenio necesaria para inhibir la vía de captación lenta de Ca^{2+} es alrededor de un orden de magnitud menor que la requerida para inhibir la RaM (Sparagna y cols., 1995). Por ello, aunque la diálisis intracelular con 200 nM de rojo de rutenio es capaz de inhibir al uniportador mitocondrial (Kirichok y cols., 2004), en nuestros experimentos utilizamos una concentración mucho mayor de rojo de rutenio (100 μ M) para asegurar que, en caso de existir ambos sistemas de transporte en las células T Jurkat, la captura de Ca^{2+} por la mitocondria fuera eficazmente inhibida.

La adición de rojo de rutenio en la pipeta de registro provocó un pequeño incremento en el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} que no fue estadísticamente significativo respecto al encontrado en las células que habían sido tratadas sólo con EGTA y cóctel mitocondrial. Por otro lado, la administración intracelular de atractilósido (20 μ M) canceló los efectos del cóctel de manera que el porcentaje de inactivación alcanzó niveles similares a los obtenidos en las células tratadas con EGTA solo (Figura 31A, Tabla 10). Además, no se observaron diferencias significativas cuando se comparaba el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} en células expuestas a la combinación de atractilósido y rojo de rutenio juntos con el observado en aquellas células dializadas con atractilósido solo. Efectos congruentes con los producidos sobre la inactivación de I_{CRAC} fueron también observados sobre el porcentaje de células inactivantes. Así, mientras el rojo de rutenio eleva dicho porcentaje desde un 16%, correspondiente a las células expuestas a EGTA y cóctel mitocondrial, hasta un 60%, la administración de atractilósido solo o combinado

con rojo de rutenio comporta un incremento hasta el 100%, porcentaje idéntico al registrado en células expuestas sólo a EGTA (Tabla 10).

La comprobación de que el rojo de rutenio prevenía parcialmente el efecto del cóctel mitocondrial sobre la inactivación de I_{CRAC} y el hecho de que este compuesto también puede actuar sobre otras proteínas de membrana, como los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia iónica (canales BK) o los receptores de rianodina, directa o indirectamente implicadas en la homeostasis celular del Ca^{2+} , motivó que nos planteáramos el empleo de rutenio 360 (Ru 360), un inhibidor más potente y selectivo del uniportador mitocondrial que el rojo de rutenio (Kirichok y cols., 2004). La administración de Ru 360 (1 μ M) a células dializadas con una solución intracelular suplementada con EGTA y cóctel mitocondrial no alteró significativamente la extensión ni la frecuencia de la inactivación de I_{CRAC} respecto a las observadas en células tratadas sólo con EGTA y cóctel mitocondrial (Figura 31B, Tabla 11).

Asimismo, exploramos adicionalmente la participación de la translocasa de nucleótidos de adenina de la mitocondria mediante el empleo del ácido bongkrékico, un inhibidor de ANT_m que, a diferencia del atractilósido que impide la unión de los nucleótidos de adenina a sus sitios de unión en ANT_m , interfiere con su disociación. Además, el empleo de este compuesto resulta de particular interés, dado que el atractilósido puede inducir la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (Halestrap y Davidson, 1990), lo cual podría causar una liberación masiva de Ca^{2+} desde la mitocondria y por tanto, la inactivación de I_{CRAC} .

A pesar de las diferencias existentes entre estos dos fármacos, sus efectos sobre la inactivación de I_{CRAC} fueron superponibles y consistentes en un aumento significativo del porcentaje de inactivación respecto al observado en el grupo control, tratado sólo con EGTA y cóctel mitocondrial (Figura 31B; Tabla 11).

Por otro lado, observamos que el porcentaje de células inactivantes es similar en las células control dializadas con EGTA + cóctel mitocondrial respecto del observado en presencia de EGTA + cóctel mitocondrial + Ru360, lo cual podría ser debido fundamentalmente a que este lote de células mostró una mayor tendencia hacia la inactivación. Sin embargo, en este caso también se observaba un aumento en el porcentaje de células inactivantes cuando se adicionaba un inhibidor del transportador de nucleótidos de adenina de la mitocondria, el ácido bongkrékico, en presencia de EGTA + cóctel mitocondrial (Tabla 11).

Por tanto, los resultados obtenidos con los diferentes inhibidores de los transportadores mitocondriales (rojo de rutenio, Ru 360, atractilósido y ácido bongkrékico) apuntan a que las mitocondrias funcionalmente activas son capaces de regular la inactivación de los canales CRAC fundamentalmente mediante la producción y liberación de ATP.

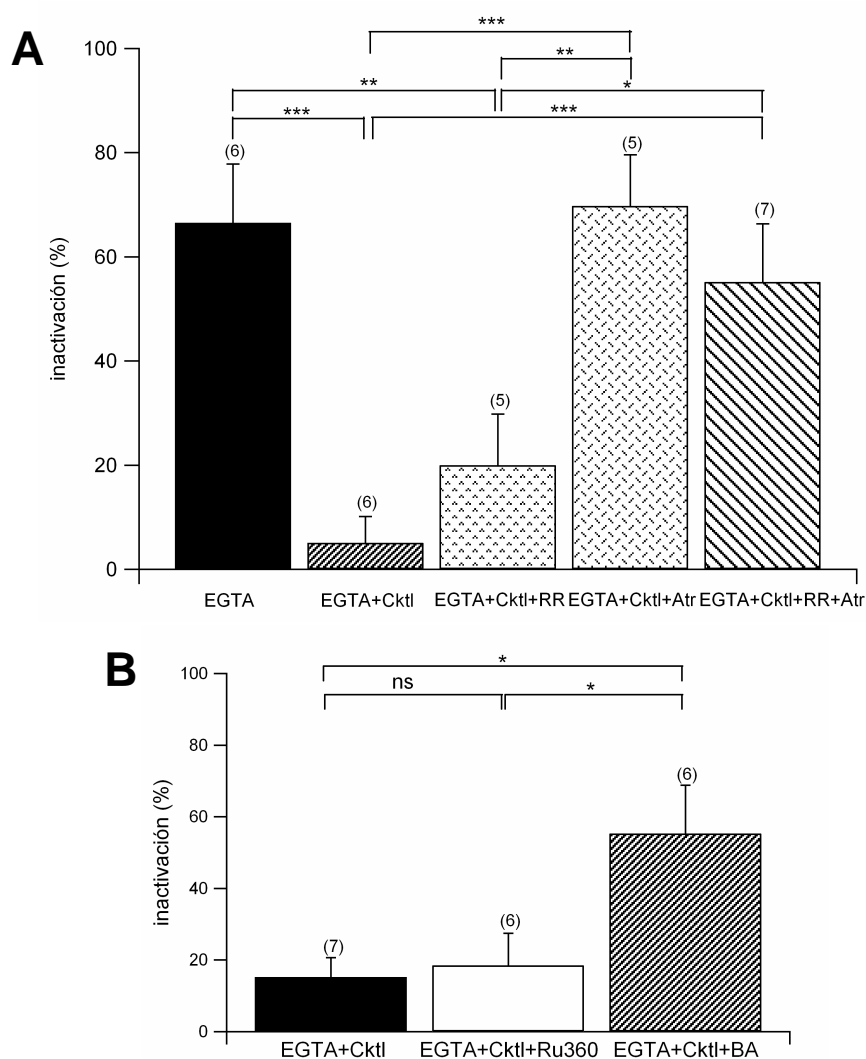


Figura 31. La inactivación lenta de I_{CRAC} es modulada por el ATP liberado por las mitocondrias. (A) Porcentaje de inactivación de I_{CRAC} en células dializadas con EGTA, EGTA + Cóctel mitocondrial (EGTA+Cktl), EGTA + Cktl + 100 μ M de rojo de rutenio (EGTA+Cktl+RR), EGTA + Cktl + 20 μ M de atractilósido (EGTA+Cktl+Atr) o EGTA + Cktl + 20 μ M atractilósido + 100 μ M rojo de rutenio (EGTA+Cktl+Atr+RR). (B) Porcentaje de inactivación en células dializadas EGTA + Cktl, EGTA + Cktl + 1 μ M Ru360 (EGTA+Cktl+Ru360) o EGTA + Cktl + 10 μ M ácido bongkrékico (EGTA+Cktl+BA).

Tabla 10. Efecto del rojo de rutenio (100 μ M) y de atractilósido (20 μ M) sobre el porcentaje de inactivación y de células inactivantes en células dializadas con EGTA + cóctel mitocondrial. Cktl: Cóctel mitocondrial; RR: Rojo de rutenio; Atr: Atractilósido.

Solución intracelular	% inactivación	% células inactivantes
EGTA	66,55 ± 11,28	100% (6/6)
EGTA + Cktl	5,07 ± 5,07	16,67% (1/6)
EGTA + Cktl + RR	19,97 ± 9,84	60% (3/5)
EGTA + Cktl + Atr	69,77 ± 8,81	100% (5/5)
EGTA + Cktl + RR +Atr	55,16 ± 11,19	100% (7/7)

Tabla 11. Efecto del rutenio 360 (1 μM) y de ácido bongkreónico (10 μM) sobre el porcentaje de inactivación y de células inactivantes en células dializadas con EGTA + cóctel mitocondrial. Ckfl: Cóctel; Ru 360: Rutenio 360; BA: Ácido bongkreónico.

Solución intracelular	% inactivación	% células inactivantes
EGTA + Ckfl	15,23 \pm 5,42	57,14% (4/7)
EGTA + Ckfl + Ru360	18,53 \pm 8,94	50% (3/6)
EGTA + Ckfl + BA	55,31 \pm 13,47	83,33% (5/6)

11.- ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS MICRODOMINIOS DE Ca^{2+} EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE ATP

A pesar de contar con una baja afinidad por el Ca^{2+} ($K_D = 2,3 \times 10^{-4}$ M) (NIST Database), el ATP puede actuar como un eficaz quelante de Ca^{2+} debido a su rápida unión al mismo ($k_{on} = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Naraghi y Neher, 1997). Además, el ATP sería capaz de difundir rápidamente debido a su bajo peso molecular, lo cual unido a su liberación local en la proximidad de los canales CRAC por parte de mitocondrias subplasmalemales hace que el ATP pueda modular el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados alrededor de los canales CRAC, y por tanto, su inactivación.

Para estudiar si el ATP podría comportarse como quelante de Ca^{2+} de manera análoga al BAPTA recurrimos de nuevo al programa Pore que permite estimar el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} que se generan alrededor de cada canal CRAC. Asumiendo que cada célula Jurkat expresa 1000 canales CRAC estimamos una corriente unitaria de 10,8 fA en presencia de 9,03 mM de ATP libre. Asimismo, λ , que representa la distancia media que recorren en el citosol los iones Ca^{2+} antes de unirse al quelante, fue de 4,9 nm. Este valor para el ATP era incluso menor que el obtenido en presencia de BAPTA ($\lambda = 7,5$ nm) y considerablemente inferior que el calculado para EGTA ($\lambda = 95,5$ nm). Por otro lado, las concentraciones libres de EGTA, BAPTA y ATP en células dializadas con estos quelantes fueron calculadas, mediante el programa MaxChelator WEBMAXC Standard, obteniendo unos valores de 9,65, 9,73 y 9,03 mM para EGTA, BAPTA y ATP respectivamente.

Estos datos indican que el ATP sería capaz de reducir la extensión de los microdominios de Ca^{2+} incluso de forma más eficaz que BAPTA (Figura 32).

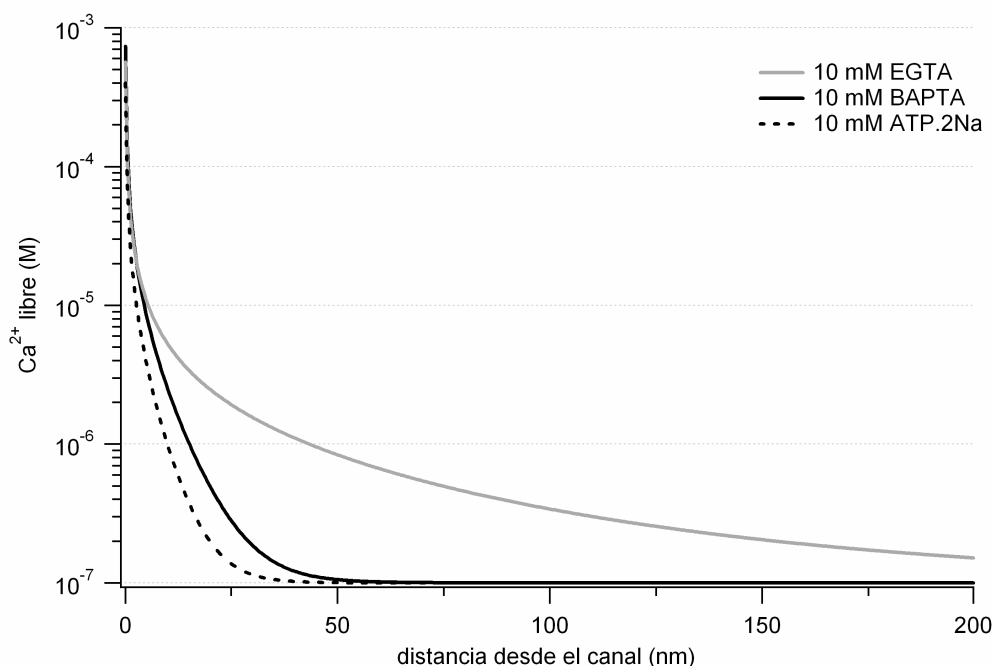


Figura 32. Estimación de la amplitud del microdominio de Ca^{2+} formado alrededor de un canal CRAC en presencia de altas concentraciones (10 mM) de tres quelantes de Ca^{2+} distintos (EGTA, BAPTA o ATP). Los valores de la distancia recorrida por el Ca^{2+} libre (λ) para 10 mM de EGTA, BAPTA y ATP de 95,5, 7,5 y 4,9 nm, respectivamente.

12.- EFECTO DEL ATP EXÓGENO SOBRE LA INACTIVACIÓN LENTA DE I_{CRAC}

Con el objetivo de obtener evidencias directas de la capacidad del ATP para regular I_{CRAC} decidimos añadir a la solución intracelular una elevada concentración (10 mM) de una sal de ATP. Hemos empleado la sal sódica (ATP.2Na) y la sal magnésica (ATP.Mg) de ATP que difiere marcadamente en su afinidad por sendos iones metálicos ($K_{\text{D,ATP.2Na}} = 1 \times 10^{-1} \text{ M}$; $K_{\text{D,ATP.Mg}} = 1,15 \times 10^{-4} \text{ M}$) (Dawson y cols., 1989; NIST database), lo que determina que la concentración de ATP libre cuando se administran a una concentración de 10 mM en solución a pH = 7,2 sea de 0,92 mM en el caso de la sal magnésica y de 9,05 mM en el caso de la sal sódica (cálculos realizados con la aplicación WEBMAXC Standard del programa MaxChelator).

El porcentaje de células inactivantes fue considerablemente menor entre las células dializadas con una solución intracelular conteniendo EGTA y suplementada con ATP.2Na (37,5%; 3/8 células) que entre aquellas en las que el suplemento utilizado fue el ATP.Mg (90%; 9/10 células). Estas diferencias en la frecuencia de la inactivación se asociaron a diferencias estadísticamente significativas en la magnitud de la misma que alcanzó un valor del $13,57 \pm 6,95\%$

en las células dializadas con ATP.2Na y del $76,89 \pm 10,39\%$ en las células dializadas con ATP.Mg (Figura 33). Estos resultados indican que el ATP libre citosólico puede regular la inactivación lenta de I_{CRAC} y sugieren que el ATP endógeno, liberado por la mitocondria, podría actuar de manera análoga a un factor modulador de la actividad de I_{CRAC} .

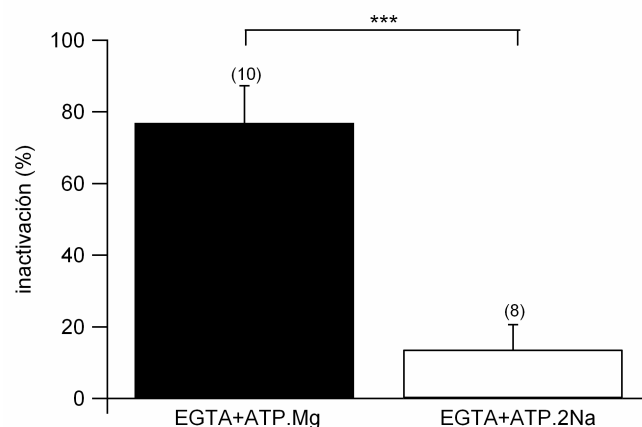


Figura 33. Efecto de dos sales de ATP sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} . La solución intracelular conteniendo EGTA (10 mM) fue suplementada con la sal magnésica (ATP.Mg) o sódica (ATP.2Na) de ATP (10 mM). Las concentraciones de ATP libre en estas condiciones experimentales eran de 0,92 mM (ATP.Mg) y de 9,05 mM (ATP.2Na).

Si el efecto del ATP exógeno estuviera relacionado con su capacidad para modificar la extensión de los microdominios de Ca^{2+} alrededor de los canales CRAC, cabría esperar en función del valor de su λ_{ATP} (4,5 nm) que redujera la inactivación de I_{CRAC} incluso cuando se administrara a una solución conteniendo BAPTA, cuya λ_{BAPTA} es de 7,5 nm. Para la realización de estos experimentos las células fueron incubadas con antimicina (0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y oligomicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 25 minutos con el fin de inhibir la producción endógena de ATP y consiguientemente controlar mejor la concentración de ATP presente en la célula. Como se muestra en la figura 34, el porcentaje de inactivación en células dializadas con altas concentraciones de BAPTA ($16,22 \pm 7,92\%$) mostró una tendencia a la baja, aunque no diferente significativamente, cuando el ATP.2Na (10 mM) era adicionado a la solución de la pipeta de registro ($4,56 \pm 4,56\%$). Además, el porcentaje de células inactivantes en las células dializadas con BAPTA fue del 60% (3/6 células) mientras que el de las células expuestas también a ATP.2Na se redujó hasta el 20% (1/5 células). Estos resultados indican que el ATP podría reducir el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados alrededor de los canales CRAC, y por tanto, de regular su inactivación, de manera similar pero incluso más eficaz que el BAPTA (Figura 34).

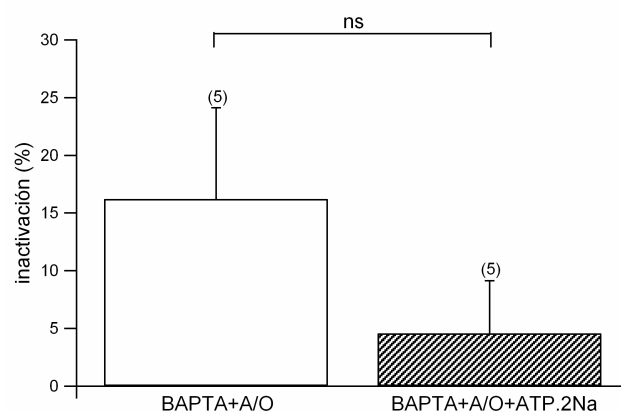


Figura 34. Efecto del ATP sobre la inactivación de I_{CRAC} en presencia de altas concentraciones de BAPTA. Porcentaje de inactivación de I_{CRAC} en células tratadas con antimicina ($0,05 \mu\text{g/ml}$) y oligomicina ($0,5 \mu\text{g/ml}$) y dializadas con una solución conteniendo BAPTA suplementada o no con ATP.2Na (10 mM).

A fin de establecer la dependencia de la inactivación de I_{CRAC} con la concentración de ATP, se añadieron a la adición a la solución intracelular distintas concentraciones de ATP.2Na en presencia de EGTA, A y O. Las células eran además previamente incubadas con A/O a fin de anular la función mitocondrial de manera que la concentración de ATP presente en la célula será la misma que la aportada a la solución intracelular. La concentración de ATP libre en la solución intracelular fue calculada para cada concentración de ATP.2Na utilizada y representada frente al porcentaje de inactivación de I_{CRAC} . Como muestra la figura 35, la concentración de ATP.2Na incluida en la solución intracelular está inversamente relacionada con el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} . Ello lógicamente implica que el porcentaje de células inactivantes se reduce al aumentar la concentración de ATP libre (Tabla 12). Así, a mayor concentración de ATP.2Na utilizada, y por tanto, de ATP libre, se minoraba el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} y el número de células inactivantes.

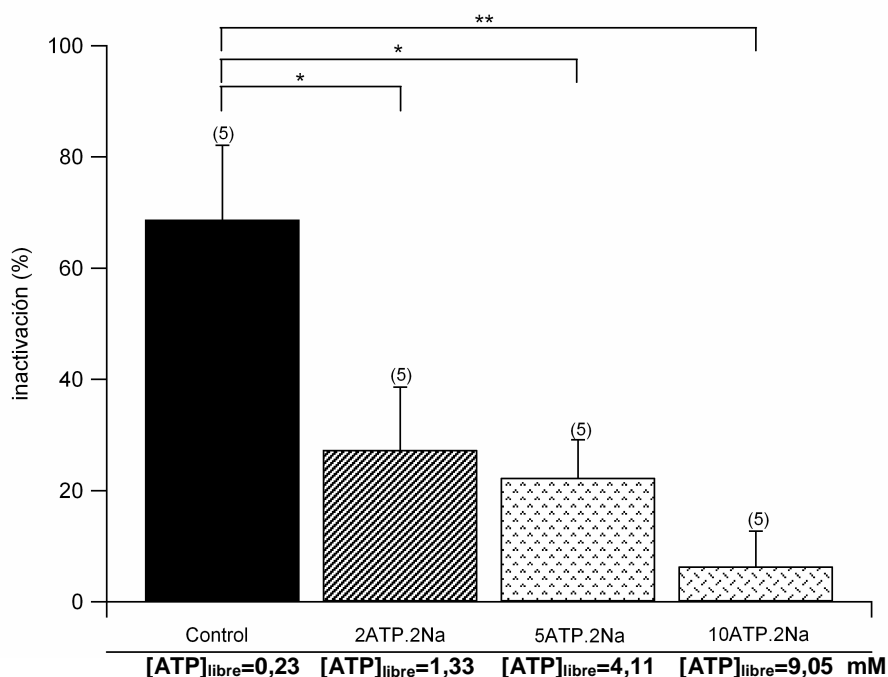


Figura 35. Relación entre la concentración de ATP libre y el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} . Las células fueron incubadas en antimicina (0.05 $\mu\text{g/ml}$) y oligomicina (0.5 $\mu\text{g/ml}$) (A/O) durante 25 minutos inmediatamente antes de la realización de los experimentos, que comportaban la diálisis intracelular con una solución que contenía 10 mM EGTA, A/O y diferentes concentraciones de ATP.2Na (0, 2, 5 y 10 mM). Las concentraciones de ATP libre fueron calculadas con la aplicación WEBMAXC Standard del programa MaxChelator.

Tabla 12. Porcentaje de inactivación y de células inactivantes en presencia de distintas concentraciones de ATP libre intracelular en células tratadas con antimicina y oligomicina.

[ATP] _{libre} intracelulares (mM)	% inactivación	% células inactivantes
[ATP] _{libre} = 0,23	68,75 ± 13,40	100% (5/5)
[ATP] _{libre} = 1,33	27,31 ± 11,29	60% (3/5)
[ATP] _{libre} = 4,11	22,32 ± 6,83	80% (4/5)
[ATP] _{libre} = 9,05	6,35 ± 6,35	20% (1/5)

Además, los datos mostrados en la figura 35 y la figura 37 permiten comparar la extensión de la inactivación tras la inclusión de altas concentraciones de ATP.2Na (10 mM) en presencia o ausencia de A/O, observándose que el porcentaje de inactivación es similar en ambos casos. Esta comparación en diferentes lotes de células apunta a que el ATP podría ser el único factor mitocondrial implicado en la reducción de la inactivación de I_{CRAC} .

13.- EFECTO DEL ATP EXÓGENO SOBRE LA INACTIVACIÓN RÁPIDA DE I_{CRAC}

Los resultados obtenidos sugerían que el ATP liberado por las mitocondrias era capaz de reducir el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados alrededor de los canales CRAC y, por tanto, de regular su actividad. Al objeto de investigar la posible existencia de modificaciones en la inactivación rápida que estuvieran influyendo en los efectos inducidos por el ATP sobre la inactivación lenta, llevamos a cabo también experimentos orientados al estudio de los posibles efectos del ATP sobre la inactivación rápida. Para ello, se administraron de forma repetida (0,5 Hz) pulsos hiperpolarizantes (hasta -120 mV) de 200 ms de duración y se evaluaron comparativamente los efectos de dos sales de ATP (ATP.Mg y ATP.2Na; 10 mM) en células dializadas con una solución intracelular suplementada con EGTA. En lugar de medir la corriente a -80 mV, tal como se realizó al comparar EGTA con BAPTA, aplicamos pulsos a -120 mV, donde las diferencias en la inactivación rápida, en el caso de existir, serían más notables, para evitar que pudiésemos no estar midiendo la inactivación rápida de manera efectiva. Tanto la amplitud como la cinética de I_{CRAC} en respuesta a los pulsos hiperpolarizantes fueron similares independientemente de la sal de ATP utilizada (Figura 36B).

En consecuencia, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inactivación entre las células dializadas con ATP.Mg o con ATP.2Na ($51,30 \pm 1,96$ y $48,99 \pm 1,69$, respectivamente) (Figura 36C). Asimismo, el porcentaje de células que presentan inactivación rápida fue del 100% en las dos condiciones experimentales.

Estos resultados indican que el ATP libre intracelular no modifica el componente rápido de la inactivación de I_{CRAC} por lo que los efectos de este nucleótido sobre el curso temporal de la corriente son exclusivamente debidos a cambios en la inactivación lenta independiente de depósito.

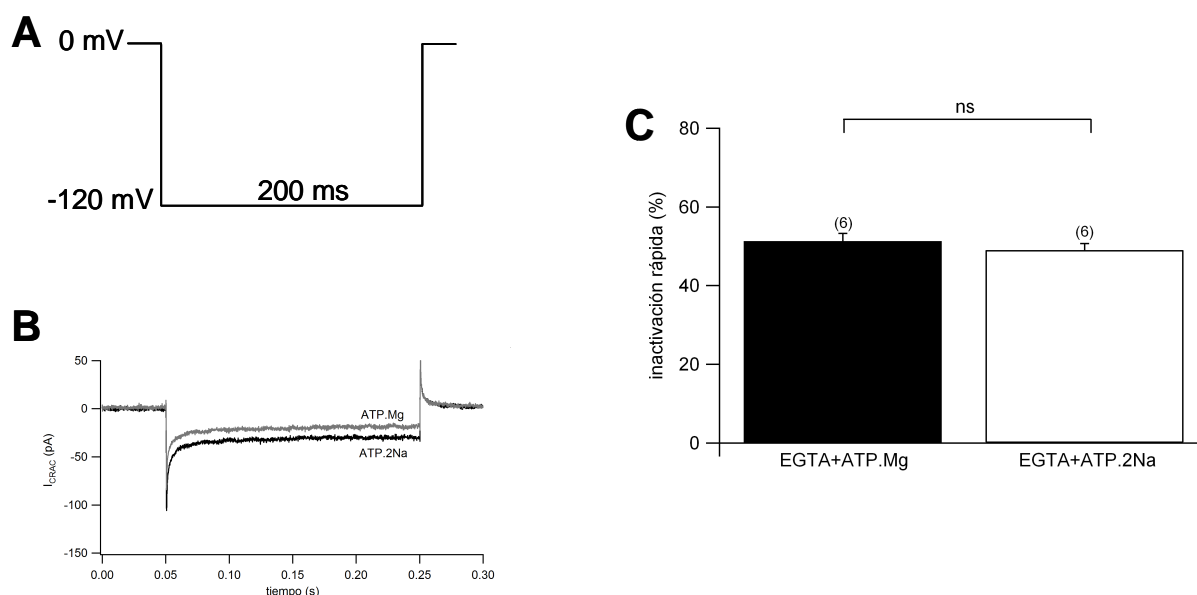


Figura 36. Inactivación rápida de I_{CRAC} en células Jurkat dializadas con altas concentraciones (10 mM) de dos sales de ATP (ATP.Mg o ATP.2Na). (A) Protocolo de voltaje utilizado para medir la inactivación rápida de I_{CRAC} . (B) Respuesta de corriente en dos células individuales durante el pulso hiperpolarizante representado en A. (C) Porcentaje de inactivación rápida en células dializadas con una solución conteniendo EGTA (10 mM) suplementada con ATP.Mg o ATP.2Na (10 mM). Ver sección de Materiales y Métodos para una descripción detallada del porcentaje de inactivación rápida.

14.- EFECTO DEL ATP ENDÓGENO SOBRE LA INACTIVACIÓN LENTA DE I_{CRAC}

Para apoyar la hipótesis de que el ATP liberado por la mitocondria es capaz de regular el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} realizamos experimentos con fármacos que alteran la capacidad de la mitocondria para liberar ATP o la capacidad de éste para secuestrar Ca^{2+} .

La oligomicina inhibe la producción de ATP pero no tiene efecto sobre la captación de Ca^{2+} por la mitocondria y tampoco produce cambio alguno en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Duchen, 1992). Este último aspecto fue confirmado mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente JC-1, dotada de una elevada sensibilidad para detectar cambios en el potencial mitocondrial (Salvioli y cols., 1997). Es de destacar que si bien el tratamiento con oligomicina (0,5 μ g/ml durante 30 minutos) no modificó el Ψ_m de las células T Jurkat incubadas con el cóctel mitocondrial (Figura 37B), sí previno el efecto de éste sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} , resultado que es congruente con el papel que aquí proponemos para el ATP mitocondrial. En experimentos pareados el porcentaje de inactivación en el grupo de células dializadas con EGTA + cóctel mitocondrial fue de $7,19 \pm 4,16\%$ y de $46,53 \pm 4,50\%$ en el grupo de células dializadas con EGTA, cóctel mitocondrial y oligomicina. Asimismo, el porcentaje

de células inactivantes se duplicó en las muestras tratadas con oligomicina (50% frente a 100%) (Figura 37A).

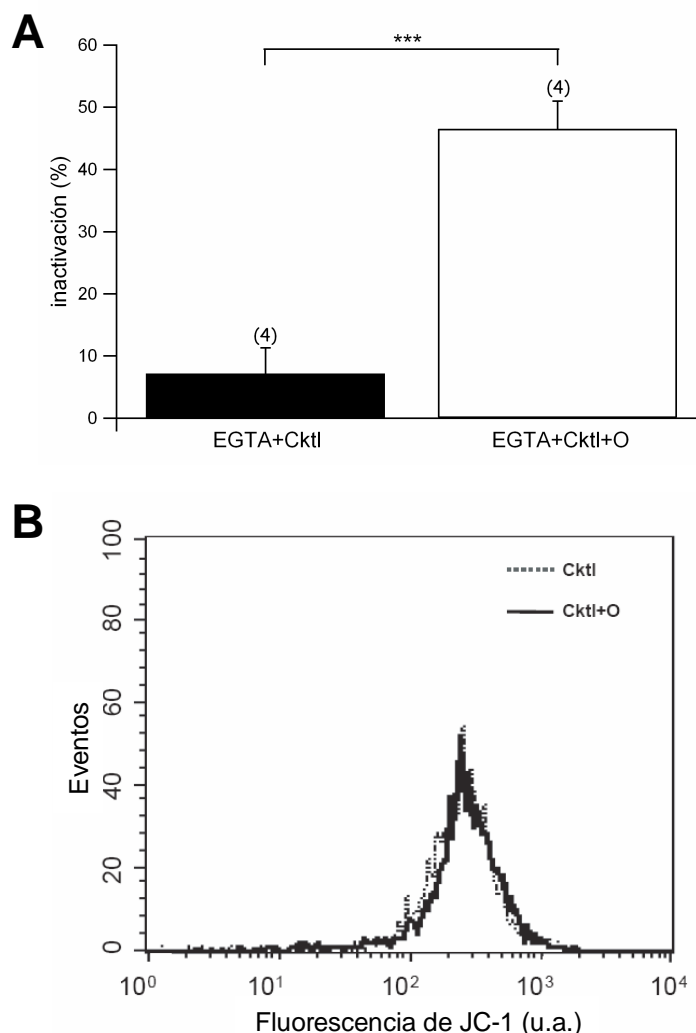


Figura 37. Efecto de la oligomicina sobre la inactivación de I_{CRAC} y el potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con EGTA y cóctel mitocondrial. (A) Porcentaje de inactivación de I_{CRAC} en células dializadas con EGTA y cóctel mitocondrial (Cktl) o EGTA, Cktl y oligomicina (0,5 $\mu\text{g/ml}$) (O); las células fueron incubadas con oligomicina durante 30 minutos antes del análisis. (B) Intensidad de fluorescencia de células cargadas con la sonda potenciométrica JC-1 analizada mediante citometría de flujo. Las células fueron incubadas en presencia del cóctel mitocondrial (Cktl) o en presencia de Cktl y O. Cada histograma de fluorescencia corresponde a 10.000 células.

Para confirmar que el ATP liberado por las mitocondrias es el principal factor implicado en la regulación de la inactivación lenta de I_{CRAC} realizamos experimentos en los que las células eran dializadas con una solución interna conteniendo EGTA (10 mM) y cóctel mitocondrial suplementado con distintas concentraciones de MgCl_2 (0, 5, 10 ó 20 mM). En estas condiciones, el Mg^{2+} incluido en la solución de la pipeta podría competir con el Ca^{2+} por su unión al ATP producido por mitocondrias funcionalmente activas.

Como muestra la figura 38, el porcentaje de inactivación se incrementa al elevar la concentración de Mg^{2+} en el citosol, como cabría esperar debido a la mayor afinidad del ATP por el Mg^{2+} que por el Ca^{2+} . Así, el Mg^{2+} exógeno puede secuestrar el ATP liberado desde mitocondrias energizadas reduciendo el efecto del cóctel mitocondrial de manera dosis-dependiente. Este grupo experimental de células mostró una frecuencia de inactivación elevada ya que incluso en el grupo control, tratado con EGTA y cóctel mitocondrial, el porcentaje de células inactivantes fue del 80%. Sin embargo, tras la adición de $MgCl_2$ a la solución intracelular, el porcentaje de células inactivantes aumentó hasta el 100% en todas las células estudiadas y el porcentaje de inactivación en las mismas llegó a multiplicarse por un factor de tres (Tabla 13).

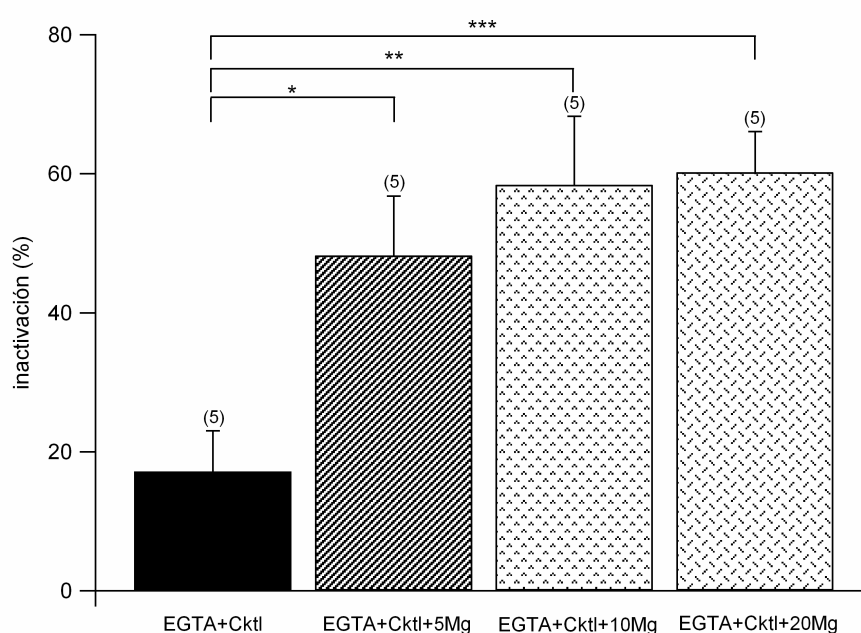


Figura 38. Efecto de la concentración intracelular de Mg^{2+} sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} en células Jurkat energizadas. Las células Jurkat fueron dializadas con EGTA (10 mM), "cóctel mitocondrial" (EGTA+Cktl) y diferentes concentraciones (0, 5, 10 y 20 mM) de $MgCl_2$.

Tabla 13. Porcentaje de inactivación y de células inactivantes tras la diálisis con distintas concentraciones de $MgCl_2$.

Solución intracelular	% inactivación	% células inactivantes
EGTA + Cktl	17,16 ± 5,86	80% (4/5)
EGTA + Cktl + 5Mg	48,22 ± 8,57	100% (5/5)
EGTA + Cktl + 10Mg	58,41 ± 9,86	100% (5/5)
EGTA + Cktl + 20Mg	60,20 ± 5,06	100% (5/5)

Estos resultados avalan el papel del ATP endógeno, liberado por las mitocondrias, en la regulación de la inactivación lenta de I_{CRAC} .

15.- ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS MITOCONDRIAS

Los resultados anteriores sugerían que las mitocondrias de las células T Jurkat, o al menos un subgrupo de ellas, podrían encontrarse en la vecindad de la membrana plasmática con fin de influir más eficazmente en el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados por los canales CRAC y, por tanto, reducir la inactivación lenta de los mismos. En consecuencia, nos planteamos el estudio de la localización subcelular de las mitocondrias de las células T Jurkat.

15.1.- Eficiencia de diferentes métodos de transfección de células T Jurkat

Para el estudio de la localización subcelular de las mitocondrias en la línea celular Jurkat utilizamos técnicas de análisis de imagen de la señal fluorescente emitida por mitocondrias marcadas de manera constitutiva con la sonda pEYFP-Mito. Este abordaje experimental requiere llevar a cabo la transfección de células T Jurkat con el vector pEYFP-Mito como paso previo al análisis morfométrico de la ubicación de las mitocondrias con respecto a la membrana plasmática.

Hemos valorado y optimizado la eficiencia de la transfección en esta línea celular mediante el uso de distintas técnicas como la inmunoporación, la electroporación o el empleo de diferentes kits comerciales (*Effectene Transfection Reagent* o *FuGENE ó Transfection Reagent*). Asimismo, una vez realizada la transfección, llevamos a cabo la selección de las células transfectadas, su expansión clonal y su mantenimiento y conservación para generar transfectantes estables.

En primer lugar, evaluamos la transfección de células T Jurkat mediante inmunoporación. Desafortunadamente, encontramos que la supervivencia celular era muy baja y, además, la viabilidad de las células supervivientes quedaba circunscrita a 24-48 horas. Ambas circunstancias condicionaron muy negativamente las posibilidades de éxito de la selección y expansión clonal, por lo que consideramos este procediendo como no adecuado.

Nuestros resultados tampoco fueron satisfactorios en el empleo de la electroporación como técnica de transfección. En este caso el problema no estribaba en la supervivencia de las células sino en la eficiencia de la transfección. Es de destacar que dicha eficiencia fue mínima independientemente de que se utilizara un vector con el ADN circular o linealizado mediante el enzima de restricción NarI (Roche) (vease la sección 6.3 de Materiales y Métodos).

Por ello, recurrimos a la transfección de las células T Jurkat mediante el kit denominado *Effectene® Transfection Reagent* (Qiagen). La aplicación del protocolo recomendado por la casa comercial permitía obtener una alta densidad de células viables, pero el análisis mediante microscopía de

fluorescencia revelaba de nuevo una baja tasa de expresión de la proteína verde, por lo que después de proceder a la selección de las células transfectadas muchas de ellas morían debido a la presión negativa ejercida por el antibiótico, no lográndose expandir dicha población.

Por último, llevamos a cabo la transfección de las células T Jurkat usando el kit *FuGENE® 6 Transfection Reagent* (Roche), un conjunto comercial de reactivos formado por una mezcla de lípidos no-liposomales y otros compuestos disueltos en etanol al 80%. Este método de transfección fue el que mejores resultados nos proporcionó, se mantenía una elevada viabilidad celular (alrededor del 95%) y, además, se conseguía que alrededor del 75% de las células viables incorporasen el vector pEYFP-Mito. Ésto permitía una adecuada selección de las células transfectadas, en virtud de su resistencia al antibiótico G418, y la obtención de una población estable de células que expresaba la proteína verde a nivel mitocondrial.

15.2.- Análisis de la localización de las mitocondrias en células transfectadas

Para el análisis de la localización subcelular de las mitocondrias utilizamos la microscopía de fluorescencia confocal sobre células transfectadas con el vector pEYFP-Mito y posteriormente fijadas y teñidas con sondas específicas del citoesqueleto y del núcleo celular. El marcaje del citoesqueleto se realizó con faloidina conjugada con Tetrametilrodamina B isotiocianato (faloidina-TRITC) que se une de manera específica a la F-actina. La F-actina es una proteína que forma parte del citoesqueleto. En la periferia celular, la F-actina entra en contacto con la membrana plasmática, formando una densa red de filamentos que la refuerzan. Este marcaje nos permitía conocer dónde se encuentra el límite inferior de la membrana plasmática. La tinción del núcleo se llevó a cabo con TO-PRO®-3 yoduro, que se une a los ácidos nucleicos. El marcaje del núcleo celular resultaba de utilidad para establecer la viabilidad de las células y descartar aquellas que se encontrasen en apoptosis o necrosis, procesos donde la topología celular normal puede encontrarse alterada (Figura 39).

En la figura 39 se muestra la localización periférica de las mitocondrias (en verde) y su agrupación en un polo de la célula como consecuencia del gran tamaño del núcleo (en azul). Llama también la atención el patrón discontinuo del marcaje de F-actina (en rojo), pudiendo observarse regiones donde el citoesqueleto de actina está más desarrollado y otras en las que los filamentos de actina pueden llegar a desaparecer completamente (ver flechas en figura 39). Además, las regiones donde el citoesqueleto aparece más desorganizado suelen coincidir con la presencia de mitocondrias más próximas a la membrana plasmática. Esta distribución subcelular de las mitocondrias apoyaría su posible función reguladora local de la actividad de canales de la membrana plasmática como CRAC.

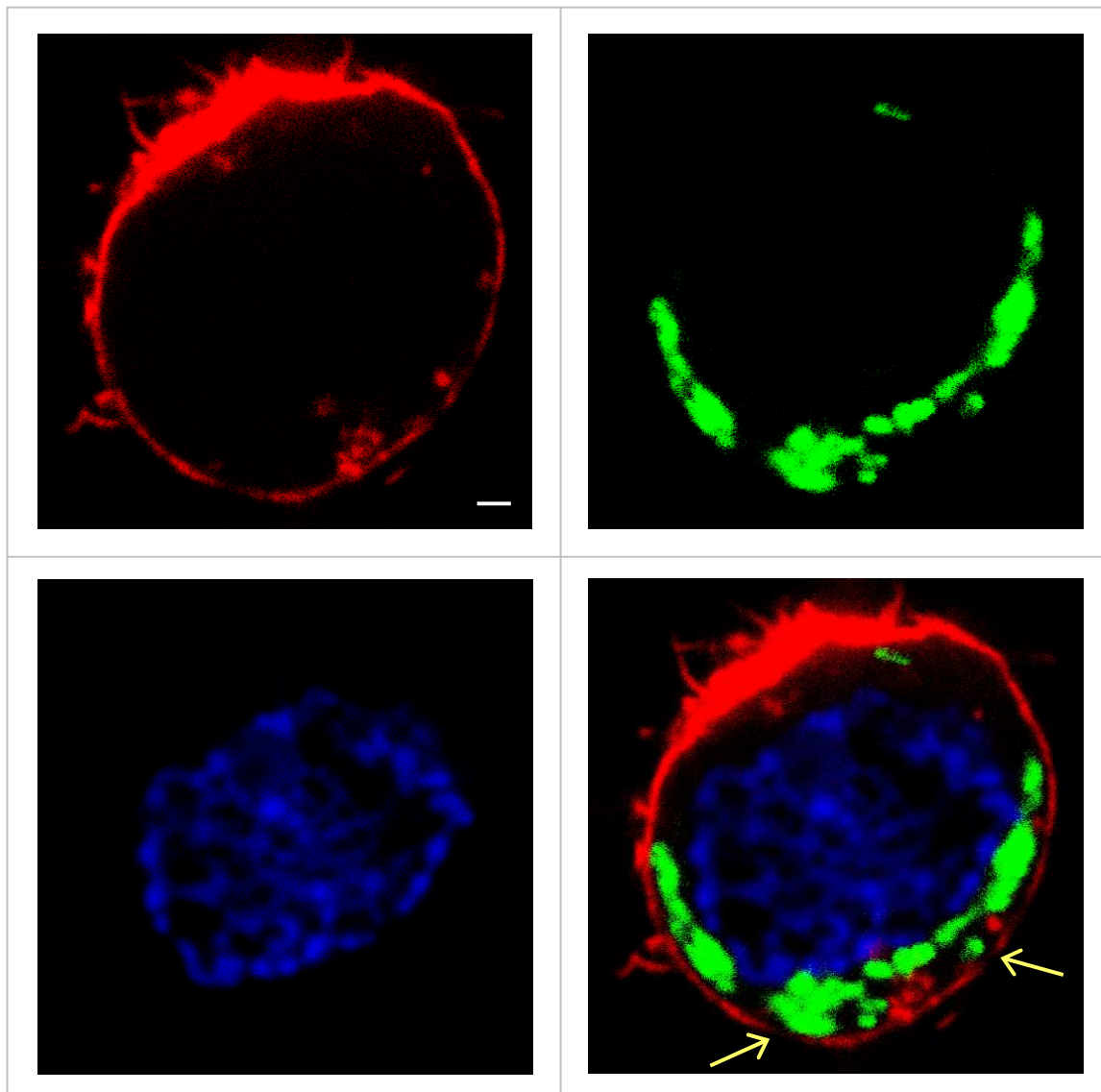


Figura 39. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal del citoesqueleto de actina, mitocondrias y núcleo de una célula Jurkat. En la parte superior izquierda se muestra el citoesqueleto de actina de la célula marcado con faloidina-TRITC. La imagen del cuadrante superior derecho muestra la imagen fluorescente de las mitocondrias teñidas con pEYFP-Mito. En la parte inferior izquierda se muestra el núcleo celular marcado con TO-PRO[®]-3 iodide. En la parte inferior derecha se muestra la combinación de las tres imágenes anteriores. Las flechas indican zonas donde el citoesqueleto de actina se reduce e incluso desaparece. La barra de calibración equivale a 1 μ m.

Mediante el uso de las herramientas de medida de la aplicación LaserPix (Bio-Rad, EEUU) se determinó la distancia relativa a la que se encuentran las mitocondrias de la membrana plasmática. Para ello, tomamos medidas desde el margen externo de los filamentos de actina, que es contiguo al margen interior de la membrana plasmática, hasta el margen externo de las mitocondrias.

En la figura 40 se muestran las distancias mínimas de la mitocondria a la membrana plasmática tras realizar 64 medidas en un total de 29 células T Jurkat. La distribución de las distancias mínimas de las mitocondrias a la membrana celular muestra un pico a 200 nm e incluso un porcentaje importante de las mismas situadas a distancias inferiores a 100 nm (Figura 43). Estos resultados sugieren la colocalización de una fracción de las mitocondrias con la membrana plasmática, lo cual posibilitaría que la concentración local de ATP pueda alcanzar los niveles necesarios para condicionar la extensión de los microdominios de Ca^{2+} generados por la actividad de los canales de la membrana plasmática.

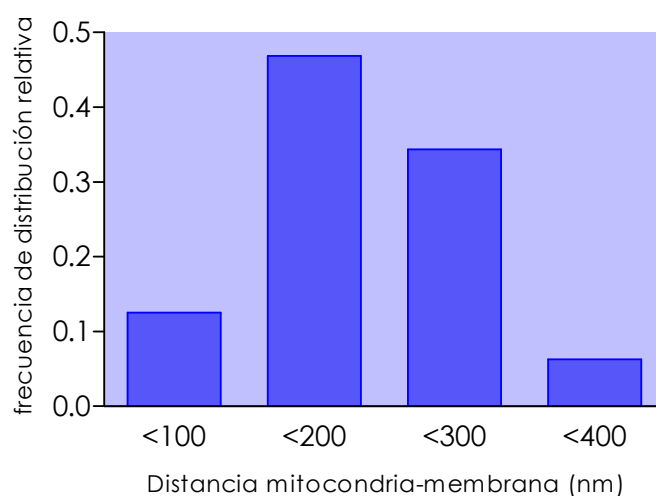


Figura 40. Distribución de frecuencias de las distancias de las mitocondrias periféricas a la membrana plasmática de las células Jurkat. Se representan las distancias registradas entre el margen externo de las mitocondrias periféricas y el margen externo del citoesqueleto de actina, el cual se sitúa en la inmediata vecindad de la membrana plasmática.

16.- ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA Ca^{2+} -ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA (PMCA) EN LA REGULACIÓN DE I_{CRAC} .

En células T Jurkat se ha descrito que la PMCA podría reducir la concentración de Ca^{2+} cuando la capacidad quelante de Ca^{2+} del citosol es baja y la actividad metabólica se encuentra suprimida (Bautista y cols., 2002). Por ello, decidimos investigar si la PMCA podría también jugar un papel determinante en la regulación de la concentración de Ca^{2+} en la submembrana celular y, consecuentemente, sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} , cuando la función metabólica mitocondrial se encuentra favorecida y en presencia de alta capacidad quelante en el citosol.

Para ello recurrimos al ortovanadato sódico, un inhibidor de la PMCA, para tratar de evidenciar el posible papel regulador de este sistema de transporte en

la inactivación I_{CRAC} en células dializadas internamente con una solución conteniendo EGTA y cóctel mitocondrial.

El análisis de estos resultados no reveló diferencias significativas ni en el porcentaje de células inactivantes entre las células control (87,5%; n = 8 células) y las que están en presencia de una solución externa conteniendo 0,1 mM de ortovanadato sódico (66,67%; n = 6 células) ni en la magnitud de su inactivación ($27,06 \pm 5,13$ frente a $25,88 \pm 8,97$) (Figura 41). En consecuencia, nuestros resultados sugieren que la actividad de la PMCA no influye sustancialmente en la amplitud y extensión de los microdominios de Ca^{2+} responsables de modular la inactivación lenta de I_{CRAC} en células con la función mitocondrial potenciada.

Ello implica que el aumento de la producción de ATP en estas condiciones experimentales modula la actividad de los canales CRAC mediante la modificación directa (es decir, actuando como quelante de Ca^{2+}) de los microdominios de Ca^{2+} y no indirectamente, a través de la potenciación de la actividad de la PMCA.

Es de destacar que el vanadato también ha sido descrito como activador de la entrada de Ca^{2+} a través de CRAC en células T Jurkat (Ehring y cols., 2000), sin embargo nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la amplitud máxima de I_{CRAC} , siendo de $7,78 \pm 0,46$ pA/pF en ausencia de vanadato (n = 8 células) y de $6,72 \pm 0,38$ pA/pF en presencia de vanadato (n = 6 células).

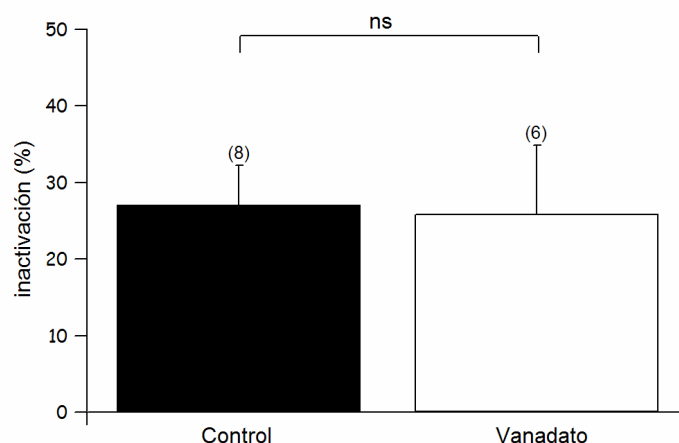


Figura 41. Efecto del ortovanadato sódico sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} . Porcentaje de inactivación en células dializadas con EGTA + cóctel mitocondrial en ausencia (control) o presencia de 0,1 mM de ortovanadato sódico (vanadato) en la solución externa.

17.- CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN LA REGULACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

Dado que la PKC es una molécula efectora responsable de los cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} mediante la actuación sobre muy diferentes receptores y canales de la membrana celular, nos propusimos abordar el estudio del efecto de distintos fármacos moduladores de la actividad de la PKC sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} en células T Jurkat con la función mitocondrial activada. Dado que ha sido descrito que la PKC puede favorecer la activación de I_{CRAC} en algunos sistemas celulares, entre ellos las propias células T Jurkat (Dellis, 2002), decidimos exponer las células a distintos fármacos moduladores sólo después de que I_{CRAC} hubiera alcanzado su amplitud máxima. De esta forma tratábamos de evitar que los posibles efectos de la PKC en la activación y centrarnos en el estudio de sus efectos sobre la inactivación lenta de I_{CRAC} .

La figura 42A muestra el efecto del PMA (forbol miristato acetato), un éster de forbol activador de la PKC, sobre el porcentaje de inactivación en células dializadas con una solución interna conteniendo EGTA (10 mM) y cóctel mitocondrial. La administración de PMA (100 nM) provoca un aumento tanto en el porcentaje de inactivación ($69,99 \pm 6,21\%$) como en el de células inactivantes (100%; 7/7 células) con respecto a los observados en las células control ($44,19 \pm 9,34\%$; 85,7% de células inactivantes; 6/7 células). Este resultado ilustra la capacidad de la PKC para promover la inactivación de I_{CRAC} en células en las que la función mitocondrial ha sido estimulada (Figura 42A). Para corroborar el efecto modulador de la PKC sobre I_{CRAC} dializamos las células T Jurkat con una solución interna conteniendo EGTA y las perfundimos con solución externa a la que se había añadido un inhibidor de la PKC: la bisindolilmaleimida ($1\mu\text{M}$) o la estaurosporina ($2\mu\text{M}$). Ambos fármacos redujeron significativamente el porcentaje de inactivación respecto al observado en el grupo control, en el que la solución de perfusión estaba desprovista de los mencionados fármacos (Figura 42B). Así, frente a un porcentaje del $77,44 \pm 8,76\%$ registrado en el grupo control, se obtuvo un porcentaje de inactivación de $41,50 \pm 5,06\%$ en las células tratadas con bisindolilmaleimida y del $15,87 \pm 9,16\%$ en las células tratadas con estaurosporina. Es de destacar también que éste último compuesto redujo a la mitad el porcentaje de células inactivantes frente al observado en las otras dos condiciones experimentales (50% en el grupo tratado con estaurosporina frente 100% en el grupo control y el tratado con bisindolilmaleimida). Estos resultados confirman el papel de la PKC como efector de la inactivación de I_{CRAC} .

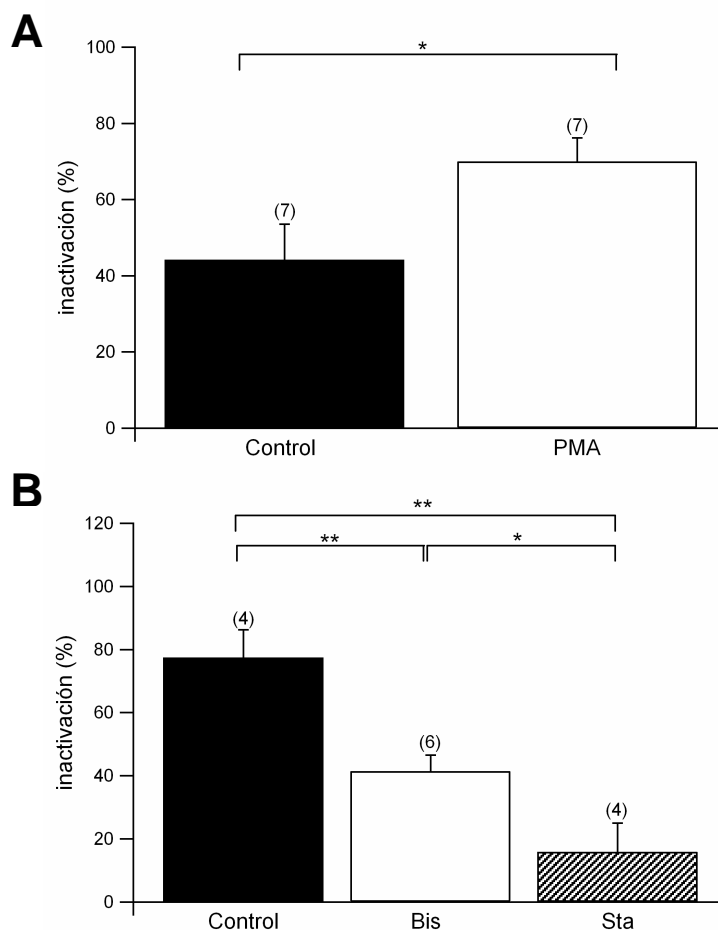


Figura 42. Efectos de diversos agentes moduladores de la actividad de la PKC sobre la inactivación de I_{CRAC} . (A) Efecto de forbol miristato acetato (PMA). Las células fueron dializadas con EGTA y cóctel mitocondrial y superfundidas con PMA (100 nM) cuando I_{CRAC} alcanzaba su amplitud máxima. (B) Efecto de dos inhibidores de la PKC (bisindolilmaleimida o estaurosporina). Las células fueron dializadas con EGTA y perfundidas con bisindolilmaleimida (Bis, 1 μ M) o estaurosporina (Sta, 2 μ M) cuando I_{CRAC} alcanzaba su amplitud máxima.

18.- EFECTO DEL CONTENIDO DE COLESTEROL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

Los resultados previamente expuestos, relativos al efecto modulador de las mitocondrias y de la PKC sobre I_{CRAC} hacían pensar en la existencia en la membrana de los linfocitos T Jurkat de microdominios de señalización integrados por múltiples proteínas de membrana, entre las que podrían encontrarse los propios canales CRAC, y organelas intracelulares, incluyendo las mitocondrias y el retículo endoplásmico, capaces de integrar la información procedente de muy diversas fuentes, tanto extracelulares (mediadores autocrinos, paracrinos, hormonas, etc) como intracelulares (nivel de llenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , Ca^{2+} citosólico, ATP, etc).

En estos dominios de señalización, podríamos encontrarnos con un elevado dinamismo en relación a sus componentes moleculares, lo cual coincidiría con las denominadas balsas lipídicas, en las que tanto algunas proteínas como la caveolina-1 y lípidos como el colesterol desempeñan un papel organizativo fundamental (vease el apartado de Introducción).

Por ello, decidimos investigar el efecto de la modificación del contenido de colesterol de la membrana de las células T Jurkat sobre I_{CRAC} . A tal fin, tratamos las células T Jurkat con metil β ciclodextrina (M β CD; 10 mM) o hidroxipropil β ciclodextrina saturada con colesterol (Cho-H β CD; 100 μ M) para, respectivamente, extraer o adicionar colesterol a las membranas celulares. A continuación valoramos sus efectos sobre el contenido de colesterol y la distribución de las balsas lipídicas en la membrana celular mediante microscopía de fluorescencia y sobre I_{CRAC} mediante la técnica de *patch clamp*.

Debemos señalar que el tratamiento de las células con M β CD indujo una disminución de la viabilidad celular con alteraciones de la morfología de muchas de las células supervivientes en las que se aprecia una reducción de su tamaño y la aparición de vesículas citoplasmáticas y cuerpos apoptóticos, indicativos de un proceso de muerte celular programada. Por el contrario, la morfología celular del grupo control y del tratado con Cho-H β CD no presentó diferencias apreciables (Figuras 43 y 45).

La incubación de las células con filipina (0,05 mg/ml durante 2 horas), un compuesto fluorescente que se une específicamente a colesterol, permitió confirmar la eficacia de los tratamientos con ambas ciclodextrinas para modificar el contenido de colesterol en las membranas de celulares T Jurkat. Es de destacar que en las células control, no tratadas con ciclodextrinas, la fluorescencia de filipina aparece nítidamente circunscrita a la membrana plasmática y al núcleo, mientras que las células tratadas con M β CD exhiben un patrón de marcaje difuso y de baja intensidad. Por el contrario, las células tratadas con Cho-H β CD presentaron un intenso marcaje y a lo largo de la membrana plasmática (Figura 43).

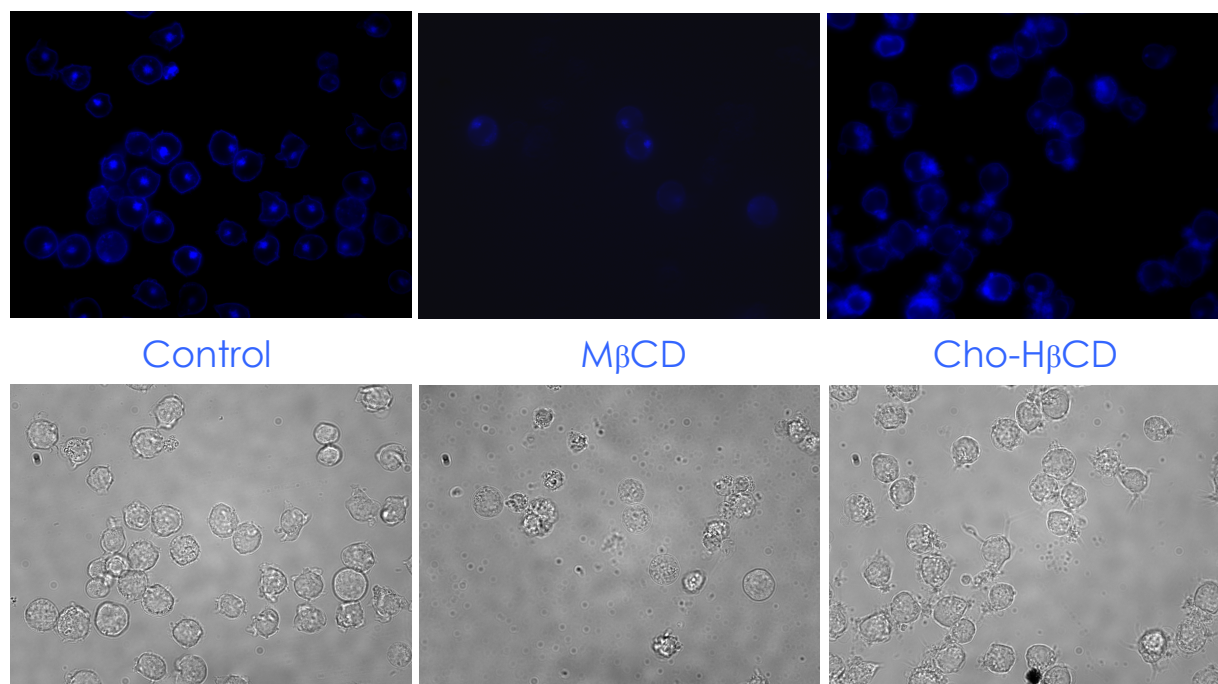


Figura 43. Análisis mediante microscopía de fluorescencia del contenido de colesterol de las membranas de las células T Jurkat tratadas con ciclodextrinas. Al objeto de modificar el contenido de colesterol, las células fueron tratadas con metil- β -ciclodextrina ($M\beta CD$; 10 mM) o hidroxipropil- β -ciclodextrina saturada con colesterol ($Cho-H\beta CD$; 100 μM) y posteriormente incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con filipina (0,05 mg/ml; λ_{ex} : 340-380 nm; λ_{em} : 460-480 nm), un marcador fluorescente que se une de manera específica a colesterol. En el panel superior se muestra la imagen de fluorescencia de filipina y en el panel inferior la imagen de campo claro. Ambas imágenes fueron recogidas usando la misma magnificación y campo de visión de manera que la posición de las células es idéntica en la imagen superior e inferior. La barra de calibración se corresponde con 10 μm .

Los experimentos electrofisiológicos no permitieron evidenciar efecto alguno del tratamiento con $M\beta CD$ sobre el porcentaje de células inactivantes (60%; $n = 5$ células) o sobre el porcentaje de inactivación ($21,17 \pm 10,25\%$) respecto a los observados en el grupo control (83,33%; $n = 6$ células; $21,66 \pm 6,17\%$) (Figura 44A). Sin embargo, tanto el porcentaje de células inactivantes (90% vs 66,67%; n de 10 y 6, respectivamente) como el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} ($42,93 \pm 5,85\%$ vs $16,93 \pm 6,56\%$) se incrementaron en las células tratadas con $Cho-H\beta CD$ respecto a las células no tratadas, lo que indica que el enriquecimiento en colesterol de las membranas celulares influye en la inactivación de I_{CRAC} (Figura 44B). Conviene mencionar que estos experimentos se realizaron en células dializadas internamente con BAPTA al objeto de evitar que una posible modificación de la función mitocondrial inducida por las ciclodextrinas pudiera interferir con la interpretación de nuestros resultados sobre la inactivación de I_{CRAC} .

Hay que indicar que M β CD y Cho-H β CD tampoco tuvieron ningún efecto sobre el proceso de activación de I_{CRAC} . Así, la amplitud máxima de la corriente del grupo de células tratadas con M β CD fue de $4,23 \pm 1,17$ pA/pF ($n = 5$ células), valores similares a los observados en su grupo control en presencia de 10 mM de BAPTA ($4,96 \pm 0,87$ pA/pF; $n = 6$ células). Tampoco las células a las que se les incorporaba colesterol en sus membranas experimentaron cambios significativos en la amplitud máxima de la corriente respecto de sus células control ($4,78 \pm 0,69$ pA/pF; $n = 10$ células y $4,37 \pm 0,37$ pA/pF; $n = 8$ células; respectivamente).

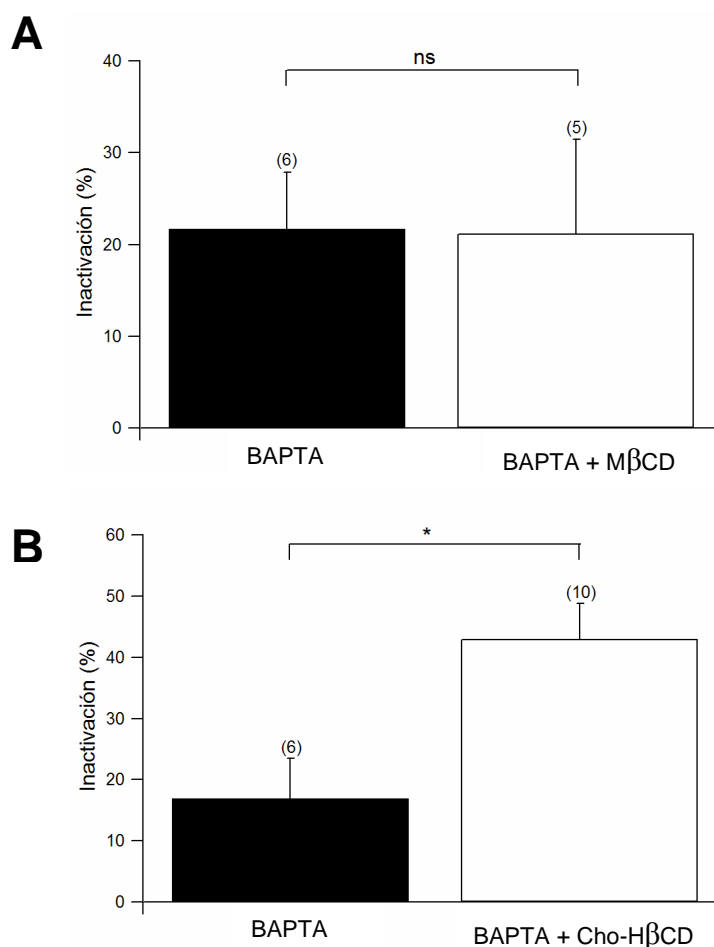


Figura 44. Efecto del tratamiento con ciclodextrinas sobre la inactivación de I_{CRAC} en células T Jurkat. Se representa el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} en células dializadas con BAPTA (10 mM) que han sido tratadas con metil- β -ciclodextrina (M β CD; 10 mM) para extraer colesterol de las membranas (A) o hidroxipropil- β -ciclodextrina saturada con colesterol (Cho-H β CD; 100 μ M) para su incorporación.

Finalmente, decidimos investigar si los cambios inducidos en la cinética de I_{CRAC} por las modificaciones del contenido celular de colesterol podrían asociarse a alteraciones en la disposición de las balsas lipídicas en la

membrana plasmática. El estudio de la disposición de las balsas lipídicas se llevó a cabo mediante microscopía de fluorescencia de células T Jurkat teñidas con la subunidad B de toxina colérica (CT-B) conjugada con Alexa Fluor 555 suministrada en el kit Vybrant® Lipid Raft que permite el marcaje selectivo de las balsas lipídicas, las cuales, tras su agregación, pueden ser fácilmente visualizadas.

La figura 45 muestra que el tratamiento con ciclodextrinas conlleva cambios en la distribución del marcaje fluorescente asociado a las balsas lipídicas. Así, las células control presentaron un marcaje intenso en la membrana celular. El tratamiento de las células con M β CD ocasionaba una disminución del marcaje, el cual adopta un patrón difuso. Por otra parte, en las células tratadas con Cho-H β CD se observa una marcada concentración del marcaje en la membrana celular que aparece con un patrón de distribución en parches. Estos resultados apuntan la correlación entre el grado de inactivación de I_{CRAC} y la conformación y distribución de las balsas lipídicas en células T Jurkat.

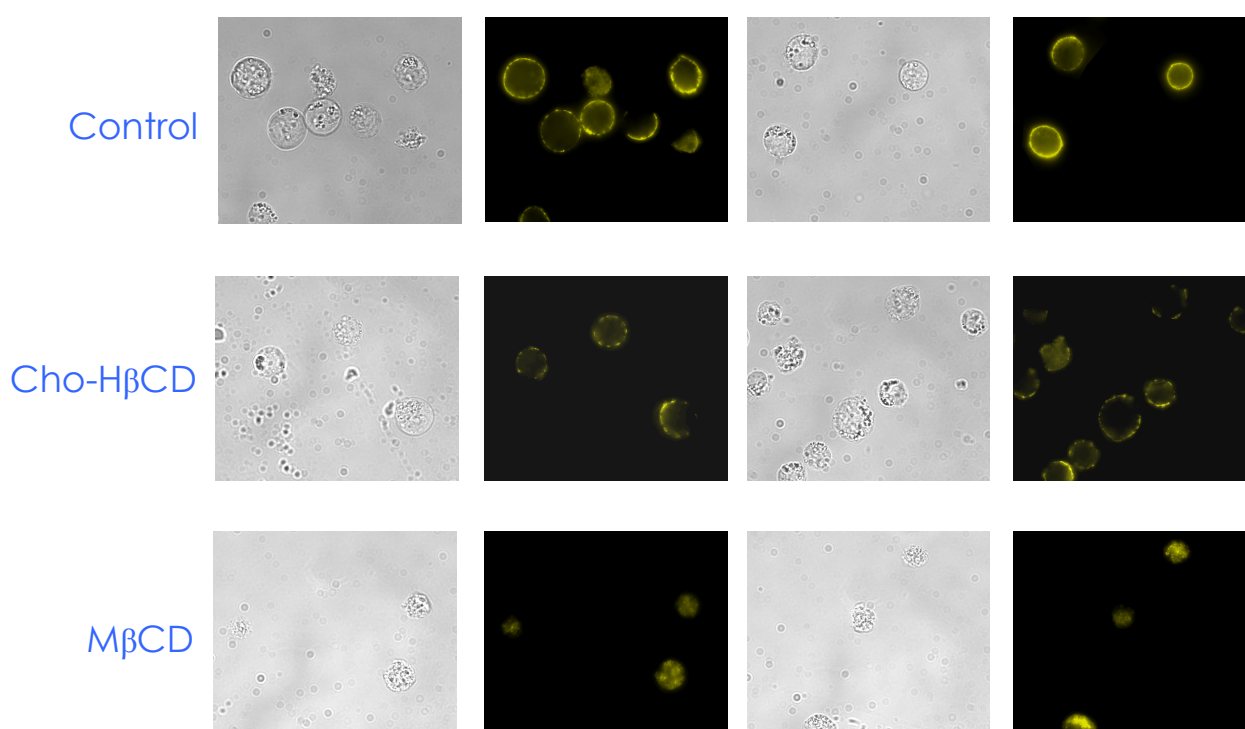


Figura 45. Análisis de balsas lipídicas en células T Jurkat mediante microscopía de epifluorescencia tratadas con ciclodextrinas. Se muestran imágenes de campo claro y de fluorescencia de células control y tratadas con metil- β -ciclodextrina (M β CD; 10 mM) o Hidroxi-propil- β -ciclodextrina saturada con colesterol (Cho-H β CD; 100 μ M) y marcadas con el kit Vybrant® Alexa Fluor 555 Lipid Raft (λ_{ex} : 555 nm; λ_{em} : 565 nm). Las imágenes fluorescentes son recogidas usando el mismo campo de visión y la misma magnificación que la imagen de campo claro situada a su izquierda. La barra de calibración equivale a 10 μ m.

DISCUSIÓN

Este trabajo ha tenido como objetivo el estudio del papel de la mitocondria en la regulación de la actividad de una corriente dependiente de depósito conocida como I_{CRAC} en linfocitos T, prestando especial atención a la posible participación de algún factor o factores que pudieran ser liberados desde las mitocondrias, así como a distintas moléculas efectoras de la homeostasis celular del Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática y proteína quinasa C).

1.- ELECCIÓN DEL MÉTODO EXPERIMENTAL

La principal técnica experimental empleada en este trabajo ha sido el registro electrofisiológico de corrientes iónicas globales en linfocitos T Jurkat, donde las corrientes CRAC dependientes de depósito representan la principal vía de entrada de Ca^{2+} a la célula desde el medio extracelular.

Distintas técnicas pueden ser empleadas para la medida de la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósitos. Posiblemente el método más utilizado sea el uso de indicadores fluorescentes, como el fura-2, que pueden ser introducidos en la célula de forma no invasiva. Sin embargo, esta aproximación cuenta con limitaciones importantes que han de ser tenidas en cuenta. Una de ellas es que en estos ensayos el potencial de membrana no puede ser controlado, y por tanto, puede variar, determinando la fuerza electromotriz y la extensión de la entrada de Ca^{2+} . Es importante considerar también, que la señal de Ca^{2+} citoplasmática no es un indicador sólo de la entrada de Ca^{2+} sino que representa el balance neto entre los flujos de entrada de Ca^{2+} , la capacidad tamponante citosólica y los mecanismos de extrusión tanto hacia los distintos depósitos intracelulares como al exterior de la célula.

La técnica de fijación de voltaje conocida como *patch clamp* permite el control del potencial de membrana y de la composición de los medios extra e intracelulares, lo cual facilita el aislamiento de la corriente de otras conductancias no deseadas, así como la introducción de diferentes compuestos de interés al interior celular. Sin embargo, no está exenta de inconvenientes, como la difusión de componentes intracelulares desde el citosol a la pipeta de registro, la alteración de la estructura celular como consecuencia de la manipulación mecánica o el uso de soluciones que determinan unas condiciones de registro alejadas de las que pudieran ser consideradas como fisiológicas. A esto se une el reducido tamaño de estas corrientes que dificulta la medida de conductancias unitarias o de canal único y por ello limitan el estudio de sus características cinéticas e incluso la estimación del número de canales que se expresan en una célula determinada.

A pesar de ello, las particulares características biofísicas de muchas de las corrientes dependientes de depósito y en particular de I_{CRAC} , hacen que el registro electrofisiológico sea la forma más directa y menos ambigua de estudiar la corriente CRAC. Así, la marcada rectificación de entrada y un

potencial de reversión por encima de + 50 mV, son características que nos permiten identificar los registros observados como correspondientes a I_{CRAC} . Sin embargo, en linfocitos T se conoce que, además de los canales CRAC, existe otro tipo de canales permeables a Ca^{2+} de alta conductancia denominados MagNum (Nadler y cols., 2001), por lo que es importante establecer condiciones experimentales en las que no se produzcan contaminaciones entre ambas conductancias. La corriente a través de los canales MagNum se encuentra activa cuando los niveles de Mg^{2+} y/o de ATP.Mg se encuentran por debajo de 1 mM (Hermosura y cols., 2002). El hecho de que nuestros experimentos hayan sido realizados en presencia de, al menos, 2 mM ATP.Mg y de 1 mM $MgCl_2$ en la solución intracelular y que las corrientes sean medidas a un potencial de -80 mV genera condiciones en las que la corriente MagNum se encuentra inactivada o su contribución, en caso de existir, sea mínima (Nadler y cols., 2001).

Asimismo, para el estudio de la regulación de I_{CRAC} establecimos unas condiciones en las que la activación de esta corriente fuera lo más eficiente posible. Como ya se ha comentado, la señal de activación de I_{CRAC} es el vaciado de los depósitos dependientes de IP_3 , por lo que todas aquellas maniobras que resulten en el descenso del contenido intraluminal de Ca^{2+} por debajo del umbral de activación permitirán la activación experimental de la corriente. Por ello, para obtener la máxima activación se introdujeron en la célula combinaciones de compuestos que provocan el extensivo vaciado de los depósitos como son una concentración supramáxima de IP_3 y de taspigargina junto con altas concentraciones de un quelante de Ca^{2+} exógeno (EGTA o BAPTA).

2.- CARACTERIZACIÓN DE I_{CRAC} : Efecto de dos quelantes de Ca^{2+}

En una primera fase procedimos a la caracterización de I_{CRAC} en presencia de altas concentraciones intracelulares (10 mM) de dos quelantes distintos de Ca^{2+} (EGTA o BAPTA). En las condiciones antes citadas se observó que I_{CRAC} presentaba cierto grado de variabilidad comparando distintos cultivos o lotes de células T Jurkat a pesar de tratarse de una línea celular. Una posible explicación a esta variabilidad podría encontrarse en el hecho de que el clon de la línea celular Jurkat utilizado (E6-1) es pseudodiploide y alrededor de un 5% de las células presenta poliploidía (información obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC); <http://www.atcc.org>).

Para minimizar el efecto de estas diferencias entre células se intentó realizar el análisis de los datos en un alto número de células, siendo además descartados todos aquellos registros donde la corriente mostraba un comportamiento extraño o atípico. Además, los experimentos en las distintas condiciones analizadas tuvieron un diseño pareado en virtud del cual tanto en la rama experimental como en la control se emplearon células preparadas en el mismo cultivo.

El análisis estadístico de los datos obtenidos reveló que no había diferencias significativas en los parámetros cinéticos de activación (I_{\max} , τ_{on} y t_{\max}) de I_{CRAC} entre las células dializadas con EGTA o BAPTA. Aunque se observó un ligero aumento en la amplitud máxima de la corriente en presencia de BAPTA, este incremento nunca fue significativo cuando se compararon los registros obtenidos en un número elevado de células (33 con EGTA y 22 con BAPTA).

Como ya se ha comentado, la inactivación rápida ocurre en el rango de milisegundos (Zweifach y Lewis, 1995a), por lo que este fenómeno podría afectar a la activación de la corriente, ya que la amplitud máxima de I_{CRAC} se obtiene a los 50-60 segundos tras el inicio del vaciado de los depósitos (ver tabla 9). Por este motivo, el hecho de que no se observaran diferencias en la amplitud máxima de I_{CRAC} en presencia de EGTA o BAPTA, sugiere que no hay diferencias en el proceso de inactivación rápida en la presencia de uno y otro quelante.

Estos resultados parecen contradecir los de Zweifach y Lewis (1995a) que mostraron la existencia de mayores diferencias en el porcentaje de inactivación rápida en células tratadas con EGTA o con un quelante rápido como el BAPTA. Sin embargo, es conocido que la inactivación rápida es dependiente de determinadas condiciones experimentales. Así, mientras que Zweifach y Lewis usaban potenciales de -120 mV, 12 mM de EGTA y BAPTA en la solución interna y 22 mM de Ca^{2+} en la externa, en nuestro caso, la inactivación rápida fue analizada durante las respuestas de corriente a la aplicación de pulsos de voltaje rectangulares, empleando las mismas condiciones de registro que las utilizadas para la evaluación de los demás parámetros cinéticos de I_{CRAC} (esto es, un potencial de -80 mV, 10 mM de EGTA o BAPTA y 10 mM de Ca^{2+} en la solución extracelular), en las cuales no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inactivación rápida en presencia de EGTA o BAPTA (Figura 25).

Además, la respuesta de la inactivación rápida también podría ser dependiente del tipo celular ya que en células RBL-1 se observaban mayores diferencias en el porcentaje de inactivación rápida en un mismo número de células que en nuestro caso y en similares condiciones experimentales (potencial de -120 mV, 10 mM de Ca^{2+} y 10 mM de EGTA o BAPTA). Sin embargo, cuando en estas condiciones el potencial se reducía a -80 mV las diferencias en la inactivación rápida entre ambos quelantes se reducían hasta valores similares a los obtenidos en nuestros experimentos (ver figura 1J de Bakowski y Parekh, 2007).

Las diferencias en la inactivación rápida entre ambos quelantes son menos marcadas cuando son medidas a potenciales de -80 mV que a potenciales más negativos (Zweifach y Lewis, 1995a). Sin embargo, aunque podría pensarse que el potencial de -80 mV empleado en nuestros experimentos podría haber sido la razón por la que apenas se observaron diferencias, cuando

se utilizó un potencial de -120 mV para evaluar la inactivación rápida en presencia de otros dos tampones de Ca^{2+} como el ATP.Mg o el ATP.2Na, entre los que existen notables diferencias en cuanto a su capacidad quelante de Ca^{2+} , tampoco se observaron diferencias significativas en la extensión de la inactivación rápida (Figura 36).

Por otro lado, el análisis de la inactivación lenta mostró diferencias significativas entre el uso de altas concentraciones de uno u otro quelante. Así, el BAPTA redujo tanto la extensión de la inactivación como el porcentaje de células inactivantes, en comparación con lo observado en presencia de EGTA (Figura 23).

El tiempo necesario para que I_{CRAC} alcanzase un estado estacionario en la mayoría de las células era de 250-350 segundos tras la activación de la corriente, por lo que, para una correcta observación del proceso de inactivación lenta, los registros hubieron de prolongarse durante al menos 350 segundos.

Una explicación para las diferencias observadas en la inactivación lenta tras la diálisis con 10 mM de EGTA o de BAPTA se encontraría en las diferentes características cinéticas de estos quelantes (Naraghi y Neher, 1997), ya que aunque presentan una afinidad por el Ca^{2+} similar (valores para K_D de $1,8 \times 10^{-7}$ M y de $2,2 \times 10^{-7}$ M, para EGTA y BAPTA respectivamente), el BAPTA presenta una cinética de unión a Ca^{2+} más rápida que el EGTA (siendo los valores de K_{on} $2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para EGTA y BAPTA, respectivamente), pudiendo, por ello, ser capaz de reducir más eficazmente la concentración de Ca^{2+} en la vecindad del canal, como manifiestan los cálculos de la extensión de los microdominios generados por un canal CRAC empleando el programa Pore (Figura 24) .

Cuando se emplean altas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} , sólo las zonas cercanas a la boca del canal CRAC son susceptibles de presentar cambios rápidos y pronunciados en la concentración de Ca^{2+} , que dan lugar a la formación de microdominios de Ca^{2+} en la proximidad de dichos canales. La apertura de los canales CRAC de la membrana plasmática generará microdominios en la submembrana plasmática, cuya extensión y amplitud estarán condicionadas por la amplitud de la corriente y por la concentración y características cinéticas de los quelantes de Ca^{2+} presentes. Nuestros resultados tanto experimentales como computacionales son fácilmente interpretables en el sentido de que la reducción del tamaño del microdominio de Ca^{2+} alrededor de la boca del canal sería la razón principal por la cual la inactivación en presencia de BAPTA es menor que en presencia de EGTA. Por tanto, el perfil espacio-temporal del Ca^{2+} en la proximidad de los canales CRAC determinaría tanto la amplitud como el porcentaje de la inactivación lenta de I_{CRAC} .

La formación de microdominios de Ca^{2+} también podría producirse en otras localizaciones donde exista un flujo de este ión como alrededor de los canales de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (IP_3R y RyR). Sin embargo, nuestras

condiciones experimentales (alta capacidad quelante y una alta concentración de IP_3 y de tapsigargina) hacen que el vaciamiento del depósito se produzca de manera muy eficiente, por lo que no es posible involucrar cambios en la velocidad de vaciamiento del retículo endoplásmico para explicar las diferencias observadas en la inactivación lenta de I_{CRAC} .

Los resultados que acabamos de discutir nos llevaron también a la conclusión de que disponíamos de un modelo experimental adecuado para poder analizar las diferencias en el proceso de inactivación lenta de I_{CRAC} dependientes de cambios subplasmalemales de la concentración de Ca^{2+} y, en concreto, de aquellos relacionados con la función mitocondrial.

3.- REGULACIÓN MITOCONDRIAL DE LA INACTIVACIÓN DE I_{CRAC}

En presencia de una baja concentración (0,1 mM) de quelantes de Ca^{2+} y en ausencia de tapsigargina, se ha observado que la diálisis con altas concentraciones de IP_3 no es capaz de activar macroscópicamente I_{CRAC} en células RBL-1 salvo que las mitocondrias sean mantenidas en un estado energizado mediante el aporte de sustratos de la respiración mitocondrial (Gilabert y Parekh, 2000). Este efecto potenciador de un cóctel mitocondrial se ve anulado al incrementar la capacidad quelante de la solución intracelular (con una concentración de EGTA $> 0,6$ mM), indicando que las mitocondrias funcionalmente activas se comportaban de manera análoga a un quelante exógeno de Ca^{2+} (Gilabert y cols., 2001).

Estos resultados indican también que las mitocondrias son capaces de competir con la SERCA por el Ca^{2+} citosólico y que la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias reduciría la $[Ca^{2+}]_i$, evitando la inhibición de los IP_3Rs y facilitando, por tanto, el vaciado de los depósitos.

Análogamente, se ha demostrado que la mitocondria es capaz de captar Ca^{2+} tras elevaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ debidas a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Este hecho determina que las mitocondrias puedan regular la actividad de distintos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Montero y col., 2000; Hernández-Guijo y col., 2001; Sánchez y cols., 2001).

Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales con una alta concentración de quelantes de Ca^{2+} exógenos (10 mM) y en presencia de tapsigargina, donde una máxima activación de I_{CRAC} tiene lugar, el estado funcional de las mitocondrias no parece contribuir significativamente al proceso de activación de I_{CRAC} (Figura 27), dado que la diálisis con sustratos respiratorios no causaba ningún efecto sobre la amplitud máxima de la corriente o su cinética de activación (τ_{on}). Estos resultados apoyan lo observado en células RBL-1, en las que la despolarización mitocondrial con antimicina y oligomicina en presencia de alta capacidad quelante no tiene efecto sobre la activación de I_{CRAC} (Gilabert y Parekh, 2000).

Asimismo, nuestros resultados muestran que la potenciación de la función mitocondrial mediante el uso de un cóctel compuesto por diferentes sustratos oxidables (ver Materiales y Métodos) también reducía la inactivación lenta de I_{CRAC} y el porcentaje de células inactivantes en células dializadas con altas concentraciones de EGTA. En este punto respecto nuestros resultados concuerdan con los de Hoth y cols. (1997) empleando la medida de los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular, a pesar de que, al contrario de lo que ocurre con los experimentos de *patch clamp*, en esos ensayos no es posible controlar ni el potencial de membrana ni la composición del medio intracelular (Hoth y cols., 1997).

El efecto modulador a nivel mitocondrial del cóctel fue confirmado mediante el tratamiento con antimicina y oligomicina, observando que en presencia de dichos inhibidores de la respiración mitocondrial la inactivación de I_{CRAC} era similar a la observada con EGTA sólo. Además, para confirmar el efecto del cóctel sobre la mitocondria se llevó a cabo el análisis mediante citometría de flujo del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) con la sonda rodamina 123. En estos experimentos, el cóctel es añadido en el medio extracelular a diferencia de los experimentos de *patch clamp* en los que es introducido en el interior celular. Esta circunstancia no constituyó una limitación importante, dado que Villalba y cols. habían demostrado la capacidad de los componentes del cóctel para mejorar la función mitocondrial cuando se añadían al medio extracelular (Gunter y Pfeiffer, 1990; Villalba y cols., 1994). Nuestros resultados revelaron un incremento de fluorescencia de la rodamina 123 en presencia del cóctel, el cual se reducía marcadamente tras el tratamiento con antimicina y oligomicina, confirmando los efectos del cóctel a nivel mitocondrial.

Por otra parte, experimentos realizados por Cho y cols. (1997) han mostrado la posibilidad de que la oligomicina tuviera efectos inhibitorios sobre los canales dependientes de depósito a través de un mecanismo independiente de su efecto sobre la ATP sintasa mitocondrial (Cho y cols., 1997). Sin embargo, en nuestros experimentos de *patch clamp* empleamos una mezcla de oligomicinas (A, B y C) (Sigma; A8674) a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Considerando que el peso molecular medio de esta mezcla es 791 g/mol, tal y como hicieron Cho y cols., la concentración media equivalente de oligomicina en nuestros experimentos sería de 0,6 μM . De acuerdo a los resultados del trabajo citado, esta concentración tendría efectos inhibitorios mínimos (< 15%) sobre la amplitud de I_{CRAC} , especialmente teniendo en cuenta que nuestra mezcla de oligomicinas está enriquecida en oligomicina A (65%; acorde a los datos del proveedor), la cual muestra menor eficacia que oligomicina B o C para inhibir la entrada de Ca^{2+} en células T Jurkat. Por lo tanto, podemos descartar un notorio efecto inhibitorio sobre I_{CRAC} producido directamente por oligomicina.

Asimismo, para comprobar si la aplicación de antimicina y oligomicina por sí mismas o a través del colapso mitocondrial pudieran tener algún efecto

sobre la inactivación de I_{CRAC} realizamos experimentos en células T Jurkat dializadas intracelularmente con 10 mM de BAPTA, observando que la adición de antimicina y oligomicina carece de efecto alguno sobre los parámetros cinéticos de I_{CRAC} en presencia de altas concentraciones de un quelante de Ca^{2+} rápido (Figura 29B). Estos resultados indican que la oligomicina y la antimicina no actúan sobre los canales CRAC de manera directa.

La regulación mitocondrial de los canales de Ca^{2+} operados por depósito ha sido demostrada tanto por métodos electrofisiológicos como de medida de la señal de Ca^{2+} citosólica, y tanto por medio de la potenciación mitocondrial (Gilabert y Parekh, 2000; Gilabert y cols., 2001) como por su inhibición (Hoth y cols., 2000). La mitocondria parece jugar un doble papel en el control de I_{CRAC} ya que por un lado facilitaría su activación al favorecer el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Gilabert y Parekh, 2000) y, además, impediría su inactivación, al retirar el Ca^{2+} a medida que entra a la célula (Hoth y cols., 2000).

La mitocondria sólo puede capturar Ca^{2+} mediante el uniportador, con la consiguiente reducción de la concentración de Ca^{2+} citosólico. El uniportador es un sistema de captura de Ca^{2+} de baja afinidad con valores de K_m (20 μ M, Palmero y cols., 1995) demasiado altos para sentir las concentraciones medias de Ca^{2+} citosólico que se alcanzan como consecuencia de la activación fisiológica de las células (1-2 μ M). Sin embargo, el uniportador mitocondrial puede estar expuesto a altas concentraciones de Ca^{2+} o microdominios de Ca^{2+} , los cuales, como se ha comentado anteriormente se formarían en la vecindad de estructuras donde acontecen flujos importantes de Ca^{2+} , como serían, por ejemplo, los propios canales CRAC. En consecuencia, para que las mitocondrias puedan llevar a cabo este papel regulador en presencia de altas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} habrían de encontrarse muy próximas a dichas estructuras, es decir, a unos cientos de nanómetros de la boca del canal CRAC, como indican los modelos matemáticos utilizados.

4.- LOCALIZACIÓN Y SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS MITOCONDRIAS EN LOS LINFOCITOS T

A diferencia de lo que ocurre con los efectos moduladores de los quelantes exógenos sobre I_{CRAC} , la regulación mitocondrial de dicha corriente está condicionada tanto por el estado metabólico celular como por la topología subcelular de las mitocondrias respecto a la membrana plasmática y el retículo endoplásmico (Lawrie y cols., 1996). Esto llevaba a preguntarse si las mitocondrias son orgánulos homogéneos en términos de su localización subcelular y de sus propiedades funcionales.

La heterogeneidad funcional de las mitocondrias en relación con el control de la señal citosólica de Ca^{2+} ha sido descrita en varios tipos celulares (Collins y cols., 2002). Se ha propuesto que las mitocondrias localizadas en la

vecindad de la membrana plasmática son capaces de secuestrar más Ca^{2+} que aquellas localizadas alrededor del núcleo (Collins y cols., 2002).

Por otro lado, hay que considerar que las distintas organelas, como las mitocondrias o las cisternas del RE, constituyen un freno a la difusión del Ca^{2+} a través del citosol, al actuar como barreras físicas que a la vez pueden secuestrar el catión, generando compartimentos o dominios en el interior celular o de la propia organela caracterizados por tener distintas concentraciones de Ca^{2+} (Alonso y cols., 2006).

Asimismo, serían las mitocondrias ubicadas en la periferia celular las responsables de la regulación de la actividad de canales de potasio dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia iónica (canales BKCa) y de canales de Ca^{2+} dependientes de depósito en diferentes tipos celulares (Malli y cols., 2003a, Park y cols., 2001), incluidas las células T (Quintana y cols., 2006; Quintana y cols., 2007). A este respecto, se ha observado que la entrada de Ca^{2+} a través de canales CRAC facilita la translocación, dependiente del citoesqueleto de actina, de las mitocondrias desde el interior celular hacia la membrana plasmática, de manera que su nueva localización en la vecindad de los canales CRAC permite mantener la actividad de los mismos al reducir la inactivación dependiente de Ca^{2+} . Este último efecto resulta esencial para lograr un aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; una vez formada la SI y, en consecuencia, para la activación de factores de transcripción como NFAT, AP1 y NF κ B y la generación de una respuesta inmune eficaz (ver Figura 5 de Quintana y cols., 2007). Además, en otros estudios llevados a cabo en células HeLa, las mitocondrias se relocalizaron desde la periferia de la célula hacia la zona perinuclear como consecuencia de la sobreexpresión de la dinamitina, una subunidad de la dinactina, lo que induce la inhibición del factor de fisión mitocondrial (Drp-1) y el aumento del número de contactos entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias, que conlleva una menor entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de depósito, indicando así, un requerimiento de mitocondrias periféricas para una óptima actividad este tipo de canales (Malli y cols., 2003a, Varadi y cols., 2004).

Por otro lado, en células T se ha encontrado que, tras la estimulación, la distancia entre la SI de la membrana plasmática y la mitocondria era reducida hasta valores por debajo de 200 nm y esta redistribución de las mitocondrias era necesaria para mantener la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Quintana y cols., 2007). Esto para redactar mejor. Asimismo, estos autores observaron que las mitocondrias situadas cerca de la SI captan más Ca^{2+} que aquellas que se encuentran más alejadas. Esto sugiere que las mitocondrias podrían formar parte del complejo de señalización formado en la SI y que su localización cercana a la sinapsis sería necesaria para la activación sostenida de la entrada de Ca^{2+} en las células T, una característica necesaria para una eficaz activación.

Sin embargo, se ha observado que tras inducir la formación de una SI funcional, pequeños cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ son suficientes para inducir la proliferación de los linfocitos T. Así, un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta 220 nM desde un nivel basal de alrededor de 40 nM era suficiente para una máxima proliferación en células CD4⁺. Esto indica que la sensibilidad de diferentes procesos Ca^{2+} dependientes, como la proliferación o la apoptosis, en células T podría ser más alta de lo que se pensaba hasta ahora, consecuencia de una estimulación focal y localizada, en la que la $[Ca^{2+}]_i$ se encuentra finamente regulada determinando la eficacia de la respuesta inmune (Schwarz y cols., 2007) o la entrada de la célula en una muerte celular programada o apoptosis (Giorgi y cols., 2008).

Además de la redistribución mitocondrial hacia la SI, se ha descrito que tanto Orai1 como STIM1 (subunidad del canal CRAC y su activador, respectivamente) son también reclutados a la SI formada entre linfocitos T y APCs. Así, Orai1 y STIM1 colocalizan con el TCR y moléculas coestimuladoras como CD3 y CD28, provocando un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en linfocitos T localizado en la zona de contacto con la APC (Lioudyno y cols., 2008).

La transfección de células T Jurkat con el vector pEYFP-Mito y el análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia confocal nos ha permitido realizar un estudio de la localización subcelular de las mitocondrias. En particular hemos determinado las distancias mínimas entre las mitocondrias de la periferia de las células T Jurkat y la cara interna de la membrana plasmática, delimitada por filamentos de actina. Es de destacar que el valor modal de la distribución es de 200 nm y que en el 78,12 % de las mediciones realizadas dicha distancia fue inferior a los 300 nm (Figura 40). Estos resultados corroboran los obtenidos mediante microscopía electrónica de células T, que refirieron un rango entre 100 y 500 nm para las distancias mínimas entre la membrana plasmática y las mitocondrias (Facchetti y cols., 1988).

Por otra parte, la capacidad de las balsas lipídicas de segregar diferentes proteínas de membrana permite crear compartimentos diferenciados en la membrana plasmática donde se acumulan las diferentes proteínas implicadas en la señalización y de los que se excluye a otras (ver introducción). Concretamente, para promover la translocación de las balsas lipídicas se necesita la coestimulación a través de CD28 que induce el movimiento de receptores unidos al citoesqueleto de actina a la zona TCR/MHC (Wulfiging y cols., 1999).

La reorganización del citoesqueleto de actina es necesaria para que se produzca la activación de los linfocitos T (Valitutti y cols., 1995). Parece existir también una relación entre la señal citosólica de Ca^{2+} y el citoesqueleto de actina en linfocitos, ya que se ha observado que pacientes con mutaciones en el gen que codifica para WASP (proteína del síndrome Wiskott-Aldrich), una proteína que interviene en el ensamblaje de los filamentos de actina, muestran, entre otros defectos, una menor entrada de Ca^{2+} y una débil activación de

NFAT, que dan lugar a una baja producción de IL-2 y una reducida proliferación celular (Simon y cols., 1992; Cianferoni y cols., 2005).

Como muestra el marcaje con faloidina-TRITC el citoesqueleto de actina no presenta una densidad homogénea sino que es posible encontrar zonas donde la actina reduce su espesor; precisamente es en esas zonas donde aparecen las mitocondrias que se encuentran situadas más periféricamente (Figura 39, ver flechas). Por ello, pensamos que, además de en la reorganización del TCR y el agrupamiento de moléculas coestimuladoras en las balsas lipídicas, el citoesqueleto de actina podría intervenir en la redistribución de las mitocondrias hacia zonas concretas de la membrana plasmática.

Estos hallazgos son congruentes con la función que le ha sido atribuida al citoesqueleto de actina en las células cromafines de la médula adrenal. En este tipo celular los filamentos de actina actúan como una barrera física que en estado de reposo impide el contacto entre los gránulos o vesículas cromafines y la membrana plasmática. Sin embargo, durante la estimulación celular se produce la desorganización del citoesqueleto favoreciéndose la aproximación de los gránulos a la membrana plasmática y la posterior liberación exocitósica de su contenido (Vitale y cols., 1991; Neco y cols., 2003). Así, en analogía con el proceso de exocitosis, la organización del citoesqueleto en las células T podría permitir la translocación de las mitocondrias hacia la membrana plasmática, donde regularían la $[Ca^{2+}]_i$ y, por lo tanto, la inactivación lenta de I_{CRAC} .

5.- MECANISMOS MITOCONDRIALES DE REGULACIÓN DE LA INACTIVACIÓN LENTA DE I_{CRAC}

5.1.- Recaptación de Ca^{2+} por el uniportador mitocondrial

Tradicionalmente, se ha considerado que las mitocondrias podrían actuar como un sistema capaz de secuestrar Ca^{2+} , mediante la captación del mismo gracias a un gradiente electroquímico generado por la respiración aerobia. La $[Ca^{2+}]_m$ cumple además un importante papel en la función de esa organela al regular la actividad de enzimas como la piruvato deshidrogenasa, la NAD⁺-isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, y consiguientemente, la velocidad del ciclo de los ácidos tricarbónicos y la producción de ATP. Por otra parte, el ATP producido a través de la fosforilación oxidativa puede servir no sólo como donante de energía en muy diferentes procesos celulares sino también como un quelante de Ca^{2+} muy eficaz por sus características cinéticas y bajo peso molecular que permite una amplia y rápida distribución citosólica.

Se ha observado que la adición de sustratos metabólicos como el piruvato y el malato en la solución extracelular es capaz de potenciar la respiración mitocondrial (Villalba y cols., 1994, Gunter y cols., 1990). La fosforilación oxidativa también depende de la presencia de $[Ca^{2+}]_m$, ya que la

actividad de las tres deshidrogenasas, antes mencionadas, es regulada positivamente por el aumento en la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial hasta niveles micromolares (Jouaville y cols., 1999).

El hecho de que el transporte de Ca^{2+} por el uniportador mitocondrial se active a concentraciones de Ca^{2+} por encima de $1 \mu\text{M}$ (Alonso y cols., 2006), nos animó a estimar el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados alrededor de los lugares de entrada de Ca^{2+} , los canales CRAC, en presencia de altas concentraciones de distintos quelantes de Ca^{2+} exógenos y verificar si en esas condiciones el uniportador podría actuar como regulador de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Mediante el uso de modelos matemáticos es posible realizar una estimación del tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados alrededor de un canal. Nosotros hemos empleado un modelo desarrollado por el Dr. Kenyon donde el parámetro λ (ver ecuación 2 en el apartado de Modelos matemáticos para la estimación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de Materiales y Métodos), que representa la distancia recorrida por el Ca^{2+} libre en la célula, nos permite estimar la extensión de la señal de Ca^{2+} citosólica originada en la boca de un único canal localizado en la membrana celular antes de su unión a un quelante exógeno. Por otra parte, desconocemos cual es la distribución de los canales CRAC en la membrana de los linfocitos T Jurkat, y en particular si lo hacen de forma homogénea o si forman grupos en zonas concretas de la célula, lo cual influiría en la magnitud local de la entrada de Ca^{2+} . Sin embargo, nuestro objetivo era conocer si podrían producirse diferencias en el tamaño de los microdominios generados alrededor de los canales en presencia de los distintos quelantes de Ca^{2+} . Así, el valor estimado de λ en presencia de 10 mM de EGTA fue de 95,5 nm y en presencia de 10 mM de BAPTA de 7,5 nm.

Los diferentes resultados obtenidos con BAPTA y EGTA son indicativos de su capacidad para modificar los microdominios de Ca^{2+} , los cuales serían de mayor extensión y amplitud en presencia de EGTA que de BAPTA, y por ende, sobre los mecanismos reguladores del canal CRAC dependientes de Ca^{2+} ; pero además, avalarían el potencial papel regulador de aquellos orgánulos (p.ej. las mitocondrias) capaces de controlar la concentración intracelular de Ca^{2+} , actuando como "sumideros" endógenos (Gilibert y Parekh, 2000).

Considerando el pequeño valor de λ estimado para BAPTA y la eficacia de este quelante para reducir la inactivación de I_{CRAC} , tanto la colocalización molecular entre los canales CRAC y las mitocondrias como, la existencia de una alta densidad y velocidad del uniportador de Ca^{2+} serían necesarias para explicar la modulación mitocondrial observada sobre I_{CRAC} .

Una posibilidad alternativa, aunque no excluyente, consistiría en la liberación por la mitocondria de un compuesto quelante de Ca^{2+} , que alcanzara concentraciones elevadas en las zonas cercanas a los canales CRAC.

5.2.- Liberación de ATP por la mitocondria

En nuestras condiciones experimentales, las mitocondrias no ejercen un papel regulador de los microdominios de Ca^{2+} generados por los canales CRAC, pero no debido a su capacidad para captar Ca^{2+} dada la débil reducción del porcentaje de inactivación de I_{CRAC} observado tras el tratamiento con inhibidores del uniportador como el rojo de rutenio o el Ru 360 (Figura 31). Por ello, aunque el papel del uniportador en la modulación de la actividad de los canales CRAC en condiciones fisiológicas no puede ser completamente descartado, resultaba necesario postular otros mecanismos para explicar el efecto del cóctel mitocondrial sobre la función de los canales CRAC como la liberación de algún factor o factores solubles capaces de difundir desde la mitocondria al citoplasma y eventualmente de modificar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Parekh, 2003; Glitsch y cols. 2002). Un candidato obvio a desempeñar este papel podría ser el ATP originado por mitocondrias periféricas ya que a su capacidad quelante de Ca^{2+} se añadiría el hecho de alcanzar concentraciones milimolares en la submembrana como ha sido demostrado en las células β pancreáticas, donde microdominios de ATP generados por el metabolismo de la glucosa son capaces de regular la actividad de los canales de K^+ sensibles a ATP de la membrana plasmática (Kennedy y cols., 1999).

Los resultados obtenidos con atractilósido y ácido bongrekico, dos inhibidores del transportador de nucleótidos de adenina de la mitocondria, confirman que el ATP liberado al citosol por la mitocondria, podría ser el responsable de la modulación de la actividad de los canales CRAC en los células T Jurkat. El ATP es un quelante de Ca^{2+} muy eficaz debido a su alta K_D ($2,3 \times 10^{-4}$ M) y al valor de su K_{on} ($5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), muy similar a la del BAPTA, (NIST Database; Naraghi y Neher, 1997), pudiendo también, por tanto, reducir la extensión del microdominio de Ca^{2+} y la inactivación dependiente de Ca^{2+} de I_{CRAC} . Estas propiedades determinan que el tamaño de los microdominios de Ca^{2+} estimados en presencia de 10 mM de ATP.2Na, añadido a la solución intracelular, sea incluso más reducido ($\lambda = 4,9 \text{ nm}$) que el generado cuando BAPTA es el quelante empleado.

La existencia de un factor difusible podría hacer pensar que la distancia a la que se encuentran las mitocondrias de la membrana plasmática pudiera no ser tan crítica, pero hay que recordar que en condiciones de altas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} en el citosol sólo habrá fluctuaciones de la concentración de Ca^{2+} en las zonas correspondientes a los microdominios. Además, no se puede olvidar la dependencia de Ca^{2+} del metabolismo mitocondrial y, por lo tanto, de la producción de ATP.

Estos resultados sugieren que en condiciones experimentales donde se potencia la función mitocondrial mediante la introducción en la célula de sustratos respiratorios, las mitocondrias situadas en la proximidad de la membrana plasmática son capaces de regular la actividad de los canales

CRAC mediante la liberación de ATP, siendo este mecanismo modulador predominante frente a la capacidad de la mitocondria para secuestrar Ca^{2+} .

La diálisis de las células con dos sales de ATP (ATP.Mg y ATP.2Na) con diferente afinidad por el Ca^{2+} sirvió para confirmar el mecanismo de acción del ATP. El ATP tiene una afinidad similar por los iones magnesio y calcio y muy superior a la que tiene por el ión sodio. Así, en presencia de EGTA y en ausencia del cóctel mitocondrial, altas concentraciones (10 mM) de ATP.2Na pero no de ATP.Mg, reducían significativamente la tasa de inactivación de I_{CRAC} , confirmando que el ATP es un eficaz quelante de Ca^{2+} .

Este aspecto fue confirmado mediante experimentos en células cuya función mitocondrial era anulada mediante el uso de antimicina y oligomicina y que eran dializadas con altas concentraciones de BAPTA o BAPTA + ATP.2Na. Los resultados de estos experimentos mostraron que no había diferencias significativas entre ambas condiciones experimentales (Figura 34), lo que sugería que el ATP debía actuar a través de un mecanismo similar al del BAPTA. Además, los efectos del ATP exógeno fueron dependientes de la concentración de ATP libre presente en el interior celular (Figura 35).

Los resultados representados en la figura 35 muestran que el aumento de la concentración de ATP.2Na en la solución intracelular y, por tanto, de la concentración de ATP libre en el citosol celular, reduce progresivamente el porcentaje de la inactivación lenta de I_{CRAC} . Por otra parte, los resultados mostrados en las figuras 33 y 35 indican que la extensión de la inactivación tras la inclusión de altas concentraciones de ATP.2Na (10 mM) en presencia de antimicina y oligomicina no difiere significativamente de la observada en su ausencia, lo que sugiere que el ATP podría ser el único factor mitocondrial implicado en la reducción de la inactivación de I_{CRAC} .

Por otra parte, resulta difícil explicar las diferencias observadas en el grado de inactivación lenta en presencia de 10 mM de ATP.Mg o de 2 mM de ATP.2Na debido a que la estimación de la concentración de ATP libre en ambas condiciones es similar (0,92 mM y 1,33 mM, respectivamente), sin embargo, estas diferencias podrían ser explicadas en el caso de existir una dependencia no lineal de la inactivación lenta de I_{CRAC} con la concentración de ATP libre, en otras palabras, la reducción de la inactivación por ATP puede ser un proceso todo o nada que ocurre por encima de un umbral de concentración de ATP libre de alrededor de 0,92 mM.

Como ya se ha mencionado los experimentos realizados con antimicina y oligomicina en presencia del cóctel mitocondrial confirmaban que el efecto del cóctel sobre la inactivación de I_{CRAC} era debido a la inhibición de la función mitocondrial. Hay que señalar que la oligomicina por sí sola inhibe la síntesis de ATP sin alterar el potencial de membrana mitocondrial (Duchen, 1992). Este efecto podría entonces provocar que las mitocondrias en presencia sólo de oligomicina fueran todavía capaces de captar Ca^{2+} pero no de sintetizar ATP. A este respecto, los experimentos realizados usando citometría de flujo con la

sonda JC-1 confirmaron que la adición de oligomicina en presencia del cóctel mitocondrial no producía cambios en el potencial de membrana mitocondrial, como ya había sido descrito en la literatura (Duchen, 1992). Asimismo, los experimentos realizados en células dializadas con EGTA y cóctel mitocondrial en presencia o ausencia de oligomicina mostraron que la oligomicina por sí sola es capaz de anular el efecto del cóctel, una primera prueba de que el ATP endógeno pudiera ser responsable de la reducción de la inactivación de I_{CRAC} .

Como experimento adicional, realizado para demostrar la participación del ATP endógeno en la regulación de la inactivación de I_{CRAC} , dializamos células con soluciones conteniendo 10 mM de EGTA, cóctel mitocondrial y concentraciones diversas de $MgCl_2$ (5, 10 ó 20 mM). Nuestra hipótesis era que el Mg^{2+} sería capaz de secuestrar el ATP libre procedente de mitocondrias energizadas y, en consecuencia, antagonizar de manera dependiente de la concentración de Mg^{2+} el efecto del cóctel mitocondrial. Los resultados mostraron, de acuerdo con nuestra hipótesis, que el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} aumenta con el incremento de la concentración de Mg^{2+} , el cual disminuía progresivamente la capacidad quelante de Ca^{2+} del ATP endógeno.

Es de destacar que la inactivación rápida y la inactivación lenta de I_{CRAC} parecen obedecer a mecanismos de señalización distintos. En experimentos previos habíamos observado que no había diferencias significativas en la inactivación rápida de I_{CRAC} en presencia de EGTA o de BAPTA, lo que indicaba que ese proceso no intervenía en las diferencias en la inactivación lenta observadas en presencia de esos dos quelantes y tampoco en la amplitud máxima de la corriente. Análogamente a lo observado con el BAPTA, no se observaron diferencias significativas en la inactivación rápida entre el grupo de células dializadas con ATP.2Na y el grupo control tratado con EGTA sólo. De esta manera, aportamos pruebas adicionales para demostrar que el proceso de inactivación lenta aquí estudiado no se encuentra contaminado por otros fenómenos de inactivación.

Por otro lado, ha sido recientemente descrito que, un metabolito intermediario como el piruvato, es capaz de reducir el grado de inactivación rápida de I_{CRAC} a concentraciones fisiológicas (alrededor de 1 mM) en células RBL-1 (Bakowski y Parekh, 2007). Este efecto del piruvato parece ser independiente del tamponamiento de Ca^{2+} citosólico y es probable que sea el reflejo de un efecto directo sobre el canal o que sea debido a la modificación de la eficacia con la que el Ca^{2+} media el fenómeno de inactivación rápida pero sin afectar directamente la función del canal CRAC (Parekh, 2008). Este hallazgo, junto con nuestras observaciones, relaciona la actividad metabólica celular con la función de los canales CRAC, por procesos que pueden ser independientes de la mitocondria como serían los mediados por piruvato o dependientes de la mitocondria como son los mediados por ATP.

Por otra parte, experimentos realizados por los mismos autores han confirmado nuestra hipótesis acerca de que el ATP carece de efecto sobre la

inactivación rápida de los canales dependientes de depósito (Bakowski y Parekh, 2007), poniendo de manifiesto que ambas formas de inactivación pueden estar reguladas de forma independiente.

6.- OTROS COMPONENTES CELULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE I_{CRAC}

6.1.- Papel de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática en la regulación de I_{CRAC}

Además de las mitocondrias, otros sistemas de transporte de Ca^{2+} podrían estar implicados en la regulación de la actividad de los canales CRAC. Este es el caso de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) cuya actividad puede estar regulada por los microdominios de Ca^{2+} generados por los canales CRAC, por lo que algunos autores han sugerido la existencia de una relación funcional bidireccional entre ambos sistemas de transporte de Ca^{2+} en linfocitos T (Bautista y Lewis, 2004). Además, el ATP generado por las mitocondrias podría actuar como fuente de energía para la PMCA.

El vanadato es un inhibidor no específico de ATPasas y fosfatasas (Swarup y cols., 1982; Di Salvo y cols., 1993; Nayler y Sparrow, 1983), que ha sido frecuentemente utilizado en estudios que requerían la inhibición de la actividad de la PMCA (Bond y Hudgins, 1980; Tiffert y Lew, 2001). Así, el posible papel de la PMCA sobre I_{CRAC} fue evaluado mediante el tratamiento con vanadato de células T Jurkat dializadas con altas concentraciones de EGTA y con el cóctel mitocondrial. No se observaron diferencias significativas ni en el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} ni en la amplitud máxima de la corriente en presencia o ausencia de vanadato (Figura 41), por lo que cabe concluir que la PMCA no parece jugar un papel predominante en el control de la actividad de los canales CRAC en células T Jurkat, al menos en nuestras condiciones experimentales con una alta capacidad quelante y la función mitocondrial potenciada por la presencia del cóctel en la solución intracelular.

También se ha propuesto la existencia de una relación funcional entre los canales CRAC y el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} de la membrana plasmática de los mastocitos (Aneiros y cols., 2005). Sin embargo, es bien sabido que la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ por el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) varía significativamente dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas, la ventana de tiempo analizada y el tipo celular en estudio. Dicha variabilidad en la relevancia funcional de este sistema de transporte de Ca^{2+} queda bien ilustrada en el hecho de que no contribuya a la reducción del Ca^{2+} intracelular en células T Jurkat (Bautista y cols., 2002). Sin embargo, hay que señalar que se han descrito diferencias en cuanto a la contribución del NCX en la señalización de Ca^{2+} entre células T humanas y células T Jurkat. Así, aunque la PMCA es el mecanismo dominante para la salida de Ca^{2+} al espacio extracelular en células T humanas y células T Jurkat, el NCX también participa en el transporte del Ca^{2+}

en células T humanas (Donnadieu y col, 1992; Balasubramanyam y cols., 1993; Donnadieu y Trautmann, 1993). En consecuencia, tanto nuestros resultados como los datos recogidos en la literatura apuntan a que ni la Ca^{2+} -ATPasa ni el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática participarían en la regulación de I_{CRAC} en las células T Jurkat.

6.2.- Modulación de I_{CRAC} por la proteína quinasa C

Además de los sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática y de distintos productos del metabolismo intermediario también existen otras moléculas capaces de modular la actividad de los canales CRAC. Este es el caso de la proteína quinasa C (PKC), cuyo papel regulador sobre los canales dependientes de depósito fue descrito hace años en células RBL-1 (Parekh y Penner, 1995) y en células T Jurkat (Dellis y cols., 2002). Por ese motivo, en este trabajo también hemos estudiado la participación de la PKC en la inactivación de I_{CRAC} en células T Jurkat. En nuestros experimentos, hemos utilizado el PMA, un activador de la PKC con estructura química muy similar a la del DAG (Kikkawa y cols., 1983; Parker y cols., 1984) y la estaurosporina, un alcaloide microbiano con efecto inhibitorio de la PKC (MacKintosh y MacKintosh, 1994), aunque dotado de escasa selectividad ya que puede actuar tanto sobre serina/treonina quinasas como sobre tirosina quinasas (Wilkinson y Hallam, 1994). Al objeto de aumentar la selectividad de la intervención farmacológica y en particular en lo que se refiere a la inhibición de las serina/treonina quinasas, también recurrimos a la bisindolilmaleimida, un compuesto que poseería una elevada potencia y selectividad para inhibir a la PKC (Toullec y cols., 1991).

Nuestros resultados confirman el papel de la PKC como molécula efectora de la inactivación lenta de I_{CRAC} , el cual podría estar directamente relacionado con la dependencia de Ca^{2+} , en base a la participación de las isoformas α y β de PKC, cuya actividad es dependiente de Ca^{2+} pero también de fosfatidilserina, DAG y/o esteres de forbol. Esta afirmación se ve reforzada por el hecho de que, tras la activación de células T, aumentan los niveles de $\text{PKC}\alpha$ y de $\text{PKC}\beta$ en la fracción insoluble a Tritón, la cual representa la fracción de membrana conteniendo componentes lipídicos y proteicos de las balsas lipídicas (Nixon y McPhail, 1999), indicando que estas isoformas de la PKC podrían estar implicadas en los complejos de señalización formados durante la formación de la SI.

Además, la entrada de Ca^{2+} a través de canales CRAC desencadena la translocación y estimulación de las isoformas α y β de la PKC, las cuales activan la cascada de ERKs (quinasas reguladas por señales extracelulares), un miembro de la familia de MAPKs que esta implicada en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Las ERKs, una vez activadas, generan ácido araquidónico. La entrada de Ca^{2+} a través de canales CRAC también estimula la translocación de lipooxigenasa a la membrana nuclear donde

metaboliza el ácido araquidónico para generar leucotrienos, moduladores de la respuesta inflamatoria (Parekh, 2007).

6.3.- Función de las balsas lipídicas en la regulación de I_{CRAC}

A tenor del contenido de las páginas precedentes, la regulación de la actividad de los canales CRAC en células T Jurkat sería un proceso complejo en el que intervendrían múltiples elementos presentes tanto en la membrana plasmática como en el citosol y que podrían organizarse en complejos de señalización con localizaciones precisas determinadas por procesos de reconocimiento intercelular como la SI. Un elemento estructural determinante en la formación de estos complejos serían las denominadas balsas lipídicas de la membrana, enriquecidas en colesterol y glicoesfingolípidos, que condicionan la presencia o exclusión de determinadas proteínas dando lugar a microdominios o zonas especializadas.

Se ha estudiado con bastante detalle el papel que podrían jugar las balsas lipídicas en la señal citosólica de Ca^{2+} del linfocito T tras su activación. Así, mediante la manipulación experimental de la composición lipídica de la membrana se ha propuesto que alteraciones en las balsas lipídicas se relacionan con una menor entrada de Ca^{2+} tanto en las células T Jurkat (Kabouridis y cols., 2000) como en los linfocitos T humanos (Tani-ichi y cols., 2005). En estos experimentos la extracción del colesterol de la membrana celular se asocia a una inhibición de la movilización de Ca^{2+} intracelular. Este hecho nos llevó a realizar experimentos para estudiar si esta observación se correlaciona con un efecto sobre el curso temporal de la corriente CRAC en células en las que se modificaba el contenido de colesterol de sus membranas. El hecho de que no se produjeran diferencias en el porcentaje de inactivación en células con menos contenido de colesterol podría deberse a las dificultades encontradas para obtener registros electrofisiológicos en esas células, tras el tratamiento al que eran sometidas, el cual dañaba apreciablemente la integridad de la membrana plasmática. Este hecho podría haber llevado a una selección de aquellas células cuyas membranas se encontraban alteradas en menor medida, en las cuales I_{CRAC} podría haberse visto menos afectada.

Nuestros resultados mostraron que no se producían diferencias en la amplitud de la inactivación tras la extracción de colesterol de las membranas. Por el contrario, el enriquecimiento de las membranas con colesterol provocó que la inactivación lenta de I_{CRAC} se viera incrementada.

Por lo tanto, la agregación de las balsas lipídicas, como consecuencia de la formación de la SI entre la célula T y la célula presentadora de antígeno, podría servir como soporte estructural para la formación de una zona altamente especializada capaz de desencadenar, de manera eficaz, la cascada de señalización que conduciría a la activación de la célula T.

Se ha postulado que la estimulación de células T Jurkat induce la agregación de balsas lipídicas que permiten la inclusión de determinadas proteínas como el TCR y Lck excluyendo a otras como CD45, generándose un ambiente en el que se favorece la señalización intracelular que pone en marcha la correcta respuesta inmune (Janes y cols., 1999). Asimismo, si bien la presencia en las balsas lipídicas de los canales CRAC (o más concretamente de ORA1) no ha sido confirmada directamente, existe la posibilidad de que, análogamente a lo observado con los canales Kv1.3, cuya presencia en las balsas lipídicas ha sido demostrada (Martens y cols., 2000; Hajdú y cols., 2003; Panyi y cols., 2003), pudiera ocurrir con los canales CRAC.

Esta hipótesis podría verse refrendada por el hecho de que moléculas como el ATP, proteínas como la PKC u organelas como las mitocondrias con capacidad para la regulación local de los canales CRAC, tal y como hemos presentado en este trabajo, podrían agregarse o colocalizarse durante el proceso de activación de los linfocitos T y participar en la regulación a nivel local de la señal de Ca^{2+} .

En resumen, nuestros resultados muestran que la modulación de los canales CRAC es llevada a cabo por una compleja maquinaria de señalización en la que participan orgánulos subcelulares, moléculas intracelulares y proteínas de membrana, pero, fundamentalmente, evidencian que el ATP producido por mitocondrias cercanas a la membrana plasmática constituye un nuevo mensajero que regula la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} de los canales CRAC en células T Jurkat. Este hallazgo perfecciona la idea actual de la existencia de una relación funcional entre los canales CRAC y las mitocondrias situadas en la periferia y supone la primera demostración de que un factor liberado por la mitocondria es capaz de modular la actividad de los canales CRAC.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos con los experimentos realizados y de la interpretación de los mismos, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Las características cinéticas de los quelantes de Ca^{2+} dializados en el interior de células T Jurkat, condicionan el porcentaje de inactivación lenta de I_{CRAC} sin afectar a su cinética de activación o de inactivación rápida.
2. La potenciación de la función mitocondrial reduce la inactivación lenta de I_{CRAC} , cuando la corriente es máximamente activada mediante la diálisis con IP_3 , tapsigargina y una alta concentración de EGTA.
3. La captación de Ca^{2+} a través del uniportador mitocondrial no provoca cambios significativos en la regulación de la actividad de los canales CRAC en presencia de una alta concentración de EGTA.
4. La liberación de ATP por mitocondrias funcionalmente activas y situadas en la proximidad de la membrana plasmática reduce el porcentaje de inactivación lenta de I_{CRAC} , probablemente como consecuencia de la disminución del tamaño de los microdominios de Ca^{2+} generados alrededor de los canales CRAC.
5. La Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática no parece estar implicada en la regulación local de la actividad de los canales CRAC en células T Jurkat, mientras que, la proteína quinasa C regula la inactivación lenta de I_{CRAC} .
7. La modificación de las balsas lipídicas de la membrana celular, podría contribuir a la regulación de la actividad de los canales CRAC.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuto O and Cantrell D. (2000) T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol*, 18: 165-184.
- Albert AP and Large WA. (2002) Activation of store-operated channels by noradrenaline via protein kinase C in rabbit portal vein myocytes. *J Physiol*, 544: 113-125.
- Alonso MT, Villalobos C, Chamero P, Álvarez J, García-Sancho J. (2006) Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium*, 40: 513-525.
- Álvarez J, Montero M and García-Sancho J. (1999) Subcellular Ca²⁺ Dynamics. *News Physiol Sci*, 14: 161-168.
- Aneiros E, Philipp S, Lis A, Freichel M and Cavalie A. (2005) Modulation of Ca²⁺ signaling by Na⁺/Ca²⁺ exchangers in mast cells. *J Immunol*, 174: 119-130.
- Annunziato L, Pignataro G and Di Renzo GF. (2004) Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev*, 56: 633-654.
- Bahnsen TD, Pandol SJ and Dionne VE. (1993) Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca²⁺ entry in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*, 268: 10808-10812.
- Bakowski D and Parekh AB. (2007) Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Curr Biol*, 17: 1076-1081.
- Bakowski D and Parekh AB. (2001) Sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum-Ca²⁺-ATPase-mediated Ca²⁺ reuptake, and not Ins(1,4,5)P₃ receptor inactivation, prevents the activation of macroscopic Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current in the presence of physiological Ca²⁺ buffer in rat basophilic leukaemia-1 cells. *Biochem J*. 353: 561-567.
- Balasubramanyam M and Gardner JP. (1995) Protein kinase C modulates cytosolic free calcium by stimulating calcium pump activity in Jurkat T cells. *Cell Calcium* 18: 526-541.
- Balasubramanyam M, Kimura M, Aviv A and Gardner JP. (1993) Kinetics of calcium transport across the lymphocyte plasma membrane. *Am J Physiol*, 265: C321-327.
- Bauer B, Krumböck N, Ghaffari-Tabrizi N, Kampfer S, Villunger A, Wilda M, Hameister H, Utermann G, Leitges M, Uberall F and Baier G. (2000) T cell expressed PKC θ demonstrates cell-type selective function. *Eur J Immunol*, 30: 3645-3654
- Bautista DM and Lewis RS. (2004) Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells. *J. Physiol*. 556: 805-817.
- Bautista DM, Hoth M and Lewis RS. (2002) Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *J Physiol*. 541: 877-894.
- Berg I, Potter BV, Mayr GW and Guse AH. (2000) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca²⁺-signaling. *J Cell Biol*, 150: 581-588.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V and Di Lisa F. (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*, 264: 687-701.
- Berridge MJ and Irvine RF. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(5992): 315-321. 1984.

- Berridge MJ. (1995) Capacitative calcium entry. *Biochem J*, 312: 1-11, 1995.
- Berridge MJ. (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, 499 (Pt 2): 291-306, 1997.
- Berridge MJ. (2006) Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium*, 40: 405-412.
- Berridge MJ. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361: 315-325.
- Bian X, Bird GS and Putney JW. (1996) cGMP is not required for capacitative Ca²⁺ entry in Jurkat T-lymphocytes. *Cell Calcium*, 19: 351-354.
- Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S and Bell GI. (1993) Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP₃R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem*, 268: 11356-11363.
- Bolotina VM and Csutora P. (2005) CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends Biochem Sci*, 30: 378-387.
- Bond GH and Hudgins PM. (1980) Inhibition of red cell Ca²⁺-ATPase by vanadate. *Biochim Biophys Acta*, 600: 781-790.
- Breitkreutz D, Braiman-Wiksmann L, Daum N, Denning MF and Tennenbaum T. (2007) Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133: 793-808.
- Breitmayer JP, Bernard A and Aussel C. (1994) Regulation by sphingomyelinase and sphingosine of Ca²⁺ signals elicited by CD3 monoclonal antibody, thapsigargin, or ionomycin in the Jurkat T cell line. *J Biol Chem*, 269(7): 5054-5058, 1994.
- Broad LM, Armstrong DL and Putney JW Jr. (1999) Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in Ca²⁺ feedback inhibition of calcium release-activated calcium current (I_{CRAC}) *J Biol Chem*, 274: 32881-32888.
- Brown DA and London E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 275: 17221-17224.
- Brown DA and London E. (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun*, 240: 1-7.
- Brown DA and Rose JK. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68: 533-544.
- Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA and Tedder TF. (1993) Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol*, 121: 1121-1132.
- Bunnell SC, Diehn M, Yaffe MB, Findell PR, Cantley LC and Berg LJ. (2000) Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *J Biol Chem*, 275: 2219-2230.
- Burack WR, Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML and Shaw AS. (2002) Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol*, 169: 2837-2841.

- Cahalan MD, Wulff H and Chandy KG. (2001) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol*, 21: 235-252.
- Camello P, Gardner J, Petersen OH and Tepikin AV. (1996) Calcium dependence of calcium extrusion and calcium uptake in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol*, 490: 585-593.
- Chan AC, Desai DM and Weiss A. (1994) The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol*, 12: 555-592.
- Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA and Cahalan MD. (2004) K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 280-289.
- Cheng KT, Liu X, Ong HL and Ambudkar IS. (2008) Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1/STIM1 channels. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.C800008200 (en prensa).
- Cho JH, Balasubramanyam M, Chernaya G, Gardner JP, Aviv A, Reeves JP, Dargis PG and Christian EP. (1997) Oligomycin inhibits store-operated channels by a mechanism independent of its effects on mitochondrial ATP. *Biochem J*, 324: 971-980.
- Cianferoni A, Massaad M, Feske S, de la Fuente MA, Gallego L, Ramesh N and Geha RS. (2005) Defective nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells and extracellular signal-regulated kinase underlies deficient IL-2 gene expression in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 116: 1364-1371.
- Clapham DE. (2003) TRP channels as cellular sensors *Nature*, 426: 517-524.
- Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD. (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J*, 21: 1616-1627.
- Crompton M and Heid I. (1978) The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur J Biochem*, 91: 599-608.
- Crompton M, Moser R, Lüdi H and Carafoli E. (1978) The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur J Biochem*, 82: 25-31.
- Csordás G, Thomas AP and Hajnóczky G. (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J*, 18: 96-108.
- Csutora P, Peter K, Kilic H, Park KM, Zarayskiy V, Gwozdz T and Bolotina VM. (2008) Novel role of STIM1 as a trigger for calcium influx factor (C1F) production. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.M709575200 (en prensa).
- Dadsetan S, Zakharova L, Molinski TF and Fomina AF. (2008) Store-operated Ca²⁺ influx causes Ca²⁺ release from the intracellular Ca²⁺ channels that is required for T cell activation. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.M709330200(en prensa).
- Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH and Jones KM. (1989) Data for Biochemical Research (Third Edition). *Oxford science publications*, pp. 414.
- Dedkova EN and Blatter LA. (2002) Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry and enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*, 539: 77-91.
- Delles C, Haller T and Dietl P. (1995) A highly calcium-selective cation current activated by intracellular calcium release in MDCK cells. *J Physiol*, 486: 557-569.

- Dellis O, Gangloff SC, Paulais M, Tondelier D, Rona JP, Brouillard F, Bouteau F, Guenounou M and Teulon J. (2002) Inhibition of the calcium release-activated calcium (CRAC) current in Jurkat T cells by the HIV-1 envelope protein gp160. *J Biol Chem*, 277: 6044-6050.
- Denton RM and McCormack JG. (1990) Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu Rev Physiol*, 52: 451-466.
- Desai R, Peretz A, Idelson H, Lazarovici P and Attali B. (2000) Ca^{2+} -activated K^+ channels in human leukemic Jurkat T cells. Molecular cloning, biochemical and functional characterization. *J Biol Chem*, 275: 39954-39963.
- Deutsch C and Chen LQ. (1993) Heterologous expression of specific K^+ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10036-10040.
- Di Salvo J, Semenchuk LA and Lauer J. (1993) Vanadate-induced contraction of smooth muscle and enhanced protein tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys*, 304: 386-391.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC and Healy JI. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature*, 386: 855-858.
- Donnadieu E and Trautmann A. (1993) *Pflugers Arch*. Is there a Na^+/Ca^{2+} exchanger in macrophages and in lymphocytes? 424: 448-455.
- Donnadieu E, Bismuth G and Trautmann A. (1992) Calcium fluxes in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 267: 25864-25872.
- Drevot P, Langlet C, Guo XJ, Bernard AM, Colard O, Chauvin JP, Lasserre R and He HT. (2002) TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J*, 21: 1899-1908.
- Duchen MR. (1992) Ca^{2+} -dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J*, 283: 41-50.
- Edidin M. (2001) Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol*, 11: 492-496.
- Ehring GR, Kerschbaum HH, Fanger CM, Eder C, Rauer H and Cahalan MD. (2000) Vanadate induces calcium signaling, Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activation, and gene expression in T lymphocytes and RBL-2H3 mast cells via thiol oxidation. *J Immunol*, 164: 679-687.
- Facchetti F, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ, De vos R and Desmet VJ. (1988) Plasmacytoid T cells: a cell population normally present in the reactive lymph node. An immunohistochemical and electronmicroscopic study. *Hum Pathol*, 19: 1085-1092.
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD and Aiyar J. (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, $IKCa1$. *J Biol Chem*, 274: 5746-5754.
- Fanger CM, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Rauer H, Wulff H, Rosa JC, Ganellin CR, Chandy KG and Cahalan MD. (2001) Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem*, 276: 12249-12256.

Fasolato C, Hoth M and Penner R. (1993) A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J Biol Chem*, 268: 20737–20740.

Ferris CD, Haganir RL, Bredt DS, Cameron AM and Snyder SH. (1991) Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 2232-2235.

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M and Rao A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441: 179-185.

Feske S, Prakriya M, Rao A and Lewis RS. (2005) A severe defect in CRAC Ca^{2+} channel activation and altered K^{+} channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med*, 202: 651-662.

Feske S. (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*, 7: 690-702.

Fierro L and Parekh AB. (2000) Substantial depletion of the intracellular Ca^{2+} stores is required for macroscopic activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol*, 522: 247-257.

Fleischer S and Inui M. (1989) Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 18: 333-364.

Franzius D, Hoth M and Penner R. (1994) Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. *Pflugers Arch*, 428: 433-438.

Gallione A. (1992) Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and its modulation by cyclic ADP-ribose. *Trends Pharmacol Sci*, 13: 304-306.

García AG, García-De-Diego AM, Gandía L, Borges R and García-Sancho J. (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, 86: 1093-1131

Genot EM, Parker PJ and Cantrell DA. (1995) Analysis of the role of protein kinase C- α , - ϵ , and - ζ in T cell activation. *J Biol Chem*, 270: 9833-9839.

Gidwani A, Holowka D and Baird B. (2001) Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. *Biochemistry*, 40: 12422-12429.

Gilibert JA and Parekh AB. (2000) Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca^{2+} current I_{CRAC} . *EMBO J*, 19: 6401–6407.

Gilibert JA, Bakowski D and Parekh AB. (2001) Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *EMBO J*, 20: 2672–2679.

Gilon P, Obie JF, Bian X, Bird GS and Putney JW Jr. (1995) Role of cyclic GMP in the control of capacitative Ca^{2+} entry in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J*, 311: 649-656.

Giorgi C, Romagnoli A, Pinton P, Rizzuto R. (2008) Ca^{2+} signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med*, 8:119-130.

Glitsch MD, Bakowski D and Parekh AB. (2002) Store-operated Ca^{2+} entry depends on mitochondrial Ca^{2+} uptake. *EMBO J*, 21: 6744-6754.

- Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ and Yuan JX. (2001) Upregulated TRP and enhanced capacitance Ca^{2+} entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H746-755.
- Grafton G and Thwaite L. (2001) Calcium channels in lymphocytes. *Immunology*, 104: 119-126.
- Gri G, Molon B, Manes S, Pozzan T and Viola A. (2004) The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol Lett*, 94: 247-252.
- Grissmer S, Lewis RS and Cahalan MD. (1992) Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human leukemic T cells. *J Gen Physiol*, 99: 63-84.
- Grissmer S, Nguyen AN and Cahalan MD. (1993) Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*, 102: 601-630.
- Gruber T, Fresser F, Jenny M, Uberall F, Leitges M and Baier G. (2008) PKC θ cooperates with atypical PKC ζ and PKC ι in NF- κ B transactivation of T lymphocytes. *Mol Immunol*, 45: 117-126.
- Gunter TE and Pfeiffer DR. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Cell Physiol*, 258: 755-786.
- Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R and Gunter K. (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*, 28: 285-296.
- Gunter TE, Buntinas L, Sparagna GC and Gunter KK. (1998) The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. *Biochim Biophys Acta*, 1366: 5-15.
- Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS and Gavin CE. (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol*, 267: C313-339.
- Gunter TE, Yule DY, Gunter KK, Eliseev RA and Salter JD. (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, 567: 96-102.
- Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heder P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV and Mayr GW. (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*, 398: 70-73.
- Guse AH. (1998) Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *Crit Rev Immunol*, 18: 419-448.
- Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG and Rao A. (2007) Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem*, 282: 16232-16243.
- Hajdú P, Varga Z, Pieri C, Panyi G and Gáspár R. (2003) Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflugers Arch*, 445: 674-682.
- Hajnóczky G, Csordás G, Das S, García-Pérez C, Saotome M, Sinha Roy S and Yi M. (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 40: 553-560.
- Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB and Thomas AP. (1995) Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 82: 415-424.

- Halestrap AP and Davidson AM. (1990) Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J*, 268: 153-160.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391: 85-100.
- Harder T, Rentero C, Zech T and Gaus K. (2007) Plasma membrane segregation during T cell activation: probing the order of domains. *Curr Opin Immunol*, 19: 470-475.
- Hardie RC and Minke B. (1993) Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci*, 16: 371-376.
- Hardie RC and Minke B. (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 8: 643-651.
- Harnick DJ, Jayaraman T, Ma Y, Mulieri P, Go LO and Marks AR. (1995) The human type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes. Structure, localization, and tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 270: 2833-2840.
- Harper JL, Camerini-Otero CS, Li AH, Kim SA, Jacobson KA and Daly JW. (2003) Dihydropyridines as inhibitors of capacitative calcium entry in leukemic HL-60 cells. *Biochem Pharmacol*, 65: 329-338.
- Hermosura MC, Monteilh-Zoller MK, Scharenberg AM, Penner R and Fleig A. (2002) Dissociation of the store-operated calcium current *I_{CRAC}* and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current *MagNum*. *J Physiol*, 539: 445-458.
- Hermosura MC, Takeuchi H, Fleig A, Riley AM, Potter BV, Hirata M and Penner R. (2000) InsP₄ facilitates store-operated calcium influx by inhibition of InsP₃ 5-phosphatase. *Nature*, 408: 735-740.
- Hernández-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuño A, Villarroja M, García AG and Gandia L. (2001) Calcium-dependent inhibition of L, N and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci*, 21: 2553-2560.
- Hilgemann DW, Nicoll DA and Philipson KD. (1991) Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature*, 352: 715-718.
- Hofer A, Fasolato C and Pozzan T. (1998) Capacitative Ca²⁺ entry is closely linked to the filling state of internal Ca²⁺ stores: a study using simultaneous measurements of *I_{CRAC}* and intraluminal [Ca²⁺]. *J Cell Biol*, 140: 325-334.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J and Rao A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 17: 2205-2232.
- Hosoi E, Nishizaki C, Gallagher KL, Wyre HW, Matsuo Y and Sei Y. (2001) Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J Immunol*, 167: 4887-4894.
- Hoth M and Penner R. (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol*, 465: 359-386.

- Hoth M and Penner R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355: 353-356.
- Hoth M, Button D and Lewis RS. (2000) Mitochondrial control of calcium channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 10607-10612.
- Hoth M, Fanger CM and Lewis RS. (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol*, 137: 633-648.
- Hsu Sf, O'Connell PJ, Klyachko VA, Badminton MN, Thomson AW, Jackson MB, Clapham DE and Ahern GP. (2001) Fundamental Ca^{2+} signaling mechanisms in mouse dendritic cells: CRAC is the major Ca^{2+} entry pathway. *J Immunol*, 166: 6126-6133.
- Hu L, Pennington M, Jiang Q, Whartenby KA and Calabresi PA. (2007) Characterization of the Functional Properties of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 in Human CD4+ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 179: 4563-4570.
- Hug H and Sarre TF. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J*, 291: 329-343.
- Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM and Giorgi JV. (1993) CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry*, 14: 196-204.
- Iino M. (1990) Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol*, 95: 1103-1122.
- Irvine RF. (1990) 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett*, 263: 5-9.
- Iwai M, Michikawa T, Bosanac I, Ikura M and Mikoshiba K. (2007) Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem*, 282: 12755-12764.
- Iwai M, Tateishi Y, Hattori M, Mizutani A, Nakamura T, Futatsugi A, Inoue T, Furuichi T, Michikawa T and Mikoshiba K. (2005) Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *J Biol Chem*, 280: 10305-10317.
- Janes PW, Ley SC and Magee AI. (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol*, 147: 447-461.
- Janes PW, Ley SC, Magee AI and Kabouridis PS. (2000) The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol*, 12: 23-34.
- Jayaraman T, Ondriasová E, Ondrias K, Harnick DJ and Marks AR. (1995) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6007-6011.
- Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P and Lechleiter JD. (1995) Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*, 377: 438-441.

- Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA and Rizzuto R. (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 13807-13812.
- Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL and Ley SC. (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 30: 954-963.
- Kabouridis PS, Magee AI and Ley SC. (1997) S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J*, 16: 4983-4998.
- Kaznatcheyeva E, Zubov A, Nikolaev A, Alexeenko V, Bezprozvanny I and Mozhayeva GN. (2000) Plasma membrane calcium channels in human carcinoma A431 cells are functionally coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate complexes. *J Biol Chem*, 275: 4561-4564.
- Kennedy H J, Pouli AE, Ainscow EK, Jouaville LS, Rizzuto R and Rutter GA. (1999) Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem*, 274: 13281-13291.
- Kerschbaum HH and Cahalan MD. (1999) Single-channel recording of a store-operated Ca²⁺ channel in Jurkat T lymphocytes. *Science*, 283: 836-839.
- Khan AA, Steiner JP, Klein MG, Schneider MF and Snyder SH. (1992) IP₃ receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science*, 257: 815-818.
- Kikkawa U, Takai Y, Tanaka Y, Miyake R and Nishizuka Y. (1983) Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 258: 11442-5.
- Kirichok Y, Krapivinsky G and Clapham DE. (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427: 360-364.
- Komalavilas P and Lincoln TM. (1994) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 269: 8701-8707.
- Kourie JI and Wood HB. (2000) Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 73: 91-134.
- Krause E, Pfeiffer F, Schmid A and Schulz I. (1996) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*, 271: 32523-32528.
- Krawczyk C, Bachmaier K, Sasaki T, Jones RG, Snapper SB, Bouchard D, Koziarzki I, Ohashi PS, Alt FW and Penninger JM. (2000) Cbl-b is a negative regulator of receptor clustering and raft aggregation in T cells. *Immunity*, 13: 463-473.
- Kubista H, Hawkins TE, Patel DR, Haigler HT and Moss SE. (1999) Annexin 5 mediates a peroxide-induced Ca²⁺ influx in B cells. *Curr Biol*. 9: 1403-1406.
- Landolfi B, Curci S, Debellis L, Pozzan T and Hofer AM. (1998) Ca²⁺ homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured in situ in intact cells. *J Cell Biol*, 142: 1235-1243.

- Lawrie AM, Rizzuto R, Pozzan T and Simpson AW. (1996) A role for calcium influx in the regulation of mitochondrial calcium in endothelial cells. *J Biol Chem*, 271: 10753-10759.
- Leonard RJ, García ML, Slaughter RS and Reuben JP. (1992) Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10094-10098.
- Lewis RS. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 19: 497-521.
- Lewis RS. (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*, 446: 284-287.
- Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G and Tsien RY. (1998) Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature*, 392: 936-941
- Litjens T, Harland ML, Roberts ML, Barritt GJ and Rychkov GY. (2004) Fast Ca²⁺-dependent inactivation of the store-operated Ca²⁺ current (I_{SO}) in liver cells: a role for calmodulin. *J Physiol*, 558: 85-97.
- Lin X, Várnai P, Csordás G, Balla A, Nagai T, Miyawaki A, Balla T and Hajnóczky G. (2005) Control of calcium signal propagation to the mitochondria by inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins. *J Biol Chem*, 280: 12820-12832.
- Liou J, Fivaz M, Inoue T and Meyer T. (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(22): 9301-9306, 2007.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr and Meyer T. (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, 15(13): 1235-1241, 2005.
- Lioudyno MI, Kozak JA, Penna A, Safrina O, Zhang SL, Sen D, Roos J, Stauderman KA and Cahalan MD. (2008) Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 2011-2016.
- Liu SK, Fang N, Koretzky GA and McGlade CJ. (1999) The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol*, 9(2): 67-75, 1999.
- Lückhoff A and Clapham DE. (1994) Calcium channels activated by depletion of internal calcium stores in A431 cells. *Biophys J*, 67: 177-182.
- Luik RM and Lewis RS. (2007) New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca²⁺ signaling in T cells. *Trends Mol Med*, 13: 103-107.
- Luo D, Broad LM, Bird GS and Putney JW. (2001) Mutual antagonism of calcium entry by capacitative and arachidonic acid-mediated calcium entry pathways. *J Biol Chem*, 276: 20186-20189.
- Ma R, Pluznick J, Kudlacek P and Sansom SC. (2001) Protein kinase C activates store-operated Ca²⁺ channels in human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*, 276: 25759-25765.
- MacKintosh C and MacKintosh RW. (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem Sci*, 19: 444-448.

- Maechler P and Wollheim CB. (1999) Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature*, 402: 685-689.
- Malli R, Frieden M, Osibow K and Graier WF. (2003a) Mitochondria efficiently buffer subplasmalemmal Ca^{2+} elevation during agonist stimulation. *J Biol Chem*, 278: 10807-10815.
- Malli R, Frieden M, Osibow K, Zoratti C, Mayer M, Demaurex N and Graier WF. (2003b) Sustained Ca^{2+} transfer across mitochondria is essential for mitochondrial Ca^{2+} buffering, store-operated Ca^{2+} entry, and Ca^{2+} store refilling. *J Biol Chem*, 278: 44769-44779.
- Manji SS, Parker NJ, Williams RT, van Stekelenburg L, Pearson RB, Dziadek M and Smith PJ. (2000) STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta*, 1481: 147-155.
- Mañes S and Viola A. (2006) Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Mol Membr Biol*, 23: 59-69.
- Martens JR, Navarro-Polanco R, Coppock EA, Nishiyama A, Parshley L, Grobaski TD and Tamkun MM. (2000) Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J Biol Chem*, 275: 7443-7446.
- Martens JR, O'Connell K and Tamkun M. (2004) Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 16-21.
- Matlib MA, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, Phillips R, Altschuld R, Katsube Y, Sperelakis N and Bers DM. (1998) Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca^{2+} uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 273: 10223-10231.
- Meiri KF. (2005) Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360: 1663-1672.
- Meldolesi J and Pozzan T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*. 23: 10-4.
- Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS and Putney JW Jr. (2006) Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orail or Orail2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem*, 281: 24979-24990.
- Mészáros LG, Bak J and Chu A. (1993) Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Nature*, 364: 76-79.
- Mikoshiha K. (2007) IP_3 receptor/ Ca^{2+} channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem*, 102: 1426-1446.
- Mochly-Rosen D, Smith BL, Chen CH, Disatnik MH and Ron D. (1995) Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: a role in beta protein kinase C mediated signal transduction. *Biochem Soc Trans*, 23: 596-600.
- Moneer Z, Dyer JL and Taylor CW. (2003) Nitric oxide co-ordinates the activities of the capacitative and non-capacitative Ca^{2+} -entry pathways regulated by vasopressin. *Biochem J*, 370: 439-448.
- Montalvo GB, Artalejo AR and Gilibert JA. (2006) ATP from subplasmalemmal mitochondria controls Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *J Biol Chem*, 281: 35616-35623.

- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J and Álvarez J. (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*, 2: 57-61.
- Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M and He HT. (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J*, 17: 5334-5348.
- Moreau B, Straube S, Fisher RJ and Putney JW Jr, Parekh AB. (2005) Ca^{2+} -calmodulin-dependent facilitation and Ca^{2+} inactivation of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels. *J Biol Chem*, 280: 8776-8783.
- Muallem S, Pandol SJ and Beeker TG. (1989) Hormone-evoked calcium release from intracellular stores is a quantal process. *J Biol Chem*, 264: 205-212.
- Muallem S. (2007) Calcium signaling: pyruvate and CRAC meet at the crossroads. *Curr Biol*, 17: R549-551.
- Myung PS, Boerthe NJ and Koretzky GA. (2000) Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol*, 12: 256-266.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM and Fleig A. (2001) LTRPC7 is a MgATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 411: 590-595.
- Naraghi M and Neher E. (1997) Linearized buffered Ca^{2+} diffusion in microdomains and its implications for calculation of $[\text{Ca}^{2+}]$ at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci*, 17: 6961-6973.
- Nayler RA and Sparrow MP. (1983) Mechanism of vanadate-induced contraction of airways smooth muscle of the guinea-pig. *Br J Pharmacol*, 80: 163-172.
- Neco P, Rossetto O, Gil A, Montecucco C and Gutiérrez LM. (2003) Taipoxin induces F-actin fragmentation and enhances release of catecholamines in bovine chromaffin cells. *J Neurochem*, 85: 329-337.
- Neher E and Sakmann B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260: 799-802.
- Neher, E. (1986) Concentration profiles of intracellular calcium in the presence of a diffusible chelator. In Heinemann, U., Klee, M., Neher, E. and Singer, W. (eds.), *Calcium Electrogenesis and Neuronal Functioning*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 80-96.
- Nichols B. (2005) Cell biology: without a raft. *Nature*, 436: 638-639.
- NIST Database of stability constants of metal complexes. Standard reference database 46, National Institute of Standards and Technology, USA.
- Nixon JB and McPhail LC. (1999) Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase. *J Immunol*, 163: 4574-4582.

- Nolz JC, Gomez TS, Zhu P, Li S, Medeiros RB, Shimizu Y, Burkhardt JK, Freedman BD and Billadeau DD. (2006) The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol*, 16: 24-34.
- Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, Chung W, Prakriya M, Feske S and Rao A. (2008) Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol*, 9: 432-443.
- Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY and Remington SJ. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273: 1392-1395.
- Ortenblad N and Stephenson DG. (2003) A novel signalling pathway originating in mitochondria modulates rat skeletal muscle membrane excitability. *J Physiol*, 548: 139-145.
- Palmero M, Gutierrez LM, Hidalgo MJ, Reig JA, Ballesta JJ and Viniegra S. (1995) The low-affinity dihydropyridine receptor and Na⁺/Ca²⁺ exchanger are associated in adrenal medullary mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 50: 879-883.
- Panyi G, Bagdány M, Bodnár A, Vámosi G, Szentesi G, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R and Damjanovich S. (2003) Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 2592-2597.
- Panyi G, Vámosi G, Bacsó Z, Bagdány M, Bodnár A, Varga Z, Gáspár R, Mátyus L and Damjanovich S. (2004a) Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1285-1290.
- Panyi G, Varga Z and Gaspar R. (2004b) Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett*. 92: 55-66.
- Parekh AB and Penner R. (1995) Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7907-7911.
- Parekh AB and Penner R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*, 77: 901-930.
- Parekh AB and Putney JW Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 85: 757-810.
- Parekh AB, Terlau H and Stühmer W. (1993) Depletion of InsP₃ stores activates a Ca²⁺ and K⁺ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature*, 364: 814-818.
- Parekh AB. (2007) Functional consequences of activating store-operated CRAC channels. *Cell Calcium*, 42: 111-121.
- Parekh AB. (2003) Mitochondrial regulation of intracellular Ca²⁺ signaling: more than just simple Ca²⁺ buffers. *News Physiol Sci*, 18: 252-256.
- Parekh AB. (2008) Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium*. doi: 10.1016/j.ceca.2007.12.006 (en prensa).
- Park MK, Ashby MC, Erdemli G, Petersen OH and Tepikin AV. (2001) Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *Embo J*, 20: 1863-1874.

- Parker PJ, Stabel S and Waterfield MD. (1984) Purification to homogeneity of protein kinase C from bovine brain--identity with the phorbol ester receptor. *EMBO J*, 3: 953-959.
- Parsey MV and Lewis GK. (1993) Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T cells. *J Immunol*, 151: 1881-1893.
- Partiseti M, Korn H and Choquet D. (1993) Pattern of potassium channel expression in proliferating B lymphocytes depends upon the mode of activation. *J Immunol*, 151: 2462-2470.
- Partiseti M, Le Deist F, Hivroz C, Fischer A, Korn H and Choquet D. (1994) The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem*, 269: 32327-32335.
- Patel S, Churchill GC and Galione A. (2001) Coordination of Ca²⁺ signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci*, 26: 482-489
- Patterson RL, Van Rossum DL and Gill DL. (1999) Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell*, 98: 487-499.
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R and Kinet JP. (2006) Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol*, 8: 771-773.
- Penniston JT and Enyedi A. (1998) Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Membr Biol*, 165: 101-109.
- Pizzo P and Pozzan T. (2007) Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol*, 17: 511-517.
- Pottosin II, Valencia-Cruz G, Bonales-Alatorre E, Shabala SN and Dobrovinskaya OR. (2007) Methyl-beta-cyclodextrin reversibly alters the gating of lipid rafts-associated Kv1.3 channels in Jurkat T lymphocytes. *Pflugers Arch*, 454: 235-244.
- Prakriya M and Lewis RS. (2003) CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium*, 33: 311-321.
- Prakriya M and Lewis RS. (2001) Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethyl-diphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. *J Physiol*, 536: 3-19.
- Prakriya M and Lewis RS. (2002) Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol*, 119: 487-507.
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A and Hogan PG. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443: 230-233.
- Premack BA and Gardner P. (1992) Signal transduction by T-cell receptors: mobilization of Ca²⁺ and regulation of Ca²⁺-dependent effector molecules. *Am J Physiol*, 263: C1119-1140.
- Price M, Lee SC and Deutsch C. (1989) Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 10171-10175.
- Putney JW Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7: 1-12.

- Putney JW, Jr. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-624.
- Quest AF. (1996) Regulation of protein kinase C: a tale of lipids and proteins. *Enzyme Protein*, 49: 231-261.
- Quintana A, Schwarz EC, Schwindling C, Lipp P, Kaestner L and Hoth M. (2006) Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 281: 40302-40309.
- Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC and Hoth M. (2007) T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 14418-14423.
- Ramsey IS, Delling M and Clapham DE. (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68: 619-647.
- Randriamampita C and Tsien RY. (1993) Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature*, 364: 809-814.
- Resh MD. (1994) Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell*, 76: 411-413.
- Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M and Pozzan T. (1994) Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells. *J Cell Biol*, 126: 1183-1194.
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M and Pozzan T. (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262: 744-747.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuff RA and Pozzan T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*, 280: 1763-1766.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G and Stauderman KA. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol*, 169: 435-445.
- Rychkov G, Brereton HM, Harland ML and Barritt GJ. (2001) Plasma membrane Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels with a high selectivity for Ca^{2+} identified by patch-clamp recording in rat liver cells. *Hepatology*, 33: 938-947.
- Sadra A, Cinek T and Imboden JB. (2004) Translocation of CD28 to lipid rafts and costimulation of IL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 11422-11427.
- Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C and Cossarizza A. (1997) JC-1, but not DiOC₆(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, 411: 77-82.
- Sánchez JA, García MC, Sharma VK, Young KC, Matlib MA and Sheu SS. (2001) Mitochondria regulate inactivation of L-type Ca^{2+} channels in rat heart. *J Physiol*, 536: 387-396.
- Schneider U, Schwenk HU and Bornkamm G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19: 621-626.

- Schwarz EC, Kummerow C, Wenning AS, Wagner K, Sappok A, Waggershauser K, Griesemer D, Strauss B, Wolfs MJ, Quintana A and Hoth M. (2007) Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol*, 37: 2723-2733.
- Schwarzmann N, Kunerth S, Weber K, Mayr GW and Guse AH. (2002) Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca^{2+} signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem*, 277: 50636-50642.
- Simon HU, Mills GB, Hashimoto S and Siminovitch KA. (1992) Evidence for defective transmembrane signaling in B cells from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Clin Invest*, 90:1396-1405.
- Simons K and Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-572.
- Simons K and Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 31-39.
- Singer SJ and Nicolson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.
- Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES and Bolotina VM. (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol*, 6: 113-120.
- Smart EJ, Ying YS, Mineo C and Anderson RG. (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10104-10108.
- Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He LP, Xu W, Johnstone LS, Dziadek MA and Gill DL. (2006a) STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca^{2+} entry. *Curr Biol*, 16: 1465-1470
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W and Gill DL. (2006b) Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem*, 281(30): 20661-20665, 2006.
- Somasundaram B, Norman JC and Mahaut-Smith MP. (1995) Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochem J*, 309: 725-729.
- Sorrentino V and Volpe P. (1993) Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol Sci*, 14: 98-103.
- Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS and Gunter TE. (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem*, 270: 27510-27515.
- Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA and Gill DL. (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 4040-4045.
- Steinmann C, Landsverk ML, Barral JM and Boehning D. (2008) Requirement Of IP_3R for tumor-mediated lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.C800029200 (en prensa).
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E and Reynolds IJ. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci*, 1: 366-373.
- Su Z, Guo X, Barker DS, Shoemaker RL, Marchase RB and Blalock JE. (2005) A store-operated nonselective cation channel in human lymphocytes. *Cell Mol Neurobiol*, 25: 625-647.

- Su Z, Csutora P, Hunton D, Shoemaker RL, Marchase RB and Blalock JE. (2001) A store-operated nonselective cation channel in lymphocytes is activated directly by Ca^{2+} influx factor and diacylglycerol. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1284-1292.
- Südhof TC, Newton CL, Archer BT 3rd, Ushkaryov YA and Mignery GA. (1991) Structure of a novel InsP_3 receptor. *EMBO J*, 10: 3199-3206.
- Sugiyama T, Yamamoto-Hino M, Miyawaki A, Furuichi T, Mikoshiba K and Hasegawa M. (1994) Subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in human hematopoietic cell lines: dynamic aspects of their cell-type specific expression. *FEBS Lett*, 349: 191-196.
- Supattapone S, Danoff SK, Theibert A, Joseph SK, Steiner J and Snyder SH. (1988) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 8747-8750.
- Swarup G, Cohen S and Garbers DL. (1982) Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem Biophys Res Commun*, 107: 1104-1109.
- Takasawa S, Nata K, Yonekura H and Okamoto H. (1993) Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells. *Science*, 259: 370-373.
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O and Putney JW Jr. (1989) Activation of calcium entry by the tumour thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 264: 12266-12271.
- Tani-ichi S, Maruyama K, Kondo N, Nagafuku M, Kabayama K, Inokuchi J, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Yagita H, Kawano S and Kosugi A. (2005) Structure and function of lipid rafts in human activated T cells. *Int Immunol*, 17: 749-758.
- Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S and Viola A. (2006) CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol*, 8: 1270-1276.
- Taylor CW and Traynor D. (1995) Calcium and inositol trisphosphate receptors. *J Membr Biol*, 145: 109-118.
- Thomas S, Preda-Pais A, Casares S and Brumeanu TD. (2004) Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol*, 41: 399-409.
- Tiffert T and Lew VL. (2001) Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells. *Cell Calcium*, 30: 337-342.
- Törnquist K, Malm AM, Pasternack M, Kronqvist R, Björklund S, Tuominen R and Slotte JP. (1999) Tumor necrosis factor-alpha, sphingomyelinase, and ceramide inhibit store-operated calcium entry in thyroid FRTL-5 cells. *J Biol Chem*, 274: 9370-9377.
- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D and Kirilovsky J. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*, 266: 15771-15781.
- Trepakova ES, Cohen RA and Bolotina VM. (1999) Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. *Circ Res*, 84: 201-209.

- Trepakova ES, Gericke M, Hirakawa Y, Weisbrod RM, Cohen RA and Bolotina VM. (2001) Properties of a native cation channel activated by Ca^{2+} store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 276: 7782-7790.
- Vaca L and Kunze DL. (1994) Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a Ca^{2+} -selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol*, 267: C920-925.
- Valdeolmillos M, O'Neill SC, Smith GL and Eisner DA. (1989) Calcium-induced calcium release activates contraction in intact cardiac cells. *Pflugers Arch*, 413: 676-678.
- Valitutti S, Dessing M, Aktories K, Gallati H and Lanzavecchia A. (1995) Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med*, 181: 577-584.
- Varadi A, Cirulli V and Rutter GA. (2004) Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca^{2+} entry in HeLa cells. *Cell Calcium*, 36: 499-508.
- Varma R and Mayor S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, 394: 798-801.
- Venkatachalam K and Montell C. (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76: 387-417.
- Verheugen JA, Vijverberg HP, Oortgiesen M and Cahalan MD. (1995) Voltage-gated and Ca^{2+} -activated K^+ channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential, and intracellular calcium. *J Gen Phys*, 105: 765-794.
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R and Kinet JP. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science*, 312: 1220-1223.
- Villalba M, Martínez-Serrano A, Gómez-Puertas P, Blanco P, Börner C, Villa A, Casado M, Giménez C, Pereira R, Bogonez E, Pozzan T and Satrústegui J. (1994) The Role of Pyruvate in Neuronal Calcium Homeostasis. Effects on intracellular calcium pools. *J Biol Chem*, 269: 2468-2476.
- Villalobos C, Nuñez L, Montero M, García AG, Alonso MT, Chamero P, Álvarez J and García-Sancho J. (2002) Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J*, 16: 343-353.
- Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y and Lanzavecchia A. (1999) T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*, 283: 680-682.
- Vitale ML, Rodríguez Del Castillo A, Tchakarov L and Trifaró JM. (1991) Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J Cell Biol*, 113: 1057-1067.
- Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Penner R and Nilius B. (2001) CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem*, 276: 47767-47770.
- Wang GL, Qian Y, Qiu QY, Lan XJ, He H and Guan YY. (2006) Interaction between Cl^- channels and CRAC-related Ca^{2+} signaling during T lymphocyte activation and proliferation. *Acta Pharmacol Sin*, 27: 437-446.

Weaver AK, Olsen ML, McFerrin MB and Sontheimer H. (2007) BK channels are linked to inositol 1,4,5-triphosphate receptors via lipid rafts: a novel mechanism for coupling $[Ca^{2+}]_i$ to ion channel activation. *J Biol Chem*, 282: 31558-31568.

Weiss A, Imboden J, Shoback D and Stobo J. (1984) Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 4169-4173.

Wilkinson SE and Hallam TJ. (1994) Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation overstated? *Trends Pharmacol Sci*. 15: 53-57.

Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ and Dziadek MA. (2001) Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J*, 357: 673-685.

Wülfing C and Chien YH and Davis MM. (1999) Visualizing lymphocyte recognition. *Immunol Cell Biol*, 77: 186-187.

Wülfing C and Davis MM. (1998) A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science*, 282: 2266-2269.

Yablonski D, Kadlecsek T and Weiss A. (2001) Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol Cell Biol*, 21: 4208-4218.

Yamashita M, Navarro-Borelly L, McNally BA and Prakriya M. (2007) Orai1 mutations alter ion permeation and Ca^{2+} -dependent fast inactivation of CRAC channels: evidence for coupling of permeation and gating. *J Gen Physiol*, 130: 525-540.

Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O and Cahalan MD. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 443: 226-229.

Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA and Cahalan MD. (2005) STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature*, 437: 902-905.

Zhang W, Tribble RP and Samelson LE. (1998) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, 9: 239-246.

Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A and Hoth M. (2004) Potent inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem*, 279: 12427-12437.

Zweifach A and Lewis RS. (1993) Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 6295-6299.

Zweifach A and Lewis RS. (1995a) Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{CRAC}) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol*, 105: 209-226.

Zweifach A and Lewis RS. (1995b) Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 270: 14445-14451.

Zylińska L and Soszyński M. (2000) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim Pol*, 47: 529-539.

ANEXO

ATP from Subplasmalemmal Mitochondria Controls Ca^{2+} -dependent Inactivation of CRAC Channels*

Received for publication, April 12, 2006, and in revised form, September 6, 2006. Published, JBC Papers in Press, September 18, 2006, DOI 10.1074/jbc.M603518200

Gema B. Montalvo¹, Antonio R. Artalejo, and Juan A. Gilibert²

From the Department of Toxicology and Pharmacology, Instituto de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid, Spain

A sustained Ca^{2+} entry is the primary signal for T lymphocyte activation after antigen recognition. This Ca^{2+} entry mainly occurs through store-operated Ca^{2+} channels responsible for a highly selective Ca^{2+} current known as I_{CRAC} . Ca^{2+} ions act as negative feedback regulators of I_{CRAC} , promoting its inactivation. Mitochondria, which act as intracellular Ca^{2+} buffers, have been proposed to control all stages of CRAC current and, hence, intracellular Ca^{2+} signaling in several types of non-excitabile cells. Using the whole-cell configuration of the patch clamp technique, which allows control of the intracellular environment, we report here that respiring mitochondria located close to CRAC channels can regulate slow Ca^{2+} -dependent inactivation of I_{CRAC} by increasing the Ca^{2+} -buffering capacity beneath the plasma membrane, mainly through the release of ATP.

A sustained elevation of cytosolic free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$)³ is the first cellular signal for T lymphocyte activation. This process starts with the specific recognition of an antigen by T cell receptors and the subsequent generation of diacylglycerol and 1,4,5-inositol trisphosphate (InsP_3). In terms of Ca^{2+} signaling, InsP_3 produces a biphasic response, due to a brief initial release of Ca^{2+} from InsP_3 -sensitive stores and a sustained Ca^{2+} entry through plasma membrane channels activated by the emptying of those stores. This latter phenomenon originally termed capacitative Ca^{2+} entry occurs through store-operated Ca^{2+} channels responsible for a highly selective Ca^{2+} current known as I_{CRAC} (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current) (1). At present, I_{CRAC} has been found in multiple cell types including T cells where it serves as the principal Ca^{2+} entry pathway (2, 3).

Interestingly, Ca^{2+} ions themselves modulate the time course of I_{CRAC} by several mechanisms: a fast inactivation process occurring in milliseconds (4) and a slower inactivation process operating in the range of seconds, which comprises

both a store-dependent component due to the refilling of stores and a Ca^{2+} -dependent but store-independent component (5).

Hence, any organelle and transport systems that regulate $[\text{Ca}^{2+}]_c$ could, in principle, also modulate CRAC channel activity. In this context, the regulatory actions of mitochondria on Ca^{2+} entry were first proposed by Lewis and coworkers in the late 1990s (6). These authors proved that Jurkat T cell mitochondria were able to reduce Ca^{2+} -mediated inhibition of store-operated CRAC channels by sequestering Ca^{2+} ions entering through those channels (6, 7). Since then, these results have been extended to other cell types where mitochondria located close to the plasma membrane have been involved in such a Ca^{2+} -buffering effect (8). However, recent evidence supports the idea that mitochondria may also regulate I_{CRAC} by some mechanism distinct from direct buffering of Ca^{2+} , such as the release of one or more factors (e.g. glutamate or ATP) (8–11), although there is no direct evidence yet.

CRAC current is generally measured in the presence of strong intracellular Ca^{2+} buffers (EGTA or BAPTA at mM concentrations) in order to decrease both store refilling and the other components of Ca^{2+} -dependent inactivation of the channels. Under these conditions, a supramaximal concentration of InsP_3 activates I_{CRAC} to its maximal extent. However, in the presence of weak intracellular Ca^{2+} buffering (0.1 mM EGTA or BAPTA), InsP_3 is largely ineffective for activating I_{CRAC} despite releasing Ca^{2+} from the stores. Only when store refilling is prevented by using inhibitors of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pump (e.g. thapsigargin) (12) or mitochondria are metabolically potentiated with a mixture or cocktail containing respiratory substrates, I_{CRAC} can be measured in cells dialyzed with low concentration of Ca^{2+} buffers (13). On the other hand, in the presence of a high concentration of a Ca^{2+} buffer, InsP_3 , and thapsigargin, global $[\text{Ca}^{2+}]_c$ changes are not expected to occur and Ca^{2+} regulatory actions would be restricted to zones in the proximity of sustained sources of Ca^{2+} ions, like the CRAC channels.

Our working hypothesis is that mitochondria may act as a complex Ca^{2+} -buffering system. The influx of Ca^{2+} ions into the mitochondrial matrix is dependent on the electrochemical gradient for Ca^{2+} , which is maintained by the aerobic respiration. In turn, three rate-limiting dehydrogenases (pyruvate, NAD^+ -isocitrate, and 2-oxoglutarate) of the tricarboxylic acid cycle are stimulated by the increase in mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$, so that in the presence of metabolic substrates an enhanced production of ATP takes place (14). ATP produced through oxidative phosphorylation may then serve not only to fuel ATP-de-

* This work was supported by DGCYT Grants BFI-2002-01101 (to J. A. G.) and BFU-2005-06034 (to A. R. A.), CAM Grant GR/SAL/0522/2004 (to J. A. G.), and UCM-CAM Grant PR45/05-14162 (to J. A. G.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ FPI predoctoral fellow from the Spanish Education and Science Ministry.

² Researcher of the Ramón y Cajal Programme. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-394-4036; Fax: 34-91-394-3851; E-mail: jagilabe@vet.ucm.es.

³ The abbreviations used are: $[\text{Ca}^{2+}]_c$, cytosolic free Ca^{2+} ; InsP_3 , 1,4,5-inositol trisphosphate; CRAC, Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} ; A/O, antimycin plus oligomycin; RR, ruthenium red; Atr, atractyloside; BA, bongkrekic acid; PMCA, plasma membrane Ca^{2+} -ATPase; BAPTA, 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid.

pendent processes but also as an effective Ca^{2+} buffer once transferred to the cytosol.

In this study we have evaluated the ability of Ca^{2+} microdomains generated beneath the plasma membrane by Ca^{2+} influx through CRAC channels to modulate I_{CRAC} in Jurkat T cells. We have also investigated the involvement of subplasmalemmal mitochondria in the regulation of such Ca^{2+} microdomains and, therefore, of I_{CRAC} characteristics. Our results indicate that energized mitochondria regulate slow Ca^{2+} -dependent inactivation of I_{CRAC} by increasing subplasmalemmal Ca^{2+} -buffering capacity mainly through a localized ATP production.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Human leukemic Jurkat T cells were cultured in RPMI 1640 culture medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES, and penicillin-streptomycin (100 units/ml and 0.1 mg/ml, respectively) in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. The glucose content of the culture medium was 11.1 mM.

Electrophysiology— I_{CRAC} was measured using the whole-cell configuration of the patch clamp technique at room temperature. Wax-coated and fire-polished borosilicate Kimax-51[®] glass pipettes had DC resistances of 2.5–3.5 M Ω when filled with a standard internal solution containing (mM): 145 Cs-glutamate, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 2 Mg-ATP, 0.03 InsP₃, 0.002 thapsigargin, and 10 HEPES, pH 7.2/CsOH. The Ca^{2+} chelators EGTA or BAPTA were included in the recording pipette at 10 mM each so that free ATP concentrations (calculated using the MaxChelator WEBMAXC Standard program, available at www.stanford.edu/~cpatton) were 0.23 and 0.22 mM, respectively at pH 7.2, 20 °C, 0.16 N ionic strength and 3 mM total Mg²⁺. The supplement of mitochondrial metabolites referred to as mitochondrial mixture contained (mM): 2 pyruvic acid, 2 malic acid, and 1 NaH₂PO₄. The extracellular solution contained (mM) 145 NaCl, 2.8 KCl, 10 CaCl₂, 10 CsCl, 2 MgCl₂, 10 D-glucose and 10 HEPES, pH 7.4/NaOH.

I_{CRAC} was measured during voltage ramps applied every 2 s. Currents were amplified and filtered with an EPC-9 patch clamp amplifier (HEKA Elektronik). A correction of +10 mV was applied to compensate for the liquid junction potential. Cell membrane capacitance was automatically canceled before each ramp. Series resistance values were usually <10 M Ω and were not compensated for. The first or second current responses to ramps were taken as a measure of leak current and subtracted from all subsequent traces. A cell was considered as an inactivating one when I_{CRAC} amplitude decayed by >10% at steady state (5 min after breaking-in) with respect to its maximum.

Flow Cytometry Analysis—Jurkat T cells ($2.5\text{--}5 \times 10^5$ cells/ml) were washed in fresh culture medium before being resuspended in the presence or absence of mitochondrial mixture and incubated for 15 min at 37 °C. The cells were treated with antimycin plus oligomycin (A/O; both at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 25 min at 37 °C. Cells were subsequently washed and incubated with 1 μM rhodamine 123 for 15 min at 37 °C before being analyzed with a FACSort[™] flow cytometer.

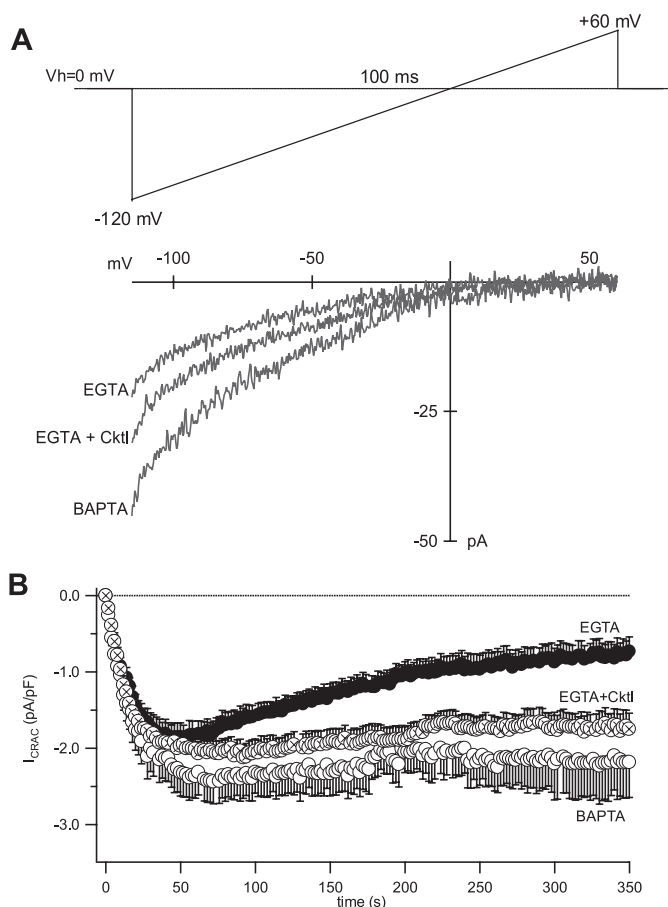


FIGURE 1. I_{CRAC} recordings from Jurkat T cells dialyzed with high concentrations of two different exogenous Ca^{2+} buffers (EGTA or BAPTA). **A**, I-V relations obtained by applying voltage ramps as depicted in the top panel in three cells dialyzed with InsP₃ (30 μM) and thapsigargin (2 μM) and EGTA, BAPTA (both at 10 mM), or EGTA + mitochondrial mixture (EGTA + CktI) when current reached its maximum. **B**, time course of I_{CRAC} . Averaged current responses to voltage ramps applied every 2 s and measured at -80 mV in cells dialyzed with EGTA ($n = 12$), BAPTA ($n = 17$), or EGTA + mitochondrial mixture (EGTA + CktI) ($n = 16$). The current traces were normalized by the respective cell capacitance and plotted against time.

For JC-1 labeling, Jurkat T cells (5×10^5 cells/ml) were washed in fresh culture medium before being resuspended and incubated in a solution containing mitochondrial mixture in the presence or absence of oligomycin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 25 min at 37 °C. The cells were treated with 2 μM JC-1 for 25 min at 37 °C and washed with phosphate-buffered saline just before the analysis in a FACSort[™] flow cytometer.

Statistical Analysis—Data are presented as mean \pm S.E. The statistical differences between means were assessed by unpaired or paired Student's *t* tests using GraphPad Prism[®] v. 4.00 software. *ns*, not significant; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

RESULTS

Effects of High Concentrations of Two Different Ca^{2+} Chelators on I_{CRAC} —The normal procedure to maximally activate I_{CRAC} is to provoke the depletion of InsP₃-sensitive Ca^{2+} stores at the endoplasmic reticulum. To achieve this, a supramaximal concentration (30 μM) of InsP₃ and thapsigargin (2 μM) was included in the internal solution. Furthermore, we decided to add high concentrations (10 mM) of two different Ca^{2+} buffers

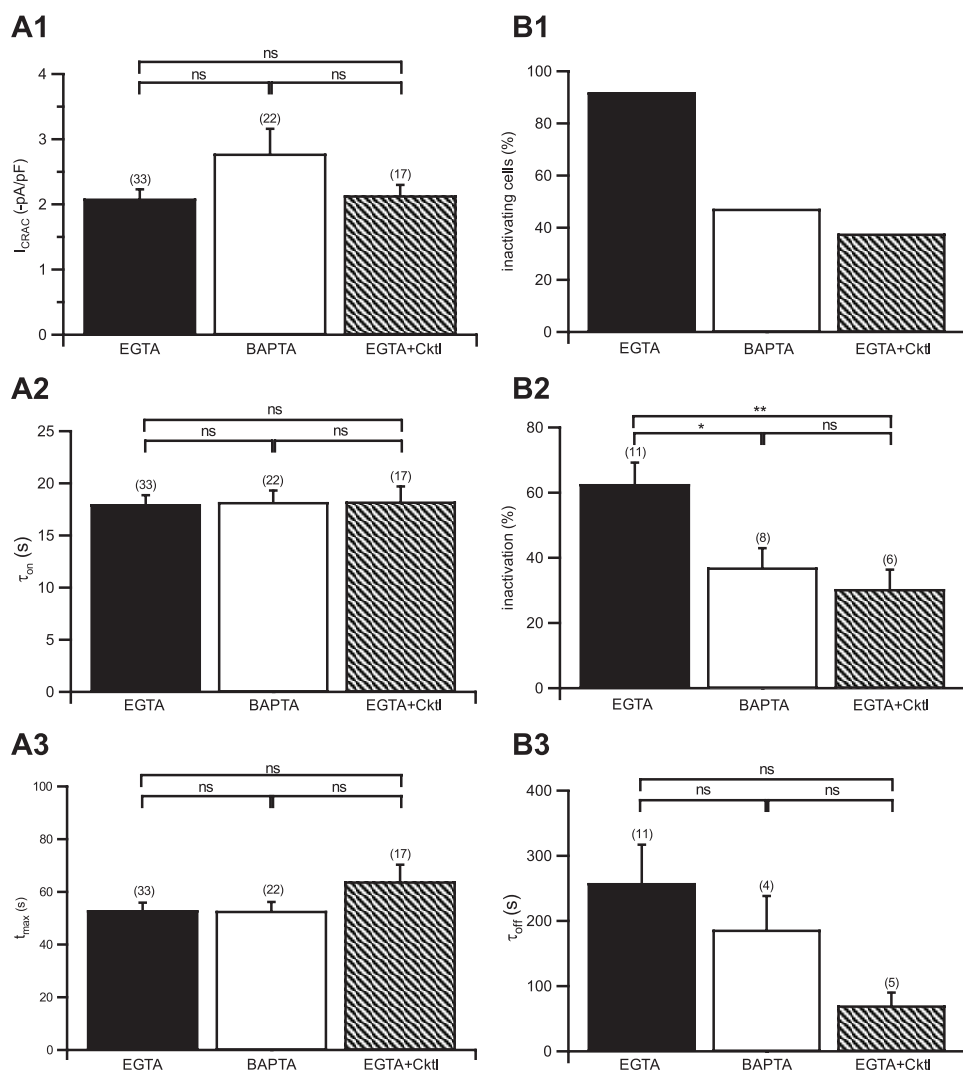


FIGURE 2. Kinetic analysis of I_{CRAC} in the presence of EGTA, BAPTA, or EGTA + mitochondrial mixture (CkII). The activation and inactivation characteristics of I_{CRAC} were analyzed by estimating several kinetic parameters. Thus, the time constant of activation (τ_{on}) was obtained by fitting a single exponential function to the I_{CRAC} time course from the start of the current to its peak when the current reached its maximum (t_{max}). The time constant of inactivation (τ_{off}) was similarly obtained by fitting a single exponential function from t_{max} to the first point where a steady state level of current was reached. *A panels*, activation-related parameters: current amplitude (A1), time constant for activation (τ_{on}) (A2), and time to peak (t_{max}) (A3). *B panels*, analysis of inactivation: percentage of inactivating cells (B1), extent of inactivation (B2), and time constant for inactivation (τ_{off}) (B3) in the inactivating cells.

(EGTA or BAPTA) to this solution in an attempt to replace the buffering effect of mitochondria. EGTA and BAPTA have similar affinity for Ca^{2+} ($K_D = 1.8 \times 10^{-7}$ and 2.2×10^{-7} M, respectively) but differ in the kinetics of Ca^{2+} binding in two orders of magnitude ($k_{on} = 2.5 \times 10^6$ and 4×10^8 M $^{-1}$ s $^{-1}$, respectively).

In the presence of either EGTA or BAPTA, I_{CRAC} exhibited its characteristic features when probed with a voltage ramp: an inwardly rectifying current-voltage relation with a positive reversal potential and a voltage-independent gating (Fig. 1A). The time course of I_{CRAC} during long-term recordings was obtained from a series of voltage ramps (see "Experimental Procedures"). Fig. 1B shows average values of I_{CRAC} at -80 mV from cells dialyzed with EGTA ($n = 12$) or BAPTA ($n = 17$).

Fig. 2 shows several parameters derived from the analysis of individual time courses. In the presence of either EGTA

or BAPTA, no differences were observed in the amplitude or the activation kinetic parameters analyzed (time constant of activation, τ_{on} , and time to peak, t_{max}) (Fig. 2, panels A1–A3), making it unlikely that rapid changes in $[Ca^{2+}]_c$ play a significant role in this process. On the contrary, marked differences were seen regarding I_{CRAC} inactivation. First, the percentage of inactivating cells (45%; 8/17) was largely reduced in BAPTA as compared with that in EGTA (95%; 11/12) (Fig. 2, panel B1). Second, BAPTA also reduced the extent of inactivation ($36.85 \pm 6.12\%$) compared with EGTA ($62.45 \pm 6.75\%$) (Fig. 2, panel B2). On the contrary, no statistically significant differences were observed between EGTA and BAPTA data regarding the time constant of inactivation in the inactivating cells (τ_{off} ; see Fig. 2, panel B3).

The present results suggest that the spatio-temporal profile of Ca^{2+} near CRAC channels determines both the amplitude and extent of the slow inactivation of I_{CRAC} .

Effects of Supported Mitochondrial Function on I_{CRAC} —The mitochondria can be maintained in an energized metabolic state during whole-cell recordings by supplementing the internal solution with a mixture containing two respiratory substrates, pyruvate and malate, and NaH_2PO_4 (13, 15–17). Under these conditions and the presence of intracellular EGTA, the current-voltage profile and the amplitude as well as the activation kinetic parameters of I_{CRAC} were similar to those observed in the presence of EGTA alone (Fig. 1 and Fig. 2, panels A1–A3). However, the percentage of inactivating cells and the extent of their inactivation were significantly reduced compared with EGTA alone, exhibiting similar values to those obtained with BAPTA (Fig. 2, panels B1–B3).

These results suggest that mitochondria act to reduce the inactivation of I_{CRAC} by a mechanism similar to that employed by BAPTA. Furthermore, adding the mitochondrial mixture to a solution containing BAPTA resulted in 100% non-inactivating cells whose amplitude of current did not differ from that observed with BAPTA alone (data not shown).

Modulatory Effects of Mixture on I_{CRAC} Occurs at the Mitochondrial Level—We set out to prove the participation of mitochondria in the regulation of I_{CRAC} using inhibitory drugs of mitochondrial respiration. For this purpose, cells were treated

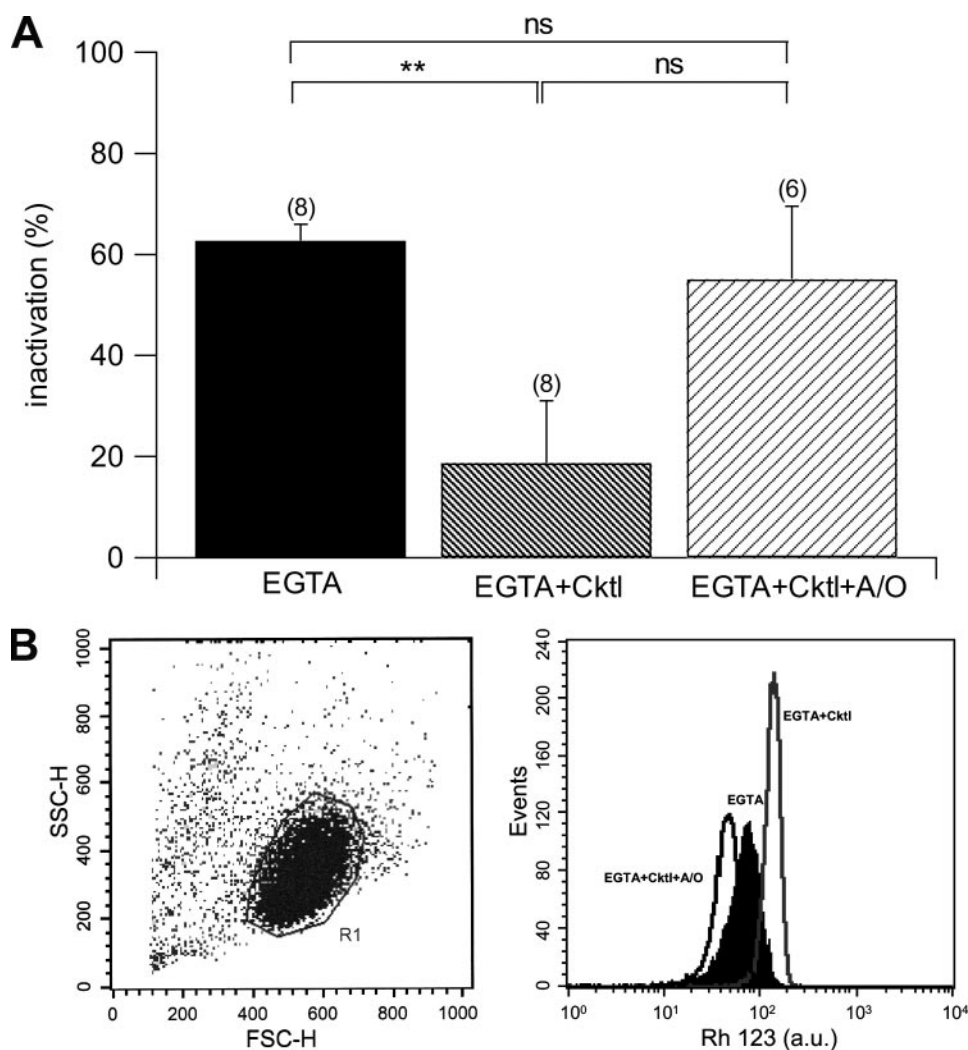


FIGURE 3. The modulatory effects of mixture on I_{CRAC} occur at the mitochondrial level. *A*, percentage of inactivation of I_{CRAC} in cells dialyzed with EGTA, EGTA + mitochondrial mixture (*Cktl*), or EGTA + *Cktl* + antimycin (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and oligomycin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (*A/O*); cells were also incubated in the *A/O* mixture during 25 min before the recording. All the experiments were carried out in the same batch of cells. *B*, effect of mitochondrial mixture and *A/O* mixture on mitochondrial function determined by flow cytometry in cells loaded with rhodamine 123. *Left*, size-complexity dot plot showing the selected region (*R1*) of viable cells where the analysis of fluorescence was performed; *right*, distribution of fluorescence in cells bathed in extracellular solution (*EGTA*) and extracellular solution supplemented with mitochondrial mixture (*EGTA+Cktl*) or mitochondrial mixture plus *A/O* mixture (*EGTA+Cktl+A/O*). The fluorescent signal corresponding to 10,000 cells was analyzed.

with antimycin A (*A*) (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$), an inhibitor of the complex III respiratory chain in combination with oligomycin (*O*) (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), an inhibitor of F_1F_0 -ATP synthase. The use of both drugs ultimately causes the collapse of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and loss of mitochondrial function.

As was expected, the effects of the mitochondrial mixture on I_{CRAC} inactivation were abolished in cells treated with *A/O*. Thus, in paired experiments, both the extent of slow inactivation of I_{CRAC} (Fig. 3*A*) and the percentage of inactivating cells (83.33%; 5/6) increased to values similar to those obtained in cells dialyzed with EGTA alone (100%; 8/8). On the contrary, no significant differences were observed in cells dialyzed with BAPTA+*A/O* compared with those with BAPTA alone with regard to I_{CRAC} inactivation (data not shown). These results confirm the ability of functional mitochondria to regulate Ca^{2+} -

dependent processes occurring at the submembrane level, such as I_{CRAC} inactivation.

The ability of pyruvate and malate to keep mitochondria in an energized state was also directly evaluated by using flow cytometry techniques in cells incubated with rhodamine 123. Rhodamine 123 is a potentiometric dye that crosses the plasma membrane easily and emits fluorescence after accumulating into mitochondria with a negative $\Delta\Psi_m$. As it is shown in Fig. 3*B*, the fluorescent signal associated to homogeneous and viable populations of Jurkat T cells increased when the cells were bathed in a solution containing the mitochondrial mixture, whereas it decreased when the cells were incubated with the mixture but in the presence of mitochondrial inhibitors (*A/O*).

ATP Released from Mitochondria Regulates I_{CRAC} Inactivation—The mitochondrial ability to regulate $[\text{Ca}^{2+}]_c$ can be due to either Ca^{2+} uptake, to Ca^{2+} buffering by ATP produced by respiring mitochondria or to both processes. To clarify this point, the hexavalent cation ruthenium red (*RR*) (100 μM), an inhibitor of the mitochondrial uniporter, was added to the pipette's solution containing mixture also. *RR* caused a small increment in the extent of inactivation although it was not statistically significant (Fig. 4*A*). However, intracellular application of atractyloside (*Atr*) (20 μM), a potent inhibitor of the mitochondrial adenine nucleotide translocase that exports ATP from mitochondria

to cytosol, canceled out the effects of the mixture on I_{CRAC} inactivation (Fig. 4*A*). No significant changes were observed when atractyloside and *RR* were applied together compared with those obtained with atractyloside alone.

RR is a widely used inhibitor of the uniporter although it targets other membrane proteins (e.g. BK channels, ryanodine receptor, etc.). For this reason, we sought to reproduce the former results by using *RU360*, a more selective and potent blocker of the mitochondrial uniporter (18). *RU360* (1 μM) did not affect the extent of inactivation of I_{CRAC} in cells dialyzed with an internal solution containing the mitochondrial mixture (Fig. 4*B*). On the other hand, besides its translocase function, mitochondrial adenine nucleotide translocase is a constituent of the inner membrane multimeric channel known as the mitochondrial permeability tran-

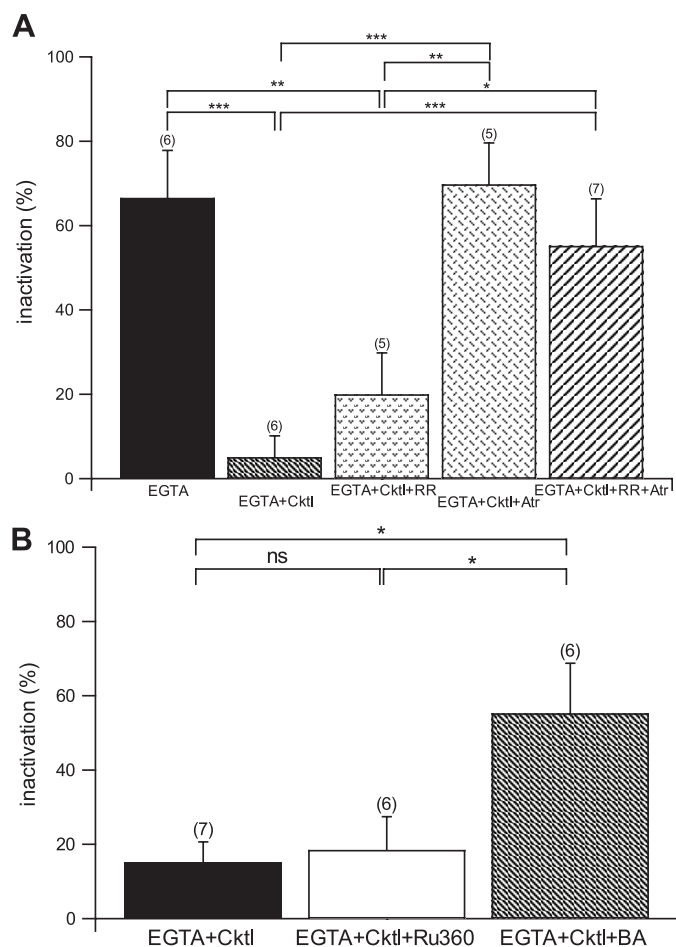


FIGURE 4. Slow inactivation of I_{CRAC} is modulated by ATP released from mitochondria. *A*, percentage of inactivation in cells dialyzed with EGTA, EGTA + mitochondrial mixture (EGTA+Cktl), EGTA + Cktl + 100 μ M ruthenium red (RR) (EGTA+Cktl+RR), EGTA + Cktl + 20 μ M atractyloside (EGTA+Cktl+Atr), or EGTA + Cktl + 20 μ M atractyloside + 100 μ M ruthenium red (EGTA+Cktl+Atr+RR). *B*, percentage of inactivation in cells dialyzed with EGTA + mitochondrial mixture (EGTA+Cktl), EGTA + Cktl + 1 μ M RU360 (EGTA+Cktl+Ru360), EGTA + Cktl + 10 μ M bongkreikic acid (EGTA+Cktl+BA).

sition pore. Interestingly, mitochondrial adenine nucleotide translocase can be inhibited by atractyloside and bongkreikic acid (BA) acting through opposite mechanisms; whereas Atr prevents binding of adenine nucleotides to carrier sites, BA prevents their dissociation from mitochondrial adenine nucleotide translocase. Moreover, in contrast to BA, Atr has been reported to open the mitochondrial permeability transition pore (19), which could potentially cause a massive Ca^{2+} release and, hence, inactivation of I_{CRAC} .

Despite these differences between the two drugs, their effects on I_{CRAC} inactivation were coincident, thus supporting a common action on the translocase function (Fig. 4B). Altogether, the results obtained with the different inhibitors of mitochondrial transporters (RR, RU360, Atr, and BA) suggest a predominant role of ATP export over the mitochondrial Ca^{2+} uptake to regulate Ca^{2+} -dependent inactivation of I_{CRAC} under our experimental conditions.

To further support this suggestion we decided to explore the effects of oligomycin on I_{CRAC} inactivation. As has already been mentioned, oligomycin acts to halt ATP production, an effect that is not readily associated to an inhibi-

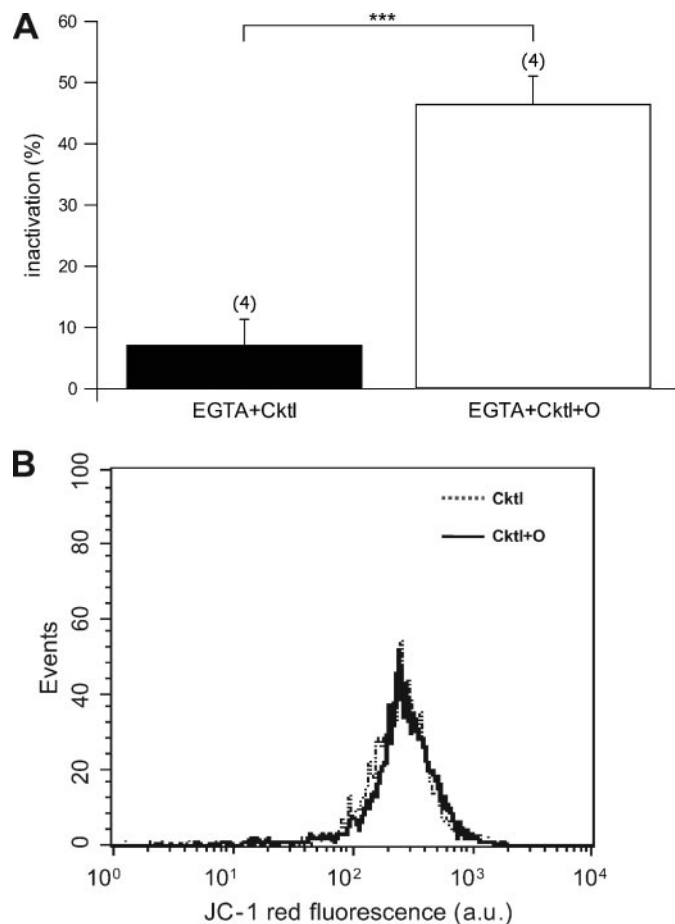


FIGURE 5. Oligomycin cancels cocktail effect without changes in mitochondrial membrane potential. *A*, percentage of inactivation of I_{CRAC} in cells dialyzed with EGTA + mitochondrial mixture (Cktl) or EGTA + Cktl + oligomycin (0.5 μ g/ml, equivalent to 0.6 μ M) (O); cells were also incubated in oligomycin during 30 min before the analysis. All the experiments were carried out in the same batch of cells. *B*, fluorescence intensities from cells loaded with the potentiometric probe JC-1 analyzed by flow cytometry incubated in the presence of mitochondrial mixture (Cktl) or Cktl + oligomycin. The fluorescent signal corresponding to 10,000 cells was analyzed.

tion of Ca^{2+} uptake or even a change in $\Delta\Psi_m$ (20). In accordance with the proposed role of mitochondrial ATP, the mixture of respiratory substrates was unable to reduce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC in cells exposed to oligomycin (5 μ g/ml) (Fig. 5A). However, $\Delta\Psi_m$ was not affected by the presence of oligomycin in Jurkat T cells stained with the cationic dye JC-1, a more specific and reliable mitochondrial *versus* plasma membrane potential probe than rhodamine 123 or DiOC₆ (21) (Fig. 5B).

To get direct evidence involving ATP in the regulation of I_{CRAC} , intracellular solutions containing high concentrations (10 mM) of ATP as disodium (ATP·2Na) or magnesium (ATP·Mg) salts were dialyzed in two groups of cells. The difference between these two salts lies in their affinity for Ca^{2+} ions, ATP·2Na being a more effective Ca^{2+} chelator than ATP·Mg. As is shown in Fig. 6A, the rate of inactivation of I_{CRAC} was significantly reduced when 10 mM ATP·2Na ([ATP] free = 9.05 mM) was included in the pipette's solution instead of ATP·Mg ([ATP] free = 0.92 mM). This result indicates that ATP·2Na can regulate the slow inactivation of

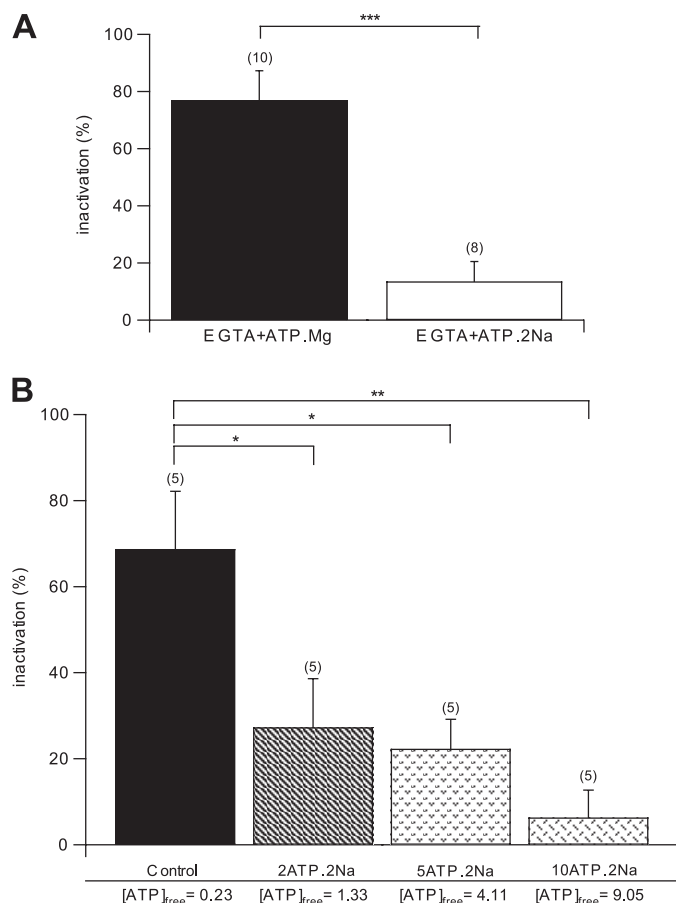


FIGURE 6. Effect of two different ATP salts on the extent of I_{CRAC} inactivation. A, 10 mM ATP-Mg or ATP-2Na were added to the standard intracellular solution containing 10 mM EGTA and the pH corrected to 7.2/CsOH. Free ATP concentrations were 0.92 mM (for ATP-Mg) and 9.05 mM (for ATP-2Na). B, relationship between the free ATP concentrations and percentage of inactivation over a range of ATP-2Na concentrations. The cells were incubated in antimycin (0.05 μ g/ml) and oligomycin (0.5 μ g/ml) (A/O) during 25 min before the beginning of the recordings and dialyzed with 10 mM EGTA + A/O and different concentrations of ATP-2Na (0, 2, 5, and 10 mM). Free ATP concentrations were calculated using the MaxChelator WEBMAXC Standard program.

I_{CRAC} and suggests that endogenous ATP released from mitochondria may act in a similar way.

To establish the relationship between the ATP-2Na concentration and the degree of inactivation, the free ATP concentration corresponding to different amounts of ATP-2Na added to the intracellular solution was represented against the percentage of inactivation in cells dialyzed with EGTA + A/O. As it is shown in Fig. 6B, the increase of ATP-2Na, and hence of free ATP concentration, was associated with a reduction in the percentage of I_{CRAC} inactivation in a dose-dependent manner.

Estimation of the Extent of Ca^{2+} Microdomains Generated by a Single CRAC Channel in the Presence of High Concentrations of Exogenous Ca^{2+} Chelators—To estimate the amplitude and spatial extent of Ca^{2+} microdomains generated by Ca^{2+} entry through a single CRAC channel under our recording conditions, we used PORE, a freeware application developed by Dr. James Kenyon, University of Nevada. PORE is an Excel spreadsheet with an attached Visual Basic Program that utilizes the equation proposed by Dr. Erwin Neher (22). This equation

predicts the Ca^{2+} gradient generated in the presence of high concentrations of a barely saturated and highly mobile exogenous chelator from the opening of a single channel. The extent of the gradient is a function of Ca^{2+} flux through the channel, the diffusion coefficient for Ca^{2+} , and the Ca^{2+} binding rate for the chelator used as shown in Equation 1

$$[Ca^{2+}]_c(r) = [Ca^{2+}]_{\infty} + \frac{i_{CRAC}}{4\pi F D_{Ca} r} \exp(-r/\lambda) \quad (\text{Eq. 1})$$

where $[Ca^{2+}]_c(r)$ is the steady state free Ca^{2+} concentration as a function of distance from the channel, $[Ca^{2+}]_{\infty}$ is the free Ca^{2+} in the bulk solution (*i.e.* 10^{-7} M), F is the Faraday's constant, D_{Ca} is the diffusion coefficient for Ca^{2+} (2.2×10^{-6} cm²/s, (23)), r is the distance from the channel, and λ is the mean path length of free Ca^{2+} . As shown in Equation 2, λ can be expressed as

$$\lambda = \sqrt{D_{Ca}/(k_{on} \cdot [B])} \quad (\text{Eq. 2})$$

where k_{on} is the on rate constant for binding of Ca^{2+} by the chelator ($k_{on} = 2.5 \times 10^6$ M⁻¹ s⁻¹ for EGTA, 4×10^8 M⁻¹ s⁻¹ for BAPTA, and 1×10^9 M⁻¹ s⁻¹ for ATP (23)), and $[B]$ is the concentration of free buffer in the bulk solution. As shown in Equation 3, the free buffer concentration $[B]$ is calculated according to

$$[B] = \frac{[B]_{tot} \cdot K_D}{K_D + [Ca^{2+}]_{\infty}} \quad (\text{Eq. 3})$$

where $[B]_{tot}$ is the concentration of total buffer (free plus bound; 10^{-2} M) and K_D is the dissociation constant for the Ca^{2+} buffer complex ($K_D = 1.8 \times 10^{-7}$ M for EGTA, 2.2×10^{-7} M for BAPTA, and 1.95×10^{-4} M for ATP).

The current through CRAC channels is too small to be resolved at the single channel level under typical recording conditions. As a consequence, different indirect approaches like fluctuation analysis (3) or single channel recording in divalent-free external solutions (24) have been used to estimate the unitary conductance and also the number of CRAC channels/cell. Moreover, other cationic conductances can contaminate CRAC current recordings in the absence of intracellular Mg^{2+} . Therefore, Prakriya and Lewis (25) studied the biophysical properties of CRAC channels isolated from the Mg^{2+} -sensitive component and estimated the unitary CRAC Ca^{2+} current (i_{CRAC}) to be -3.8 fA in 20 mM external Ca^{2+} at -110 mV. Therefore, to study only the contribution of the different buffers in the shaping of the Ca^{2+} microdomains, the same unitary current was considered for the different experimental conditions assuming that open probability of a single CRAC channel is not affected for the different intracellular buffers employed.

Our calculation assumes that standing gradients develop in microseconds after the opening of channels, provided that Ca^{2+} buffers do not saturate, a condition fulfilled in our experiments due to the small single unitary conductance of CRAC channels (a few fA) and the high concentration (10 mM) of intracellular exogenous buffers used. However, this model does not consider how channels are arranged in the plasma mem-

Mitochondrial ATP Regulates CRAC Channel Activity

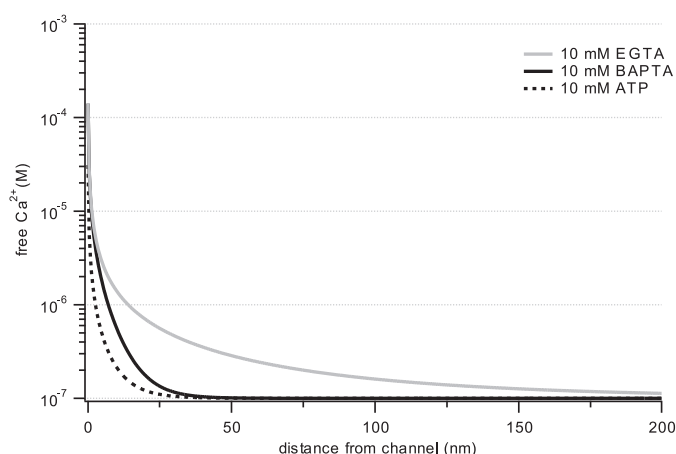


FIGURE 7. Estimation of Ca^{2+} microdomains generated from a single CRAC channel in the presence of a high (10 mM) total concentration of three different exogenous Ca^{2+} chelators (EGTA, BAPTA, and ATP) as a function of the distance to the channel (see "Results" for details). The mean path length (λ) values for free EGTA (95.5 nm), BAPTA (7.5 nm), and ATP (4.9 nm) concentrations calculated using the MaxChelator WEBMAXC Standard program were 95.5, 7.5, and 4.9 nm, respectively.

brane (homogeneously or forming clusters), which in the case of CRAC channels is currently unknown.

Fig. 7 shows the profiles of Ca^{2+} microdomains near a single CRAC channel as a function of the distance to its mouth in the presence of three different Ca^{2+} buffers (EGTA, BAPTA, and ATP) at 10 mM. In the presence of EGTA an extended Ca^{2+} microdomain builds up around CRAC channels; interestingly, in the presence of BAPTA or ATP the spatial extension of this microdomain becomes markedly and similarly reduced and fully dissipates at distances beyond 50 nm from the channel.

DISCUSSION

When using the whole-cell configuration of the patch clamp technique and high concentrations of an exogenous Ca^{2+} buffer, InsP_3 , and thapsigargin in the intracellular solution, it is expected that after depletion of InsP_3 -sensitive stores the only regions experiencing abrupt changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ are those around the mouth of CRAC channels. Thus, our experimental conditions allow the study of Ca^{2+} -dependent regulation of CRAC channels triggered by Ca^{2+} microdomains formed at the subplasmalemmal region.

First, we evaluated the effects of high intracellular concentrations (10 mM) of two different Ca^{2+} chelators (EGTA or BAPTA) on CRAC currents. Because we were unable to observe any difference in the time course of activation of I_{CRAC} comparing values calculated from cells dialyzed with EGTA or BAPTA, it is unlikely that rapid and very much localized changes in cytosolic Ca^{2+} play a significant role in this process.

The functional state of mitochondria also seems not to contribute to activation of I_{CRAC} , as respiratory substrates did not cause any effect on τ_{on} (Fig. 2, A panels). This conclusion agrees with previous results from RBL-1 cells in which mitochondrial depolarization with A/O in the presence of strong cytosolic buffering did not affect the activation of I_{CRAC} (13).

In contrast, different results were observed when inactivation parameters were measured. BAPTA reduced both the rate and extent of inactivation and also the percentage of inactivation

ing cells as compared with EGTA (Fig. 2, panels B1-B3). Interestingly, when the mitochondrial function was boosted with the mitochondrial mixture, respiring mitochondria could then regulate slow inactivation of I_{CRAC} in cells dialyzed with EGTA in a manner similar to that observed with BAPTA.

At variance with exogenous buffers, regulatory effects exerted by mitochondria on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ are very conditioned by their metabolic state and topological distribution with respect to sources of Ca^{2+} mobilization such as the plasma membrane or the endoplasmic reticulum (26). The question then arises as to whether mitochondria are homogenous organelles in terms of their location and/or functional properties. Indeed, functional heterogeneity has been described in several types of cells regarding the Ca^{2+} signaling abilities of particular subsets of mitochondria (16, 27). Collins *et al.* (27) found that mitochondria located in the vicinity of the plasma membrane have larger $\Delta\Psi_m$ values and sequester more Ca^{2+} than those located around the nucleus. Likewise, the ability of subplasmalemmal mitochondria to modulate the activity of ion channels like large conductance Ca^{2+} -dependent potassium channels (BK_{Ca} channels) or store-operated Ca^{2+} channels has been demonstrated in different cell types (28, 29). In a recent study, mitochondria from HeLa cells were relocalized from the cell periphery to the perinuclear area by overexpression of the dynactin subunit dynamitin, which causes inhibition of the fission factor, dynamin-related protein (Drp-1). As a consequence, the number of endoplasmic reticulum-mitochondria contacts increased and Ca^{2+} influx through store-operated Ca^{2+} channels was severely reduced, thus indicating a requirement of peripheral mitochondria for optimal store-operated Ca^{2+} activity (28, 30).

On the other hand, the inclusion of metabolic substrates like pyruvate and malate into the intracellular solution during whole-cell recordings is essential to maintain mitochondrial respiration and ATP production (15, 17). In addition, oxidative phosphorylation in the mitochondria depends on the presence of micromolar levels of $[\text{Ca}^{2+}]_m$ to induce the activation of three dehydrogenases of the tricarboxylic acid cycle. Because mitochondrial Ca^{2+} uniporter does not transport Ca^{2+} below a concentration of ~ 200 – 300 nM (36), we wanted to estimate how far a microdomain extends from a Ca^{2+} source (the CRAC channel) in the presence of high concentrations of a diversity of exogenous Ca^{2+} buffers.

A rough estimation of how long Ca^{2+} ions can diffuse into the cell from the mouth of a CRAC channel before they bind to an exogenous buffer is given by the mean path length parameter, λ (see Equation 2). The value of λ is 95.5 nm in the presence of 10 mM of EGTA and 7.5 nm in the presence of 10 mM of BAPTA, which may explain the differences in I_{CRAC} inactivation observed between the two chelators.

Considering the small λ value estimated for BAPTA and the effectiveness of this buffer to reduce I_{CRAC} inactivation, both a molecular colocalization between CRAC channels and mitochondria and a high density and velocity of the Ca^{2+} uniporter would be required to account for the observed mitochondrial modulation of I_{CRAC} . From our experimental results, an alternative mechanistic explanation would consist of the release by

mitochondria of a highly mobile and effective Ca^{2+} chelator able to raise high concentrations (several millimolar) near CRAC channels.

Like BAPTA, ATP can act as a very effective Ca^{2+} chelator due to its rapid reaction with Ca^{2+} (k_{on} of $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (23). Thus, in the presence of 10 mM added ATP·2Na in the intracellular solution, the spatial extension of a Ca^{2+} microdomain generated by Ca^{2+} influx through a single CRAC channel would be even narrower than that occurring when BAPTA is used ($\lambda = 4.9 \text{ nm}$).

Furthermore, according to the results obtained using uniporter and mitochondrial adenine nucleotide translocase blockers (Fig. 4A) a plausible scenario could then be that ATP originated from peripheral mitochondria would shape spatially the Ca^{2+} microdomains generated by CRAC channels. This interpretation implies that ATP concentrations must be in the order of several millimolar in the microdomain region. It is now worth recalling that ATP microdomains of this size have been reported in pancreatic β -cells where they regulate the activity of ATP-sensitive K^+ channels at the plasma membrane (31).

Recent data indicate that other Ca^{2+} transport systems could also be considered. This is the case of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA), whose activity is regulated by the Ca^{2+} microdomains generated by CRAC channels, suggesting a close functional association between both Ca^{2+} transport systems in T cells (32).

Because specific PMCA inhibitors do not exist, vanadate, a nonspecific inhibitor of ATPases and phosphatases, has been used in studies requiring the inhibition of PMCA (33). To rule out a possible regulatory role of PMCA on I_{CRAC} , we evaluated the effect of 0.1 mM vanadate (sodium orthovanadate) in cells dialyzed with 10 mM EGTA and mitochondrial mixture. No differences were observed in cells treated with vanadate compared with control cells regarding the amplitude or time course of I_{CRAC} (data not shown). Thus, PMCA does not appear to play a predominant role in controlling slow Ca^{2+} -dependent inactivation in Jurkat T cells under our particular experimental conditions.

A similar cross-talk has been proposed to exist between CRAC channels and the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) in mast cells (34). Nevertheless, the relative contribution of these systems to the control of local $[\text{Ca}^{2+}]$ varies significantly with the experimental conditions used, the time window analyzed and the cell type under study. So, NCX does not appear to contribute significantly to Ca^{2+} clearance in Jurkat T cells (35), whereas the regulatory role of PMCA was established under conditions of low buffer capacity and unsupported mitochondrial metabolism.

To sum up, our results show that ATP produced by subplasmalemmal mitochondria is a soluble messenger that regulates the Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels in Jurkat T cells, supporting and refining the already existing notion of a functional relationship between CRAC channels and peripheral mitochondria.

Acknowledgment—We thank Dr. Raquel Castejon for assistance and access to flow cytometer facilities.

REFERENCES

- Hoth, M., and Penner, R. (1992) *Nature* **355**, 353–356
- Parekh, A. B., and Penner, R. (1997) *Physiol. Rev.* **77**, 901–930
- Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6295–6299
- Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1995) *J. Gen. Physiol.* **105**, 209–226
- Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14445–14451
- Hoth, M., Fanger, C. M., and Lewis, R. S. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 633–648
- Hoth, M., Button, D. C., and Lewis, R. S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10607–10612
- Parekh, A. B., and Putney, J. W., Jr. (2005) *Physiol. Rev.* **85**, 757–810
- Glitsch, M. D., Bakowski, D., and Parekh, A. B. (2002) *EMBO J.* **21**, 6744–6754
- Makowska, A., Zablocki, K., and Duszynski, J. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 877–884
- Parekh, A. B. (2003) *News Physiol. Sci.* **18**, 252–256
- Bakowski, D., and Parekh, A. B. (2001) *Biochem. J.* **353**, 561–567
- Gilbert, J. A., and Parekh, A. B. (2000) *EMBO J.* **19**, 6401–6407
- Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A., and Rizzuto, R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13807–13812
- Villalba, M., Martinez-Serrano, A., Gomez-Puertas, P., Blanco, P., Borner, C., Villa, A., Casado, M., Gimenez, C., Pereira, R., and Bogonez, E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2468–2476
- Gilbert, J. A., Bakowski, D., and Parekh, A. B. (2001) *EMBO J.* **20**, 2672–2679
- Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, C755–C786
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D. E. (2004) *Nature* **427**, 360–364
- Halestrap, A. P., and Davidson, A. M. (1990) *Biochem. J.* **268**, 153–160
- Duchen, M. R. (1992) *Biochem. J.* **283**, Pt. 1, 41–50
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., and Cossarizza, A. (1997) *FEBS Lett.* **411**, 77–82
- Neher, E. (1986) in *Calcium Electrogenesis and Neuronal Functioning* (Heinemann, U., Klee, M., Neher, E., and Singer, W., eds), pp. 80–96, Springer-Verlag, Berlin
- Naraghi, M., and Neher, E. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 6961–6973
- Kerschbaum, H. H., and Cahalan, M. D. (1999) *Science* **283**, 836–839
- Prakriya, M., and Lewis, R. S. (2002) *J. Gen. Physiol.* **119**, 487–507
- Lawrie, A. M., Rizzuto, R., Pozzan, T., and Simpson, A. W. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10753–10759
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2002) *EMBO J.* **21**, 1616–1627
- Malli, R., Frieden, M., Osibow, K., and Graier, W. F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 10807–10815
- Park, M. K., Ashby, M. C., Erdemli, G., Petersen, O. H., and Tepikin, A. V. (2001) *EMBO J.* **20**, 1863–1874
- Varadi, A., Cirulli, V., and Rutter, G. A. (2004) *Cell Calcium* **36**, 499–508
- Kennedy, H. J., Pouli, A. E., Ainscow, E. K., Jouaville, L. S., Rizzuto, R., and Rutter, G. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 13281–13291
- Bautista, D. M., and Lewis, R. S. (2004) *J. Physiol.* **556**, 805–817
- Tiffert, T., and Lew, V. L. (2001) *Cell Calcium* **30**, 337–342
- Aneiros, E., Philipp, S., Lis, A., Freichel, M., and Cavalie, A. (2005) *J. Immunol.* **174**, 119–130
- Bautista, D. M., Hoth, M., and Lewis, R. S. (2002) *J. Physiol.* **541**, 877–894
- Gunter, T. E., Yule, D. Y., Gunter, K. K., Eliseev, R. A., and Salter, J. D. (2004) *FEBS Lett.* **567**, 96–102