

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**EL CANAL DE POTASIO Kv1.3.
PAPEL FISIOLÓGICO Y
BIOLOGÍA DEL COMPLEJO FUNCIONAL**

**Rubén Vicente García
Barcelona 2005**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDICINA, BIENIO 2001-2003
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

Presentada por

RUBÉN VICENTE GARCÍA

El interesado,

Visto bueno del director,

Dr. ANTONIO FELIPE CAMPO

Profesor Titular de Bioquímica
Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular
Universidad de Barcelona

A mi familia

Iba a cumplir cuarenta años. Si sucumbía en esa época, de mí sólo quedaría un nombre en una serie de altos funcionarios, y una inscripción griega en honor del arconte de Atenas. Desde entonces, cada vez que he visto desaparecer en mitad de la vida a un hombre cuyos éxitos y fracasos el público cree poder medir exactamente, he recordado que a esa edad yo existía tan sólo para mí mismo y para algunos amigos, que a veces debían dudar de mí como lo hacía yo personalmente. He comprendido que pocos hombres se realizan antes de morir, y he juzgado con mayor piedad sus interrumpidos trabajos.

Marguerite Yourcenar
Memorias de Adriano

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quisiera que apareciesen aquellas personas por las que siento una profunda gratitud, y sin embargo, sé que mis palabras no reflejarán mis sentimientos, y mi memoria, no hará justicia. Con este objetivo, y sin intención de que el orden establezca ningún tipo de prioridad, me surge de adentro nombrar en primer lugar a mis padres, que son mi soporte, a los que nunca deberé nada y que sin embargo, me dan todo lo que tienen, con esa generosidad que sólo el amor entiende. Dichoso me siento de su orgullo, porque este trabajo es fruto de su esfuerzo.

Mi director de tesis y amigo Antonio, es la persona que realmente sabe valorar cada uno de los experimentos que aquí se presentan. Su energía y su pasión por la ciencia le han permitido llevar hacia adelante este grupo de investigación. Es un privilegio haber aprendido con él, un placer compartir estos años, y un honor que depositase su confianza en mí. Cuando salga de este laboratorio me sentiré perdido, pero también sé que Antonio siempre estará dispuesto a ayudarme, y eso es todo un lujo.

El grupo de investigación donde me he formado es pequeño, a veces demasiado pequeño, escuálido, pero por él ha pasado mucha gente. Gente que al recordarla me hace reír, porque eso sí, me he reído mucho todos estos años. Gemma nos dio el relevo a Mireia, Maribel y a mí. Entramos como un huracán al laboratorio nuevo, y si no fuese porque Antonio el primer año nos enseñó codo con codo, de ahí no hubiese fructificado más que una gran carcajada. ¿En qué no erraríamos? La teoría de que hasta que no falles todos los puntos de un protocolo es imposible que te salga el experimento, era nuestro consuelo. Pero me abandonaron, mis chicas volaron, y yo, aún sin alas, me quedé. En este momento, en el que la tristeza podría haberse apoderado de mí, comenzó la proyección internacional del grupo. Desde Chile llegaron Rodrigo y María Isabel, trayendo con ellos alegría a un laboratorio que me venía grande. Desde Grecia llegó Rena, tan esbelta como tranquila. Vividora sin complejos, enamorada de esta ciudad. Con ellos comenzó un segundo periodo más profesional, más responsable, pero igualmente divertido, y a la vez, corto.

Aun en los periodos en los que Antonio y yo éramos los únicos miembros del grupo, no me he sentido solo. De esto se han encargado mis otras compañeras, las más constantes, las que me han ayudado desde el primer día. Elena, Sylvie e Ivette, compañeras de poyata con las que tantos viajes hemos planeado, tantas vidas hemos imaginado y tanto apoyo nos hemos dado. ¿Por qué nos interesa todo Elena? ¿De dónde sacamos las ganas de ilusionarnos con cualquier locura? ¿Locura o cordura? A ti Ivette, no sé dónde será la próxima cena o cuándo la siguiente copa, la que te achina los ojos. Un placer compartir contigo estos años de amistad, y los que nos quedan. Y es que el grupo RST tiene gente con un corazón enorme. Muchas gracias a todos por hacerme sentir uno más.

La última etapa de mi estancia en el grupo la he compartido con gente maravillosa. Nuria, Txell, Ramón y Joassia aparecieron con una vitalidad abrumadora. Las risas más recientes son con ellos, personas con sólo una cara, la más generosa que he visto nunca.

Formalmente debería agradecer a los profesores que me han acogido en las estancias en el extranjero que he realizado. La palabra correcta es acoger, y el formalismo no tiene cabida en estas pocas páginas. Alexander Sorkin es, en palabras de Antonio, una bellísima persona, y a él y a su mujer Tatiana, encantadora y orgullosa rusa de humor ácido, les guardo un cariño enorme. No sé si en algún momento llegaron a comprenderme, mi inglés y su acento se batieron durante tres meses de estancia en los que siempre deseaba que llegase la hora del café para escucharles. De allí me quedo con tres personas: Emily, Andreas y Rita. Emily, una orgullosa judía ruso-israelita que me enseñó a ser levantino en Denver. Andreas, excelente amigo con el que bebí más de una botella de vino de la bodega de Rita, nuestra abstemia casera, la más generosa de todas las americanas, la más divertida y la más loca.

La segunda estancia fue aun más intensa, Mike y Kim me arroparon como a un hijo, me cuidaron como se tiene que cuidar a un alicantino en las Rocky Mountains, y me enseñaron América tal como la ven los americanos. No tendría páginas para agradecerles todo lo que hicieron por mí. En el ámbito científico, Mike me hizo disfrutar y me mostró otra cara de la ciencia, más romántica, más serena. Otro regalo de esta estancia fue compartir laboratorio con Carmen, persona a la que adoro y cuya confianza en mí me llena de orgullo. Fue mucho tiempo y mucha gente. Escapadas con Rafael para que me enseñase los lugares con más encanto del pueblo, Bibi y Fede abriéndome su casa como si fuese la mía, la panda del moco en todo su esplendor. Subí un 4000, acampé en la nieve, me bañé en lagos impresionantes, bailé danzas indias, bebí muchas cervezas, y aprendí de todo, de las buenas y de las malas experiencias. Gente que me gustaría volver a encontrar y gente a la que ya no encontraré.

Y en todos estos viajes, vaya donde vaya, mi hermana. Porque donde he ido he trabajado, pero también he vivido, y para saber disfrutar tienes que tener un maestro que te enseñe. Y esa es ella, la mejor.

Una parte importante del trabajo que aquí se presenta se ha realizado en colaboración con el Dr. Carles Solsona. Agradezco su ayuda y sus consejos. Por supuesto es un placer compartir con el Dr. Artur Escalada los trabajos que aparecen en esta memoria.

De la misma forma, estos trabajos son producto de colaboraciones científicas que me han enseñado mucho y de las que estoy profundamente agradecido. Así, agradezco la predisposición de la Dra. Carmen López Iglesias del servicio de microscopía electrónica y Maria Calvo en el servicio de microscopía confocal para colaborar cada vez que hemos solicitado su ayuda. Porque para que estos trabajos saliesen adelante, ha habido mucha gente siempre dispuesta a dar la mano, su consejo o su opinión. Entre ellos agradezco la ayuda desinteresada de los doctores Francesc Tebar y Joan Beltran, así como la de sus colaboradores.

Volviendo a las risas y buen humor, no me puedo olvidar de la gente del departamento, la que te fuerza la sonrisa cuando no tienes humor, la que te sigue la broma cuando lo estás, la que siempre te ayuda y te hace coger ritmo al andar por los pasillos. En especial a Toni, a Raquel y a mis secretarias favoritas. ¡Qué suerte la mía!

Y por último, para cerrar estas páginas de optimismo, agradecimiento y buen humor, en las que parece que todo ha sido fácil, y es que realmente lo ha sido, no me olvido de que cada vez que he salido del laboratorio he tenido amigos para disfrutar esta ciudad, Barcelona, que siempre está dispuesta a acoger gente.

A toda la gente que he nombrado le doy las gracias, a los olvidados les pido perdón, y con los lectores de estas páginas me excuso por haber sido tan enfático en algunos comentarios, pero es que muy pocas veces una persona se detiene a mirar atrás y comienza a valorar todo lo que ha recibido. Y cuando lo haces es muy difícil no caer abrumado. ¿Dónde están los malos momentos? No los recuerdo. Estas páginas podrían haber estado escritas de mil formas, pero ésta es una tan válida como las demás, porque lo importante está recogido en ellas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Canales iónicos	1
1.2. Canales de potasio dependientes de voltaje	2
1.2.1. Selectividad y conducción	3
1.2.2. Canales formados por dos segmentos transmembrana	6
1.2.3. Canales formados por seis segmentos transmembrana	7
1.2.3.1. Diversidad de los Kv	8
1.2.3.2. Mecanismo de apertura los canales Kv (<i>gating</i>)	11
1.2.3.3. Mecanismo de cierre de los canales Kv	13
1.2.3.3.1. Inactivación rápida o tipo N	13
1.2.3.3.2. Inactivación lenta o tipo C	14
1.2.3.4. Subunidades auxiliares del complejo	15
1.2.3.4.1. Subunidades Kv β	16
1.2.3.4.2. Subunidades MiRPs	18
1.2.3.4.3. Otras subunidades auxiliares	19
1.2.3.5. Biología celular de los canales Kv	21
1.2.3.5.1. Localización subcelular	22
1.2.3.5.2. Degradación de los Kv	24
1.3. El canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3	25
1.3.1. Actividad	26
1.3.2. Composición del complejo	26
1.3.2.1. Heterotetrámeros	26
1.3.2.2. Subunidades beta	27
1.3.3. Regulación a corto término	27
1.3.4. Tráfico y localización subcelular	28
1.3.5. Farmacología del canal	29
1.3.6. Kv1.3 en fenómenos de regulación del volumen celular, proliferación y apoptosis	30
1.3.6.1. Proliferación celular y Kv1.3	31
1.3.6.2. Apoptosis y Kv1.3	31
1.3.7. Kv1.3 en el sistema nervioso	32
1.3.8. Kv1.3 en el sistema inmunitario	33
1.3.8.1. Células linfoides	33
1.3.8.2. Células mieloides	37
1.3.8.3. Kv1.3 como diana farmacológica en procesos de inmunosupresión	39
2. OBJETIVOS	43
3. METODOLOGÍA	47
3.1. Animales y modelos experimentales “in vivo”	47
3.1.1. Caquexia cancerosa	47

3.1.2.	Tratamiento con el factor de necrosis tumoral α (TNF α)	47
3.1.2.1.	Crónico	47
3.1.2.2.	Agudo	48
3.1.3.	Administración de lipopolisacárido (LPS)	48
3.1.4.	Animales utilizados para el aislamiento de macrófagos	48
3.2.	Líneas y cultivos celulares	48
3.2.1.	Aislamiento de macrófagos derivados de médula ósea	49
3.3.	Anticuerpos	49
3.4.	ADNc y sondas específicas	50
3.5.	Proteínas fluorescentes	50
3.6.	Análisis de la expresión génica	53
3.7.	Extracción de proteína e inmunoprecipitación	53
3.8.	Sistemas de expresión heteróloga	54
3.8.1.	Células HEK 293	54
3.8.2.	Ovocitos de <i>Xenopus</i>	55
3.9.	Extracción e inmunoprecipitación de <i>lipid rafts</i>	56
3.10.	Técnicas de microscopia	57
3.10.1.	Microscopia electrónica	57
3.10.2.	Inmunocitoquímica	58
3.10.3.	Microscopia de fluorescencia	59
3.10.4.	Microscopia confocal	60
3.10.4.1.	Fluoróforos	61
3.10.4.2.	Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)	61
3.10.4.3.	Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	62
3.11.	Electrofisiología	65
3.12.	RT-PCR semicuantitativa	69
4.	RESULTADOS	79
4.1.	Bloque 1	79
4.1.1.	<i>Differential K⁺ channel regulation in macrophages</i>	81
4.1.2.	<i>K⁺ channel regulation in systemic inflammatory response</i>	97
4.2.	Bloque 2	103
4.2.1.	<i>Kvβ subunits in macrophages</i>	105
4.2.2.	<i>Heteromeric Kv1.3-Kv1.5 complex in macrophages</i>	115
4.3.	Bloque 3.	133

4.3.1.	<i>Kv1.5 association modifies Kv1.3 targeting</i>	135
4.3.2.	Interacciones entre subunidades α - β	151
4.3.3.	Internalización del canal Kv1.3	155
5.	DISCUSIÓN	161
6.	CONCLUSIONES	173
7.	BIBLIOGRAFÍA	177