

5 **Discusión**

5. DISCUSIÓN

La actividad del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3 se ha relacionado con diversas funciones en células no excitables. Además de establecer el potencial de membrana, se ha descrito que su participación es necesaria en fenómenos de proliferación, regulación del volumen celular, activación y apoptosis. En células del sistema inmunitario Kv1.3 es el principal canal de potasio dependiente de voltaje. En concreto, en linfocitos su actividad está altamente regulada. Así, la proliferación y la activación celular, que en estas células se producen conjuntamente, vienen precedidas de un aumento de las corrientes de potasio dependientes de voltaje (Lin y cols., 1993; Kalman y cols., 1997). Esta salida de potasio mantendría potenciales negativos en la célula favoreciendo la entrada de calcio necesaria para la señalización de estos procesos. Por otro lado, aunque también implicado con la proliferación celular, la acción conjunta de canales de cloro y Kv1.3 es necesaria para la regulación del volumen de estas células (Cahalan y cols., 2001). Por último, también se ha descrito que este canal participa en la apoptosis de los linfocitos T en dos fases, una temprana, después de la cual este canal queda inhibido, y una tardía, en la que se produce la salida de potasio a través de Kv1.3 disminuyendo el volumen celular y favoreciendo la formación del apoptosoma (Dallaporta y cols., 1998; Bock

y cols., 2002; Storey y cols., 2003; Lang y cols., 2004).

La acción de este canal en funciones tan diversas sólo se comprende si se tiene en cuenta que estas proteínas están altamente reguladas. En este contexto cabe señalar que Kv1.3 presenta distintas secuencias diana de proteínas quinasa que modulan su actividad (Cai y cols., 1992; Payet y Dupuis, 1992; Holmes y cols., 1996; Fadool y cols., 1997). La fosforilación del canal puede modificar tanto la amplitud de corriente como su mecanismo de apertura y cierre. Por otro lado, la corriente generada por Kv1.3 también se ve afectada por la interacción de Kv1.3 con otras proteínas. Las subunidades auxiliares de los canales Kv también modulan a Kv1.3 (Martel y cols., 1998; McCormack y cols., 1999; Kuryshev y cols., 2000; Grunnet y cols., 2003), y estas subunidades a su vez, son diana de proteínas reguladoras que modifican su asociación (Kwak y cols., 1999). Así, una misma cascada de señalización afectará de una forma u otra al canal Kv1.3 dependiendo a su vez de las proteínas auxiliares que se expresen. En este sentido, también se ha de tener en cuenta la regulación espacial, es decir, la compartimentación que existe en las células y que favorece la interacción de proteínas implicadas en una misma vía de señalización. De hecho, para Kv1.3 se ha descrito que su localización en distintos microdominios puede afectar a su función,

bien por las interacciones que tiene en ellos con otras proteínas o bien por las interacciones lípido-proteína que pueden modificar la actividad del canal (Hajdu y cols., 2003; Bock y cols., 2003; O'connel y Tamkun, 2005). Toda esta compleja regulación a la que se ven sometidos estos canales será finalmente la que permita a la membrana plasmática adecuar sus propiedades biofísicas y responder con gran flexibilidad a las necesidades fisiológicas de la célula en cada situación.

En este escenario, esta memoria pretende estudiar en profundidad el complejo generador de corrientes de potasio dependientes de voltaje formado por la isoforma Kv1.3, tanto su regulación en distintos procesos fisiológicos, como su composición multimérica al interactuar con otras proteínas y su biología celular, que implica su tráfico a membrana, su compartimentación y su degradación. Con este propósito se ha escogido como modelo de estudio los macrófagos. Estas células del sistema inmunitario son capaces de integrar numerosos estímulos y liberar una gran variedad de inmunomoduladores que establecen la respuesta inmunitaria adecuada. La presencia de corrientes de potasio dependientes de voltaje en la línea mieloide de las células del sistema inmunitario ya había sido descrita mediante estudios electrofisiológicos (Eder, 1997). Esta corriente presentaba una farmacología similar a la descrita en linfocitos. Kv1.3 era pues el canal candidato a generar la salida de potasio en estas células y se demostró su

expresión en varios tipos de fagocitos mononucleares (DeCoursey y cols., 1996; Kotecha y Schlichter, 1999).

Además del hecho de que los macrófagos pudiesen estar expresando Kv1.3, nos interesó la posible regulación que sufriese ante diferentes estímulos fisiológicos. En este sentido, ya se había descrito que la corriente Kv presente en estas células se veía modulada con estímulos proliferantes y de activación (Nelson y cols., 1992; Nörenberg y cols., 1992; Nörenberg y cols., 1994; Eder y Fischer, 1997). En estos procesos los macrófagos se diferencian de los linfocitos al ser éstos dos fenómenos excluyentes, es decir, un macrófago activado deja de proliferar. Sin embargo, la activación de ambos tipos celulares presenta grandes similitudes. La unión de lipolisacárido al receptor CD14 de los macrófagos produce la activación de la fosfolipasa C que generará diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (Chow y cols., 1995). De esta forma esta vía activa por un lado la PKC y por otro la señalización por calcio de forma muy similar a lo descrito para linfocitos T tras la estimulación del receptor TCR. Sin embargo, a diferencia de los linfocitos T donde la señalización permitía la defosforilación del factor NF-AT por la calcineurina y su translocación a núcleo (Dolmetsch y cols., 1998), el factor de transcripción clave en la activación de los macrófagos, responsable de la síntesis de numerosas citoquinas, es el NF- β B (Valledor y Ricote, 2004). Su activación

pasa por la degradación de la subunidad inhibitoria I- β B, para lo cual es necesaria su fosforilación por la quinasa IKK. Para que esta señalización se produzca se ha demostrado que es necesaria la acción conjunta de la PKC y la calcineurina (Steffan y cols., 1995; Trushin y cols., 1999).

Teniendo en cuenta las similitudes y divergencias entre los linfocitos T y los macrófagos, los estudios de caracterización de las corrientes de potasio presentes en estos últimos que se muestran en la primera contribución de la memoria, pretenden analizar la importancia de estas corrientes en la fisiología celular tal y como se ha descrito en el caso de los linfocitos.

La identificación inequívoca de Kv1.3 como principal isoforma responsable de las corrientes de salida de potasio tanto por las características de la corriente como por la farmacología específica, sólo presenta un punto de incertidumbre al detectarse también la presencia de Kv1.5, pero no una corriente asociada a esta isoforma Kv. En este trabajo se muestra también que el canal de rectificación anómala Kir2.1 es el responsable de la corriente de entrada de potasio en los macrófagos.

El factor de crecimiento de macrófagos MCSF se ha visto implicado en procesos de crecimiento, supervivencia y diferenciación del desarrollo de la línea monocítica hematopoyética (Rohrschneider y cols., 1997; Valledor y cols., 1999; Valledor y cols., 2000). En nuestros

estudios se ha utilizado este factor para inducir la proliferación en macrófagos quiescentes y evaluar los cambios que se producían en las corrientes de potasio. Los cambios en las corrientes y la expresión de los canales se ha realizado a 24 h del tratamiento, lo que sitúa nuestro estudio en la regulación a largo plazo que se da en estos procesos. Así, los macrófagos inducidos a proliferar presentan un aumento de las corrientes de salida y de entrada de potasio. Este aumento se debe principalmente a la existencia de una síntesis *de novo* de canales Kv1.3 y Kir2.1. El aumento de canales Kv1.3 pero también de los canales de rectificación anómala hace suponer que los macrófagos proliferantes tienen un potencial de membrana muy hiperpolarizado. Este potencial podría estar relacionado con la hiperpolarización descrita durante la fase G1 del ciclo celular (Villereal y Cook, 1977; Villereal y Cook, 1978; Nilius y cols., 1993; Wonderlin y Strobl, 1996). En este sentido se ha descrito que en la proliferación inducida por MCSF, la vía de señalización que implica la actuación de la calcineurina activada por movimientos de calcio no intervendría (Comalada y cols., 2003). Lo que queda claro sin embargo es que el potencial de membrana de los macrófagos es importante en su viabilidad ya que el bloqueo de Kv1.3 reduce drásticamente la proliferación de estas células.

La activación de estas células por lipopolisacárido tiene efectos también sobre

las corrientes de los macrófagos. Sin embargo, en este caso, el aumento de las corrientes de salida dependientes de voltaje es mucho mayor, y por el contrario, las corrientes de entrada quedan reducidas. Si comparamos esta situación con la descrita en el caso de los linfocitos T, vemos que a diferencia de estos (Ghanshani y cols., 2000; Alizadeh y Staudt, 2000), el aumento de la corriente de Kv1.3 viene en gran medida acompañado de un aumento de expresión del canal. Sin embargo, la posibilidad de que la función de Kv1.3 sea la de contraponerse a la despolarización que produce la entrada de calcio favoreciendo la señalización está en discusión. Mientras que unos autores señalan cómo movimientos de calcio preceden la aparición de marcadores de activación (Velasco y cols., 1997), se ha descrito que la principal isoforma de PKC que actúa en la vía de señalización del LPS es independiente de calcio (Valledor y cols., 2000). En este sentido señalar que, mientras que el factor de linfocitos NF-AT requiere de entradas prolongadas o frecuentes de calcio, NF- β B se regula por aumentos puntuales de calcio intracelular (Dolmetsch y cols., 1998; Santana y cols., 2000), lo que sugiere un escenario ligeramente diferente. Es relevante también el hecho de que los macrófagos, al igual que los linfocitos, presentan canales CRAC para la entrada de calcio extracelular y canales de potasio dependientes de calcio, pero estos últimos diferentes al canal descrito en linfocitos (Gallin, 1984; Ince y cols., 1987; Gallin,

1989; Gallin y McKinney, 1988; Malayev y Nelson, 1995; DeCoursey y cols., 1996; Floto y cols., 1996; Nörenberg y cols., 1997).

La disminución de la expresión de marcadores de activación al bloquear los canales Kv1.3 refuerza la importancia que parece tener este canal en la fisiología de los macrófagos y la estrecha relación que existe entre corrientes iónicas y vías de señalización.

El TNF β es una citoquina que sintetiza en macrófago activado con acción paracrina y autocrina. La transcripción de esta citoquina está bajo el control de los factores de transcripción NF- β B y AP-1. TNF β actúa sobre el propio macrófago incrementando la expresión de citoquinas y factores de activación (Drouet y cols., 1991; Rhoades y cols., 1992).

En nuestro modelo, TNF β induce el canal Kv1.3 de forma similar al lipopolisacárido aunque en menor medida. Por otro lado, su acción también disminuye la expresión de Kir2.1. La posibilidad de que esta citoquina fuese el mediador por el que el lipopolisacárido actuase sobre los canales se exploró utilizando animales deficientes para el receptor de TNF β . Por el contrario, los resultados muestran que la acción de este factor es redundante a la que tiene el lipopolisacárido. Por otro lado, la activación mediada por TNF β también necesita de la participación de Kv1.3 como lo demuestra la disminución de la expresión del marcador de activación iNOS en presencia de MgTx en el medio.

La regulación génica frente a citoquinas a la que están sometidos los canales iónicos en este modelo nos llevó a preguntarnos si esta regulación podría darse también en otros tejidos. Existen diversas situaciones patológicas en las que el organismo responde produciendo citoquinas inflamatorias provocando así lo que se conoce como inflamación sistémica. Este mecanismo de respuesta está asociado a distintas agresiones como el cáncer, las infecciones, drogadicción o el VIH. En todas ellas uno de los principales mediadores de estas enfermedades inflamatorias en el sistema nervioso central es el TNF β (Houzen y cols., 1997, Köller y cols., 1998; Turrin y Plata-Salamán, 2000).

Nuestros estudios en cerebro de animales tratados con LPS y TNF β van en concordancia con lo encontrado en macrófagos. Cabe señalar además que, en el caso del tratamiento con LPS, los efectos producidos sobre Kv1.3 sí que parecen estar mediados exclusivamente por la acción de TNF β . El aumento de la expresión de Kv1.3 puede reflejar tanto la activación de la microglía como un aumento de expresión de este canal en las neuronas que lo expresan (Kues y Wunder, 1992). En este caso esperaríamos una disminución de la excitabilidad neuronal en la zona del hipocampo y de las neuronas del bulbo olfatorio aunque no se puede descartar la inducción de la expresión en zonas del cerebro donde no se expresa el canal en situación normal. La disminución de Kir2.1 es más difícil de interpretar. La expresión

de esta proteína en este tejido no está tan restringida como en el caso de Kv1.3 (Nichols y Lopatin, 1997). Una disminución de este canal debe afectar claramente al potencial de reposo y en concreto a la repolarización después del potencial de acción en neuronas. Pero además, al ser un canal de rectificación fuerte, la compensación de su función por canales de rectificación débil puede tener como consecuencia la disminución del potencial de acción al permitir mayor salida de iones potasio en potenciales despolarizantes y acortar así la duración y amplitud de éste. Los cambios de expresión de los canales iónicos pueden estar relacionados con las disfunciones neurológicas asociadas a la inflamación sistémica.

En el caso del modelo experimental de caquexia cancerosa la regulación de Kv1.3 difiere a lo esperado. Teniendo en cuenta que TNF β es uno de los principales mediadores de este proceso, lo que se observa en animales con tumor es que Kv1.3 tiene menor expresión tal y como ocurre para otros canales Kv (Coma y cols., 2003). En un síndrome tan complejo como la caquexia, donde intervienen distintos mediadores además del TNF β como la IL1 y la IL6, el desorden neurológico es el resultado de numerosos factores que interactúan (Turrin y Plata-Salamán, 2000).

Estos estudios muestran cómo la regulación de Kv1.3 por citoquinas es un mecanismo general. Pero esta regulación puede producirse, además de por cambios

en su expresión, por cambios en el complejo generador de la corriente. Los canales de potasio están formados por cuatro subunidades β y cuatro subunidades α asociadas, además de otras posibles interacciones. Los cambios en la composición del complejo pueden modificar la actividad del canal y por tanto las propiedades fisiológicas de la membrana donde localiza. En este sentido en los estudios en macrófagos se puede ver cómo los parámetros que definen el *gating* de Kv1.3 cambian cuando los macrófagos están activados. La curva de activación de la corriente de salida de potasio presenta una pendiente claramente diferente entre macrófagos quiescentes o proliferantes y macrófagos activados bien por TNF β , bien por lipopolisacárido. Estos resultados nos llevaron a pensar que podía existir un cambio en la composición del complejo teniendo en cuenta que la farmacología de la corriente seguía siendo específica para Kv1.3. En este sentido la tercera contribución del apartado de resultados muestra el estudio de las subunidades Kv β presentes en estas células y su regulación.

Los macrófagos expresan la mayoría de las subunidades auxiliares Kv β a excepción de las pertenecientes a la familia génica Kv β 3, siendo este patrón similar al descrito en musculatura esquelética (Grande y cols., 2003). Estas proteínas modifican la activación, inactivación y deactivación de los canales Kv (Martens y cols., 1999). En este sentido, se han estudiado las constantes de tiempo

de estos tres estados y la inactivación de la corriente de salida de potasio en macrófagos proliferantes y activados. Por otro lado, se ha analizado la expresión génica de las distintas subunidades beta intentado encontrar patrones de expresión que respondiesen a las características cinéticas y de dependencia de voltaje observadas. En cuanto a la activación, los macrófagos tratados con TNF β difieren del resto al presentar constantes de tiempo mayores y con una dependencia de voltaje diferente. Si se atiende al patrón de expresión de Kv β en estas células cabe señalar que a diferencia del resto de tratamientos, en las células tratadas con TNF β la subunidad Kv β 2.1 no incrementa su expresión con respecto al resto de subunidades. Se describió que Kv β 2.1 compite con el resto desplazándolas del complejo (Xu y Li, 1997). La menor proporción de esta subunidad en macrófagos activados con TNF β podría explicar sus diferencias con respecto al resto de tratamientos. Así, de la misma forma a las constantes de tiempo de activación, la inactivación en macrófagos tratados con TNF β presenta unas constantes de tiempo con distinta dependencia al voltaje que el resto de tratamientos.

En el grado de inactivación con respecto al potencial de membrana, los macrófagos tratados con MCSF presentan un desplazamiento de la curva de inactivación hacia potenciales positivos. Este desplazamiento podría relacionarse con la disminución de la expresión de la

subunidad Kv β 1.2 que se da en los dos estados de activación del macrófago estudiados, revirtiendo el aumento de expresión de esta subunidad que se da en los macrófagos proliferantes. Esta acción del LPS y TNF β puede ser responsable de la mayor inactivación de la corriente de Kv1.3 a potenciales negativos.

La deactivación es más rápida en macrófagos activados con LPS que los tratados con TNF β . Este dato, junto a la expresión diferencial de subunidades en ambos casos permite concluir que la regulación de las subunidades Kv β por parte del LPS no viene mediada por el TNF β .

Asignar cambios en los parámetros de activación e inactivación a cambios en la regulación génica de las subunidades auxiliares resulta complicado, más aún cuando los estudios de interacción de Kv1.3 con estas proteínas son escasos y contradictorios. No hay que olvidar además la presencia de Kv1.5 en estas células. Las interacciones Kv1.5 con las distintas Kv β han sido estudiadas con mayor profundidad. Se sabe por ejemplo que Kv β 1.2 y Kv β 1.3 inducen la inactivación rápida del canal (England y cols., 1995; Uebele y cols., 1998), que Kv β 1.2 y Kv β 2.1 desplazan la curva de activación a potenciales más electronegativos (England y cols., 1995; Uebele y cols., 1996) y que Kv β 2.1 disminuye la expresión de canal en membrana y anula los efectos de Kv β 1.3 sobre la inactivación del canal (Accili y cols., 1997; Xu y Li, 1997). En nuestro

modelo, Kv1.5 no ve aumentada su expresión en los distintos tratamientos, tal como se muestra en la primera contribución de esta memoria, y Kv1.3 es el canal mayoritario. Quizá el efecto de las subunidades Kv β sobre Kv1.5 sea más aparente en el caso de los macrófagos quiescentes o tratados con MCSF. Puede ser sin embargo, que la retención que ejerce Kv β 2.1 sobre Kv1.5 provoque que el canal detectado en membrana sea principalmente Kv1.3. La dificultad de interpretación estos experimentos nos llevaron a plantearnos los estudios de interacción en sistemas de expresión heteróloga que se muestran en el apartado de resultados.

Los cambios en el *gating* observados en los macrófagos activados pueden producirse también por cambios en la composición de las subunidades β que conforman el complejo. Como ya se ha comentado Kv1.5 está presente en los macrófagos aunque de forma minoritaria. Además, la farmacología de las corrientes de salida demuestran que Kv1.3 es el canal que genera estas corrientes. Dado que Kv1.5 es resistente a las toxinas empleadas existen dos posibles explicaciones a presencia: bien el canal Kv1.5 no llega a membrana, bien esta proteína está formando complejos heteroméricos con Kv1.3, el cual le confiere sensibilidad a MgTx y Shk-Dap. Cambios en la farmacología de los Kv por asociaciones heteroméricas ya se ha descrito previamente (Sobko y cols., 1998). El artículo en preparación muestra como las células Raw

expresan Kv1.5 en membrana y cómo es capaz de formar complejos heteroméricos con Kv1.3. La presencia de Kv1.5 modifica la curva de activación de Kv1.3 desplazándola a potenciales más positivos. Sin embargo no se detectan cambios significativos en la pendiente. Relevantes son también los estudios de farmacología realizados en células HEK donde se muestra cómo la presencia de Kv1.5 reduce la sensibilidad del canal a MgTx. Pero al contrario que los homómeros Kv1.5, los distintos ratios Kv1.3-Kv1.5 siguen siendo sensibles a esta toxina. Este dato indicaría que distintas combinaciones entre Kv1.3 y Kv1.5 podrían ser responsables de las corrientes en macrófagos. De esta forma, los cambios en actividad revelan una forma de modular la corriente de potasio dependiente de voltaje en estas células. Así, situaciones como los macrófagos tratados con TNF β , donde ambas isoformas se ven reguladas de forma diferencial, provocarían la formación de heterotetrameros con mayor predominancia de Kv1.3 o la formación de homómeros de este canal. De igual forma, existen estímulos fisiológicos en los que se ha descrito que el canal Kv1.5 se vería inducido y el canal Kv1.3 reprimido como la inhibición de la respuesta inmunitaria con glucocorticoides (Takimoto y cols., 1993; Takimoto y cols., 1996; Lampert y cols., 2003). Si esta regulación se diera en macrófagos, la presencia de mayor proporción de Kv1.5 en el complejo podría llevar el umbral de activación del canal a potenciales más

positivos modificando así las propiedades biofísicas de la membrana.

El entorno en el que localiza una proteína determina las interacciones a las que se ve sometida. El estudio de microdominios en la membrana y cómo las proteínas se compartimentan en ellos ha llegado a definir estos dominios como focos de señalización. Esta localización en balsas de colesterol se ha descrito para diversos canales Kv (Martens y cols., 2004). En concreto Kv1.3 localiza en *rafts* en la membrana de los linfocitos T y su actividad está altamente regulada en función de la población de *rafts* donde se encuentre (Hajdu y cols., 2003; Bock y cols., 2003; O'connel y Tamkun, 2005).

Nuestros estudios muestran como Kv1.3 presenta una buena expresión en superficie, sin embargo, este canal presenta ligeras retenciones intracelulares en el tránsito a través del aparato de Golgi. Se ha descrito que la caveolina comienza a formar los microdominios ricos en colesterol a la altura del Golgi (Galbiati y cols., 2001). Esta proteína también presenta cierta retención en este orgánulo (Ren y cols., 2004). La posibilidad de que Kv1.3 localice en vesículas ricas en caveola queda demostrada en nuestro estudios en células HEK. En estas células Kv1.3 y Kv1.5 también se asocian formando heterotetrámeros. El tráfico del canal resultante y su expresión en superficie depende de la estequiometría del complejo tal y como se ha descrito para otros Kv (Zhu y cols., 2003). De la misma forma, la

localización en membrana puede diferir por la presencia de otra subunidad en el complejo. Los análisis de movilidad lateral en membrana son un reflejo de la asociación de las proteínas a estructuras inmóviles y de las interacciones laterales a las que se ven sometidas y que determinarán su difusión lateral. Los estudios de FRAP muestran como la presencia de Kv1.5 modificaría la localización de Kv1.3 en la membrana plasmática.

Estas plataformas ricas en colesterol también juegan un papel importante en la fisiología de los macrófagos. Estas células presentan receptores Fc que son de la familia de las inmunoglobulinas y participan en el proceso de fagocitosis. La acción de tirosinas quinasas sobre estos receptores y el direccionamiento de los Fc a plataformas ricas en ceramida son pasos previos al proceso de fagocitosis (Greenberg y cols., 1993; Abdel Shakor y cols., 2004). En este sentido Kv1.3 también se ve dirigido a plataformas ricas en ceramida y es diana de tirosina quinasas en linfocitos T (Bock y cols., 2003). Además, el bloqueo de Kv1.3 no inhibe la actividad fagocitaria de los macrófagos alveolares de tal forma que podría ser importante la depolarización local de la membrana durante el proceso de fagocitosis (Mackenzie and cols., 2003).

En este sentido la presencia de Kv1.5 cambian la localización en membrana del canal cobra su relevancia. Mas aún cuando este canal, al contrario que

Kv1.3, tiene dominio de unión a tirosina quinasas de la familia Src. Estos datos, aun no siendo más que simples especulaciones, acentúan la importancia de la composición del complejo Kv1.3 por las interacciones que puede promover con las proteínas del entorno.

Finalmente, en el estudio de la actividad de una proteína se ha de tener en cuenta la vida media de esta y la regulación que determina su degradación. En este sentido estamos interesados en la posible internalización de este canal tras la acción de tirosinas quinasas sobre él. Este mecanismo se ha demostrado para otro canal de la misma familia, Kv1.2, pero no se ha definido qué vehículo de internalización utilizaría (Nesti y cols., 2004). Nuestros estudios de microscopia de fluorescencia apuntan a que este canal podría ser transportado en endosomas recubiertos de clatrina. La dinámica en membrana de esta proteína sería entonces compleja utilizando distintos sistemas de transporte en membrana.