

MODULACIÓN LOCAL DE UN CANAL OPERADO POR DEPÓSITO

Gema B. Montalvo

Tutores: Juan A. Gilabert, Antonio R. Artalejo.

Dpto. Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria.

RESUMEN

En linfocitos T la entrada de Ca^{2+} ocurre principalmente a través de un tipo de canal de Ca^{2+} dependiente de depósito conocido CRAC (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} current). Estos canales se abren como consecuencia del vaciado de los depósitos de Ca^{2+} , lo cual es producido por la acción del inositol trifosfato (IP_3) generado tras el reconocimiento de un antígeno. Microdominios de Ca^{2+} locales actúan como reguladores negativos de los canales CRAC promoviendo los procesos de inactivación. Se ha propuesto que las mitocondrias, funcionando como secuestradores de Ca^{2+} intracelulares, pueden ser capaces de controlar la actividad de I_{CRAC} , sin embargo, la posibilidad de que un factor liberado desde la mitocondria pudiera mediar los efectos atribuidos a ellas ha sido también apuntada en la literatura. A este respecto, cabe señalar que las mitocondrias solo cuando se encuentran metabólicamente activas son capaces de reducir la inhibición mediada por Ca^{2+} de los canales CRAC en presencia de altas concentraciones de diferentes quelantes intracelulares e inhibidores de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que este efecto es mediado principalmente por un factor soluble mitocondrial (ATP) que puede actuar como quelante de calcio.

En este contexto, hemos empezado a estudiar otros elementos que podrían ejercer un control local en la actividad de los canales CRAC como la protein quinasa C, la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática o la composición lipídica de la membrana plasmática.

ABSTRACT

In T lymphocytes, the Ca^{2+} entry mainly occurs through a particular type of store-operated Ca^{2+} (SOC) channel known as I_{CRAC} . These channels open as consequence of Ca^{2+} stores emptying which is induced by inositol trisphosphate action next to recognition of an antigen. Local Ca^{2+} microdomains act as negative feedback regulators of CRAC channels promoting inactivation processes. Mitochondria by serving as intracellular Ca^{2+} buffers have been indicated to control the activity of I_{CRAC} , however, the possibility of a factor released from mitochondria

have been also pointed out, but no direct evidences have obtained at this respect yet. Thus, metabolically competent respiring mitochondria were able to reduce Ca^{2+} -mediated inhibition of CRAC channels in the presence of high concentrations of different intracellular chelators and inhibitors of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Recently, our group has shown that this effect is mainly mediated by a soluble mitochondrial factor (ATP) than can act as calcium chelator.

In this context, we have begun to study other elements than could to exert a local control in the activity of CRAC channels as protein kinase C, plasma membrane calcium ATPase or the contribution of the lipidic composition of plasma membrane.

La activación de los linfocitos T tras el reconocimiento del antígeno depende de una entrada sostenida de Ca^{2+} que tiene lugar a través de canales dependientes de depósitos de la membrana plasmática. Estos canales generan una corriente conocida como I_{CRAC} , la cual se activa como consecuencia del vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} por la acción del IP_3 generado tras la estimulación del receptor de la célula T.

Para conseguir una activación óptima de la corriente utilizamos condiciones experimentales que provocan el vaciado irreversible de los depósitos de Ca^{2+} de la manera más eficiente posible. Mediante la técnica de registro electrofisiológico conocida como *patch-clamp*, en su configuración de célula entera, la cual permite controlar la composición de la solución intracelular medimos I_{CRAC} en células Jurkat (una línea celular de linfocitos T humanos) en presencia de altas concentraciones (10 mM) de quelantes de Ca^{2+} como EGTA y BAPTA, IP_3 (30 μM) y tapsigargina (2 μM). El estudio cinético de la activación de I_{CRAC} reveló que no existían diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros (amplitud máxima de la corriente, tiempo al pico o constante de tiempo de activación) entre células dializadas con EGTA o BAPTA. Por el contrario, el porcentaje de células que presentaban inactivación en presencia de EGTA era mucho mayor que en presencia de BAPTA. Además, la extensión de la inactivación en las células inactivantes también se reducía en presencia BAPTA. La explicación para este resultado se encontraría en las diferentes características cinéticas de estos quelantes (Naraghi and Neher, 1997), ya que aunque presentan una afinidad por el Ca^{2+} similar, el BAPTA

presenta una cinética de unión a Ca^{2+} más rápida que el EGTA, limitando la concentración de Ca^{2+} en la vecindad del canal.

Por otro lado, las mitocondrias pueden ser mantenidas en un estado metabólico energizado durante los registros mediante la diálisis de un cóctel compuesto por sustratos respiratorios (piruvato, malato y NaH_2PO_4) que potencian la función mitocondrial (Gunter and Pfeiffer, 1990). Bajo estas condiciones experimentales y en presencia de EGTA intracelular, el porcentaje de células inactivantes y la extensión de su inactivación se reducen significativamente respecto al observado en presencia de EGTA, mostrando valores similares a los obtenidos en las células tratadas con BAPTA. Esto podría ser debido a la formación de zonas de alta concentración de Ca^{2+} alrededor de los canales CRAC, conocidas como microdominios de Ca^{2+} . Estos microdominios actúan como reguladores negativos provocando la inactivación del canal. Por tanto, cualquier orgánulo, sistema de transporte o metabolito capaces de regular la concentración de Ca^{2+} intracelular podría ser capaz de modular la actividad de los canales CRAC. Así, el uso de BAPTA como quelante reduciría la inactivación de I_{CRAC} a través de la reducción del tamaño de esos microdominios debido a su rápida cinética de unión a Ca^{2+} . Por otro lado, se ha propuesto que las mitocondrias son capaces de reducir la inactivación de los canales CRAC por medio de la captación de Ca^{2+} a través de su uniportador (Hoth *et al.*, 1997) y también se ha postulado que el efecto regulador de la mitocondria podría deberse a su capacidad para liberar al citoplasma algún factor responsable de la modulación de la actividad de los canales CRAC (Parekh, 2003).

Para averiguar a través de cual de estos mecanismos se produce la modulación de los canales CRAC tratamos las células con inhibidores del uniportador (rojo de rutenio o Ru360) o del transportador de ADP/ATP (atractilósido o ácido bongkrékico). La reducción en el porcentaje de inactivación en presencia de los inhibidores del transportador de ADP/ATP pero no de los inhibidores del uniportador confirmó que el efecto regulador mitocondrial está principalmente mediado por la liberación de ATP al citosol, el cual actúa como un eficaz quelante de Ca^{2+} , reduciendo el tamaño del microdominio y por tanto, la inactivación Ca^{2+} -dependiente de I_{CRAC} . Para establecer la relación entre la concentración de ATP.2Na y el grado de inactivación, introdujimos en la pipeta de registro diferentes concentraciones de ATP.2Na en presencia de altas

concentraciones de EGTA junto con inhibidores de la actividad mitocondrial (antimicina y oligomicina). Así, en presencia de A/O la función mitocondrial es anulada de manera que la concentración de ATP presente en la célula será aquella que introducimos mediante el uso de ATP exógeno y observamos que la concentración de ATP. $2Na$ incluida en la solución intracelular reducía de manera dosis dependiente el porcentaje de inactivación de I_{CRAC} .

Como prueba adicional 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 donde las células eran dializadas con la solución interna conteniendo 10 mM EGTA, cóctel mitocondrial suplementado con distintas concentraciones de $MgCl_2$ y observamos que el porcentaje de inactivación aumenta al incrementar la concentración de Mg^{2+} en el citosol celular, lo cual era de esperar debido a que el Mg^{2+} es capaz de competir con el Ca^{2+} para secuestrar el ATP liberado por las mitocondrias reduciendo su capacidad quelante en la célula. De esta forma, nuestro grupo ha identificado el ATP como un factor difusible mitocondrial que actúa como el modulador de la actividad de los canales CRAC (Montalvo *et al.*, 2006), demostrándose, por primera vez, la existencia de un factor difusible mitocondrial implicado en la regulación de I_{CRAC} .

Este hallazgo ha dirigido nuestro estudio hacia la localización subcelular de los distintos elementos implicados en la regulación local de los canales CRAC. Así, hemos empezado a realizar estudios, acerca del papel modulador de otros componentes implicados en esta regulación, además de estudiar el microambiente en la proximidad del canal y su capacidad para regular I_{CRAC} .

Algunos autores han señalado otros sistemas de transporte de Ca^{2+} que 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; plasma membrane Ca^{2+} -ATPase), cuya actividad es regulada por la extensión de los microdominios de Ca^{2+} generados por los canales CRAC sugiriendo una estrecha asociación funcional entre ambos sistemas de transporte de Ca^{2+} (Bautista and Lewis, 2004). Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que, en nuestras condiciones experimentales, la PMCA no modula la inactivación de I_{CRAC} , debido a que la

introducción en la célula un inhibidor de la PMCA, el vanadato sódico, en presencia de EGTA y del cóctel mitocondrial no provoca diferencias en la inactivación respecto del grupo control no tratado con dicho inhibidor.

Asimismo, también ha sido descrita la participación de otras moléculas efectoras como la proteína quinasa C (PKC) en la modulación de canales dependientes de depósito en otros tipos celulares como células RBL (Parekh and Penner, 1995), por lo que quisimos estudiar si la PKC era capaz de regular la actividad de los canales CRAC en células Jurkat. Para ello, llevamos a cabo registros sobre células perfundidas con activadores (PMA, forbol miristato acetato) o inhibidores de PKC (estaurosporina o bisindolilmaleimida). Nuestros resultados muestran que las células presentan una actividad basal de PKC que cuando es potenciada aumenta la extensión de la inactivación de manera significativa.

Por otro lado, pensamos que la regulación de I_{CRAC} también puede estar determinada por la localización de los distintos componentes implicados en su regulación y esta distribución podría estar condicionada por la formación de microdominios estructurales en la membrana plasmática. Por ello, hemos empezado a realizar estudios alterando la cantidad de colesterol de las membranas mediante el uso de ciclodextrinas. Estas moléculas son eficaces en la eliminación de colesterol de las membranas, sin embargo, si son saturadas con colesterol previamente pueden insertar ese colesterol en la membrana plasmática.

Así, observamos que no hay diferencias en la amplitud de la inactivación cuando extraemos colesterol de las membranas. Sin embargo, su amplitud aumenta significativamente cuando incorporamos colesterol. Hoy sabemos que la membrana plasmática no es homogénea sino que presenta zonas ricas en colesterol y esfingolípidos conocidas como balsas lipídicas o *lipid rafts*. Estas zonas juegan un papel importante en la señalización celular al permitir excluir o incluir determinadas proteínas de membrana según sus características fisicoquímicas. En el linfocito T, las balsas lipídicas juegan un papel determinante en el proceso de reconocimiento del antígeno. Aunque no poseemos evidencias directas, el incremento de la inactivación podría ser debido a que existiera una mayor agregación de canales gobernada por estas balsas lipídicas

dando lugar a microdominios de mayor tamaño, y por tanto, a un aumento en la inactivación de los canales CRAC.

La acción de los fármacos utilizados para la extracción e incorporación de colesterol en la membrana plasmática fue confirmada mediante el uso la técnica de microscopia de fluorescencia y el marcaje de las células con filipin, un compuesto fluorescente que se une específicamente a colesterol. Además, el marcaje de las balsas lipídicas con el kit “Vibrant Alexa Fluor 555 Lipid Raft labelling” (Molecular Probes) reveló su patrón de distribución, observándose una disposición distinta tras alterar experimentalmente la composición de colesterol de las membranas.

Estos resultados indican que la formación de microdominios estructurales en la membrana plasmática podría jugar un papel importante en la regulación de I_{CRAC} aunque será necesario realizar nuevos experimentos para determinar que elementos podrían estar asociados a las balsas lipídicas y como podrían afectar a la actividad de los canales CRAC en linfocitos T.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, BFI2002-01101), la Comunidad de Madrid (CAM, GR/SAL/0522/2004) y la Universidad Complutense (PR45/05-14162).

BIBLIOGRAFÍA

Hoth M, Fanger CM and Lewis RS (1997). *Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes*. J. Cell. Biol. 137: 633-648.

Parekh AB (2003). *Mitochondrial regulation of intracellular Ca^{2+} signaling: more than just simple Ca^{2+} buffers*. News Physiol. Sci. 18: 252-256.

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.

Naraghi M and Neher E (1997). *Linearized buffered Ca^{2+} diffusion in microdomains and its implications for calculation of $[Ca^{2+}]$ at the mouth of a calcium channel*. J. Neurosci. 17: 6961-6973.

Gunter TE and Pfeiffer DR (1990). *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. Am. J. Cell. Physiol. 258: 755-786.

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.

Parekh AB and Penner R (1995). *Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7907-7911.