

1 Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Canales iónicos

Nuestra habilidad para hacer ejercicio, para percibir un mundo de colores o para procesar el lenguaje, recae en la rapidez de comunicación entre células. Tal señalización, la más rápida de nuestro cuerpo, implica mensajes eléctricos producidos por la apertura y cierre de canales iónicos en las membranas celulares. Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el paso de iones a través de la membrana plasmática, de forma selectiva y a favor de gradiente electroquímico. Son responsables, entre otras funciones, del mantenimiento del potencial de membrana, de la contracción muscular, permiten la regulación del volumen celular, participan en diversas vías de señalización y son los encargados de la generación y propagación del impulso nervioso.

A lo largo del siglo XX numerosos autores han realizado grandes aportaciones sobre la biofísica de las membranas biológicas y en el estudio de estas proteínas. Sin embargo, se pueden enumerar cronológicamente una serie de investigaciones que, por su novedad conceptual y/o metodológica, han revolucionado el conocimiento en este campo:

Las teorías de Julius Bernstein sobre la naturaleza de las membranas biológicas y su excitabilidad tuvieron vigencia hasta mediados del siglo XX. Este

autor propuso a principios de siglo que las células estaban rodeadas de una membrana aislante con una pequeña permeabilidad selectiva al potasio. Esta permeabilidad por tanto, sería responsable de que el potencial de reposo estuviese cercano al equilibrio de potencial para el potasio. La membrana activa sin embargo, perdería esta permeabilidad selectiva haciéndose permeable a todos los iones. En la propagación del potencial de acción las corrientes locales de las regiones excitadas serían suficientes para estimular las regiones adyacentes (Bernstein, 1902; Bernstein, 1912).

Durante un periodo que comprendería de mediados de los años treinta a principios de los cincuenta, los estudios de Alan Hodgkin y Andrew Huxley revolucionarían la biofísica clásica. En contra de las teorías de Bernstein, Hodgkin y Huxley demuestran la participación del sodio en la excitabilidad celular y publican la descripción cuantitativa de la generación y propagación del impulso nervioso en el axón gigante del calamar (Hodgkin y Huxley, 1939; Hodgkin y Huxley, 1945; Hodgkin y Katz, 1949; Hodgkin y Huxley, 1952; Hodgkin y cols., 1952). Este proceso vino acompañado y fue consecuencia del desarrollo de una metodología para el registro de corrientes iónicas. Esta nueva técnica permitía mantener controlado el voltaje de la membrana celular y se denominó *voltage-clamp*. La interpretación de los eventos de la membrana en términos de conductancias

separadas para el sodio y para el potasio, junto con la descripción cuantitativa de la apertura, donde sugieren una mecanismo de apertura y cierre dependiente de voltaje, fueron clave para que ambos autores fueran galardonados con el premio Nobel de Medicina en 1963.

Un nuevo avance en el campo de la electrofisiología se dio más adelante cuando Erwin Neher y Bert Sakmann consiguieron desarrollar la metodología que permitía registrar pequeños áreas de membrana, el *patch clamp* (Neher y Sackmann, 1976; Hamill y cols., 1981). En 1981 estos autores muestran cómo las pipetas de vidrio pueden fusionarse con las membranas celulares formando sellos de alta resistencia y estabilidad mecánica. Utilizando esta técnica se podían registrar las corrientes totales en células pequeñas y lo más impactante, registrar la actividad de un canal único. Ambos autores recibieron el premio Nobel de Medicina en 1991.

Por otro lado, en el ámbito de la biología molecular de estas proteínas, el clonaje y caracterización molecular de los canales iónicos supuso otro gran salto en la comprensión del funcionamiento de estas proteínas. La unión de los canales de sodio a toxinas específicas permitió su purificación a partir de membranas. El conocimiento de su secuencia aminoacídica facilitó así la identificación del primer ADN codificante de un canal iónico por parte del laboratorio de Shosaku Numa (Noda y col, 1984). Sin embargo, el desconocimiento de ligandos de alta

afinidad para los canales de potasio imposibilitaba esta estrategia. Por otro lado, los análisis electrofisiológicos del mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) apuntaban a que el causante de este fenotipo podía ser un canal de potasio. En 1987, mediante el mapaje génico de este mutante, el laboratorio de Lily Jan publica el clonaje del primer canal de potasio al que se llamó *Shaker* (Papazian y cols., 1987).

Cabe señalar por último algunas de las grandes aportaciones de Roderick MacKinnon como el gran avance en el conocimiento de la estructura de los canales, la selectividad del poro, la unión a proteínas beta reguladoras, adaptadoras y a toxinas, mediante estudios de cristalografía y que le han valido el Nobel de Química en el año 2003 junto a Peter Agre, descubridor de los denominados canales de agua o acuaporinas (MacKinnon, 1991; Heginbotham y cols., 1994; Doyle y cols., 1998, Gulbis y cols., 2000; Zhou y cols., 2001).

1.2. Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales iónicos tienen fundamentalmente dos componentes que los caracterizan: la permeabilidad y el mecanismo de apertura y cierre (Armstrong y Hille, 1998). Según estos dos componentes, los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) son aquellos que controlan el flujo de iones potasio a

través de la membrana, y su mecanismo de acción se basa en la sensibilidad a la diferencia de potencial a ambos lados de ésta. En una célula en reposo, la concentración intracelular de K^+ es mucho mayor a la exterior (155mM frente a 4mM en células musculares) lo que facilita la salida del catión K^+ a favor de su gradiente de concentración, generando así una corriente de salida. Debido a que la membrana no es permeable a los aniones citoplasmáticos, esta difusión al exterior provoca una electropositividad externa frente a una electronegatividad interna. El cambio de potencial generado es suficiente para bloquear la difusión neta al exterior pese al gradiente de concentración existente. Este potencial de equilibrio para el potasio viene determinado por la ecuación de Nerst (Nerst, 1888):

$$E_K = \frac{RT}{FZ} \ln \frac{[K]_{int}}{[K]_{ext}}$$

Donde R, es la constante de los gases; T, la temperatura absoluta; F, la constante de Faraday y Z, la valencia del ión. Este potencial de equilibrio para el potasio tiene unos valores alrededor de -95mV dependiendo del tipo celular. La alta permeabilidad de la membrana celular al potasio determina que el potencial de reposo de la mayoría de las células sea cercano al potencial de equilibrio del potasio.

En células excitable como las neuronas, estos canales determinan el

potencial de reposo, la duración del potencial de acción, modulan la liberación de neurotransmisores y regulan la frecuencia de disparo (Trimmer, 1993). En el potencial de acción cardiaco distintos tipos de canales de potasio participan en cada una de las fases. En concreto, los canales de potasio dependientes de voltaje generan la corriente transitoria de salida y la corriente rectificadora retardada de activación lenta que completa la repolarización del potencial de acción (Deal y cols., 1996).

En células no excitables las funciones de estos canales son menos conocidas, además del mantenimiento del potencial de membrana, se ha demostrado la participación de estos canales en distintas vías de señalización implicadas en procesos de control del volumen celular, proliferación, activación y apoptosis (Deutsch y Chen, 1993; Wonderlin y Strobl, 1996; Cahalan y Chandy, 1997; Szabò y cols., 2004).

1.2.1. Selectividad y conducción

Los canales de potasio dependientes de voltaje se dividen estructuralmente en tres clases, los canales formados por subunidades de seis segmentos transmembrana (6TM-1P), los canales formados por subunidades de cuatro segmentos transmembrana (4TM-2P) y los canales formados por subunidades de dos segmentos transmembrana (2TM-1P). Estas subunidades, llamadas subunidades γ , son

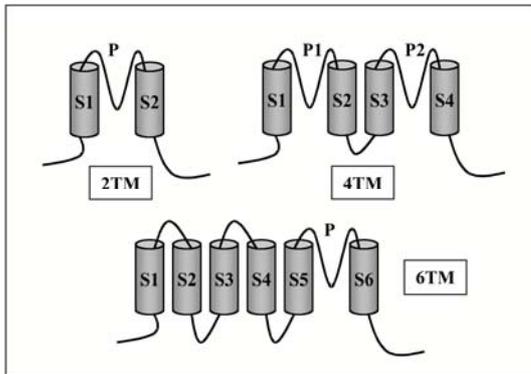


Figura 1. Representación de los tres patrones estructurales de subunidades β . Dominios S, segmentos transmembrana. Dominio P, parte integrante del poro.

capaces de formar un canal a través del que pasan los iones potasio. Mediante predicciones por unión a toxinas (MacKinnon, 1991), y más tarde por estudios de microscopía electrónica y cristalografía, se ha demostrado que los canales de potasio los conforman tetrameros de subunidades γ (Li and cols., 1994; Doyle y cols., 1998).

La estructura básica y compartida por todos los canales de potasio está formada por dos dominios transmembrana (2TM) conectados por una región bucle que entra y sale de la bicapa lipídica por el lado exterior de la membrana plasmática. Este bucle, llamado dominio P, forma parte esencial del poro del canal. En el caso de los canales de cuatro segmentos transmembrana esta estructura básica está repetida.

Los dominios P de los canales de potasio tienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada : TxxTxG(Y/F)GD. Esta secuencia

constituye parte esencial del filtro de selección del canal. De esta forma, mutaciones en los aminoácidos de esta secuencia provocan la pérdida de selectividad del canal por el ión K^+ (Heginbotham y cols., 1994; Aiyar y cols., 1996).

La cristalización del canal de potasio KcsA dio repuestas sobre la base molecular de la selectividad y conducción del poro de estos canales (Doyle y cols., 1998). Este canal proveniente de *Streptomyces lividans*, al tener una estructura básica de 2TM pero con una secuencia de aminoácidos similar al los canales de vertebrados e invertebrados, resultaba adecuado para la cristalografía por su simplicidad. Cada subunidad γ del canal está formada por dos hélices γ transmembrana, una interna al canal y otra externa, conectadas por un segmento de 30 aminoácidos que conforma la parte externa del poro, donde también se forma una pequeña hélice γ . El poro tiene una longitud de unos 45Å compuesto , desde el interior hasta el exterior celular, por un túnel de unos 18Å, seguido de una cavidad donde aún los iones permanecen solvatados (~10Å) y un conducto estrecho que conforma el filtro de selección donde se introducen los iones K^+ sin moléculas de agua (~12Å) (Figura 2). Este conducto estrecho lo conforma el esqueleto de carbonilos de la secuencia conservada de cada subunidad γ y cuyos oxígenos coordinan a los iones potasio. Pese a que el radio atómico del sodio (0,95Å) es menor

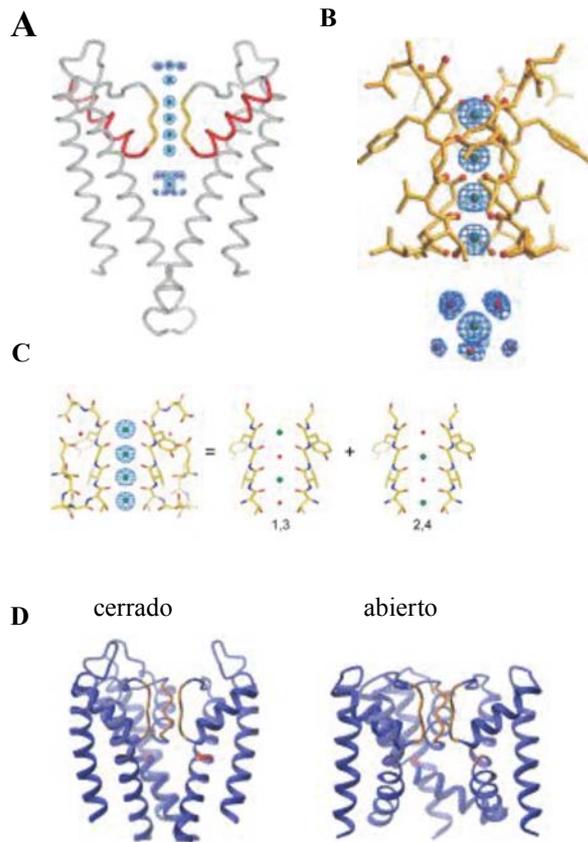


Figura 2. El poro conductor de iones potasio. A. Dos de las cuatro subunidades KcsA. Cada subunidad contiene una hélice externa a la membrana y una interna próxima al poro. En rojo la hélice del poro. En amarillo el filtro de sección. En azul la densidad electrónica formada por iones potasio y agua. B. Representación del poro en el que se muestra la deshidratación de los iones al pasar por el filtro de selección formado por el esqueleto de carbonilos de los distintos aminoácidos que lo componen. C. Densidad electrónica en el filtro correspondiente a las dos configuraciones, S1-S3 y S2-S4, de iones potasio (verde) con moléculas de agua (rojo) en el poro. D. Conformaciones cerrada y abierta del poro resueltas a partir de la cristalización canales 2TM-1P. Imágenes extraídas de MacKinnon, 2003.

que el del potasio (1,33Å), este primero no entra en el conducto porque los átomos de oxígeno de los carbonilos no están suficientemente cerca para que la deshidratación del Na^+ sea energéticamente favorable.

En lo que se refiere a la conducción los iones potasio, estos llegan hasta la cavidad rodeados de partículas de agua. Una vez allí se favorece la entrada de los iones potasio al filtro de selección al estar las cuatro hélices del poro orientadas en dirección amino a carboxilo terminal, generando así un potencial electrostático negativo. La disposición de los anillos de oxígeno del filtro favorece la deshidratación del potasio. El filtro de selección tiene dos posiciones de unión para dos iones potasio (S1-S3 y S2-S4) que, una vez dentro, al no

existir uniones fuertes, la repulsión entre la carga de los iones favorece la difusión a favor de gradiente (Figura 2C).

La estructura obtenida del cristal de KcsA es un buen modelo para el estudio de las propiedades del poro de los canales iónicos. Existen datos que apuntan a que la parte interna del poro podría diferir en los canales Kv por la existencia de una secuencia conservada de Pro-x-Pro que rompería la hélice γ del segmento transmembrana más cercano al poro (del Camino y col., 2000). Sin embargo este motivo no está presente en otras familias de canales de potasio y además, la funcionalidad de quimeras con el sensor de voltaje de la familia Kv y el poro de KcsA, demuestra que ambas proteínas no son

estructuralmente incompatibles (Lu y cols., 2001, 2002).

1.2.2. Canales formados por dos segmentos transmembrana

Este grupo lo comprenden los canales de potasio rectificadores anómalos (Kir), que aunque no se incluyen dentro de los canales dependientes de voltaje, su actividad está altamente regulada por los cambios en el potencial de membrana (Hille, 2001). Estructuralmente son tetrámeros de subunidades compuestas de dos dominios transmembrana con los extremos amino y carboxilo intracelulares. El primer canal Kir fue clonado en 1993 (Kubo y cols., 1993) y actualmente se conocen siete subfamilias distintas con un total de 15 miembros en mamíferos. Esta es una familia amplia de canales, cuya diversidad se ve incrementada por la formación de canales heterotetraméricos entre miembros de la misma subfamilia (Ashcroft, 2000).

El término rectificación anómala describe la tendencia a actuar como válvula favoreciendo la entrada de iones potasio durante hiperpolarizaciones de la membrana y bloqueando la salida frente a despolarizaciones de ésta. La rectificación es el resultado de un bloqueo dependiente de voltaje por cationes que se introducen en la cara interna del poro y bloquean la salida del potasio. Se han descrito dos tipos de agentes causantes de la rectificación: una rectificación suave producida por iones

Mg²⁺ (Vandenberg 1987; Matsuda y col., 1987; Horie y cols., 1987) y otra abrupta producida por poliaminas como la espermina y la espermidina (Lopatin y cols., 1994; Nicholson y Lopatin, 1997).

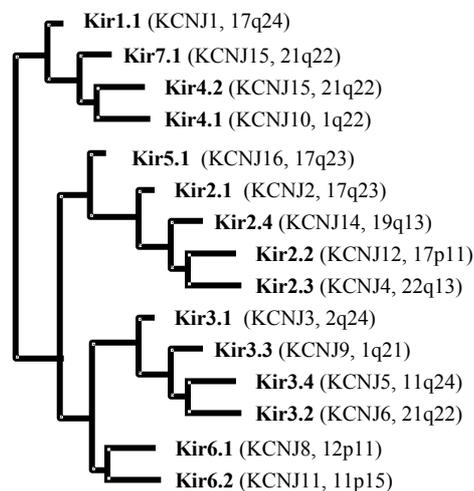


Figura 3. Árbol filogenético de los canales Kir. Para el análisis se ha utilizado la región hidrofóbica central. Extraído de Gutman y cols., 2003.

Los canales rectificadores anómalos también permiten corrientes de salida de potasio. De hecho, esa es su función fisiológica normal ya que raramente el potencial de una célula animal llega a ser menor que el potencial de equilibrio para el potasio. Estos canales por tanto permiten salida de potasio en un rango de voltaje de unos cuantos milivoltios por encima del potencial de equilibrio para este ión. De esta forma mantienen el potencial de membrana cercano al del potasio, sin embargo, cuando se produce una despolarización, estos canales se cierran. El umbral de potencial en el cual estos canales estabilizan el potencial de membrana

depende de su mecanismo de apertura y cierre (*gating*).

La actividad de estos canales está altamente regulada por distintos agentes citoplasmáticos como los nucleótidos de adenina, protones, fosforilaciones y proteínas G. Además, el grado de rectificación y su distribución tisular difiere entre distintas subfamilias. Por ejemplo, las subfamilias Kir1 y Kir6 serían sensibles a los niveles intracelulares de ATP, presentan una rectificación débil, y una localización más específica en riñón la primera y páncreas la segunda; sin embargo la familia Kir2 y Kir3, de expresión más ubicua, presentan una rectificación fuerte (Nichols y Lopatin, 1997).

1.2.3. Canales formados por seis segmentos transmembrana

Este grupo lo componen principalmente canales de potasio dependientes de voltaje de la familia Kv. Estos canales están formados por cuatro subunidades γ , cada una de las cuales, según estudios de hidrofobicidad y glicosilación, contendría seis segmentos transmembrana (S1-S6) en forma de hélices γ , quedando los extremos amino y carboxilo intracelulares. La región conservada que conformaría el poro y el filtro de selección está delimitada por los segmentos S5 y S6 unidos por la región P que entra y sale de la membrana como ya se ha descrito para el canal KcsA (Apartado 1.2.1).

En el segmento transmembrana S4 cada tres aminoácidos uno está cargado positivamente (Lys/Arg) y los otros dos son hidrofóbicos tal como se ve en la figura 4. Esta estructura es probablemente sensible a cambios en el campo eléctrico, y su movimiento ante cambios de potencial en la membrana, es la base de la sensibilidad al voltaje de estos canales. Estudios de mutagénesis dirigida disminuyendo la carga positiva de esta región dan como resultado disminución de la sensibilidad al voltaje en la activación de estos canales (Papazian y cols., 1991; Aggarwal y MacKinnon, 1996). Además, esta estructura primaria del canal se repite en las distintas familias de canales iónicos como se observa en la figura 4. Sin embargo, además del sensor de voltaje, existen otras regiones del canal conservadas que también están involucradas en los cambios conformacionales del canal respecto al voltaje como aminoácidos del segmento S2, el dominio T1 o el segmento S5 (Seoh y cols., 1996; Minor y cols., 2000). Los dominios implicados en el mecanismo de apertura (*gating*) se discutirán más adelante.

En el extremo amino terminal se encuentra el dominio T1 formado por unos 100 aminoácidos que conforma, conjuntamente con el resto de dominios T1 de las subunidades γ del canal, una plataforma anular con un estrecho poro cargado positivamente (Kreusch y cols., 1998). Este poro sin embargo, no es la entrada de los iones potasio al canal, sino

Canales de K⁺	
Shaker	R V I R L V R V F R I F K L S R H S K G L
Shab	Q V F R I M R I L R V L K L A R H S T G L
Shaw	E F F S I I R I M R L F K V T R H S S G L
Shal	F V T R V F R V F R I F K F S R H S Q G L
Canales de Na⁺	
Nav1	S A L R T F R V L R A L K T I S V I P G L
Nav2	P T L Q T A R T L R I L K I I P L N Q G L
Canales de Ca²⁺	
	S V L R C I R L L R L F K I T K Y W T S L
Secuencia consenso	R X X R X X R X X K X X

Figura 4. Secuencia de aminoácidos segmento S4 de distintos canales iónicos. En negro los aminoácidos con cargas positivas.

que estos acceden al interior por las aberturas laterales que quedan entre el tetrámero de dominios T1 y los segmentos transmembrana. Estas aberturas se aprecian en la imagen de microscopía electrónica de un canal *Shaker* obtenida a una resolución de 2,5nm (Figura 5). En ella se observan dos estructuras tetraméricas unidas. La estructura mayor (300kDa), la conforman los segmentos transmembrana del canal. La estructura de menor tamaño (100kDa), la forman los dominios T1. Entre ambas estructuras se observan ventanas por donde accederían los iones al interior del canal (Sokolova y cols., 2001). En cuanto a la función, este dominio está implicado en la tetramerización de las subunidades γ (Li y cols., 1992; Xu y cols., 1995). Además, esta estructura serviría como plataforma para la asociación de las subunidades γ reguladoras a las subunidades γ (Gulbis y cols., 2000). Esta idea viene reforzada por los estudios de cristalización de los dominios T1 asociados a subunidades γ realizados en el

laboratorio de Roderick MacKinnon, en los se muestra esta unión T1-subunidad γ (Apartado 1.2.3.4.1, Figura 9).

1.2.3.1. Diversidad de los Kv

El primer canal de potasio se clonó, como ya se a mencionado, a partir del

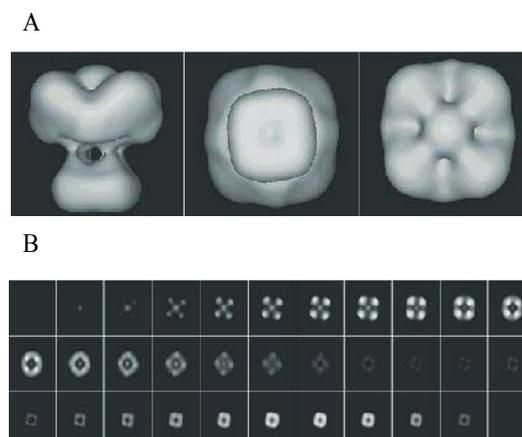


Figura 5. Estructura tridimensional de un canal *Shaker* por microscopía electrónica. A. Vista del canal transversal a la membrana, desde la parte intracelular y desde la parte extracelular. En esta imagen se aprecia la estructura tetramérica formada por los segmentos transmembrana (exterior) y los dominios T1 (interior). B. Secuencia de secciones del canal donde se aprecia el poro delimitado por las cuatro subunidades β . Extraído de Sokolova y cols., 2001.

mutante *Shaker* de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* (Papazian y cols., 1987). A partir de entonces comenzó la identificación de lo que es la familia de canales iónicos más diversa, los canales de potasio dependientes de voltaje. Inicialmente se clonaron cuatro genes de Kv en *Drosophila*: *Shaker*, *Shab*, *Shal* y *Shaw*. Dichos genes a su vez presentaban distintas isoformas por *splicing* diferencial. Los primeros canales que se clonaron en mamíferos se relacionaron con estas isoformas, de ahí que la subfamilia Kv1 se siga llamando *Shaker* y menos frecuentemente la Kv2 con *Shab*, Kv3 con *Shal* y Kv4 con *Shaw*. En humanos, la mayoría de las isoformas descritas están codificadas por genes diferentes permitiendo una marcada expresión diferencial en los diferentes tipos celulares. Actualmente en humanos se conocen 11 subfamilias de canales Kv con 38 miembros en total.

La diferente nomenclatura adoptada por los distintos laboratorios para nombrar a los diferentes clones conforme se iban identificando produjo gran confusión. Debido a esto, se propuso una nomenclatura sistemática que es ampliamente aceptada y que recientemente ha sido revisada (Chandy y cols., 1991; Chandy y Gutman, 1993; Gutman y cols., 2003). En esta nueva actualización, se han incluido los canales KCNQ y HERG dentro de esta clasificación tal como se muestra en la figura 5. Este sistema nombra a los canales según la estructura: Kv x . y Donde la “K” se refiere a

canal de potasio, la “v” a su dependencia del voltaje, “x” es el número que haría referencia a la familia génica, e “y” numera los canales de cada subfamilia en el orden conforme se han clonado.

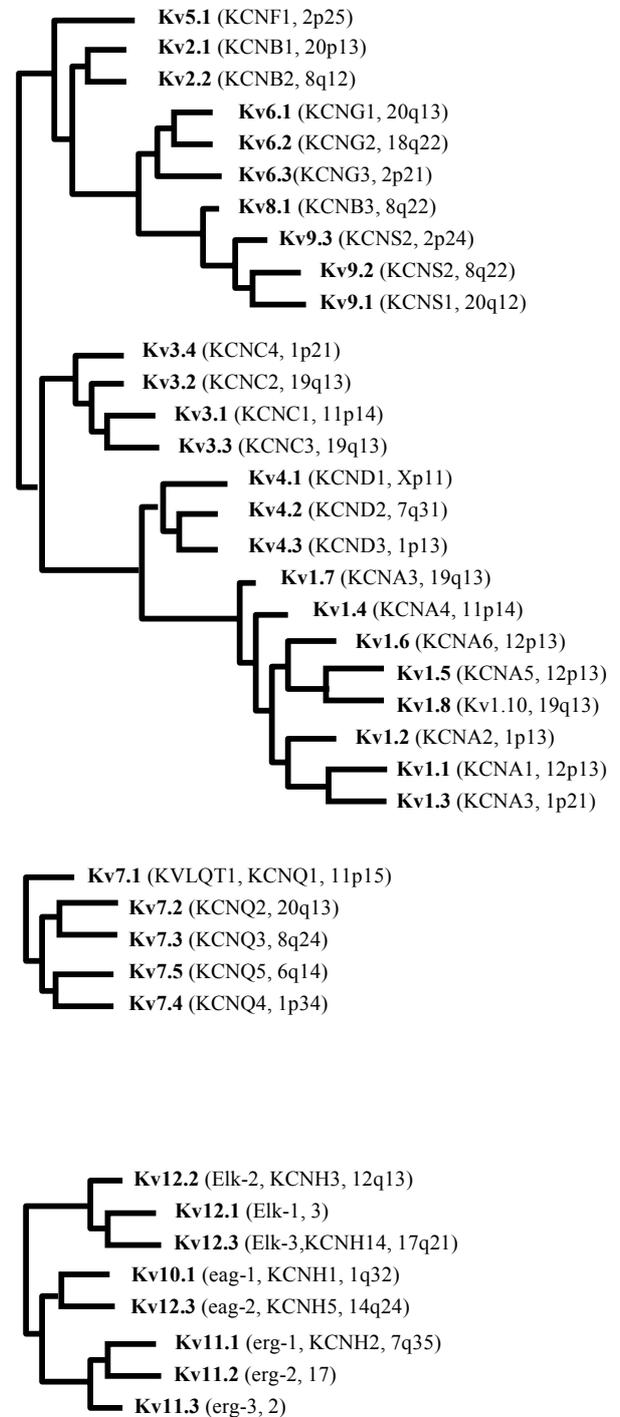


Figura 6. Árbol filogenético de los canales Kv. Para el análisis se ha utilizado la región hidrofóbica central. Extraído de Gutman y cols., 2003.

Además de la gran cantidad de canales Kv existentes, esta diversidad se ve incrementada en el proceso de tetramerización. Como ya se ha comentado estos canales los conforman cuatro subunidades γ , sin embargo los complejos que generan pueden ser homo o heterotetraméricos (Christie y cols., 1990; Isacoff y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1990). Estos últimos se restringen a miembros de la misma subfamilia. La región implicada en esta asociación específica de subfamilia, es el dominio T1 de las subunidades γ . Por un lado, esta estructura no es imprescindible para que se dé la formación del complejo, ya que sería la región del poro la que permitiría la tetramerización (Tu y cols., 1996); sin embargo, los aminoácidos expuestos en la interfase de cada dominio T1 son específicos de cada subfamilia e impiden la formación de complejos híbridos entre ellas (Li cols., 1992; Xu y cols., 1995; Bixby y cols., 1999). Una excepción a esta regla son los canales heteroméricos con las subunidades γ no conductoras. Estas subunidades se agrupan en distintas subfamilias (Kv5, Kv6, Kv8, Kv9) y necesitan formar heterotetrámeros con miembros de otras subfamilias para generar canales funcionales (Hugnot cols., 1996; Post y cols., 1996; Salinas y cols., 1997). Estas isoformas no son funcionales principalmente por cambios en aminoácidos del segmento S6 conservados en el resto de subfamilias. La asociación de estas subunidades, también llamadas

moduladoras, se ha descrito principalmente con miembros de la subfamilia *Shab* (Kv2), produciendo cambios en la actividad de estos canales (Salinas y cols., 1997; Hulme y cols., 1999).

Por otro lado, según estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos, en la misma subfamilia existen complejos heteroméricos predominantes y otros que no se detectan *in vivo*. Así por ejemplo, mientras que en la materia gris del sistema nervioso humano se detecta heterotetrámeros formados por Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 y Kv1.4, en la materia blanca sólo se detecta asociación entre Kv1.1 y Kv1.4. Estudios similares han detectado distintas asociaciones de isoformas dependiendo del tejido y la especie analizada (Wang y cols., 1993; Shamotienko y cols., 1997; Koch y cols., 1997; Coleman y cols., 1999).

La relación estequiométrica de las subunidades que integran los heterotetrámeros determinan las propiedades del canal, es decir, la activación e inactivación de este, la regulación a la que está sometido, sensibilidad al voltaje y la expresión en superficie (Christie y cols., 1990; Isacoff y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1990; Sobko y cols., 1998; Manganas y Trimmer, 2000; Coma y cols., 2002; Zhu y cols., 2003).

1.2.3.2. Mecanismo de apertura del canal (*gating*)

Diferentes aproximaciones se han realizado para entender el mecanismo por el cual el cambio de potencial de la membrana provoca un cambio de conformación en el canal produciendo la apertura de éste. Como se ha mencionado anteriormente, el segmento S4 parece ser el sensor de voltaje y su movimiento respecto al potencial, el responsable del cambio conformacional. En este proceso existe una corriente previa a la conducción de iones por parte del canal, llamada *gating current*, la cual se relaciona con el movimiento de cargas propias del canal durante la apertura de este (Armstrong y Bezanilla, 1973). En concreto, en el mecanismo de apertura de un canal *Shaker* se mueven 13 cargas netas a través del campo eléctrico (Schoppa y cols., 1992). Así mismo se conoce que son las cuatro cargas positivas más exteriores del segmento S4 de cada subunidad las que participan en esta *gating current* (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh y cols., 1996). El resto de cargas del segmento S4 estarían implicadas en la estructura de la proteína. Existen además evidencias del movimiento de S4 hacia el exterior durante la despolarización de la membrana (Larsson y cols., 1995; Yusaf y cols., 1996; Baker y cols., 1998). Sin embargo, el entorno proteico en el que se mueve este segmento, su interacción con lípidos, o las interacciones entre S4 y el resto de

segmentos transmembrana son actualmente motivos de discusión.

MacKinnon y colaboradores presentaron en 2003 la estructura obtenida por cristalografía del canal KvAP, un canal dependiente de voltaje de una arquea, *Aeropyrum pernix* (Jiang y cols., 2003). Este canal tiene una secuencia similar a otros canales Kv. La cristalización se llevó a cabo en presencia de detergente y formando complejos con fragmentos Fab que estabilizaban la estructura, dirigidos contra el bucle entre los segmentos S3 y S4. En líneas generales en la estructura que presentó este grupo los segmentos S5 y S6, es decir la parte que corresponde al poro, presentan una disposición similar a la estructura de KscA. Sin embargo, el resto de segmentos no se disponen transversales a la membrana. El bucle S1-S2 está inmerso en un ambiente lipídico, el segmento S4 se encuentra en la interfase membrana-citoplasma y forma una pala junto a un fragmento del segmento S3. Esta pala sería el sensor de voltaje que, en este modelo, atravesaría de lado a lado la bicapa lipídica frente a la despolarización de la membrana generando las *gating currents*. Otro dato importante es que el segmento S4 y S5 no interactúan más que por el bucle que los une. Según este modelo, la pala sensor de voltaje estaría conservada en todos los Kv. Experimentos de biotilización a ambos lados de la membrana realizados en este estudio sugieren un mecanismo de apertura del canal en el que la pala atraviesa la

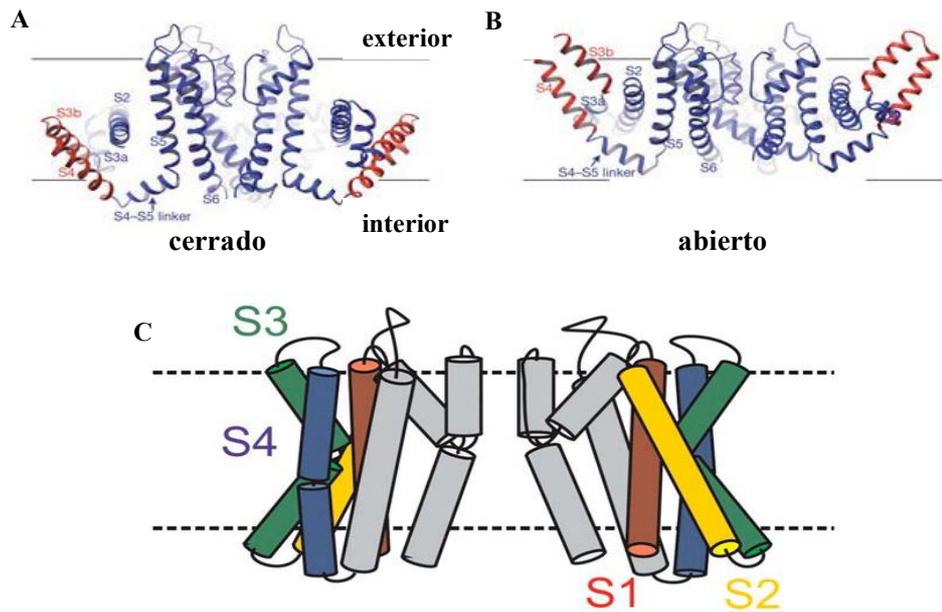


Figura 7. Representación del movimiento del sensor de voltaje. A. y B. estado cerrado y abierto según el modelo de MacKinnon. En rojo la pala sensor de voltaje. Extraído de Jiang y cols., 2003 C. Configuración del canal KvAP según Cuello y cols., 2004.

membrana tal como se muestra en la figura 7 (Jiang y cols., 2003).

Sin embargo, aunque esta estructura podría ser característica del canal KvAP, no parece que pueda aplicarse al resto de canales Kv. Inmediatamente a la publicación del nuevo modelo surgieron las primeras réplicas en las que se recopilaban datos que contradecían esta estructura para los Kv y se presentaban otros que ponían en duda la validez del modelo KvAP (Cohen y cols., 2003; Lainé y cols., 2003; Cuello y cols., 2004; Bezanilla, 2005). Si bien no se descartaba que esta estructura pudiese ser cierta para el canal KvAP, si se argumenta que el procedimiento de cristalización podría no ser el adecuado para estudiar la estructura de estos canales en su conformación nativa. En estas revisiones se critica con dureza la presencia del bucle S1-

S2 dentro de la membrana, la idea de la pala S3-S4 que ha de atravesar toda la membrana y la ausencia de interacciones entre S4 y los segmentos que conforman el poro. Esto provocó una reinterpretación de los resultados cristalográficos por parte del laboratorio de donde procede el modelo (MacKinnon, 2004), donde ya S1 y S2 se sitúan transversales a la membrana.

Un nuevo modelo de KvAP más reciente, parece consensuar los datos que se tenían hasta el momento del sensor de voltaje y mecanismo de apertura, con algunos de los datos aportados por el trabajo de MacKinnon (Cuello y cols. 2004). Esta nueva aproximación se ha realizado utilizando resonancia electrónica paramagnética en unos 140 canales KvAP en estado abierto inactivo mutados con un residuo de cisteína sustituyendo cada uno

de los aminoácidos de la región sensible a voltaje. La estructura obtenida se muestra en la figura 5, donde se ve que presenta una distribución transmembrana clásica de los distintos segmentos, con la diferencia de mostrar el segmento S4 en la interfase lípido-proteína pero con las cargas protegidas del ambiente lipídico. Otra novedad en este nuevo modelo es que se sitúa el segmento S1 envuelto entre el resto de segmentos y en contacto con el sensor de voltaje y el poro. La validez de esta nueva estructura está aún en discusión.

1.2.3.3. Mecanismo de cierre de los canales Kv

Como respuesta a una despolarización de membrana prolongada los canales de potasio dependientes de voltaje restringen el movimiento de iones a través del poro mediante el proceso de inactivación. En estos canales se distinguen dos tipos de inactivación, tipo N y tipo C. Mientras que la inactivación tipo N ocurre en los primeros milisegundos después de la apertura, la inactivación tipo C es más lenta.

1.2.3.3.1. Inactivación rápida o tipo N

En las primeras aproximaciones al estudio de la inactivación tipo N que se da tanto en canales de Na⁺ como de K⁺, se vio que ésta podía ser eliminada por acción de proteasas en el lado intracelular (Armstrong y cols., 1973), que era mimetizada por

derivados del tetraetilamonio (TEA) (Armstrong, 1969) y que tenía cierta dependencia de voltaje (Armstrong y Bezanilla, 1977; Aldrich y cols., 1983). Estos primeros estudios desembocaron a finales de los setenta en el modelo de “bola y cadena” (Armstrong y Bezanilla, 1977). Según este modelo la inactivación se produciría por la existencia una bola de inactivación que bloquearía el canal por la parte interna, y que estaría unida a éste por una cadena de aminoácidos (Figura 7).

El dominio de inactivación de los canales Kv se encuentra en los primeros veinte aminoácidos del extremo N terminal de la subunidad γ (Hoshi y cols., 1990; Zagotta y cols., 1990) y en las subunidades γ reguladoras (Rettig y cols., 1994). La posición de los aminoácidos de este dominio no es tan importante como que existan dos regiones, una hidrofóbica que incluiría los 10 primeros aminoácidos, seguida de una región con cargas positivas (Murrell-Langnado y Aldrich, 1993).

La idea de que este dominio interacciona directamente con el poro viene soportada por una serie de evidencias: la inactivación sólo ocurre una vez el canal se abre (Zagotta y Aldrich, 1990), sólo es necesaria la unión de un dominio de inactivación aunque existen cuatro por canal (uno de cada subunidad) (MacKinnon y cols., 1993; Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995), altas concentraciones de potasio extracelular reducen la inactivación, como indicando que la entrada de éste expulsaría del poro el dominio de

inactivación (Demo y Yellen, 1991) y por último, esta inactivación se mimetiza con el bloqueo del canal con aminos cuaternarias por la parte citoplasmática, las cuales se ha descrito que se unen al poro (Armstrong, 1971; Choi y col., 1991).

Los primeros estudios estructurales de los canales en los que se mostraba la existencia de los dominios T1 y las regiones internas del poro, pusieron en duda el modelo de “bola y cadena” por los cambios conformacionales que se tendrían que dar para que la bola llegase a la cavidad del poro (Aldrich; 2001). Sin embargo, estudios en el laboratorio de MacKinnon con KcsA y aminos cuaternarias lo confirmaron con algunas nuevas aportaciones. Según este nuevo modelo el extremo N-terminal se elongaría al introducirse por las ventanas que existen entre los segmentos T1 y el poro, de tal forma que los aminoácidos cargados positivamente interaccionarían con la conexión T1-S1 que posee varios aminoácidos cargados negativamente, y los tres primeros aminoácidos de la parte hidrofóbica, se unirían en la cavidad del poro (Zhou y cols., 2001).

Esta inactivación es característica de determinadas subunidades γ de la familia Kv como son Kv1.4, Kv3.3, Kv3.4 y los miembros de la familia Kv4. La rapidez con la que se reduce el flujo de salida de potasio hace que la corriente de estos canales se denomine transitoria de salida (*transient outward*) o de tipo A (Deal y cols. 1996; Snyders, 1999). Sin embargo,

las subunidades γ auxiliares que puedan estar presentes en el complejo de membrana también son capaces de inducir esta inactivación (Heinemann y cols., 1995; Wang y cols., 1996).

1.2.3.3.2. Inactivación lenta o tipo C

La inactivación tipo C, además de ser más lenta que la tipo N, se origina por cambios conformacionales de la parte externa del poro tal como se representa en la figura 7 (Yellen y cols., 1994; Liu y cols., 1996). El grado de inactivación

Figura 8. Representación de las tres conformaciones de cierre del canal. En el centro del diagrama se representa el canal abierto a partir de las hélices internas que corresponden a S6 (gris) y los segmentos del filtro (verde). En la parte superior, la conformación cerrada del poro según la cristalización de KcsA. En la parte inferior las inactivaciones lenta y rápida. En rojo se representa movimientos de cierre. En azul se representa la obturación rápida del poro. Extraído de Yellen, 2002.



depende de la ocupación de un lugar de unión para iones potasio en la parte externa al poro, de tal forma que este sitio ha de quedar libre para que la inactivación proceda (Lopez-Barneo y cols., 1993; Baukrowitz y Yellen, 1995). El aumento de la concentración extracelular de potasio o la presencia de TEA disminuyen este tipo de inactivación ya que en ambas condiciones existe una unión al lugar externo que estabiliza la salida de potasio (Choi y cols., 1991; López-Barneo y cols., 1993). Se considera pues que el filtro de selección actúa también como una compuerta con distintas conformaciones y que el sitio externo de unión al potasio favorece la no inactivación del canal (Yellen, 1998; Berneche y Roux, 2005). Una prueba de ello es que la eliminación de cationes del medio externo desemboca en la pérdida de conductancia del canal (Pardo y cols., 1992; López -Barneo y cols., 1993; Jäger y cols., 1998).

Se han descrito aminoácidos clave que determinan el grado de inactivación tipo C y que se sitúan, tanto en la parte externa del poro del canal, como en residuos formadores del poro (López-Barneo 1993; Heginbotham y cols. 1994; Yang y cols., 1997; Ortega-Sáez y cols., 2000).

Por otro lado, la inactivación tipo C se ve incrementada por la presencia de bloqueadores por la parte interna del poro, que disminuyen la conductancia a través del poro, disminuyendo por tanto la unión de potasio a la parte externa del poro. De esta

forma, la inactivación tipo N incrementa la inactivación tipo C (Baukrowitz y Yellen, 1995). En ambos casos el grado de inactivación es independiente de voltaje a potenciales en los que la activación es completa, lo que sugiere que, al igual que la inactivación tipo N, la inactivación C es un proceso acoplado a la activación.

El paso de canal inactivo a canal deactivado o cerrado, capaz de abrirse de nuevo frente a una despolarización, es un proceso que depende de tiempo. Sin embargo, la exposición a potenciales hiperpolarizantes facilita el paso de canal inactivo a canal cerrado; en este proceso pueden estar involucrados la disposición de los iones dentro de la boca del poro (Ortega-Sáez y cols., 2000) y también el acoplamiento a los cambios conformacionales del sensor de voltaje (Olcese y cols. 1997).

1.2.3.4. Subunidades auxiliares del complejo

El complejo funcional de los canales iónicos está formado por subunidades formadoras del poro, subunidades γ , y subunidades auxiliares que confieren al canal distintas propiedades como cambios en la inactivación, en el mecanismo de apertura y cierre (*gating*) o promoviendo la expresión en la superficie celular. La purificación de los primeros canales de sodio evidenció que los canales iónicos se componían de distintas subunidades con distinto tamaño (Beneski y

Catterall, 1980). A finales de los años ochenta ya se tenía un conocimiento extenso de las subunidades γ de canales de sodio y calcio, tanto de la estructura primaria de estas subunidades, como de la función que desempeñaban (Catterall, 1988). Sin embargo en el caso de los canales de potasio, no fue hasta 1992 que se aisló la primera subunidad γ al copurificarla con canales Kv1 aislados con la dendrotoxina (Parcej y cols., 1992). Esta primera subunidad auxiliar era citoplasmática y mostraba cómo los canales de potasio respondían al patrón de complejos heteroméricos que ya se había descrito para canales de sodio y calcio. En estos complejos existen subunidades capaces de formar el poro y generar corriente, en la mayor parte de los casos, y subunidades auxiliares que pueden ser citoplasmáticas o transmembrana que modifican la actividad del canal. Esta segunda clase de subunidades auxiliares con dominio transmembrana también existe en los canales de potasio y de hecho fueron descubiertas antes de las subunidades citoplasmáticas. En 1988 Takumi y colaboradores aíslan la proteína MinK (IsK), la cual era capaz de generar corrientes aunque sorprendentemente sólo poseía un segmento transmembrana. Esta proteína, que rompía todos los esquemas de estructura-función que se tenían hasta el momento, resultó ser una subunidad auxiliar del canal de potasio Kv7.1, y juntos, eran responsables de la corriente cardíaca de rectificación tardía lenta

(Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996). MinK forma parte de una familia de subunidades auxiliares llamada MiRPs (*MinK-Related Peptides*).

1.2.3.4.1. Subunidades Kv β

A partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la primera subunidad Kv γ purificada se aislaron los primeros ADNc codificantes de subunidades Kv γ en cerebro de rata, y desde entonces, se han identificado diversos genes para estas proteínas (Scott y cols., 1994; Rettig y cols., 1994). Existen tres subfamilias de subunidades Kv γ , la familia Kv β 1 esta formada por tres miembros que provienen de un mismo gen y se generan por *splicing* alternativo Kv γ 1.1, Kv γ 1.2 y Kv γ 1.3 (Rettig y cols. 1994). La subfamilia Kv β 2 tendrían un solo miembro, Kv γ 2.1 (Scott y cols., 1994) y la subfamilia Kv β 3 tendría dos miembros provenientes del mismo gen llamados Kv γ 3 y Kv γ 4 (Heinemann y cols., 1996; Fink y cols., 1996). Este último, Kv γ 4, considerado en un principio como producto de un gen distinto ahora se incluye dentro de la subfamilia Kv γ 3. Las subunidades γ son proteínas hidrofílicas, por tanto citoplasmáticas, que comparten un núcleo altamente conservado, siendo en el extremo N-terminal donde presentan las mayores diferencias. La región carboxilo terminal, la más conservada, es por donde se da la asociación con las subunidades γ (Wang y cols., 1996). La subunidad γ a su vez

interacciona con la subunidad γ por el dominio T1 tal como se muestra en la figura 9, generándose un octámero compuesto de cuatro subunidades γ y cuatro subunidades β (Gulbis y cols., 2000). Esta interacción se da temprano en la vía de biosíntesis, formándose el complejo γ - γ en el retículo endoplasmático (Shi y cols., 1996; Nagaya y Papazian, 1997).

Una de las propiedades más aparentes que confieren las subunidades $Kv\gamma$ es el aumento de la cinética de inactivación. Tanto la familia $Kv\gamma 1$ como la subfamilia $Kv\gamma 3$ inducen rápida inactivación, tipo N, siguiendo el modelo de “bola y cadena” anteriormente descrito

(Martens y cols., 1999; Hanlon y Wallace, 2002).

A estas subunidades además se les ha asignado otro tipo de funciones como su posible papel como chaperonas ya que aumentan la expresión en la superficie de la membrana celular de los canales (Shi y cols., 1996; Fink y cols., 1996). Estas proteínas ayudarían en el plegamiento y ensamblaje de las distintas subunidades incrementando así el paso de retículo endoplasmático al aparato de Golgi. Por otro lado, se ha propuesto que estas subunidades podrían desempeñar un papel como sensores redox, ya que según la secuencia de aminoácidos, estas

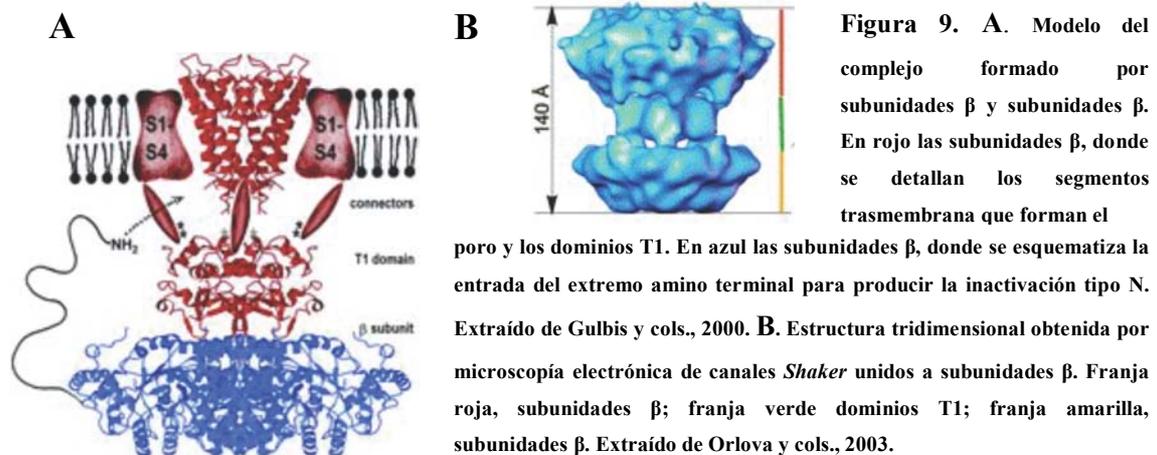


Figura 9. A. Modelo del complejo formado por subunidades β y subunidades γ . En rojo las subunidades β , donde se detallan los segmentos transmembrana que forman el poro y los dominios T1. En azul las subunidades γ , donde se esquematiza la entrada del extremo amino terminal para producir la inactivación tipo N. Extraído de Gulbis y cols., 2000. B. Estructura tridimensional obtenida por microscopía electrónica de canales *Shaker* unidos a subunidades β . Franja roja, subunidades β ; franja verde dominios T1; franja amarilla, subunidades γ . Extraído de Orlova y cols., 2003.

(Rettig y cols., 1994; Heinemann y cols., 1995). Sin embargo, las funciones son diversas y no todas las subunidades γ presentan las mismas. En este sentido, se ha descrito que producen otro tipo de cambios en la actividad de los canales como la apertura a potenciales más negativos, la disminución de la deactivación, el incremento de la inactivación tipo C o cambios en la amplitud de la corriente

subunidades pertenecerían a la superfamilia de las oxidoreductasas. De hecho, en la estructura cristalina, $Kv\gamma 2.1$ tendría un sitio de unión al cofactor NADPH, sin embargo se desconoce el sustrato sobre el que actuaría (Gulbis y col., 1999). Se ha propuesto que estas subunidades podrían acoplar el estado redox celular a la función del canal. Esto se ha visto en el caso de la subunidad $Kv\gamma 1.2$ y el canal $Kv4.2$, donde

canal adquiere sensibilidad al oxígeno en presencia de la subunidad auxiliar (Pérez-García y cols., 1999). Sin embargo este mecanismo no es general. Por otro lado, se ha demostrado que mutaciones en la zona de unión al cofactor NADPH afectan a la función de las subunidades γ promoviendo el tráfico del canal pero no a su acción sobre la inactivación del canal (Peri y cols., 2001; Campomanes y cols., 2001).

La asociación entre subunidades beta y canales Kv mayoritariamente se da con la subfamilia Kv1. Además, las interacciones γ - γ son selectivas, de tal forma que sólo se producen determinadas combinaciones de ensamblaje (Sewing y cols., 1996; Nakahira y cols., 1996). Por otra parte, la presencia de distintas subunidades beta en un mismo complejo es posible, sin embargo existen ciertas subunidades con un carácter dominante. Así se ha visto que la presencia de la subunidad Kv γ 2.1 inhibiría la inactivación producida por las subunidades Kv γ 1 (Xu y Li, 1997).

1.2.3.4.2. Subunidades MiRPs

Estas proteínas están formadas por un segmento transmembrana con el extremo N-terminal extracelular y el extremo C-terminal intracelular. Sin embargo, al no existir estructura cristalina que muestre la disposición de estas subunidades en el complejo del canal existe controversia al respecto. Mediante análisis de mutagénesis con cisteínas y de sensibilidad a toxinas se ha intentado estudiar si el segmento

transmembrana de estos péptidos se encuentra próximo al poro o es integrante del filtro de selección. Ambas opciones siguen en debate (Tai y Goldstein, 1998; Tapper y George, 2001; Kurokawa y cols., 2001). Sobre lo que existe sin embargo más acuerdo es en que el complejo del canal se combinan dos MiRPs con cuatro subunidades γ (Chen y cols., 2003).

El extremo carboxilo terminal de estos péptidos tiene un papel funcional de relevancia en la acción sobre las subunidades γ . Una de las variantes del síndrome *long QT* está asociada a una mutación puntual en esta región de la subunidad MinK; reduciéndose drásticamente la corriente I_{Ks} cardiaca (Splawski y cols., 1997; Sesti y Goldstein, 1998). La delección completa de esta región altera dramáticamente la función de MinK pero no evita la formación del complejo multimérico (Tapper y George, 2000). Otra región de interés parece ser una secuencia de tres aminoácidos clave en la región transmembrana de estas proteínas que determinaría los cambios de *gating* en el complejo. La acción diferencial de MinK con MiRP2 sobre el canal Kv7.1 radica en esta secuencia (FTL en MinK frente a TVG en MiRP2). Mientras que MinK provoca una corriente de activación lenta, MiRP2 lleva a Kv7.1 a generar una corriente de activación rápida con un componente independiente de voltaje (Melman y cols., 2001; Melman y cols., 2002). Por último, la región amino terminal del péptido se ha relacionado con los cambios que estas

subunidades provocan en la deactivación del canal.

Hasta el momento, los estudios sobre estas proteínas auxiliares se han centrado en los canales cardiacos de las familias Kv7 y Kv11 (KCNQ y HERG). Sin embargo cada vez más, se evidencia que los miembros de la familia MiRP actúan sobre muchas otras subunidades γ : MiRP2 forma complejos con Kv2.1 y Kv3.1 en cerebro ralentizando la activación de estos canales (McCroassan y cols., 2003), MiRP3 actúa sobre miembros de la familia Shaker como Kv1.1 y Kv1.3 suprimiendo la corriente (Grunnet y cols., 2003) y también se ha visto que MiRP1 y MinK incrementan la corriente de Kv4.3 (Deschenes y Tomaselli, 2002). Esta familia de proteínas auxiliares presenta, si cabe, más incógnitas que las subunidades Kv γ , sin embargo, la diversidad de tejidos en los que se expresan (McCrossan y Abbott, 2004), puede ser un reflejo de su importancia a la hora de modular las corrientes de potasio.

1.2.3.4.3. Otras subunidades auxiliares

Existen otro tipo de subunidades auxiliares de reciente descubrimiento que interaccionarían con las subunidades γ incrementando su expresión en superficie o su actividad. Una familia de proteínas citoplasmáticas con alta homología a los sensores de calcio y que incluyen dominios de unión a este, se ha visto que interaccionan con los canales Kv4. Estas

proteínas denominadas KChIP (K^+ -*Channel interacting proteins*) son capaces de incrementar la densidad de corriente, desplazar el *gating* a potenciales más positivos, disminuir la inactivación y acelerar la recuperación de ésta (An y cols., 2000). El aumento de calcio intracelular aumentaría los efectos sobre la inactivación del canal (Deschenes y cols., 2002). Estas proteínas se unen mediante su extremo carboxilo terminal a los primeros treinta aminoácidos de extremo amino terminal de los Kv4 (Zhou y cols., 2004).

Una proteína citoplasmática que se une transitoriamente a los canales Kv promoviendo su expresión en superficie es la KChAP (K^+ -*Channel associated protein*). Esta proteína pertenece a una familia de proteínas de unión a factores de transcripción, pero es única en su unión a canales Kv. KchAP aumenta la amplitud de la corriente sin modificar la actividad de Kv1.3/2.1/2.2/4.3 y sin embargo no lo hace con Kv1.1/1.2/1.4/1.5/1.6/3.1 y canales de las subfamilias Kv7 y Kv10 (Kuryshhev y cols., 2000). Por otra parte se ha visto que interacciona con subunidades Kv γ (Kuryshhev y cols., 2001). Esta proteína se une al extremo amino de las subunidades γ , pero una vez en el canal está en superficie, ya no se detecta su presencia.

Otro tipo de proteínas auxiliares presentes en los complejos, que sin embargo ya no son específicas de los canales Kv, son las proteínas de anclaje y adaptadoras. Dentro de ellas, la familia de proteínas MAGUK (*Membrane Associated*

GUanilate Kinase) emerge como componente clave para la organización de los complejos en membrana. Se caracteriza por la presencia de tres dominios de interacción proteína-proteína PDZ (*Postsynaptic Disc large Zonula ocludens*), un dominio SH3, y otro dominio relacionado con las guanilato quinasas. Dentro de esta familia se encuentran miembros como PSD-95 (*Post Synaptic Density*) y SAP-97, para los que se ha descrito interacción con los canales Kv (Kim y Sheng, 1996; Burke y cols., 1999; Murata y cols., 2001; Folco y cols., 2004). Esta interacción se da a través de una secuencia presente en el extremo C-terminal de los canales (S/T-X-V/L) y los dos primeros dominios PDZ de las proteínas MAGUK. Sin embargo también se ha observado una secuencia en el dominio T1 de los canales que podría interactuar con los dominios PDZ aunque su función no está clara (Elsdtrom y cols., 2002). El papel de estas proteínas de anclaje sería facilitar la señalización entre los canales y distintos enzimas de las diversas vías de señalización (Godreau y cols., 2002; Folco y col., 2004), y distribuir y regular la abundancia de los canales (Sheng y Wyszynski, 1997; Tiffany y cols., 2005). Con esta función de aproximar moléculas participantes en una vía de señalización se ha descrito también la interacción de canales Kv con proteínas de anclaje o adaptadoras de quinasas. Los canales de potasio tienen distintas secuencias de fosforilación y su actividad

se ve influenciada por la acción de quinasas y fosfatasas. La presencia en el complejo de proteínas adaptadoras de quinasas puede ser determinante en la regulación y modulación de la actividad del canal. Así, dentro de la familia de proteínas de anclaje de la proteína quinasa A (AKAPs), se ha descrito cómo uno de sus miembros denominado “yotiao” se encuentra en el complejo formado por Kv7.1 y MinK en células cardíacas, acoplado tanto a la PKA (proteína quinasa A) como a la PP1 (fosfatasa 1) en el complejo para el correcto funcionamiento (Marx y cols., 2002). Por otro lado, proteínas de anclaje de la PKC (proteína quinasa C) como las ZIP (PKC-Zeta Interacting Proteins), son capaces de asociar la PKC con las subunidades auxiliares Kv γ 2 en células del sistema nervioso (Gong y cols., 1999).

Si bien el complejo funcional de los canales de potasio sigue considerándose el formado por las subunidades γ , cada vez más se hace evidente que las entidades moleculares responsables de las corrientes de potasio son complejos multiméricos. La existencia de distintas subunidades actuando sobre la actividad del canal, es una muestra de la fina regulación a la que se somete la actividad de estas proteínas, siendo su composición variable según el tejido, el tipo celular, y dentro de éste, según la regulación temporal y espacial.

1.2.3.5. Biología celular de los canales Kv

El ensamblaje de las distintas subunidades γ , y de éstas con las subunidades α , se da en el retículo endoplasmático durante los primeros pasos de la biogénesis de estos canales (Shi y cols., 1996; Nagaya y Papazian, 1997). Una vez formado el complejo funcional, la maduración de los canales Kv requiere del transporte desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi. Los complejos inmaduros contienen glucosilaciones en residuos de Asn que sufrirán modificaciones en el Golgi formándose sacáridos de composición compleja (Nagaya y Papazian, 1997). La calnexina es una chaperona residente en retículo que se une al canal glucosilado aumentando su estabilidad y favoreciendo el paso a Golgi (Khanna y cols., 2001). La glucosilación en algunos casos modifica la actividad del canal, como se ha demostrado para Kv1.1 (Watanabe y cols., 2003), puede determinar la vida media de estas proteínas, como en el caso del canal *Shaker* (Khanna y cols., 2001; Watanabe y cols., 2004), o ser necesaria para la expresión en superficie del canal como se ha visto para Kv10.1 (Zhou y cols., 1998).

En la regulación de la expresión en superficie de los canales Kv, además de la regulación génica, existen mecanismos postraduccionales que determinan la cantidad de complejos en la membrana plasmática. En concreto los distintos canales Kv presentan diferentes programas

de tráfico a membrana. El punto que limita la expresión en superficie de las proteínas de membrana suele ser el paso del retículo al Golgi (Lodish y cols., 1983). Esta retención intracelular en retículo se ha descrito en canales como Kv1.1, Kv1.2, y Kv1.6. Por otro lado, Kv1.4 es un canal con una buena expresión en superficie, observándose principalmente en Golgi y en membrana plasmática (Manganas y cols., 2001). Si bien en un principio se apuntaba a las subunidades γ como determinantes de la alta expresión en superficie de los complejos Kv, siendo esto cierto para algunas subunidades γ (Shi y cols., 1996; Accili y cols., 1997; Campomanes y cols., 2002); con el tiempo se ha visto que todos los canales Kv1 probablemente llevan asociadas subunidades γ . Además todas ellas tienen efectos similares promoviendo la expresión en superficie, puesto que esta acción se da por el dominio C-terminal común a todas (Campomanes y cols., 2002). Por otra parte, se ha visto que en la secuencia de las subunidades γ existen motivos de retención dominantes que establecen el tráfico del canal.

Las subunidades γ presentan motivos de retención en retículo distintos a las secuencias de localización en retículo (RXR, KDEL). En el extremo C-terminal se encuentra la secuencia VXXSL, cuyas variaciones entre subunidades γ explicarían en parte distintos la diversidad de patrones de expresión de los canales y cuya delección impide la expresión en superficie de estas proteínas. Esta región tiene efectos

positivos para una alta glucosilación del canal en Golgi y el transporte a membrana (Li y cols., 2000; Zhu y cols., 2001). Por otro lado existen secuencias señal dominantes en el tráfico localizadas en la región del poro. Estas secuencias pueden impedir el transporte eficaz de retículo a Golgi como es el caso de Kv1.1, y son dominantes frente a la secuencia VSXXL (Zhu y cols., 2001; Manganas y cols. 2001). Entre estos dos motivos, región del poro y VSXXL, existe una interdependencia, de tal forma que existen determinados aminoácidos en la región del poro necesarios para los efectos de la secuencia VSXXL, como por ejemplo, la treonina 523 en Kv1.4 de rata (Zhu y cols., 2003). Además de estas señales existen otras que determinarían la vida media del canal, la interacción con chaperonas tipo KChAP y calnexina, o el nivel de glucosilación (Kuryshv y cols., 2000; Khanna y cols., Khanna y cols., 2001; Watanabe y cols., 2003; Zhu y cols., 2003; Manganas y Trimmer, 2004).

El tráfico resultante de la formación de complejos heteroméricos entre distintas subunidades γ dependerá de la combinación de las señales de tráfico de cada una de ellas, teniendo en cuenta que hay señales débiles y fuertes, y de la estequiometría del canal formado. Así por ejemplo, la combinación de un canal con fuerte señales de retención como Kv1.1 con un canal de gran expresión en superficie como Kv1.4 resulta en un canal con retención pero con alta glucosilación (Zhu y

cols., 2003). Cambios en la estequiometría entre ambas subunidades varían el tráfico en función de la subunidad más abundante (Manganas y Trimmer 2001).

1.2.3.5.1. Localización subcelular

Los canales iónicos no se distribuyen al azar en la membrana plasmática. De hecho, la localización específica de los canales iónicos en determinados dominios de membrana es esencial para el correcto funcionamiento celular. Teniendo como ejemplo las neuronas, se sabe que Kv2.1 localiza en agrupaciones densas en el soma celular y las dendritas proximales del hipocampo (Lim y cols., 2000). También se ha descrito que los canales de potasio dependientes de voltaje de la familia Kv1 localizan flanqueando los nódulos de Ranvier de los axones (Wang y cols., 1993), o que dos canales de corriente transitoria de salida como Kv1.4 y Kv4.2, localizan en diferentes regiones de la neurona, el primero a lo largo del axón y en el extremo presináptico, modulando la propagación del potencial de acción y la liberación de neurotransmisores, y el segundo en la zona somatodendrítica, regulando la excitabilidad de la membrana postsináptica (Copper y cols., 1998; Alonso y Widmer, 1997).

Las proteínas MAGUK, como PSD-95 y SAP-97, participan en la distribución en la membrana e inmovilización de los canales Kv. Como ya

se ha explicado previamente, interaccionan con los canales mediante dominios PDZ. La capacidad de agrupar canales puede ser debida a la existencia de varios dominios de interacción PDZ en cada proteína MAGUK y a la asociación entre dominios PDZ con el citoesqueleto (Reuver y Garner, 1998; Wu y cols., 1998). Por un lado, la asociación de estas proteínas con los canales se ha demostrado en células nativas tanto del sistema nervioso como del cardiovascular (Kim y cols., 1995; Muarata y cols., 2001; Laube y cols., 1996; Rasband y cols., 2004). Por otro lado, la cotransfección de estas proteínas con distintas subunidades y en células de mamífero lleva a la inmovilización y agrupación de los canales en la membrana plasmática (Kim y cols., 1995; Kim y Sheng, 1996; Tiffani y cols., 2000). Sin embargo, aunque PSD-95 sea abundante en el sistema nervioso y se haya demostrado su asociación con los Kv, no es imprescindible para que se de una correcta distribución de estos tal como se ve en ratones deficientes de esta proteína (Rasband y cols., 2004).

Estas proteínas MAGUK son capaces de dirigir a los canales iónicos a los microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas o *lipid rafts*. Se ha demostrado que PSD-95 es capaz de aumentar la presencia de Kv1.4 en estos microdominios y que SAP-97 forma agrupaciones entre caveolina 3 y Kv1.5 (Wong y Schlichter, 2004; Folco y cols., 2004).

El interés en estas balsas lipídicas tiene su origen en un cambio de concepción de la organización de la membrana plasmática; del tradicional modelo del “mosaico de proteínas en un mar de fosfolípidos” se ha pasado a una apreciación cada vez mayor de la heterogeneidad lipídica de la membrana. La existencia de microdominios lipídicos sugiere que la interacción lípido-proteína puede determinar la localización de los canales en membrana y su función. Las estructuras de balsas lipídicas o *lipid raft* están enriquecidas en esfingolípidos y colesterol, estableciendo una fase diferente respecto a los fosfolípidos que los rodean, y siendo más estructuradas y menos fluidas (Harder y Simons, 1997; Brown y London, 1997). En estas estructuras se encuentran proteínas relacionadas con diferentes vías de señalización, como proteínas quinasa C, tirosinas quinasa y proteínas G, facilitando así la interacción entre moléculas participantes en una misma vía (Galbiati y cols., 2001). En cuanto a la diversidad de estas plataformas de membrana, parece que existen múltiples tipos según la presencia de proteínas específicas, datos ultraestructurales y variedad en la composición lipídica. Una de estas subpoblaciones de balsas lipídicas, caracterizada por la presencia de la proteína de adaptadora caveolina, son las caveolas. Los *lipid rafts* presentan dos características bioquímicas relevantes a la hora de aislarlos, presentan resistencia a la solubilización con detergentes y una

densidad de flotación baja (Brown y Rose, 1992).

Los canales iónicos pueden localizarse en estos microdominios. El primer canal que se describió asociado a *lipid rafts* fue Kv2.1 (Martens y cols., 2000). Este canal presentaba diferente actividad cuando estaba presente en estos dominios. Posteriormente, similar disposición y modificación de la actividad se ha encontrado en otros canales de potasio dependientes de voltaje como Kv1.3, Kv1.4 y Kv1.5, en canales de potasio de la familia Kir y en canales dependientes de calcio (Martens y cols., 2001; Hajdu y cols., 2003; Wong y Schlichter, 2004). Sin embargo, el mecanismo por el cual estas proteínas se dirigen a plataformas lipídicas no está claro. Una posibilidad es que los canales con sus proteínas asociadas favorezcan la formación de *rafts*. También se contempla que la disposición en estas plataformas podría ser energicamente favorable para estos canales. Lo que si se conoce es que las moléculas dirigidas a estos dominios suelen presentar cadenas laterales saturadas y por ello muchas de ellas tienen grupos acilo con palmitato o miristilato (Melkonian y cols., 1999). No es común en los canales este tipo de modificación postraducciona pero si en proteínas del complejo como KChIP y las MAGUK (Cho y cols., 1992; Takimoto y cols., 2002). En relación a que proteínas del complejo promuevan la asociación con *rafts*, ya se ha comentado que PSD-95 favorecería la presencia de

Kv1.4 en balsas lipídicas (Wong y Schlichter, 2004).

El papel que juegan estas balsas de colesterol en el caso de los canales no está claro, por un lado esta disposición sería un mecanismo de compartimentación de la superficie celular ante determinados estímulos, donde los canales interactúan 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 degradación (Simons e Ikonen, 1997; Martens y cols., 2004).

Por último, resaltar cómo la presencia de los canales en estos microdominios modula su actividad en gran medida. Estos cambios, que van desde cambios en la cinética de activación e inactivación hasta la supresión de la corriente generada por el canal, podrían producirse bien por interacción del canal con proteínas reguladoras existentes en las plataformas, o bien por interacciones directas lípido-proteína (Martens y cols., 2000; Martens y cols., 2001, Hajdu y cols., 2003; Bock y cols., 2003).

1.2.3.5.2. Degradación de los Kv

La vida media de los canales Kv varía dependiendo de cada subunidad γ y está altamente regulada por el grado de glucosilación (Khanna y cols., 2001; Watanabe y cols., 2003). En proteínas con alta glucosilación como Kv1.4, la estabilidad del complejo es relativamente

alta (~6h) frente a subunidades con menor glucosilación como Kv1.1 (~4h). Esta diferencia se agudiza si se estudia solamente el canal presente en superficie donde Kv1.4, que presenta un buen tráfico a membrana, tiene una vida media cuatro veces mayor a Kv1.1 (Watanabe y cols., 2003). Así mismo, el mecanismo de degradación de los canales dependerá en gran medida del tráfico y sublocalización que presenten. Los canales que presentan una mayor retención en retículo se degradan principalmente en el proteosoma, previa translocación retrograda desde el retículo al citoplasma (Kopito, 1997; Khanna y cols., 2001). Sin embargo, menos clara es la vía de degradación de los canales en superficie. La endocitosis de proteínas de membrana ocurre siguiendo varios mecanismos, algunos dependiendo de clatrina (Takei y Haucke, 2001), otros dependiendo de caveolina (Pelkmans y Helenius, 2002) y aún otros independientes de ambas proteínas (Nichols y Lippincott-Scvhwartz, 2001). Se han descrito canales Kv presentes en caveolas como Kv1.5 (Martens y cols., 2001), sin embargo esta localización no se ha relacionado con una vía de degradación. Además, esta distribución no es compartida por todos los canales Kv, y poco o nada se sabe del mecanismo general por el cual estas proteínas podrían internalizarse. Un mecanismo propuesto recientemente y válido para Kv1.2, es la señalización por tirosinas quinasas, que suprimen la corriente de los canales y provocarían la

endocitosis dependiente de dinamina (Nesti y cols., 2004). Se ha descrito que otros canales Kv son susceptibles de la acción de tirosinas quinasas como Kv1.3 y Kv1.5 (Holmes y cols., 1996; Fadool y cols., 1997). Aunque Kv1.3 parecería que no se internaliza tras la acción de las tirosinas quinasas según los primeros estudios realizados sobre el canal, recientemente se ha puesto en duda la metodología empleada y se propone un mecanismo similar al de Kv1.2 (Nesti y cols., 2004).

1.3. El canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3

Kv1.3 fue clonado por primera vez en cerebro de rata, donde se le llamó RCK3 (Stümer y cols., 1989), Kv3 (Swanson y cols., 1990) o RGK5 (Christie y cols., 1990). Posteriormente se clonó en cerebro de ratón y se le llamó MK3 (Grissmer y cols., 1990). Por otro lado este canal también fue clonado en linfocitos T de ratón (Chandy y cols., 1990), rata (Douglass y cols., 1990) y por primera vez en humano al cual se le llamó HGK5 y HLK3 (Attali y cols., 1992; Cai y cols., 1992). Todos estos clones codifican para el mismo canal de potasio que, con la nomenclatura estandarizada, pasó a llamarse Kv1.3. La distribución mayoritaria de esta proteína es en sistema inmunitario, donde se expresa en linfocitos T, linfocitos B y microglía (Cahalan y cols., 2001), y en sistema nervioso, con una localización

restringida al hipocampo, córtex piriforme y el bulbo olfatorio (Kues y Wunder, 1992).

1.3.1. Actividad

El umbral de activación de Kv1.3 se sitúa alrededor de los -50mV . Tras la despolarización, la corriente generada por Kv1.3 progresa de forma sigmoïdal de tal forma que a los 10ms alcanza el pico máximo y comienza a inactivarse con una constante de tiempo que ronda los 200-400ms. Este canal es muy dependiente de voltaje, con una pendiente en la curva de activación alrededor de los -6mV y un punto medio de activación cercano a los -35mV .

La inactivación de la corriente generada por Kv1.3 progresa con un ritmo intermedio entre las corrientes llamadas de salida transitoria (*transient outward*), con constantes de inactivación menores a 100ms, y las corrientes rectificadoras tardías (*delayed rectifier*), con constantes mayores a 1s (Grissmer y cols., 1990).

Además, la corriente de Kv1.3 presenta una acumulación de la inactivación durante episodios de despolarización repetidos debido a que la recuperación entre pulsos no es completa. Esta inactivación es de tipo C ya que la presencia de TEA extracelular la suprime e implica residuos de la parte externa del poro (Grissmer y Cahalan, 1989; Panyi y cols., 1995).

1.3.2. Composición del complejo

1.3.2.1. Heterotetrámeros

Kv1.3 forma complejos heteroméricos en el sistema nervioso humano. En un estudio realizado por Coleman y colaboradores se muestra cómo en la materia gris del sistema nervioso central Kv1.3 forma complejos tetraméricos junto con Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.4 (Coleman y cols., 1999). Sin embargo en la materia blanca esta subunidad no estaría presente en los complejos heteroméricos descritos. Por otro lado, en otro estudio realizado en

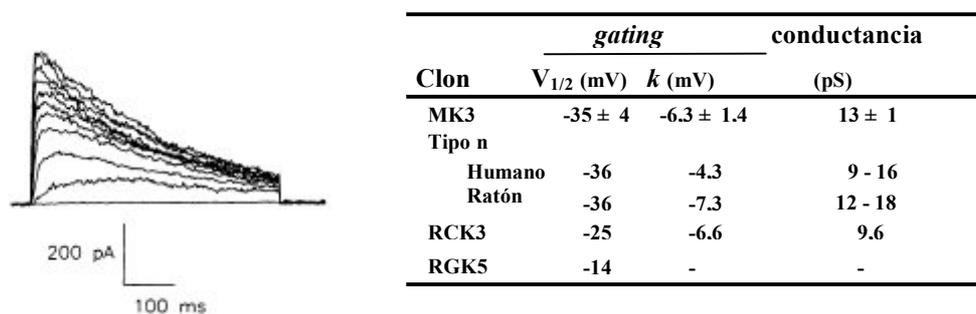


Figura 11. Comparación entre las corrientes generadas por los distintos clones de Kv1.3 expresados en oocitos de *Xenopus* con las corrientes n de linfocitos de ratón y humano. Gráfica de las corrientes de potasio generadas por MK3 en oocitos. El registro se ha realizado cambiando el potencial desde -50mV a $+50\text{mV}$ mediante incrementos de 10mV . Extraído de Grissmer y cols., 1990.

córtex bovino, se ha descrito que Kv1.3 formaría complejos híbridos con Kv1.2, Kv1.4 y Kv1.6 (Shamotienko y cols., 1997).

1.3.2.2. Subunidades beta

Los estudios de interacción entre Kv1.3 y subunidades beta auxiliares son escasos y contradictorios. La controversia existente entorno a la modulación que ejercen las subunidades γ sobre Kv1.3 se debe principalmente al desconocimiento de muchas de las variables que afectan a la interacción γ - γ y a que el procesado de estas proteínas en cada sistema de expresión es distinto.

La expresión de Kv1.3 en ovocitos de *Xenopus* con Kv γ 1.1 y Kv γ 2.1 conduce a un aumento de las corrientes generadas por el canal sin afectar a los parámetros cinéticos de éste. El efecto obtenido es más pronunciado en el caso de Kv γ 2.1 (McCormack y cols., 1999).

Kv γ 1.2 disminuye la constante de tiempo de la inactivación cuando se coexpresa con Kv1.3 en células HEK293 (Martel y cols., 1998). Sin embargo, en este mismo modelo, Kv γ 2 no tiene efectos aparentes sobre la actividad del canal.

En linfocitos T, donde Kv1.3 es el canal de potasio dependiente de voltaje mayoritario, se sabe que se expresan las subunidades auxiliares Kv γ 1.1 y Kv γ 2.1 (Auteri y cols., 1997). Estas subunidades además, incrementan su expresión al estimular los linfocitos con la citoquina

proliferativa IL2. Esta regulación sugiere, según los autores, que el aumento de corriente dependiente de voltaje que se observa en estos linfocitos proliferantes podría deberse a una mejora de la expresión del canal en membrana por el ensamblaje con subunidades γ .

1.3.3. Regulación a corto término

El análisis de la estructura primaria de Kv1.3 revela que posee diversas secuencias diana para la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína quinasa C (PKC), lo que sugiere que su actividad puede modularse mediante fosforilación (Cai y cols., 1992; Payet y Dupuis, 1992). Esta suposición se confirmó al inmunoprecipitar el canal a partir de linfocitos T, ya que la proteína que se obtiene se encuentra en estado fosforilado (Cai y Douglass, 1993). En estas células la acción conjunta de estas dos quinasas puede llegar a inhibir la corriente del canal (Payet y Dupuis, 1992). Sin embargo, también se ha demostrado que la sensibilidad de Kv1.3 a estas quinasas disminuye en el caso de la expresión heteróloga en células HEK293, lo que sugiere que la modificación de la actividad del canal por quinasas dependería de otros factores, como por ejemplo, la existencia de proteínas accesorias del complejo (Martel y cols., 1998). De hecho, la importancia de la existencia de subunidades auxiliares cobra fuerza al haber datos de otros autores donde se demuestra que la PKC es capaz de

incrementar la corriente generada por Kv1.3 y modificar el *gating* (Chung y Schlichter, 1997).

La fosforilación del canal por parte de tirosinas quinasas (TKs) también ha sido estudiada. Kv1.3, al igual que Kv1.2 y Kv1.5 (Timpe y Fantl, 1994; Peralta, 1995; Holmes y cols 1996), es sensible a la acción de estas quinasas y su fosforilación da lugar a la supresión de la corriente. Estos estudios se han hecho con tirosinas quinasas de la familia Src (Holes y cols., 1996; Fadool y cols., 1997) y con receptores con actividad tirosina quinasas, como los receptores de EGF e insulina (Bowlby y cols., 1997). Sin embargo, los residuos implicados en cada caso no son los mismos. Por otro lado, también se ha visto una interrelación entre la fosforilación entre PKC y TKs, de tal forma que la acción previa de la primera puede alterar el efecto de la fosforilación en tirosinas, mostrándose así la compleja regulación del canal (Strauss y cols., 2002). Cabe señalar también que la acción directa entre TKs de la familia Src y Kv1.3 es improbable ya que, a diferencia de otros canales como Kv1.5, no contiene el dominio de unión SH3. Sin embargo, en linfocitos T se ha visto que una proteína de la familia MAGUK, la hDlg, es capaz de unir la proteína quinasa p56lck con el canal (Hanada y cols., 1997). En el sistema nervioso se han descrito otras proteínas adaptadoras de tirosinas quinasas para Kv1.3 como son Grb10 y n-Shc (Cook y Fadool, 2002).

En cuanto a regulación a corto término también se ha descrito que la actividad de Kv1.3 podría ser dependiente de calcio. Se ha demostrado que la proteína quinasa II dependiente del complejo Ca^{2+} -calmodulina, que posee una secuencia diana parecida a la PKA, es capaz de inhibir la corriente de Kv1.3 en linfocitos T. La acción de esta quinasa podría ser clave, en la cascada de señalización por calcio, durante la activación y proliferación linfocitaria (Chang y cols., 2000).

1.3.4. Tráfico y localización subcelular

Recientemente se ha descrito que el tráfico de Kv1.3 es similar al de Kv1.4, es decir, con una buena expresión en superficie. Sin embargo, en este trabajo también se comenta que Kv1.3 se acumularía en regiones intracelulares de morfología distinta a retículo endoplasmático (O'connel y cols., 2005).

La compartimentación de las proteínas de membrana permite crear plataformas donde las vías de señalización convergen. Como ya se ha comentado, las balsas lipídicas de la membrana ricas en colesterol son destino de numerosas moléculas cuya actividad se ve modificada por las interacción proteína-proteína y lípido-proteína que tienen lugar en estos microambientes. Una de las proteínas cuya función se ve influenciada por su presencia en estos dominios es Kv1.3. En linfocitos T, donde este canal es mayoritario, se demostró que la manipulación del

contenido de colesterol de la membrana alteraba la actividad de Kv1.3 (Hajdu y cols., 2003), lo que sugería que este canal podía estar presente en *lipid rafts*. Recientemente se ha publicado que en expresión heteróloga, la movilidad de Kv1.3 en membrana se ve afectada por la depleción de colesterol (O'connel y Tamkun, 2005). Sin embargo los estudios que demuestran la presencia de este canal en *rafts* se realizaron en linfocitos T, donde se sitúa a Kv1.3 en distintas poblaciones de balsas lipídicas según el estado celular. De esta forma se ha visto que la inducción de la apoptosis promueve la movilización del canal a distintas poblaciones de *rafts* ricas en ceramida provocando su inhibición (Bock y cols., 2003). En estas células también se ha demostrado la proximidad de Kv1.3 con CD3, uno de los componentes de los receptores antigénicos (Panyi y cols., 2003). Por otro lado, la localización 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., 2004).

1.3.5. Farmacología del canal

Los estudios farmacológicos son esenciales para el conocimiento de la actividad de los canales iónicos. El descubrimiento de toxinas, como la tetrodotoxina y saxitoxina, y su utilización en el campo de la biofísica, demostró en los

años sesenta que los canales de sodio y potasio eran entidades moleculares separadas (Narahashi y cols., 1964; Hille, 1968). De hecho, la mayor parte del conocimiento actual de la arquitectura de los canales ha sido fruto de experimentos farmacológicos y uno de los objetivos más perseguidos en este campo es encontrar compuestos cada vez más potentes y selectivos. Por otro lado, siendo las funciones de los canales iónicos tan diversas y a la vez tan decisivas para el funcionamiento correcto del organismo, no es de extrañar que la fuente principal de inhibidores de canales esté en la naturaleza, y en concreto en las toxinas peptídicas.

Gran parte de los inhibidores específicos de Kv1.3 provienen de veneno del escorpión. Estos polipéptidos adoptan conformaciones definidas por tres o cuatro puentes disulfuro que se unen con gran afinidad al vestíbulo externo del poro de este canal (Aiyar y cols., 1995; Aiyar y cols., 1996). Una de las toxinas más selectivas para Kv1.3 proveniente del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* es la margatoxina, MgTx (Garcia-Calvo y cols., 1993), sin embargo otros miembros de la familia *Shaker* como Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6, también son bloqueados a concentraciones bajas de toxina. Además de las toxinas de escorpión, más recientemente se ha descubierto una toxina de la anémona *Stichodactyla helianthus* llamada ShK que es capaz de bloquear Kv1.3 a concentraciones de picomolar (Pennington y cols., 1996).

Variaciones sobre esta toxina en el laboratorio del Dr. George Chandy han llevado al desarrollo de un compuesto igual de potente, pero que presenta mayor especificidad por Kv1.3 que por otros canales de la familia *Shaker* (Kalman y cols., 1998). Este nuevo péptido recibe el nombre de ShK-Dap²². En la tabla se muestra el aumento de selectividad de esta nueva toxina.

Tabla 1. Selectividad de ShK y ShK-Dap²² sobre los canales Kv. Se muestran las IC₅₀ en pM ± error.

Canal	ShK	ShK-Dap ²²
mKv1.1	16 ± 3	1.800 ± 577
rKv1.2	9.000 ± 300	39.000 ± 3.200
mKv1.3	11 ± 1.4	23 ± 3
mKv1.4	312 ± 51	37.000 ± 11.000
hKv1.5	>100.000	>100.000
hKv1.6	165 ± 3	10.500 ± 900
mKv1.7	11.500 ± 2.340	>100.000
mKv3.1	>100.000	>100.000
rKv3.4	>100.000	>100.000
rKCa4	28.000 ± 3.300	>100.000

1.3.6. Kv1.3 en fenómenos de regulación de volumen celular, proliferación y apoptosis.

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. De esta forma frente a un medio hipoosmótico, donde la célula sufre lo que se conoce como *swelling* o incremento de volumen, se activan mecanismos de compensación en los que intervienen flujos de salida de iones cloro y potasio acompañados de agua,

permitiendo a la célula reducir su volumen. Este mecanismo, conocido como RVD (*regulatory volume decrease*), es necesario, por ejemplo, para que los linfocitos regulen su volumen en espacios intersticiales donde experimentan grandes cambios de osmolaridad (Garber y Cahalan, 1997). En el caso de estas células se ha visto cómo el aumento de volumen celular por choque osmótico activa canales de cloro provocando la despolarización de la membrana. Frente a este cambio de potencial se activan los canales Kv1.3 que regulan la salida de potasio. Esta pérdida de iones intracelulares favorece la salida de agua y la disminución del volumen celular (Cahalan y cols., 2001). Además de este mecanismo RVD, en timocitos de ratón se ha descrito una vía dependiente de calcio donde actuarían conjuntamente canales de calcio llamado SWAC con canales de potasio dependientes de calcio. En esta segunda vía las corrientes Kv tendrían menor relevancia (Ross y Cahalan, 1995). Se ha visto sin embargo que la expresión heteróloga de Kv1.3 en líneas celulares del sistema inmunitario sin canales Kv es suficiente para dotar a estas células de un mayor control del volumen celular similar al descrito para Kv1.5 (Deutsch y Chen, 1993; Felipe y cols., 1993).

La regulación del volumen celular es un proceso activo en fenómenos de proliferación celular y de apoptosis. Kv1.3 se ha descrito que participa en estos dos procesos y su acción se ha relacionado en

parte con el control del volumen celular (Lang y cols., 2004; Pardo, 2005).

1.3.6.1. Proliferación celular y Kv1.3

A pesar de que no se conoce exactamente el mecanismo por el que los canales de potasio participan en la proliferación celular, sí que se sabe que estas proteínas son requeridas durante este proceso. Una de las pruebas de ello es que el bloqueo de estos canales disminuye la proliferación celular, tanto en modelos fisiológicos, como en aquellos donde la proliferación es una manifestación patológica (Wonderlin y Strobl, 1996). En lo que se refiere la participación de estas proteínas durante el proceso, se apuntan dos posibles funciones. Por un lado se sabe que durante la fase G1 del ciclo celular se produce una hiperpolarización de la célula que permite tanto una correcta señalización por calcio, necesaria para la proliferación (Nilius y cols., 1993), como el transporte dependiente de sodio de metabolitos necesarios para el paso de G1 a fase S (Villereal y Cook, 1977; Villereal y Cook, 1978). Por otro lado, las células aumentan de volumen durante la fase G1 del ciclo y como ya se ha descrito, los canales de potasio participan en la regulación del volumen celular (Lang y cols., 2000). Además, relacionando también la proliferación y el volumen celular, se ha visto asociación entre canales de cloro y la proliferación en distintos tipos celulares (Lang y cols., 2000; Wondergem y cols.,

2001). No sólo resulta complicado esclarecer las funciones de estas proteínas con la proliferación sino que, debido principalmente a la falta de inhibidores selectivos de canales de potasio, se han identificado pocos canales que participen directamente en este proceso. Uno de ellos es Kv1.3.

Kv1.3 es necesario para la activación linfocitaria, durante la cual, tras el reconocimiento del antígeno, se produce la proliferación celular para generar una respuesta inmunitaria efectiva. Esta proliferación se ve bloqueada por la acción de inhibidores específicos del canal (Lin y cols., 1993; Kalman y cols., 1997). También se ha relacionado a Kv1.3 con la proliferación en otros tipos celulares como las células progenitoras de oligodendrocitos, y células tumorales de próstata, colon, mama y melanomas (Artym y Petty, 2002; Chittajallu y cols., 2002; Abdul y Hoosein, 2002; Abdul y Hoosein, 2003; Fraser y cols., 2003; Vautier y cols., 2004). Cabe destacar que, en células donde se expresa éste canal junto a Kv1.5, se han descrito cambios en el patrón de expresión entre ambos canales relacionados con la proliferación celular (Kotecha y Schlichter, 1999; Preuyat y cols., 2003).

1.3.6.2. Apoptosis y Kv1.3

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada controlado genéticamente. Durante este proceso se produce la condensación nuclear, la

fragmentación del ADN, la despolarización mitocondrial, cambios en la composición de la membrana plasmática y la reducción del volumen celular (Green y Reed, 1998). La relación de Kv1.3 con este proceso de muerte celular se puso en evidencia en un estudio en el que se presentaba cómo linfocitos deficientes de este canal, la línea CTLL-2, eran insensibles a estímulos de muerte celular. Según este trabajo, la sensibilidad se restablecía al reintroducir el canal en las células (Bock y cols., 2002). Existen estudios de apoptosis en linfocitos T en los que se describe cómo Kv1.3 queda rápidamente inhibido bajo estímulos proapoptóticos como la activación del receptor CD95 o la adición de ceramida al medio. Esta inhibición se produce por la acción de tirosinas quinasas de la familia Src, e implica un reclutamiento del canal en plataformas de membrana ricas en ceramida (Szabo y cols., 1996; Gulbis y cols., 1997; Bock y cols., 2003). Esta primera inhibición estaría relacionada con la iniciación del programa de muerte celular. Sin embargo, se ha descrito que a tiempos largos se produce una activación de Kv1.3 implicada al parecer en la ejecución de la apoptosis. Esta segunda fase se ha relacionado con la disminución del volumen celular y la salida de potasio de la célula para favorecer la acción de la caspasa 3 y el apoptosoma (Dallaporta y cols., 1998; Bock y cols., 2002; Storey y cols., 2003; Lang y cols., 2004)

1.3.7. Kv1.3 en el sistema nervioso

A pesar de ser el tejido a partir del cual se clonó, Kv1.3 tiene una expresión muy restringida en sistema nervioso central. De hecho los estudios de inmunohistoquímica muestran que este canal se distribuye casi exclusivamente en hipocampo, cortex piriforme y el bulbo olfatorio (Kues y Wunder, 1992). Por otro lado, este canal se ha descrito también en células de la glía, tanto en astrocitos y oligodendrocitos como en la microglía.

En cuanto a la función de Kv1.3 en las neuronas que lo expresan, se sabe que contribuye a establecer el potencial de membrana, determina la frecuencia disparo y en general está involucrado en la excitabilidad neuronal. La aplicación de inhibidores específicos de este canal en hipocampo mejora el aprendizaje asociativo en ratas (Kourrich y cols., 2001). Por otro lado, se ha visto que ratones deficientes genéticamente para este canal muestran un sentido del olfato aumentado y con potenciales de acción alterados en neuronas del bulbo olfatorio (Fadool y cols., 2004). Parecería pues que la modulación de la actividad de Kv1.3 estaría relacionada con la codificación de la información olfativa y del aprendizaje. En relación a ello, se sabe que la modulación por tirosina quinasas de los canales Kv es un mecanismo dinámico por el cual se modifica la excitabilidad neuronal y por ello la habilidad del cerebro para codificar la información (Hille, 2001). En el caso de Kv1.3 se ha visto que la

acción de tirosinas quinasas modifican la actividad del canal llegando a suprimir la corriente (Holmes y cols., 1996; Cook y Fadool, 2002). De hecho, quinasas de la familia Src se expresan en el bulbo olfatorio y regulan la actividad de Kv1.3 a través de diferentes proteínas adaptadoras (Cook y Fadool, 2002). Este mecanismo modularía la actividad de Kv1.3 en estas neuronas controlando así la capacidad olfatoria y de aprendizaje. En este sentido que se ha visto que en ratones deficientes para el canal, en los que se produce una un aumento de la capacidad olfatoria, la modulación por tirosina quinasas de la excitabilidad neuronal está alterada, indicando que Kv1.3 es un sustrato clave para el control por estas quinasas (Fadool y cols., 2004)

La expresión de Kv1.3 en células de la glía está relacionada con fenómenos de proliferación celular (Attali y cols., 1997, Chittajallu y cols., 2002). Recientemente se ha demostrado que Kv1.3 regula directamente la proliferación de los precursores de oligodendrocitos. De hecho, en dicho estudio se demuestra que Kv1.3 tendría un efecto mitogénico (Vautier y cols., 2004). No es de extrañar por tanto que este canal se exprese en abundancia en numerosos gliomas, tanto astrocitomas como oligodendrocitomas (Preuyat y cols., 2003). Por otro lado, en células de la microglía Kv1.3 también está implicado en fenómenos de proliferación como se comentará más adelante (Apartado 1.3.8.2.)

1.3.8. Kv1.3 en el sistema inmunitario

1.3.8.1. Células linfoides

La expansión de linfocitos a partir de un mismo clon es la base de la respuesta inmunitaria frente a un tipo de antígeno. En el caso de los linfocitos T, la detección y reconocimiento de un péptido a través del complejo TCR/CD3, presentado a través del complejo de histocompatibilidad por parte de células presentadoras de antígeno, desemboca en el reclutamiento de una serie de tirosinas quinasas que promoverán la vía de señalización y que dará lugar a la activación del linfocito y proliferación de éste. La acción de las tirosinas quinasas, entre las que se encuentran miembros de la familia Src, llevará consigo la activación de la fosfolipasa $C\gamma$, la cual catalizará la reacción de rotura del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de la membrana en diacilglicerol y 1,4,5-inositol trifosfato (IP_3). Por un lado, el diacilglicerol activa la proteína quinasa C que en su vía de señalización terminará favoreciendo el ensamblaje del complejo transcripcional Fos/Jun, el cual promoverá la transcripción de varios genes con elementos AP1 (*Activation protein-1*) en su promotor. Por otro lado, la generación de IP_3 provoca el incremento de concentración de calcio intracelular, que procede tanto de compartimentos intracelulares, como del exterior celular, y que activará la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina, llamada calcineurina, responsable de la desfosforilación del factor de transcripción

NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) que transloca a núcleo y promueve la transcripción de la interleuquina 2 (IL2); citoquina imprescindible para la proliferación de los linfocitos T. En este proceso se requiere de una señalización por Ca^{2+} sostenida para mantener NF-AT activo en el núcleo.

Los canales iónicos presentes en los linfocitos T son responsables del mantenimiento de la señal por Ca^{2+} . En concreto, esta situación se consigue por la acción conjunta del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3, del canal de potasio dependiente de calcio KCa3.1 y del canal de calcio activado por la liberación de calcio CRAC.

El primer paso en la señalización por calcio tiene que ver con la liberación de este ión a partir de compartimentos intracelulares promovida por IP_3 y ADP-ribosa cíclico. La unión de IP_3 a su receptor en retículo, IP_3R , permite la salida de calcio este orgánulo, pasando de una concentración de 100nM de calcio intracelular a unos 500nM (Lewis, 2001). Sin embargo, se ha observado que en este tipo celular existirían un segundo tipo de compartimentos cercanos a la membrana plasmática; éstos liberarían calcio en respuesta al aumento de ADP-ribosa cíclico que se produce por la activación de la ADP-ribosil ciclasa. Esta activación se produce al actuar sobre ella las tirosinas quinasas que

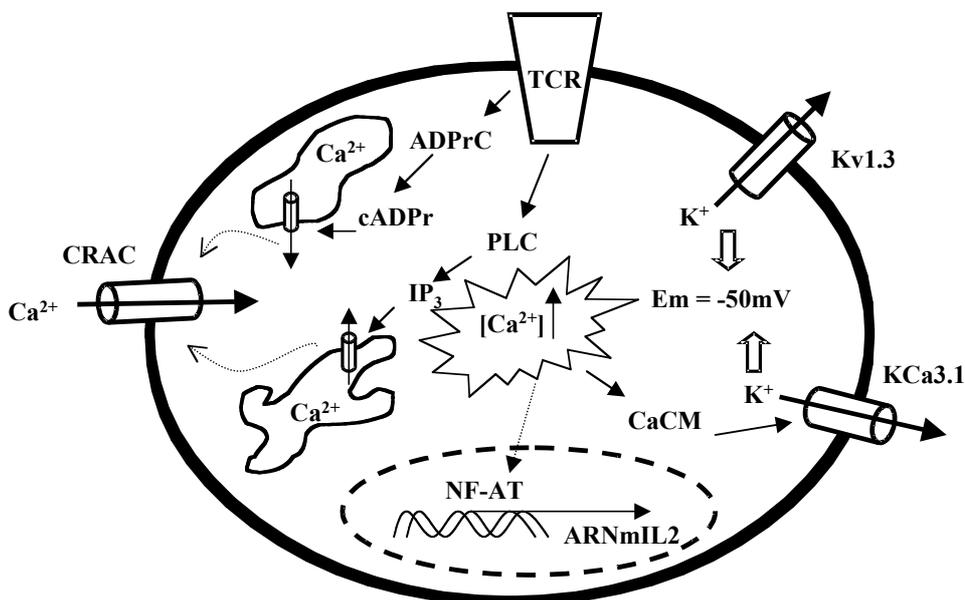


Figura 12. Representación de la vía de señalización por calcio tras la estimulación del complejo TCR/CD3 en linfocitos T. El complejo TCR/CD3 promueve la salida de calcio de compartimentos intracelulares por la acción de la fosfolipasa C y la ADP-ribosil ciclasa. La liberación de calcio activa los canales CRAC que permiten la entrada de calcio extracelular. La acción de Kv1.3, activado por despolarización, y KCa3.1 activado por calcio-calmodulina (CaCM), permiten mantener la célula hiperpolarizada. El calcio promueve la entrada del factor de transcripción NF-AT al núcleo y la expresión de la citoquina IL2 necesaria para la activación linfocitaria.

se activan en el complejo TCR/CD3 (Guse y cols., 1995; Guse y cols., 1999).

En la segunda fase de la señalización por calcio, éste provendría del exterior celular y de una forma continuada, a través de los canales CRAC. Estos canales, cuya identidad molecular se desconoce, se caracterizan por tener un mecanismo de apertura independiente de voltaje y una rectificación anómala (Zweifach y Lewis, 1993). Esto se traduce en que una vez estos canales se abren por la presencia de calcio, será el gradiente electroquímico, además de la rectificación anómala, el que determinará el flujo de iones Ca^{2+} . El flujo será por tanto mayor en potenciales hiperpolarizados. Esta dependencia de la corriente de calcio al voltaje, a pesar de no ser canales de calcio dependientes de voltaje los que actúen, es la razón por la que la modulación fisiológica de la actividad de los CRAC viene determinada por el potencial de membrana y en definitiva, por la acción de los canales de potasio.

La principal corriente de potasio dependiente de voltaje presente en estas células se denominó tipo "n" (Decoursey y cols., 1984; Matteson y Deutsch, 1984) y está generada por Kv1.3 (Chandy y cols., 1990). Este canal es el responsable del mantenimiento del potencial de membrana de los linfocitos T en unos valores que van de -50 a -60mV . Su alta sensibilidad al voltaje le permite responder a pequeños cambios de potencial inducidos por la liberación de Ca^{2+} y mantener así

potenciales hiperpolarizantes que promueven la entrada de Ca^{2+} sostenida a través de los canales CRAC (Verheugen y cols., 1995; Defarias y cols., 1995). Este proceso está acompañado de una regulación positiva a la entrada de Ca^{2+} al activarse los canales KCa3.1 por Ca^{2+} -calmodulina y contribuir al mantenimiento del potencial negativo, llegándose a valores de -80mV . En células T en reposo existen una media de 300 canales Kv1.3 por célula, mientras que sólo hay unos 10 canales KCa3.1 y unos 15 CRAC. Sin embargo, durante la activación linfocitaria la expresión de los canales KCa3.1 y CRAC aumentan en mayor medida que la de los Kv1.3 (Deutsch y cols., 1986; Grissmer y cols., 1993). Mientras que el aumento de expresión de los canales KCa3.1 y CRAC se produce principalmente por un incremento de la transcripción y traducción, en el caso de Kv1.3 se cree que participan mayoritariamente mecanismos postraduccionales (Ghanshani y cols., 2000; Alizadeh y Staudt, 2000). El promotor de KCa3.1 contiene elementos AP-1 y su aumento de expresión podría estar coordinado al aumento de expresión de los canales CRAC (Ghanshani y cols., 2000). Al final del proceso, en un linfocito activado se contabilizan unos 500 canales Kv1.3, 400 canales KCa3.1 y unos 140 CRAC.

Los canales Kv1.3 aparecen en las primeras fases del desarrollo de los linfocitos T. Los timocitos inmaduros expresan la misma cantidad de Kv1.3 que

los linfocitos maduros periféricos (Schlichter y cols., 1986). Un trabajo reciente del laboratorio del Dr. George Chandy describe como existe un patrón de expresión de canales distinto en los diferentes tipos de linfocitos T (Wulff y cols. 2003). En este trabajo se muestra cómo en linfocitos T en reposo, de memoria centrales y los de memoria efectores existe un patrón similar, unos 300 canales Kv1.3 y unos 30 KCa3.1 de media por célula. La activación de los canales en reposo y los de memoria centrales provoca el aumento de expresión anteriormente descrito, de forma que pasan a un fenotipo con gran cantidad de canales KCa3.1 y baja de Kv1.3. Sin embargo, la activación de los linfocitos T de memoria efectores provoca un incremento espectacular de Kv1.3 (1500 por célula) sin variar la expresión de los KCa3.1.

Conjuntamente a la caracterización de las corrientes Kv1.3 en linfocitos se observó que la utilización de bloqueadores de canales de potasio inhibía la activación en este tipo celular. El tratamiento de linfocitos T con inhibidores como el tetraetilamonio, la quinina y la 4-aminopiridina, en concentraciones adecuadas para canales de potasio, bloqueaba la proliferación y la producción de IL2. Este fenómeno, conjuntamente con el conocimiento de la existencia de un aumento de la densidad de corrientes potasio que precede a la síntesis de ADN, producida por la estimulación con agentes mitógenos, fueron las primeras evidencias

del papel clave que desempeñan estas proteínas en la fisiología de los linfocitos (Decoursey y cols., 1984; Chandy y cols., 1984; Deutsch y cols., 1986; Decoursey y cols., 1987). La aparición de inhibidores específicos de canales de potasio como la caribdotoxina, confirmaba que el bloqueo específico de las corrientes de potasio inhibía la proliferación y síntesis del IL2 en los linfocitos T (Price y cols., 1989). Sin embargo, ha sido el descubrimiento de inhibidores altamente selectivos para Kv1.3 o KCa3.1 lo que ha permitido valorar la contribución de cada canal a la fisiología de estas células. El bloqueo específico de Kv1.3 con margatoxina es suficiente para despolarizar la célula a valores similares a los que se consigue con caribdotoxina (Leonard y cols., 1992). Este dato indica que Kv1.3 es el principal responsable de mantener el potencial de membrana en estas células. Por otro lado, 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 calcio necesaria en este proceso (Lin y cols., 1993; Kalman y cols., 1997).

Además de los canales previamente descritos, se han descubierto otros canales dependientes de voltaje minoritarios en linfocitos T. En ratón, Kv1.1 se expresa en timocitos y Kv3.1 se ha detectado en linfocitos T en reposo y en diversas enfermedades autoinmunitarias. Sin embargo, estos canales no se expresan en células humanas, aunque si se ha detectado

Kv3.1 en células B de pacientes con leucemia (Chandy y cols., 1990; Grissmer y cols., 1992). Un dato que resulta sorprendente, respecto a la función que se le asigna a Kv1.3 en este tipo celular, proviene de los primeros estudios realizados sobre ratones deficientes genéticamente para Kv1.3. Estos animales no presentan un sistema inmunitario alterado, sino que la deficiencia de Kv1.3 es funcionalmente compensada por un aumento en las corrientes de cloro (Koni y cols., 2003).

Los canales de potasio por tanto, son fundamentales en la fisiología de los linfocitos T, y su función, clave en la activación celular, es de gran interés por su posible utilización como diana terapéutica para la modulación del sistema inmunitario. Esta consideración se discutirá más adelante (1.3.8.3).

En linfocitos B, al igual que en los T, los canales iónicos son importantes en la fisiología celular. En un reciente trabajo realizado por Chandy y colaboradores se muestra como el patrón de expresión de estas proteínas cambia en el proceso de diferenciación de los linfocitos B a células de memoria (Wulff y cols., 2004). Estas células presentan los canales de potasio KCa3.1 y Kv1.3. Sin embargo durante los procesos que se producen en la diferenciación a células de memoria caracterizadas por el cambio en las inmunoglobulinas, Kv1.3 incrementa en gran medida su expresión. Este tipo de células es capaz de presentar antígenos a los

linfocitos T sin una preactivación, activarse a umbrales más bajos y diferenciar rápidamente a células secretoras de antígenos (Bar-Or y cols., 2001). Los autores sugieren que la alta expresión de Kv1.3 podría estar detrás de esta rápida activación. En este estudio se muestra como la inhibición específica del canal con ShK bloquea la proliferación de estas células, mientras que en células inmaduras y de memoria en primeros estadios es el bloqueo del canal KCa3.1 el que resulta efectivo para suprimir la proliferación celular.

1.3.8.2. Células mieloides

La familia de fagocitos mononucleares comprende diversos tipos celulares entre los que se encuentran los macrófagos tisulares, los osteoclastos del hueso, las células de Langerhans de la dermis, la microglía del cerebro y células dendríticas foliculares de los órganos linfoides (Van Furth, 1992). Si bien no existe un conocimiento tan profundo de los canales implicados en la fisiología de estas células como lo hay en el caso de los linfocitos T, sí que existen trabajos en los que se describen las corrientes presentes y la regulación que sufren en procesos de activación o proliferación.

Se ha demostrado la existencia corrientes de rectificación anómala responsables de establecer el potencial de membrana, tanto en macrófagos, como en microglía. En ambos tipos celulares las corrientes se caracterizan por su alta

rectificación y sensibilidad a Na^+ , Ba^{2+} y Cs^+ . La presencia de Kir2.1 se ha demostrado en macrófagos de ratón y en la línea celular monocítica de humano THP-1 (Kubo y cols., 1993; DeCoursey y cols., 1996). En cuanto a su regulación, se ha descrito que la corriente de rectificación anómala aumenta en microglía con la adherencia celular y con estímulos de proliferación, como la presencia del factor de proliferación de macrófagos M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*). Por otro lado, un estímulo que conduce a estas células a la activación, como es la presencia de lipopolisacárido (LPS) en el medio, es capaz de reducir la densidad de corriente de rectificación anómala, tanto en microglía, como en la línea celular de macrófagos J774.1 (Visentin y cols., 1995; McKinney y Gallin, 1990).

Estas células del sistema inmunitario también presentan corrientes de salida de potasio de tipo “rectificación retardada” que están asociadas a canales de la familia Kv. En concreto, se ha descrito el mismo tipo de corrientes en microglía, en las líneas monocíticas THP-1 y J774.1 y en macrófagos derivados de médula ósea y alveolares (Gallin y Sheehy, 1985; Nelson y cols., 1990; DeCoursey y cols., 1996; Eder y Fischer, 1997). La misma sensibilidad a caribdotoxina, a kaliotoxina y a noxiustoxina se ha descrito para la corriente de estas células como para la corriente tipo “n” de linfocitos T. De hecho se ha demostrado que Kv1.3 se expresa en THP-1, en macrófagos alveolares y en células de

la microglía (DeCoursey y cols., 1996; Kotecha y Schlichter, 1999). Sin embargo, en células de la microglía se ha visto un cambio de patrón de expresión de canales Kv durante el paso de un estado en reposo a un estado más proliferante, disminuyendo la expresión del canal Kv1.5 y aumentando la expresión de Kv1.3 (Kotecha y Schlichter, 1999).

La corriente de rectificación retardada aumenta al estimular con LPS o M-CSF tanto en las células de la microglía como en monocitos y macrófagos derivados de la médula ósea (Nelson y cols., 1992; Nörenberg y cols., 1992; Nörenberg y cols., 1994; Eder y Fischer, 1997). Por otro lado, estas corrientes participan en la proliferación celular ya que su bloqueo selectivo reduce la proliferación en células de la microglía (Kotecha y Schlichter, 1999).

Las células mieloides, al igual que los linfocitos, también presentan canales de potasio dependientes de calcio y canales de calcio activados por calcio, lo que sugiere que existiría un mecanismo de señalización dependiente de calcio soportado por los canales de potasio al igual que el descrito anteriormente (Apartado 1.3.8.1). En concreto se han descrito dos tipos de canales de potasio activados por calcio, uno de alta conductancia y otro de baja conductancia. Ambas clases se encuentran tanto en macrófagos como en microglía (Gallin, 1984; Ince y cols., 1987; Gallin, 1989; Gallin y McKinney, 1988; DeCoursey y cols., 1996). En cuanto a los

canales CRAC, se ha descrito su presencia tanto en microglía como en macrófagos (Malayev y Nelson, 1995; Floto y cols., 1996; Nörenberg y cols., 1997).

1.3.8.3. Kv1.3 como diana farmacológica en procesos de inmunosupresión

La inmunosupresión como terapia se aplica en el caso de los trasplantes de órganos para prevenir el rechazo del nuevo órgano. Por otro lado, los fármacos inmunosupresores también se utilizan para el control de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Actualmente la diana farmacológica para la inmunosupresión es la calcineurina, una fosfatasa que en linfocitos T es clave para la transcripción de la citoquina IL2, la cual es necesaria para la proliferación de los linfocitos activos y por consiguiente, para la respuesta inmunitaria (Sigal y Dumont, 1992). Sin embargo, los inhibidores que se utilizan de este enzima como la ciclosporina A, el FK506 y la rapamicina, presentan una alta toxicidad en hígado y riñón, lo que limita su uso terapéutico; es por ello que la búsqueda de nuevos agentes inmunosupresores tiene gran interés (Cahalan y Chandy, 1997).

El uso de moduladores de canales iónicos para el tratamiento de alteraciones nerviosas y cardiovasculares es común. Los inhibidores de canales son los principales agentes terapéuticos en el tratamiento de apoplejías, epilepsia y arritmias. La distribución tisular restringida de los canales del sistema inmunitario, Kv1.3 y

KCa3.1, y su papel clave en la proliferación y activación de estas células, apuntan a estas proteínas como posibles dianas farmacológicas para la inmunosupresión como ya se utilizan en otro tipo de alteraciones (Cahalan y cols., 2001). De hecho, se han realizado estudios *in vivo* con el objetivo de valorar la validez de estos canales como dianas para la inmunosupresión. En el primero de ellos, el bloqueo de Kv1.3 con margatoxina era capaz de suprimir la reacción de hipersensibilidad retardada en cerdo (Koo y cols., 1997). Sin embargo, la sensibilidad de Kv1.1 y Kv1.2 a esta toxina y la de estos canales en cerebro y sistema nervioso periférico, hacen inviable el uso de esta toxina como agente terapéutico (Suarez-Kurtz y cols., 1999).

Los últimos estudios en los que se ha definido claramente el patrón de expresión de estos canales dependiendo del tipo de célula T y B, argumentan sobre la posibilidad de utilizar estas proteínas como dianas farmacológicas (Wulff y cols., 2003; Wulff y cols., 2004). Según estos autores KCa3.1 sería dominante en la fisiología de linfocitos T y B, inmaduros y de memoria, en los primeros estadios. Agentes bloqueadores de esta proteína serían indicados en la supresión de respuestas inmunitarias agudas, como por ejemplo el rechazo a trasplante y fases agudas de alteraciones autoinmunes. De hecho, utilizando un inhibidor específico de este canal TRAM-34, junto con un inmunosupresor actualmente utilizado

como la ciclosporina A, produce efectos sinérgicos en ensayos para la inhibición de la proliferación de linfocitos T (Wulff y cols., 2000). Esta terapia combinada sería de gran ayuda para reducir la toxicidad actual de los inmunosupresores utilizados.

Por otra parte, Kv1.3 no sería una diana adecuada para la inhibición de esta respuesta inmune primaria. Según estos autores, aunque Kv1.3 media los primeros pasos en la activación de los linfocitos, el aumento de expresión de KCa3.1 permite a estas células escapar del bloqueo. Sin embargo existen enfermedades inmunitarias en las que las células de memoria tardías estarían implicadas como la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, la soriasis o la enfermedad del Crohn entre otras (Friedrich y cols., 2000; Beeton y cols., 2001; O'Connor y cols., 2001; Yoon y Jun, 2001). En estos casos, una terapia dirigida específicamente contra células de memoria frente a células inmaduras y de memoria en primeros estadios sería deseable. Como primeros pasos, se ha visto que la kaliotoxina reduce la severidad de la encefalomiелitis autoinmune adoptiva experimental, un modelo de esclerosis múltiple, inhibiendo la activación de linfocitos T (Beeton y cols., 2001). Este efecto sin embargo no se sabe si se debe a la inmunosupresión por el bloqueo de Kv1.3 o al incremento de liberación de neurotransmisores debido a que esta toxina inhibe tanto Kv1.3 como Kv1.1. Otro trabajo reciente muestra que el bloqueo de este canal previene la

reabsorción ósea inflamatoria en una enfermedad periodontal experimental causada principalmente por células de memoria del sistema inmunitario (Valverde y cols., 2004).

Queda claro pues que, el éxito de la inmunosupresión con los canales iónicos como dianas terapéuticas en inmunosupresión, dependerá del desarrollo de fármacos cada vez más selectivos, más potentes y con una toxicidad más reducida, con los que se consiga un efecto más específico y que permita la obtención de mejores índices terapéuticos.