



---

# **Universidad de Valladolid**

**CURSO 2019-2020**

**FACULTAD DE MEDICINA  
GRADO EN MEDICINA**

**EFFECTOS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA  
SOBRE LA PROLIFERACION INDUCIDA POR Kv1.3**

**Alumno: Pablo Fernández Velasco  
Tutoras: Pilar Ciudad Velasco  
M<sup>a</sup> Teresa Pérez García**

# RESUMEN

En este trabajo se estudia la posibilidad de que los cambios conformacionales dependientes de voltaje que sufre Kv1.3 sean un elemento esencial para activar vías de señalización que conducen a la proliferación. Estudiamos los efectos que tenían las variaciones del potencial de membrana sobre la proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293. Para ello se transfectaron células con el canal silvestre Kv1.3, bien solo, bien junto con canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). Estos  $K_{ATP}$  permiten cambiar el potencial de membrana, ya que utilizamos tanto un canal silvestre ( $K_{ATPWT}$ ), que está cerrado en condiciones basales, como un mutante con ganancia de función ( $K_{ATPGD}$ ), que está abierto en condiciones basales y por tanto hiperpolariza a las células que lo expresan. La proliferación inducida por Kv1.3 no se vio alterada por la coexpresión de Kv1.3 +  $K_{ATPWT}$ , pero fue abolida en las células que coexpresaban Kv1.3 +  $K_{ATPGD}$ . La repolarización de la membrana mediante incubaciones cortas en medios con altas concentraciones de  $K^+$  extracelular revirtió el efecto inhibitorio que ejercía  $K_{ATPGD}$  sobre la proliferación inducida por Kv1.3. Para excluir la posibilidad de que estos resultados fueran debidos a la permeabilidad a  $K^+$  de Kv1.3 se repitieron los experimentos con el mutante del poro Kv1.3WF, obteniéndose los mismos resultados. Estos resultados nos permiten concluir que el canal Kv1.3 modula la proliferación actuando como un sensor de voltaje, que ante cambios en el  $E_M$  sufre cambios conformacionales que conducen a la activación de vías de señalización que favorecen la proliferación celular.

**Palabras clave:** Kv1.3, potencial de membrana, células de músculo liso vascular, modulación fenotípica.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1 Sistema cardiovascular y estructura de los vasos sanguíneos	4
1.2 Células de músculo liso vascular y modulación fenotípica	5
1.3 Canales de K <sup>+</sup> voltaje dependiente (Kv) y su papel en la modulación fenotípica: El canal Kv1.3	6
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>11</b>
3.1 Vectores	11
3.2 Cultivo celular	11
3.3 Transfección de HEK293	11
3.4 Medida del potencial de membrana	12
3.5 Ensayos de proliferación	13
3.6 Análisis estadístico de datos	14
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
4.1 Efectos de la expresión de Kv1.3 solo o con KATP sobre EM	15
4.2 Efecto de la expresión de Kv1.3 solo o con KATP sobre la proliferación celular	16
4.3 Efectos de la manipulación del EM en células expresando Kv1.3 con KATP sobre la proliferación celular	16
4.4 Efectos de la expresión del canal Kv1.3WF solo o con canales KATP sobre el EM y la proliferación	17
4.5 Efectos de la manipulación del EM en células expresando Kv1.3WF con KATP sobre la proliferación celular	18
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>21</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>21</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>22</b>
<b>9. PRESENTACIÓN TFG</b>	<b>23</b>

## ABREVIATURAS

- **EdU**: 5-ethynyl-2-deoxyuridine.
- **E<sub>M</sub>**: Potencial de membrana.
- **FBS**: Suero bovino fetal.
- **HEK**: Células embrionarias de riñón humano.
- **[K<sup>+</sup>]<sub>E</sub>**: Concentración de K<sup>+</sup> extracelular.
- **K<sub>ATP</sub>**: Canal de potasio regulado por ATP.
- **K<sub>ir</sub>**: Canal de potasio rectificador interno.
- **K<sub>v</sub>**: Canal de potasio dependiente de voltaje.
- **MEM**: Minimal Essential Medium, Gibco.
- **PM**: Modulación fenotípica.
- **SUR**: Receptor de sulfonilureas.
- **VSMCs**: Células de músculo liso vascular.

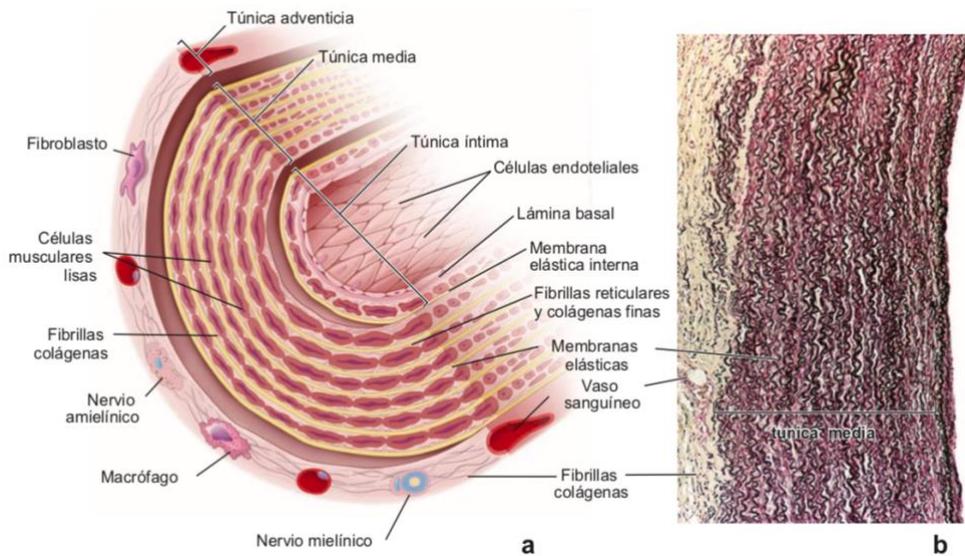
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema cardiovascular y estructura de los vasos sanguíneos

El sistema cardiovascular está formado por el corazón y una red de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) que transportan la sangre y cuya principal misión es asegurar una adecuada perfusión a todos los tejidos del organismo, además de conservar y amortiguar las oscilaciones de la presión sanguínea **(1)**.

La pared de los vasos sanguíneos está formada por tres capas, que de fuera a dentro son: túnica adventicia, túnica media y túnica íntima. Estas estructuras se encuentran bien conservadas en la mayoría de los vasos (excepto los capilares que carecen de túnica media) aunque dependiendo del tipo de vaso y la localización pueden presentar ciertas variaciones de grosor y composición **(2)**.

- **Túnica adventicia**, es la capa de tejido conjuntivo más externa, se compone principalmente de tejido colágeno de disposición longitudinal y algunas fibras elásticas. Estos elementos se mezclan gradualmente con el tejido conjuntivo laxo que rodea los vasos. El espesor de la túnica adventicia oscila entre relativamente delgado en la mayor parte del sistema arterial hasta bastante grueso en las vénulas y venas, donde es el componente principal de la pared vascular. Además, la túnica adventicia de las arterias y las venas grandes contiene un sistema de vasos llamados *vasa vasorum* que irriga las paredes vasculares, al igual que una red de nervios autónomos llamados *nervi vasorum* que controlan la contracción del músculo liso en la pared del vaso.
- **Túnica media** o capa media, se compone principalmente de capas organizadas en estratos circunferenciales de células musculares lisas (**VSMC, Vascular Smooth Muscle Cells**). En las arterias, esta capa es relativamente gruesa y se extiende desde la membrana elástica interna hasta la membrana elástica externa. La membrana elástica externa es una lámina de elastina que separa la túnica media de la túnica adventicia. Entre las VSMCs de la túnica media hay cantidades variables de elastina, fibras reticulares y proteoglicanos. Las hojas o láminas de elastina son fenestradas y están dispuestas en capas circulares concéntricas. Todos los componentes extracelulares de la túnica media son producidos por las VSMCs.
- **Túnica íntima**, es la capa más interna de la pared del vaso, consta de tres componentes: 1) una capa simple de células epiteliales, el endotelio; 2) la lámina basal de las células endoteliales (una delgada capa extracelular compuesta principalmente por colágeno, proteoglicanos, y glucoproteínas) y 3) la capa subendotelial, que consta de tejido conjuntivo laxo. En este tejido conjuntivo laxo a veces se encuentran células musculares lisas. La capa subendotelial de la íntima en las arterias y arteriolas contiene una capa o lámina de material elástico fenestrado que recibe el nombre de membrana elástica interna. Las fenestraciones permiten que las sustancias se difundan con facilidad a través de la capa y alcancen las células más profundas dentro de la pared del vaso.



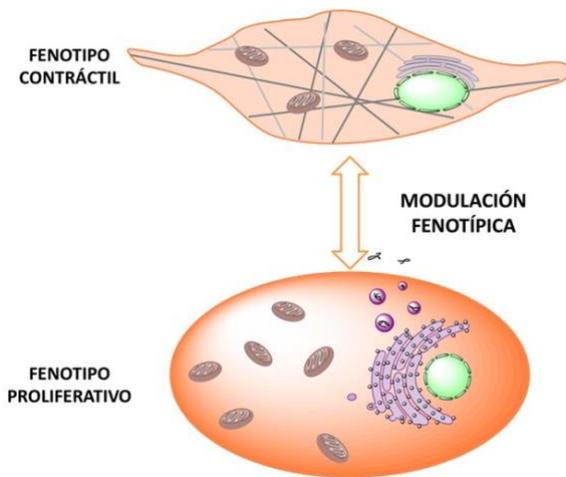
**Figura 1. Estructura de la arteria aorta humana. Figura a:** diagrama de los distintos componentes vasculares descritos en el texto. **Figura b:** fotomicrografía que muestra el corte de la pared de la aorta humana teñida con resorcina-fucsina de Weigert; se observan las membranas elásticas entremezcladas con las células de músculo liso de la túnica media (2).

## 1.2 Células de músculo liso vascular y modulación fenotípica

Las células de músculo liso vascular son las encargadas de dar soporte estructural al vaso y regular el flujo de sangre. Presentan una amplia gama de proteínas contráctiles, receptores, moléculas de señalización y canales iónicos, y su ciclo celular está caracterizado por unas tasas de proliferación, migración y producción de proteínas de la matriz extracelular bajas. Esta descripción se corresponde con un **fenotipo contráctil**, quiescente y bien diferenciado que puede sufrir modificaciones de tal forma que las VSMCs pueden pasar a un estado menos diferenciado que se corresponde con un **fenotipo proliferativo** o sintético, con mayores tasas de síntesis proteica, proliferación y con capacidad de migrar. Este proceso se conoce como **modulación fenotípica (PM, Phenotypic Modulation) o cambio fenotípico (3, 4)**.

Los fenotipos contráctil y proliferativo representan los extremos de un espectro de fenotipos con múltiples estadios intermedios que, regulados por señales extracelulares e intracelulares, coexistirían en las paredes de los vasos.

En un vaso sano, la PM ocurre a un ritmo bajo, aunque constante y suficiente como para posibilitar la renovación de la pared vascular, así como para asegurar la reparación anatómica y funcional del daño en caso de que éste se produjese. Sin embargo, cuando los mecanismos que controlan el proceso fallan, la plasticidad de las VSMCs se vuelve perjudicial porque es responsable de la hiperplasia de la íntima, un proceso que lleva al engrosamiento de la capa íntima y que constituye uno de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de afecciones vasculares como la arterioesclerosis, la re-estenosis postangioplastia o la vasculopatía del trasplante, problemas médicos potencialmente mortales y relevantes desde un punto de vista epidemiológico. (3,4,5)



**Figura 2. PM en VSMCs.** Las VSMCs con fenotipo contráctil son células diferenciadas, de aspecto fusiforme, que contienen proteínas contráctiles como filamentos de actina y miosina. Las células con fenotipo proliferativo presentan abundante retículo endoplasmático rugoso que permite la síntesis de proteínas asociadas a las funciones migratorias y de proliferación, así como de proteínas de la matriz extracelular.

### 1.3 Canales de K<sup>+</sup> voltaje dependiente (Kv) y su papel en la modulación fenotípica: El canal Kv1.3

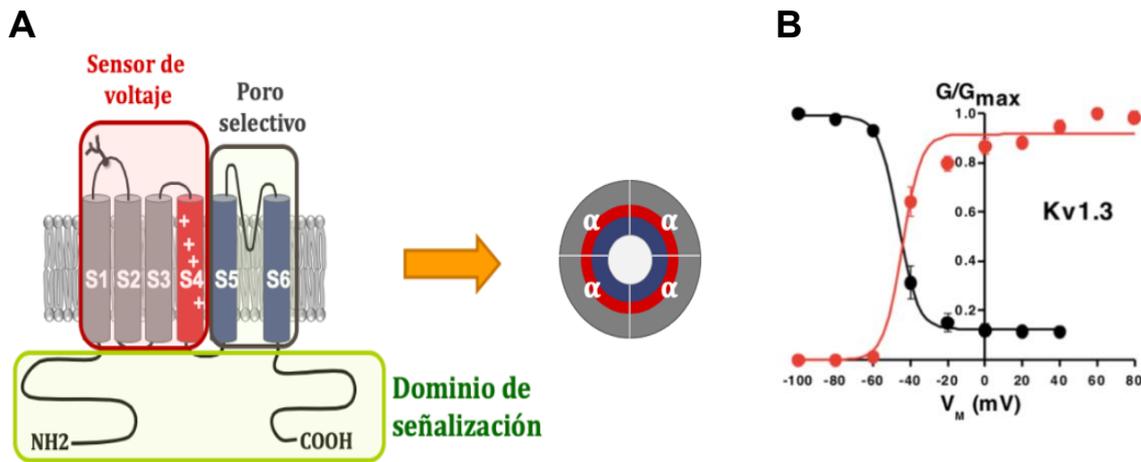
#### *Perspectiva general*

Las VSMCs presentan una gran variedad de canales Kv, cuya expresión es diferente en función del lecho vascular y el tamaño del vaso donde se encuentren. Los canales Kv juegan un papel fundamental en la respuesta de las VSMCs regulando el potencial de membrana y, en consecuencia, el flujo de Ca<sup>2+</sup>. Ambos mecanismos están implicados a su vez en funciones celulares básicas como la proliferación, migración y secreción celular.

Dentro de la gran familia de canales de potasio dependientes de voltaje, el canal Kv1.3 ha sido implicado en proliferación en diferentes tipos celulares como: linfocitos T, linfocitos B, oligodendrocitos, macrófagos, microglía, astrocitos y células tumorales (6). Este resultado se ha observado también en las VSMCs de distintos lechos vasculares y distintas especies, incluyendo la humana (7). Un estudio previo de nuestro grupo de investigación caracterizó la expresión de un gran número de canales iónicos en VSMCs de arteria femoral de ratón. Para ello se utilizaron dos modelos de proliferación: un modelo *in vivo* (por lesión endoluminal del vaso) y un modelo *in vitro* (VSMCs en cultivo primario). Se observó que solo dos genes de los 96 analizados mostraron un aumento significativo en su expresión en ambos modelos: el canal Kv1.3 y la subunidad Kvβ2, subunidad que actúa de chaperona de los canales Kv1 (3). Asimismo, se demostró como la inhibición de este canal disminuía la proliferación y migración de las VSMCs en cultivos celulares. Trabajos posteriores muestran como el bloqueo del canal reduce la formación de hiperplasia de la íntima en un modelo de lesión murina (8). Estos resultados sugieren un papel fundamental de Kv1.3 en el proceso de modulación fenotípica de las VSMCs por lo que es relevante estudiar los mecanismos responsables para la utilización de este canal como posible diana terapéutica para controlar la hiperplasia de la íntima asociada a lesiones vasculares.

#### **Kv1.3**

Kv1.3 es un canal de potasio dependiente de voltaje que pertenece a la subfamilia Kv1 (familia Shaker). El canal funcional es un tetrámero de subunidades α, constituidas cada una de ellas por 6 hélices transmembrana (S1-S6) y dos dominios citoplasmáticos. Los elementos transmembrana se organizan en dos dominios, el **sensor de voltaje**, encargado de detectar el potencial de membrana (S1-S4) y el dominio que forma el **poro** (S5-S6). El dominio citoplasmático amino terminal participa en la tetramerización de las subunidades α y trabajos recientes sugieren que los dominios intracelulares pueden tener un destacado papel en la señalización celular a través de sus interacciones con otras proteínas (ver Figura 3).



**Figura 3. A. Esquema de la estructura del Kv1.3.** La figura muestra las subunidades Kva descritas arriba y la disposición de las cuatro subunidades alrededor de poro para formar el canal funcional (6). **B. Biofísica del canal.** La figura muestra las curvas de activación (en rojo) e inactivación (en negro) dependiente de voltaje del canal.

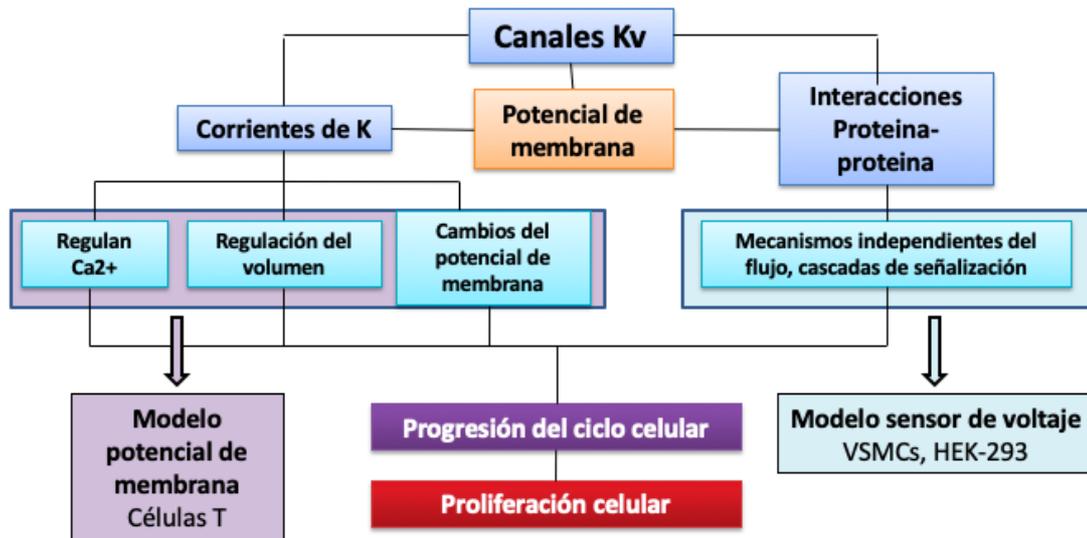
El canal funciona de tal forma que la despolarización de la membrana provoca un movimiento de cargas en S4 (corriente de compuerta o de “gating”) acompañado de un cambio conformacional en S4 que se traduce en un desplazamiento de la unión de las subunidades S4-S5. Este desplazamiento determina un cambio estructural que provoca la apertura del poro del canal y permite el paso de iones K<sup>+</sup> a su través. El umbral de activación de los canales Kv1.3 está situado en torno a los valores de -50 mV y -60 mV, y la probabilidad de apertura del canal aumenta con la despolarización. El punto medio de la activación dependiente de voltaje se encuentra alrededor de -40mV en células T (curva roja en la figura 3B). La despolarización mantenida conduce a una inactivación del canal dependiente del voltaje con un valor medio situado en torno a -45mV (9).

Además, la actividad de Kv1.3, puede ser modulada mediante la interacción con otras proteínas como: las subunidades β citoplasmáticas, integrinas, caveolinas o proteínas con dominios PDZ. Asimismo, modificaciones post-transcripcionales como la fosforilación o la glicosilación pueden regular la actividad del canal (6).

### **Participación del canal en la proliferación celular**

Los mecanismos por los que Kv1.3 está implicado en la proliferación celular no han sido descritos aun con exactitud. No obstante, existen 2 modelos que, desde un punto de vista mecanicista, intentan explicar cómo Kv1.3 media la progresión del ciclo celular.

- **El modelo de potencial de membrana.** Este modelo propone que el canal Kv1.3 es importante en la proliferación, porque los flujos de K<sup>+</sup> pueden controlar el potencial de membrana y, por lo tanto, la fuerza impulsora del Ca<sup>2+</sup>. Además, también pueden contribuir a regular el volumen celular, que también es un parámetro crítico para la proliferación celular (10). En las células inmunes (células T, células B y macrófagos) este es el mecanismo que explica el papel de Kv1.3 en proliferación (9,11,12).
- **El modelo del sensor de voltaje.** Según este modelo, hay cambios conformacionales dependientes de voltaje en el canal que se traducen en la activación de cascadas de señalización que inducen proliferación. En este modelo, la señalización no depende de su actividad como canal sino de la proteína del canal que puede interactuar con las vías de señalización celular a través de proteínas asociadas (13).



**Figura 4. Mecanismos de proliferación de los canales Kv.** Los canales Kv influyen en la progresión del ciclo celular a través de mecanismos dependientes e independientes del flujo de iones (10).

#### ***Kv1.3 actúa como un sensor de voltaje***

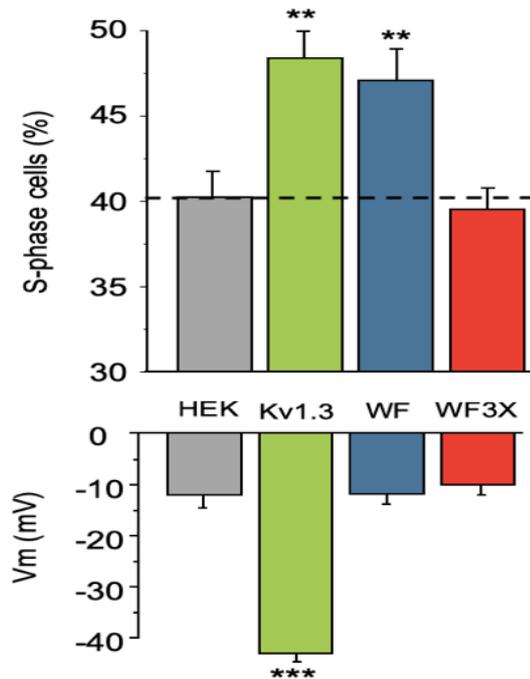
Para estudiar el mecanismo mediante el cual Kv1.3 induce proliferación se expresó el canal en un sistema heterólogo, las células HEK293, que permite expresar la proteína de interés sola o acompañada y estudiar el efecto producido sobre la función de interés. Resultados previos del laboratorio ya demostraron que la sobreexpresión del canal en las células HEK aumenta la proliferación con respecto a las células no transfectadas y que este efecto pudo inhibirse mediante el uso de bloqueadores selectivos de Kv1.3 (3). Para estudiar el mecanismo implicado se construyeron varios mutantes del canal que se describen a continuación:

1. Canal Kv1.3WF, canal Kv1.3 con una mutación en la región del poro; el resultado es un canal Kv1.3 con el sensor de voltaje intacto pero que no permite el flujo de iones a través del poro.
2. Canal Kv1.3WF3X, canal Kv1.3 con el poro y el sensor mutado, es decir, no detecta cambios en el potencial de membrana y no conduce K<sup>+</sup>.



**Figura 5. A. Kv1.3WF:** Kv1.3 no conductor con una mutación puntual (W389F) en el dominio del poro. **B. Kv1.3WF3X:** Kv1.3 no conductor e insensible al voltaje, con la mutación del poro (W389F) y tres mutaciones puntuales adicionales en la región S4 (R320N / L321A / R326I).

Con estos mutantes se realizaron experimentos de proliferación celular y se demostró que solo las células transfectadas con el canal silvestre y el mutante WF (sin poro, pero con un sensor de voltaje intacto) aumentaban su tasa de proliferación con respecto a las HEK control. La conclusión de estos experimentos fue que en las células HEK, Kv1.3 puede inducir la proliferación mediante un mecanismo independiente de flujo de K<sup>+</sup>, pero requiere un sensor de voltaje intacto (16).



**Figura 6. Mutantes de Kv1.3 y proliferación.** Efecto de la expresión del canal Kv1.3 o sus mutantes en células HEK sobre la tasa de proliferación celular (gráfica superior) y sobre el potencial de membrana (gráfica inferior).

En este trabajo se profundiza en los mecanismos que involucran al canal Kv1.3 en proliferación, analizando cómo afectan los cambios en el potencial de membrana ( $E_M$ ) a la proliferación mediada por el canal Kv1.3 y el canal Kv1.3WF. Para ello se transfectarán células HEK293 con el canal silvestre Kv1.3 y el mutante del poro Kv1.3WF, bien solos, bien junto con canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). Estos  $K_{ATP}$  nos permitirán cambiar  $E_M$ , ya que utilizaremos tanto un canal silvestre ( $K_{ATP}$  WT) como un mutante con ganancia de función ( $K_{ATP}$  GD), que está abierto en condiciones basales y que por tanto va a hiperpolarizar las células. De esta manera estudiaremos cómo afectan los cambios en el potencial de membrana a la proliferación celular mediada por Kv1.3.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis** de este trabajo es que los cambios en el potencial de membrana ( $E_M$ ) de la célula son detectados por el canal Kv1.3, que sufre unos cambios conformacionales dependientes de voltaje que se transmiten al dominio citoplasmático y activan cascadas de señalización implicadas en la proliferación celular.

El **objetivo principal** ha sido estudiar cómo los cambios en el potencial de membrana afectan a la proliferación celular inducida por Kv1.3 o el mutante del poro Kv1.3WF en células HEK293.

Los objetivos específicos han sido:

1. Medir el potencial de membrana de las células HEK293 transfectadas con el canal Kv1.3 solo o en presencia de los canales  $K_{ATP}$  WT o  $K_{ATP}$  GD.
2. Analizar la tasa de proliferación de células HEK293 transfectadas con el canal Kv1.3 solo o en presencia de los canales  $K_{ATP}$  WT o  $K_{ATP}$  GD.
3. Estudiar el efecto sobre la proliferación inducida por Kv1.3 de maniobras experimentales que impidan la hiperpolarización inducida por  $K_{ATP}$  GD.
4. Comprobar si el efecto de los cambios en el potencial de membrana sobre la proliferación son los mismos cuando se expresa el canal sin poro, Kv1.3WF, repitiendo las determinaciones de los objetivos 1, 2 y 3 en células transfectadas con Kv1.3WF.

## 3. MATERIAL Y METODOS

### 3.1 Vectores

Para la realización de este trabajo las células HEK se transfectaron con los vectores de expresión que se describen a continuación:

1. **pmCherry-N1**. Este vector está diseñado para expresar una proteína de interés fusionada con el extremo amino de la proteína mCherry. El vector vacío expresa una proteína fluorescente roja, mCherry, que se utiliza como condición control del experimento y permite determinar la eficiencia de transfección. Las células se someten al proceso de transfección con un vector que no expresa el canal de estudio.
2. **pCherry-N1-Kv1.3**. Este vector expresa la proteína de fusión formada por el canal Kv1.3 y la proteína mCherry en su extremo carboxilo (**14**).
3. **pCherry-N1-Kv1.3-WF**. Expresa el canal Kv1.3 sin poro, con la mutación W389F, fusionado con la proteína mCherry.
4. **pcDNA3.1-Kir6.2WT**. Expresa la proteína de membrana Kir6.2 silvestre, que es la subunidad formadora del poro del canal de potasio sensible a ATP,  $K_{ATP}$ , que se activa por la disminución de los niveles intracelulares de ATP y se cierra en presencia de niveles elevados de ATP.
5. **pcDNA3.1-Kir6.2G334D**. Expresa la subunidad formadora de poro Kir6.2 con una mutación, G334D, que hace que al canal insensible a la inactivación por ATP y que, por tanto, está constitutivamente abierto, es una mutación de ganancia de función.
6. **pECE-SUR1**. Expresa la subunidad reguladora SUR1 (receptor de sulfonilurea) que junto con la subunidad Kir6.2 forma el canal de potasio sensible a ATP,  $K_{ATP}$ . Los vectores 4,5 y 6 fueron donados por el Dr. Colin Nichols (St. Louis, MO).

### 3.2 Cultivo celular

Para expresar los vectores mencionados anteriormente se utilizó la línea celular HEK293. Esta línea celular se obtuvo en 1973, cuando células embrionarias renales, mediante un proceso de transformación, incorporaron a su cromosoma 19 parte del ADN del adenovirus humano tipo 5. Estas células son muy utilizadas en investigación porque son muy fáciles de cultivar, crecen muy rápido y se transfectan con mucha facilidad.

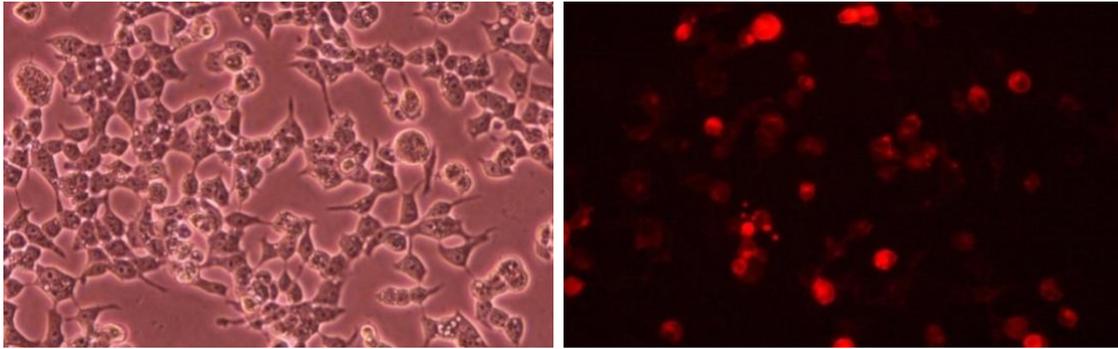
Las células HEK293 fueron adquiridas de ATCC® CRL-3216™. El medio de cultivo utilizado fue el MEM, suplementado con un 5 % de FBS, 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina, 5 µg/ml de fungizona y 2 mM de L-glutamina. Las células se manipularon siempre en una campana de flujo laminar (Telstar Biostar) con un filtro que retiene partículas superiores a 0.2 µm y permite mantener las condiciones de esterilidad. Se utilizaron material y soluciones estériles. Las células se mantuvieron en un incubador (Hera Cell 150, Telstar) a 37 °C, bajo atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 Transfección de HEK293

Las células HEK293 fueron transfectadas mediante lipofección cuando alcanzaron una confluencia comprendida entre el 80-90%. Se usó Lipofectamina® 2000, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La lipofección es una técnica que permite introducir material genético dentro de la célula utilizando liposomas, que son vesículas capaces de fundirse con la membrana plasmática, puesto que ambas estructuras están formadas por una bicapa fosfolipídica. En el proceso se utiliza, generalmente, un lípido con carga positiva (lípido catiónico) que es capaz de unirse con el material genético, que está cargado negativamente.

En el proceso de transfección se utilizaron 1-2 microgramos de plásmido para transfectar una placa de Petri de 35mm de diámetro, 9,6 cm<sup>2</sup>, al que se añadió Lipofectamine2000 en una proporción de 1:3 (1 µg de plásmido: 3 µl de Lipofectamina). La mezcla se preparó en un eppendorf con 1ml de Opti-MEM, que es un medio de suero reducido. Para permitir que se formasen los liposomas, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, el medio en el que estaban siendo cultivadas las células HEK fue eliminado y sustituido por la mezcla de transfección. Pasadas 24 horas, se comprobó cualitativamente la eficiencia de la transfección observando en el microscopio el número de células que expresaban la mCherry, la proteína fluorescente roja.



**Figura 7. Imágenes de microscopía de células HEK.** A la izquierda imagen de células HEK adquiridas con un microscopio de contraste de fases. A la derecha imagen adquirida con un microscopio de fluorescencia que muestra en rojo las células HEK transfectadas con un vector que expresa la proteína Cherry.

### 3.4 Medida del potencial de membrana

La medida del potencial de membrana ( $E_m$ ) se llevó a cabo con la técnica de patch-clamp en el modo current clamp (fijación de corriente) y en la configuración de parche perforado.

El patch-clamp (pinzamiento de membrana) es una técnica electrofisiológica que permite estudiar las propiedades eléctricas de las membranas biológicas. Fue desarrollada en la década de los 70 por los científicos alemanes, Erwin Neher y Bert Sakmann y obtuvieron por ello, en 1991, el premio Nobel de Fisiología.

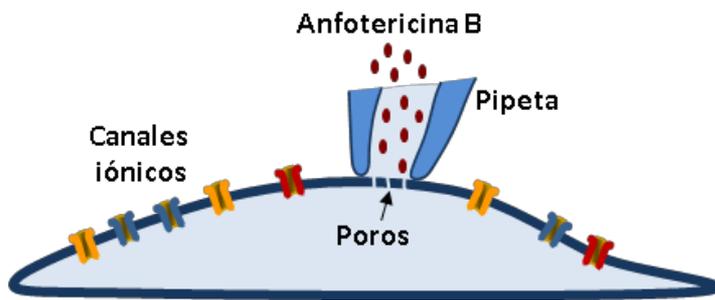
En los experimentos de patch-clamp se emplean dos electrodos:

- **Electrodo de registro**, situado dentro de una micropipeta que se rellena con una solución interna, es el que está en contacto con la célula.
- **Electrodo de referencia**, situado en la solución externa que baña a las células.

Cuando el electrodo situado en la pipeta entra en contacto con la célula se aplica una pequeña succión, se forma un sello de alta resistencia y se establece un circuito eléctrico. El amplificador conectado al electrodo de registro permite registrar y controlar el potencial de membrana y las corrientes iónicas.

El potencial de membrana lo medimos con la modalidad de current-clamp (o fijación de corriente), que nos permite medir el  $E_m$  de las células y sus cambios en respuesta a cambios en la composición de la solución externa (diferentes concentraciones de  $K^+$ ).

Se utilizó la configuración de parche perforado que nos permite preservar la composición del medio intracelular. En esta configuración, el acceso eléctrico con el citosol se consigue añadiendo en la solución interna de la pipeta agentes como nistatina o anfotericina B que generan pequeños poros en la membrana por los que solo se mueven iones monovalentes, de tal forma que se mantienen el resto de los componentes del citosol (**15**).



**Figura 8. Configuración de parche perforado.** La configuración de parche perforado se consigue incorporando el antibiótico y antifúngico, anfotericina B, en la solución interna de la pipeta. Los pequeños poros que se forman en la membrana permiten únicamente el paso de iones monovalentes, por lo que se evita la diálisis del medio intracelular a la misma vez que se consigue un buen acceso eléctrico.

### Procedimiento experimental

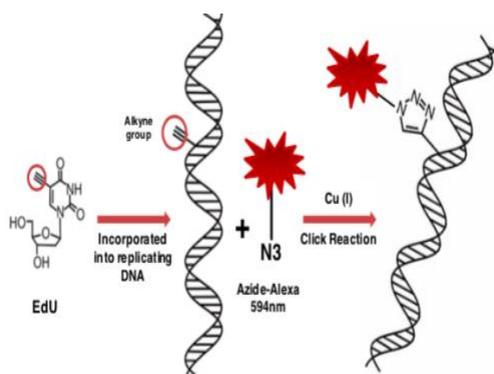
Las células HEK transfectadas se sembraron sobre pequeños cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina y se dispusieron en el fondo de una pequeña cámara de registro (0,2 ml), situada en la platina de un microscopio invertido. La cámara se perfundió por gravedad con la solución de baño o solución externa que contiene (en mM): 141 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES (pH 7.4 con NaOH). Para los tratamientos con concentraciones crecientes de potasio las soluciones se obtienen aumentando la concentración de KCl a expensas de reducir la concentración de NaCl para mantener la osmolaridad.

Se utilizaron pipetas de vidrio de borosilicato (2.0 mm O.D, WPI) pulidas (Narishege PP-83) y con unas resistencias de entre 3-7 MΩ. Para los experimentos de parche perforado antes de rellenar la pipeta con la solución interna se sumerge la punta de la pipeta brevemente en una solución que contiene (en mM): 40 KCl, 95 KGlutamato, 8 CaCl<sub>2</sub> y 10 HEPES (pH 7.2 con KOH) y posteriormente, se rellena con la misma solución que contenía anfotericina B (480 µg / ml).

Los registros se obtuvieron con un amplificador Axopatch 700A. Después de obtener un sello de alta resistencia se evaluó el acceso eléctrico al citoplasma celular comprobando el aumento en la capacitancia de la célula. En este momento el amplificador se cambió al modo de current clamp y se registró en modo continuo el potencial de membrana para determinar su valor en reposo o sus cambios en respuesta al aumento de [K<sup>+</sup>] extracelular en células control o células transfectadas con los diferentes plásmidos. Los datos electrofisiológicos se analizaron con la subrutina CLAMPFIT del software PCLAMP (Axon) y el software ORIGIN 7.5.

### 3.5 Ensayos de proliferación

Para determinar la tasa de proliferación celular se utilizó el kit comercial Click-iT®EdU CellproliferationAssay (Invitrogen). En este ensayo se emplea el reactivo EdU (5-etinil-2'-deoxyuridina), que es un análogo de la timidina que es incorporado por las células que proliferan al nuevo DNA sintetizado durante la fase S del ciclo celular. La adición posterior de azida AlexaFluor® 488 (verde), que reacciona con el grupo alquilo de EdU mediante la reacción de Click, permite detectar el EdU incorporado mediante fluorescencia verde.



**Figura 9. Reacción de click.**

Las células en proliferación incorporan el análogo de la timidina EdU, cuyo grupo alquilo es capaz de unirse a una azida fluorescente, en una reacción catalizada por cobre y detectada por fluorescencia.

Las células HEK se transfectaron con los vectores indicados en cada experimento, se sembraron 40.000 células por cristales de 12 mm de diámetro cubiertos con poli-L-lisina y se incubaron con Edu (20  $\mu$ M) en medio de cultivo durante 30 minutos. Posteriormente las células se fijaron con formaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% y se procedió a iniciar la reacción de Click-IT, según las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el número total de células, éstas se incubaron con el marcador fluorescente Hoechst 33342 (azul), que se une al DNA marcando los núcleos. Por último, los cristales se montaron en portaobjetos utilizando Vectashield®.

La tasa de proliferación se estimó como el porcentaje de células que incorporaron Edu (Células Edu +) con respecto al total de células marcadas con el marcador nuclear Hoechst 33342.

Las imágenes se adquirieron con el objetivo de 10X en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i, con el software Nis-Element (Nikon). Las imágenes se binarizaron para medir el porcentaje de área teñida usando el software Fiji (Imagen J).

En cada experimento se hicieron triplicados de cada condición y se adquirieron 4 o 5 imágenes de cada cristal, en todos los experimentos se realizaron controles internos positivos y negativos. La selección y el análisis de los campos se llevó a cabo con el método de doble ciego.

Para los ensayos de proliferación en los que el medio extracelular tenía concentraciones de  $K^+$  elevadas se fueron mezclando en las proporciones requeridas las soluciones A y B, siendo solución A (en mM): 114.9 NaCl, 0 KCl, 0.81  $MgSO_4$ , 44  $NaHCO_3$ , 0.91  $NaH_2PO_4$ , 5.55 Glucosa, 1 piruvato de sodio,  $2.5 \times 10^{-4}$   $Fe(NO_3)_3$  y 1.80  $CaCl_2$  y solución B: la misma composición salvo el NaCl a 0 y el KCl a 114.9 mM respectivamente. De esta forma se consiguieron soluciones isosmóticas a diferentes concentraciones de  $K^+$  extracelular.

### 3.6 Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico se realizó utilizando los paquetes de software Microsoft Excel y R. Los datos recogidos de varios experimentos diferentes se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Bartlett se usaron para evaluar la normalidad y la homogeneidad de las variaciones, respectivamente. Para la comparación de 3 o más grupos se empleó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA), y cuando la ANOVA reveló diferencias entre grupos, para determinar entre qué grupos se dan las diferencias, se utilizó el Test de Tukey en el caso de distribuciones normales y variaciones iguales o el Test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn en el resto de casos. A lo largo de trabajo las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

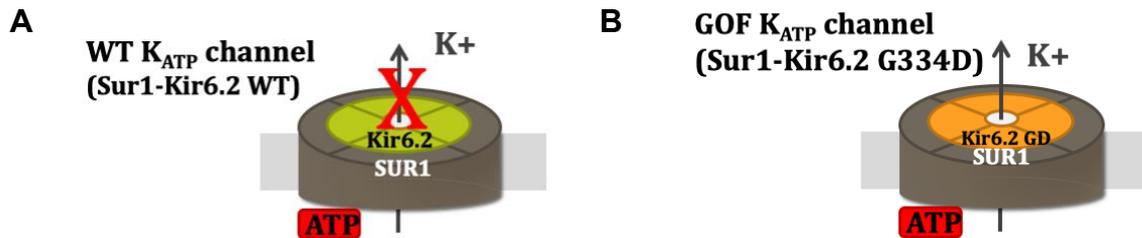
Para explorar si el papel pro-proliferativo de Kv1.3 en células HEK depende de los cambios conformacionales dependientes de voltaje que llevan el canal de un estado cerrado a un estado abierto, se manipuló el  $E_M$  en estado de reposo de las células HEK cotransfectando el canal Kv1.3 junto con una canal de potasio  $K_{ATP}$ , y se realizaron medidas tanto de potencial de membrana como de las tasas de proliferación en las diferentes condiciones de estudio.

### 4.1 Efectos de la expresión de Kv1.3 solo o con $K_{ATP}$ sobre $E_M$

Nuestro primer objetivo fue explorar el potencial de membrana en células HEK que expresan el canal Kv1.3 solo o en presencia del canal  $K_{ATP}$  silvestre ( $K_{ATPWT}$ ) o el canal  $K_{ATP}$  mutado con ganancia de función ( $K_{ATPGD}$ ).

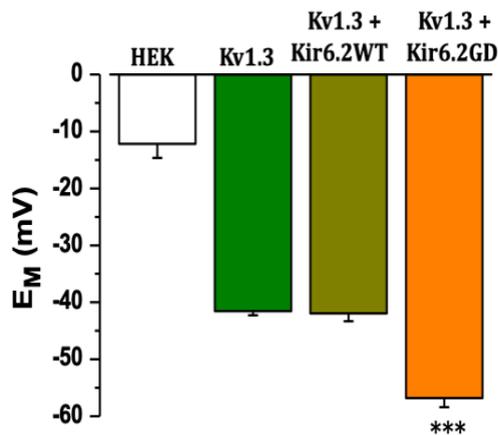
Los canales  $K_{ATP}$  son canales de potasio sensibles a nucleótidos intracelulares, que se activan por MgADP y se inhiben por ATP. Actúan como sensores metabólicos, de forma que cuando baja la concentración de ATP se abre el canal y se hiperpolariza la célula, mientras que cuando la concentración de ATP se mantiene en niveles normales, como sucede en los cultivos, el canal está cerrado y la célula despolarizada.

En este trabajo, para expresar los  $K_{ATP}$ , las células HEK fueron cotransfectadas con las subunidades Kir6.2+SUR1, que forman el canal funcional presente en tejidos como el corazón y el páncreas (17). Cuando se transfectan con la subunidad Kir6.2 silvestre, se expresa el canal  $K_{ATP}$ -WT y cuando se transfectan con la subunidad Kir6.2 con una mutación, G344D, que hace al canal insensible a ATP, se expresa el canal  $K_{ATPGD}$  o canal con ganancia de función, que está permanentemente abierto (18) (ver figura 10).



**Figura 10. Representación esquemática de los canales  $K_{ATP}$ .** A.  $K_{ATPWT}$ , en condiciones normales de cultivo está inhibido por el ATP, que se encuentra a valores de 5mM-10mM, por lo que el canal permanece cerrado y la célula no se hiperpolariza. B.  $K_{ATPGD}$ , este canal está constitutivamente abierto debido a que la mutación en la subunidad Kir6.2 lo hace insensible a la inhibición por ATP.

Cuando medimos el  $E_M$  comprobamos que, como ya se había descrito (16), la transfección de las células HEK con el canal de potasio Kv1.3 hiperpolariza el  $E_M$  de reposo. El  $E_M$  cambia de un valor medio de  $-12,2 \pm 2,5$  mV en células control, sin transfectar o transfectadas con la proteína Cherry, a un valor de  $-41,5 \pm 0,7$  mV en las células que expresan el canal Kv1.3 solo. Cuando se coexpresa el canal Kv1.3 con el  $K_{ATPWT}$  no se observa cambio en el  $E_M$ , como cabía esperar, dado que en las condiciones de cultivo en las que están las células este canal está inhibido por el ATP. Sin embargo, la coexpresión del Kv1.3 con el  $K_{ATPGD}$  hiperpolariza significativamente las células, desplazando el  $E_M$  a un valor medio de  $-56,8 \pm 1,6$  mV. A este valor de  $E_M$  el canal Kv1.3 está cerrado y no tiene capacidad de detectar cambios en el voltaje, ni de generar corrientes de gating, ni de sufrir cambios conformacionales (ver figura 3).

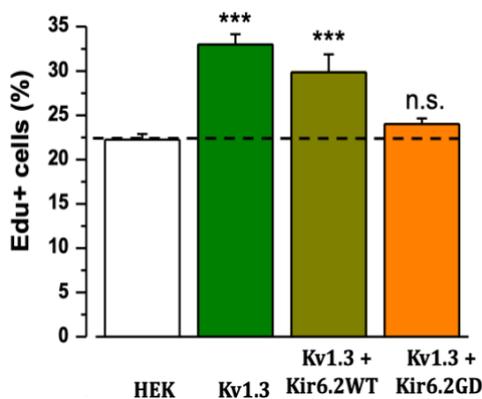


**Figura 11. Efecto sobre el  $E_M$  de la expresión del Kv1.3 solo o junto a  $K_{ATP}^{WT}$  o  $K_{ATP}^{GD}$ .** Las barras representan la media de  $E_M$  de células HEK transfectadas con los canales indicados. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las HEK control.

## 4.2 Efecto de la expresión de Kv1.3 solo o con $K_{ATP}$ sobre la proliferación celular

Una vez determinado el valor del potencial de membrana estudiamos la tasa de proliferación celular en las mismas condiciones.

Observamos como la proliferación inducida por la expresión del canal Kv1.3 no cambia cuando coexpresamos el canal  $K_{ATP}^{WT}$ . Sin embargo, cuando se coexpresa con el canal  $K_{ATP}^{GD}$ , desaparece el efecto del Kv1.3 sobre la proliferación.



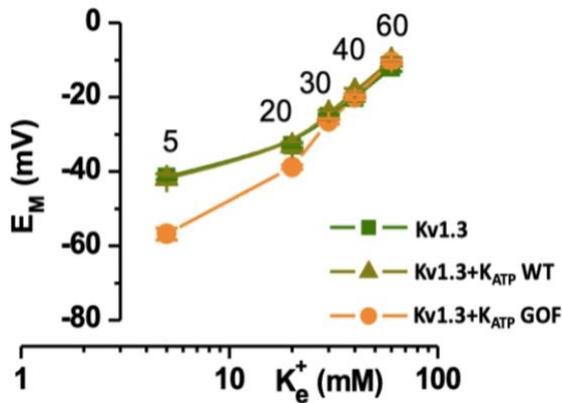
**Figura 12. Efecto sobre la proliferación de la expresión del Kv1.3 solo o junto a  $K_{ATP}^{WT}$  o  $K_{ATP}^{GD}$ .** La figura muestra la media de la tasa de proliferación, medida como células positivas para Edu, en células HEK transfectadas con los canales indicados. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las HEK control.

## 4.3 Efectos de la manipulación del $E_M$ en células expresando Kv1.3 con $K_{ATP}$ sobre la proliferación celular

Para confirmar si es la hiperpolarización de las células el factor determinante de la inhibición de la proliferación mediada por Kv1.3 en presencia de  $K_{ATP}^{GD}$ , se estudió el efecto de la incubación con concentraciones crecientes de  $K^+$  extracelular sobre el potencial de membrana en reposo y sobre la tasa de proliferación celular.

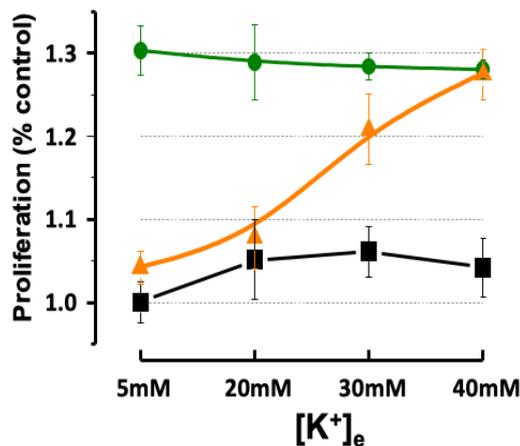
Las células HEK transfectadas con el canal Kv1.3 solo, o en presencia de  $K_{ATP}^{WT}$ , o  $K_{ATP}^{GD}$  se trataron con concentraciones crecientes de  $K^+$  extracelular, de 5 mM (concentración en condiciones normales) a 60 mM, y se midieron los cambios en el  $E_M$ .

Como muestra la figura 13, a medida que aumenta la concentración de  $K^+$  extracelular se va despolarizando el potencial de membrana en todas las condiciones estudiadas (Kv1.3 solo, Kv1.3+ $K_{ATP}^{WT}$  y Kv1.3+ $K_{ATP}^{GD}$ ), de tal forma que, a partir de una concentración de  $K^+$  extracelular determinada (en torno a 30 mM), los potenciales de membrana se igualan, sin importar que tipo de vector expresen.



**Figura 13. Efecto del K<sup>+</sup> extracelular sobre el E<sub>M</sub>.** La figura muestra la despolarización progresiva del E<sub>M</sub> al ir añadiendo concentraciones crecientes de K<sup>+</sup> extracelular a células HEK transfectadas con los canales indicados.

Sin embargo, como muestra la figura 14, la tasa de proliferación no se vio afectada por el aumento de la concentración de potasio (y por tanto por la despolarización de E<sub>M</sub>) en las células HEK control, con tasas de proliferación bajas pero constantes (**línea negra**), ni en las células transfectadas únicamente con el canal Kv1.3, que presentan valores de proliferación altos y constantes (**línea verde**). No obstante, en las células que expresan el canal K<sub>ATP</sub>GD, el efecto inhibitorio de este sobre la proliferación inducida por Kv1.3 se revierte progresivamente al aumentar la [K<sup>+</sup>]<sub>E</sub> hasta 40mM y restaurar los valores de potencial de membrana (**línea naranja**).



**Figura 14. Efectos del K<sup>+</sup> extracelular sobre la proliferación inducida por Kv1.3.** El tratamiento con las soluciones de potasio se aplicó durante la incubación con Edu. En negro las células HEK control, en verdes las células que expresan el Kv1.3 y en naranja las células que coexpresan el Kv1.3 y el K<sub>ATP</sub>GD.

#### 4.4 Efectos de la expresión del canal Kv1.3WF solo o con canales K<sub>ATP</sub> sobre el E<sub>M</sub> y la proliferación

A continuación, aunque ya se había demostrado que el efecto sobre la proliferación de los canales Kv1.3 es independiente del flujo de K<sup>+</sup> (**16**), en este trabajo se quiso descartar la posibilidad de que los efectos del cambio en el E<sub>M</sub> sobre los cambios en la proliferación fueran debidos a la permeabilidad a K<sup>+</sup> del canal Kv1.3.

Para estudiar esta posibilidad, se coexpresó el mutante del canal sin poro, el Kv1.3WF, junto con los canales K<sub>ATP</sub>WT o K<sub>ATP</sub>GD, y se determinó el potencial de membrana y la tasa de proliferación celular en cada condición.

La medida del potencial de membrana en las condiciones indicadas muestra como solo cuando se expresa el canal K<sub>ATP</sub>GD el E<sub>M</sub> cambia, la membrana se hiperpolariza a valores de -60 mV (ver figura 15), valores similares a los obtenidos cuando transfectamos el canal Kv1.3 con K<sub>ATP</sub>GD. Asimismo, Kv1.3WF induce proliferación (la proliferación inducida por Kv1.3 es independiente del flujo de K<sup>+</sup>) y ésta se inhibe en presencia del canal K<sub>ATP</sub>GD.

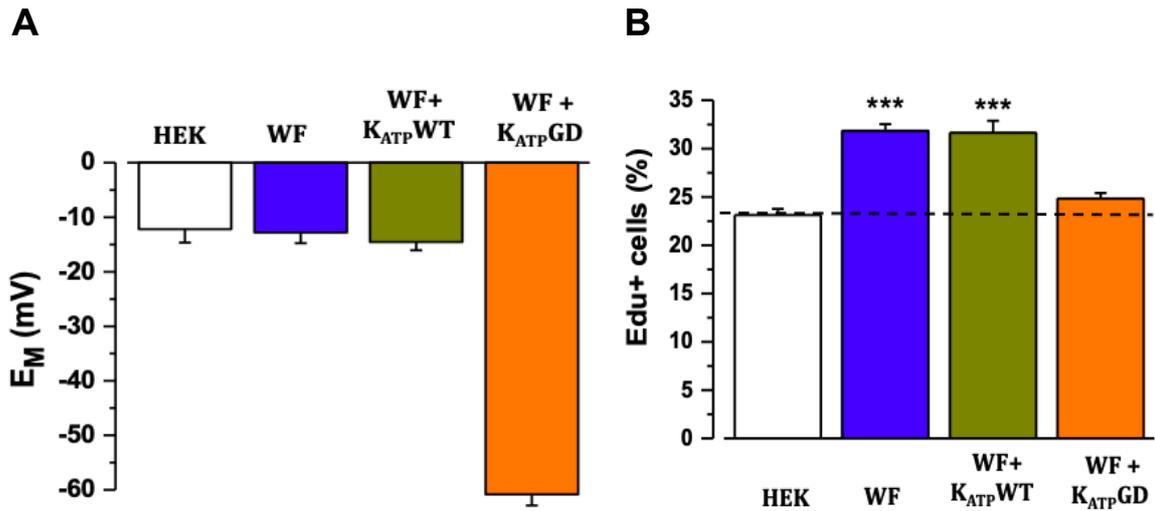


Figura 15. Efectos sobre el  $E_M$  (A) y sobre la proliferación (B) de la expresión de Kv1.3WF solo o junto con  $K_{ATP}^{WT}$  o  $K_{ATP}^{GD}$ . Las barras muestran las medias de los potenciales de membrana (A) y de las tasas de proliferación de las células HEK que expresan los canales indicados. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las HEK control.

#### 4.5 Efectos de la manipulación del $E_M$ en células expresando Kv1.3WF con $K_{ATP}$ sobre la proliferación celular

De igual forma que sucedió con el Kv1.3, la restauración de los valores de  $E_M$  con altas  $[K^+]_E$  permitió recuperar los valores de la proliferación inducida por Kv1.3WF en presencia de canales  $K_{ATP}^{GD}$ .

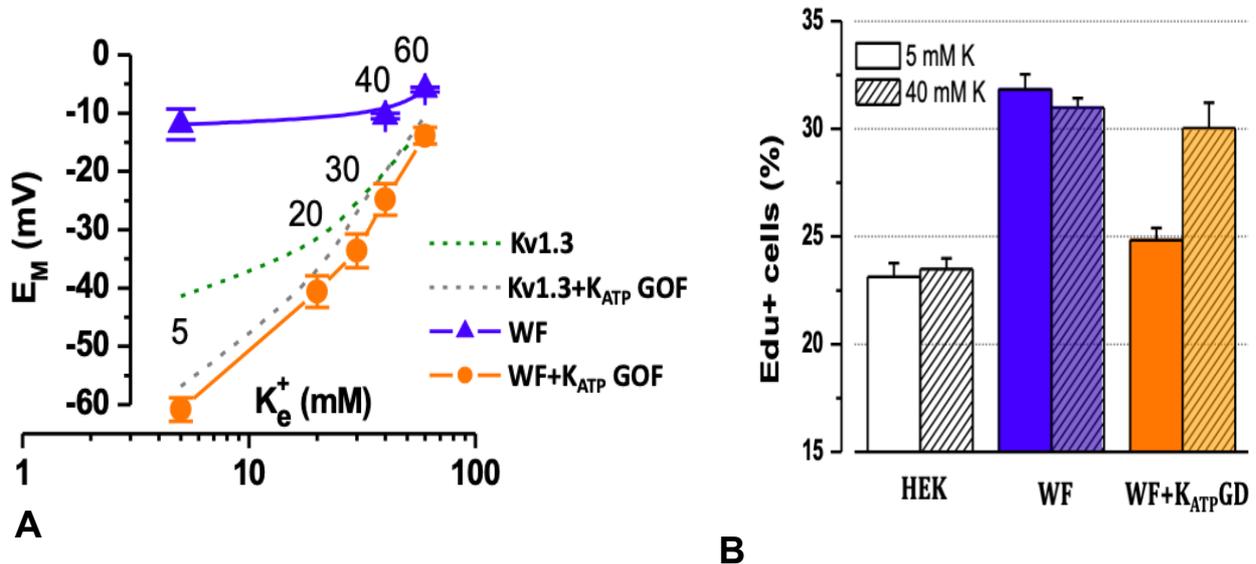


Figura 16. Efectos del aumento del  $K^+$  extracelular sobre el  $E_M$  (A) y sobre la proliferación (B). **A.** Las curvas muestran la despolarización progresiva del  $E_M$  con concentraciones crecientes de  $K^+$  extracelular. **B.** Proliferación medida tras incubar las células con 5 o 40 mM de  $K^+$  durante la incubación con Edu, en células que expresan Kv1.3WF solo o con  $K_{ATP}^{GD}$ .

Estos datos sugieren que la proliferación inducida por Kv1.3 requiere de cambios conformacionales, sensible al potencial de membrana, que se producen en la transición de cerrado a abierto y que son independientes de la permeabilidad a  $K^+$  del canal Kv1.3.

## 5. DISCUSIÓN

La modulación fenotípica es un proceso fisiológico de las VSMCs que les permite transitar desde un fenotipo contráctil, no migratorio y bien diferenciado, a un fenotipo proliferativo, migratorio y con altas tasas de síntesis de proteínas de la matriz extracelular. Este cambio de fenotipo que pueden experimentar las VSMCs es esencial para la reparación de lesiones vasculares inducidas por causas mecánicas, quirúrgicas o en respuesta al crecimiento o el desarrollo. Sin embargo, una excesiva e incontrolada modulación fenotípica que dirija las VSMCs hacia un fenotipo proliferativo es uno de los mecanismos etiopatogénicos implicados en la arterioesclerosis, la re-estenosis postangioplastia, la vasculopatía del trasplante o la hipertensión. Aunque estas entidades son complejas e involucran múltiples procesos de los que se conoce poco, los canales de potasio dependientes de voltaje han sido señalados como posibles dianas terapéuticas que pueden ofrecer resultados más positivos que las terapias actuales (19).

En este trabajo estudiamos el efecto de los cambios en el potencial de membrana sobre la proliferación inducida por el canal de potasio Kv1.3 en un sistema heterólogo, las células HEK293. Trabajos previos ya demostraron que Kv1.3 es capaz de aumentar la tasa de proliferación cuando se expresa en estas células y que este efecto es independiente de su función como canal ya que mutantes sin poro, pero no los insensibles al potencial de membrana, son también capaces de estimular la proliferación (16). Esto sugiere que el canal Kv1.3 induce proliferación **actuando como un sensor de voltaje** que detecta cambios en el potencial de membrana que se traducen en cambios conformacionales dependientes de voltaje que llevarían a la activación de cascadas/vías de señalización que activarían la proliferación celular, como se ha descrito para la vía de MEK/ERK (14).

### *Los cambios en el potencial de membrana modulan o afectan la proliferación inducida por Kv1.3*

Con el objetivo de confirmar si el papel pro-proliferativo de Kv1.3 en las células HEK depende de los cambios conformacionales dependientes de voltaje se manipuló el potencial de membrana de reposo de las células cotransfectando canales Kv1.3 con canales  $K_{ATP}$ :  $K_{ATP}^{WT}$  inhibidos por ATP y  $K_{ATP}^{GD}$  insensibles a la inhibición por ATP. La transfección de células HEK con canales Kv1.3 hiperpolarizó el  $E_M$ . Tal y como se esperaba, el  $E_M$  no se modificó en las células cotransfectadas con  $K_{ATP}^{WT}$ , mientras que las cotransfectadas con  $K_{ATP}^{GD}$  tienen un potencial de membrana significativamente hiperpolarizado debido a que estos canales mutantes están permanentemente abiertos, aumentando la permeabilidad a  $K^+$  y acercando el  $E_M$  hacia el potencial de equilibrio del  $K^+$ , en torno a -70 o -80 mV en estas células. Los ensayos de proliferación realizados en estas condiciones mostraron que la proliferación inducida por Kv1.3 no se modificó tras la cotransfección con  $K_{ATP}^{WT}$ , pero fue completamente abolida en presencia de  $K_{ATP}^{GD}$ . Para confirmar que la hiperpolarización celular es la responsable de la inhibición de la proliferación inducida por Kv1.3 en presencia de  $K_{ATP}^{GD}$  se estudió el efecto que tenía revertir los valores de  $E_M$  incubando las células con concentraciones crecientes de  $K^+$  sobre el  $E_M$  y la proliferación celular. El aumento de la  $[K^+]_E$  no afectó a la proliferación basal de HEK ni tampoco a la proliferación inducida por Kv1.3. Sin embargo, a medida que aumenta la  $[K^+]_E$  y el  $E_M$  se despolarizaba, el efecto inhibitorio que ejercía  $K_{ATP}^{GD}$  sobre la proliferación inducida por Kv1.3 se fue revirtiendo progresivamente.

### ***Los efectos del potencial de membrana sobre la proliferación inducida por Kv1.3 son independientes de la corriente de potasio del canal***

Para excluir la posible contribución de la permeabilidad a  $K^+$  de Kv1.3 a los cambios en la proliferación asociados a las variaciones en el  $E_M$  se coexpresó el mutante sin poro Kv1.3WF junto con los canales  $K_{ATPWT}$  o  $K_{ATPGD}$ , como se indicó anteriormente. Es importante descartar esta posibilidad porque la permeabilidad al  $K^+$  puede traer consigo cambios en el pH celular, cambios en el volumen o cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, parámetros que pueden afectar a la proliferación celular. Los resultados obtenidos mostraron que solo en presencia de  $K_{ATPGD}$  se hiperpolarizó la membrana, y nuevamente se produjo una inhibición de la proliferación inducida por Kv1.3WF. Al igual que con los canales Kv1.3, la restauración de los valores de  $E_M$  con incubaciones cortas en alto  $K^+$  extracelular recuperó la proliferación inducida por Kv1.3WF en presencia de canales  $K_{ATPGD}$ .

Por tanto, el canal Kv1.3 no funciona solo como un simple poro que permite el paso de iones a través de la membrana plasmática, sino que, además, actúa como una proteína integral de membrana sensible a cambios en el potencial de membrana que puede influir, a través de cambios conformacionales dependientes de voltaje, en complejos macromoleculares activando distintas vías de señalización celular.

Los resultados indican que el canal Kv1.3 es capaz de impulsar la proliferación de células HEK cuando se produce una transición de un estado cerrado a un estado abierto en el rango de valores del potencial de membrana de reposo. Se ha propuesto que las transiciones cerrado-abierto pueden modificar la disposición de algunas regiones citoplasmáticas del dominio C-terminal del canal que tendrían como resultado la exposición de determinados residuos aminoacídicos susceptibles de ser fosforilados, lo cual activaría la proliferación (16). Es decir, la conformación abierta del canal podría corresponderse con un estado ON para proliferación, debido a una conformación en el dominio C-terminal que posibilita o facilita la proliferación de las células HEK mediante interacciones proteína-proteína, mientras que la conformación cerrada, que es la situación que nos encontramos cuando las células están hiperpolarizadas debido a la presencia de  $K_{ATPGD}$ , podría corresponderse con un estado OFF para proliferación del dominio citoplasmático C-terminal, con una conformación diferente que no es capaz de activar la proliferación. Además, esta transición OFF-ON para la proliferación es independiente de la permeabilidad al  $K^+$  como demuestran los resultados con Kv1.3WF.

Otros datos del laboratorio sugieren que la fosforilación de estos residuos en el dominio C-terminal en el estado ON facilitan la interacción del canal con la proteína IQGAP3, que es una proteína de andamiaje relacionada con la proliferación celular a través de la vía MEK/ERK.

### ***Kv1.3 como diana terapéutica***

La cuestión más interesante es como llevar estas conclusiones a la práctica clínica. El uso de sustancias bloqueantes del canal Kv1.3 que impidan la transición cerrado-abierto y por tanto las transiciones ON-OFF del dominio citoplasmático C-terminal responsables de las interacciones proteína-proteína pueden constituir una herramienta eficaz para prevenir el remodelado vascular secundario al proceso de modulación fenotípica que experimentan las VSMCs. La utilización de estos bloqueantes podría presentar ventajas en comparación con otras drogas anti-proliferativas, como lo inhibidores de la ruta mTOR o el paclitaxel, que son muy poco específicos, presentan mayor toxicidad y tasas de fallo terapéutico mejorables.

## 6. CONCLUSIONES

1. La proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293 es abolida en presencia del canal  $K_{ATP}GD$  que está constitutivamente abierto y provoca hiperpolarización del  $E_M$ .
2. La proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293 que coexpresan  $K_{ATP}GD$  se recupera al revertir la hiperpolarización del  $E_M$  mediante incubaciones cortas en medios con altas  $[K^+]_E$ .
3. La proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293 es independiente de su función primaria como canal, como demuestran los resultados con el canal Kv1.3WF.

Estos resultados nos permiten concluir que el canal Kv1.3 modula la proliferación actuando como un sensor de voltaje, de forma que los cambios conformacionales dependientes de voltaje del canal son un elemento esencial en la proliferación inducida por Kv1.3.

## 7. AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras y a su grupo de investigación en canales iónicos y fisiopatología vascular. En especial a Pilar Ciudad, que me ha ayudado siempre desde que comencé a realizar este trabajo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Herring N, Paterson D. Levick's** Introduction to cardiovascular physiology. 6th ed. 2018.
2. **Ross M, Wojciech P.** Histologia. 7th ed. São Paulo: Grupo Gen - Guanabara Koogan; 2016.
3. **Cidad, P. et al.** Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1203–1211 (2010).
4. **López-López, J. R., et al.** Kv channels and vascular smooth muscle cell proliferation. *Microcirculation* 25, 1–9 (2018).
5. **Yoshida, T. et al.** Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ. Res.* 96, 280–291 (2005).
6. **Pérez-García, M. T., Cidad, P., & López-López, J. R.** (2018). The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 314(1), C27–C42.
7. **Cidad, P., Miguel-Velado, E., Ruiz-McDavitt, C., Alonso, E., Jiménez-Pérez, L., Asuaje, A., ... López-López, J. R.** (2015). Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 467(8), 1711–1722.
8. **Cidad, P., Novensà, L., Garabito, M., Batlle, M., Dantas, A. P., Heras, M., ... Roqué, M.** (2014). K<sup>+</sup> Channels Expression in Hypertension After Arterial Injury, and Effect of Selective Kv1.3 Blockade with PAP-1 on Intimal Hyperplasia Formation. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 28(6), 501–511.
9. **Panyi, G.** (2005). Biophysical and pharmacological aspects of K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes. *European Biophysics Journal*, 34(6), 515-529.
10. **Urrego, D., Tomczak, A. P., Zahed, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A.** (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), 20130094.
11. **Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., ..& MacKinnon, R.** (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
12. **McCormack, T., McCormack, K., Nadal, M. S., Vieira, E., Ozaita, A., & Rudy, B.** (1999). The effects of Shaker  $\beta$ -subunits on the human lymphocyte K<sup>+</sup> channel Kv1.3. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20123-20126.
13. **Kaczmarek, L. K.** (2006). Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(10), 761.
14. **Jiménez-Pérez, L., Cidad, P., Álvarez-Miguel, I., Santos-Hipólito, A., Torres-Merino, R., Alonso, E., ... & Pérez-García, M. T.** (2016). Molecular determinants of Kv1.3 potassium channels-induced proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3569-3580.
15. **Molleman A.** Patch clamping. Chichester: Wiley; 2008.
16. **Cidad, P., Jiménez-Pérez, L., García-Arribas, D., Miguel-Velado, E., Tajada, S., Ruiz-McDavitt, C., ... & Pérez-García, M. T.** (2012). Kv1.3 channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(5), 1299- 1307.
17. **Seino S.** Physiology and pathophysiology of K<sub>ATP</sub> channels in the pancreas and cardiovascular system. 2003.
18. **Masia R, Koster J, Tumini S, Chiarelli F, Colombo C, Nichols C et al.** An ATP-Binding Mutation (G334D) in KCNJ11 Is Associated With a Sulfonylurea-Insensitive Form of Developmental Delay, Epilepsy, and Neonatal Diabetes. 2007.
19. **Arévalo-Martínez M, Cidad P, García-Mateo N, Moreno-Estar S, Serna J, Fernández M, Swärd K, Simarro M, de la Fuente MA, López-López JR, et al.** (2019) Myocardin-dependent Kv1.5 channel expression prevents phenotypic modulation of human vessels in organ culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39:e273–e286.

## **9. PRESENTACIÓN TFG PÓSTER**

# Efectos del potencial de membrana sobre la proliferación inducida por Kv1.3

Pablo Fernández Velasco, Pilar Ciudad Velasco, M<sup>a</sup> Teresa Pérez García  
 Instituto de biología y genética molecular (IBGM) y Departamento de Bioquímica y Biología molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid

UVA

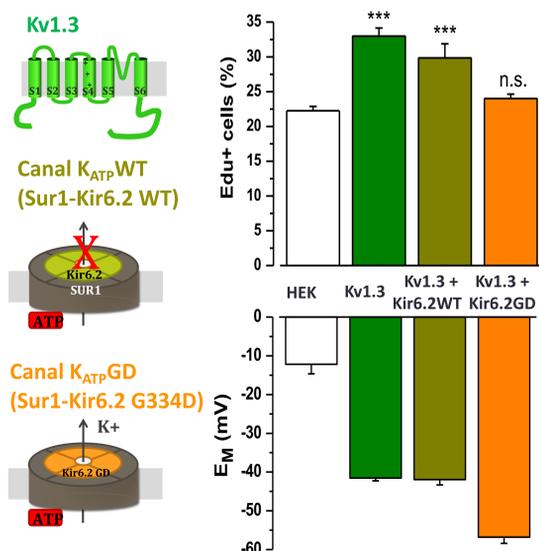
## RESUMEN

En este trabajo se estudia la posibilidad de que los cambios conformacionales dependientes de voltaje que sufre Kv1.3 sean un elemento esencial para activar vías de señalización que conduzcan a la proliferación. Estudiamos los efectos que tenían las variaciones del potencial de membrana sobre la proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293. Para ello se transfectaron células con el canal silvestre Kv1.3, bien solo, bien junto con canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). Estos  $K_{ATP}$  permiten cambiar el potencial de membrana, ya que utilizamos tanto un canal silvestre ( $K_{ATP}$ WT) como un mutante con ganancia de función ( $K_{ATP}$ GD), que está abierto en condiciones basales y por tanto hiperpolariza a las células que lo expresan. La proliferación inducida por Kv1.3 no se vio alterada por la coexpresión de Kv1.3+ $K_{ATP}$ WT, pero fue abolida en las células que coexpresaban Kv1.3+ $K_{ATP}$ GD. La repolarización de la membrana mediante incubaciones cortas en medios con altas concentraciones de  $K^+$  extracelular revirtió el efecto inhibitorio que ejercía  $K_{ATP}$ GD sobre la proliferación inducida por Kv1.3. Para excluir la posibilidad de que estos resultados fueran debidos a la permeabilidad a  $K^+$  de Kv1.3 se repitieron los experimentos con el mutante del poro Kv1.3WF, obteniéndose los mismos resultados.

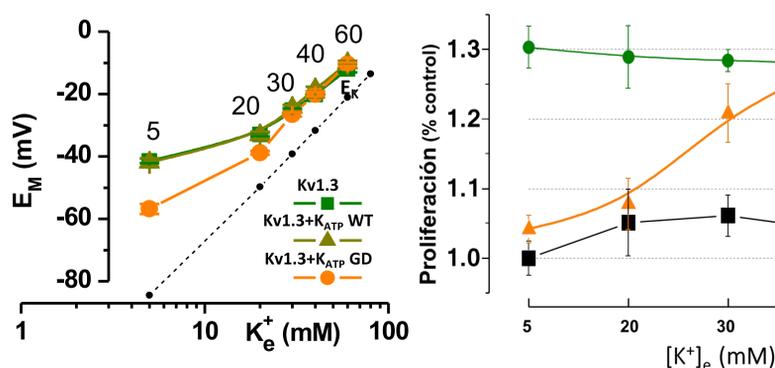
## RESULTADOS

### CONSECUENCIAS DE LA HIPERPOLARIZACIÓN DEL $E_M$ SOBRE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR Kv1.3

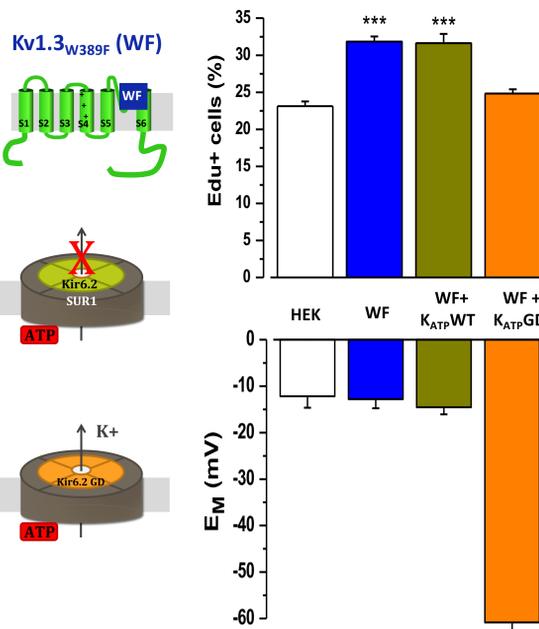
La coexpresión de Kv1.3 con  $K_{ATP}$ GD hiperpolarizó las células HEK e inhibió la proliferación inducida por Kv1.3



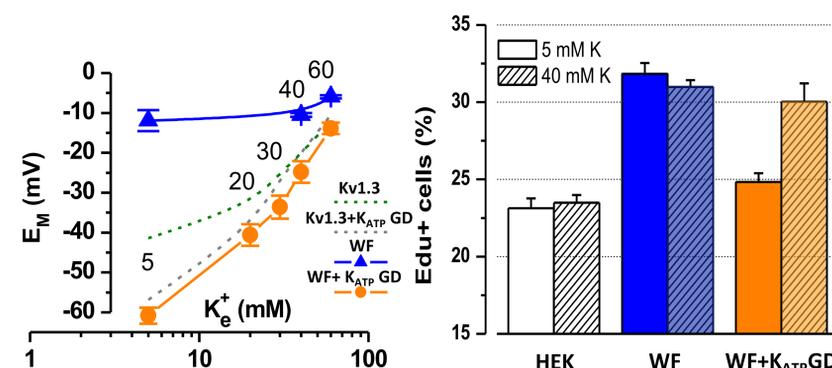
La repolarización del  $E_M$  mediante incubaciones cortas en altas concentraciones de  $K^+$  extracelular recuperó la proliferación inducida por Kv1.3 en presencia de  $K_{ATP}$ GD



La coexpresión de Kv1.3WF con  $K_{ATP}$ GD hiperpolarizó las células HEK e inhibió la proliferación inducida por Kv1.3



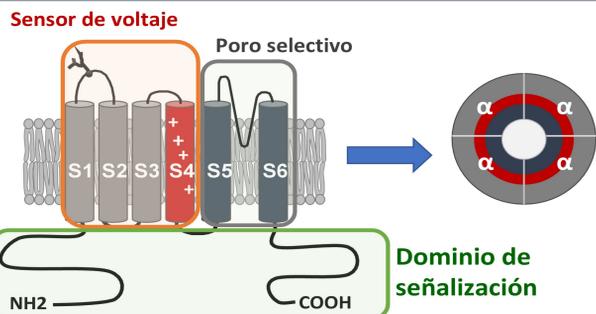
La repolarización del  $E_M$  mediante incubaciones cortas con altas concentraciones de  $K^+$  extracelular también recuperó la proliferación inducida por Kv1.3WF en presencia de  $K_{ATP}$ GD



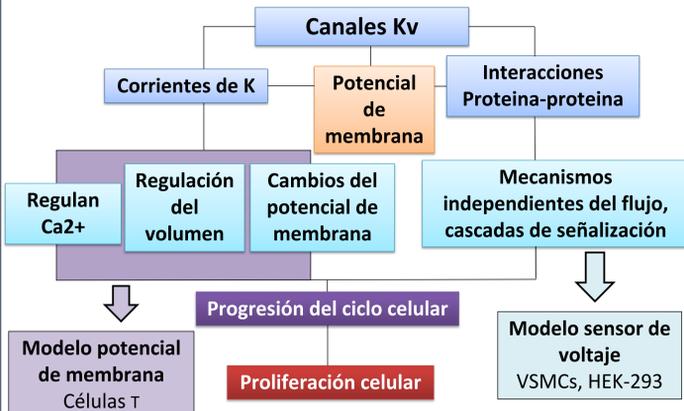
Los efectos del cambio en el  $E_M$  sobre la proliferación inducida por Kv1.3 no se deben al flujo de  $K^+$  del canal

## INTRODUCCIÓN

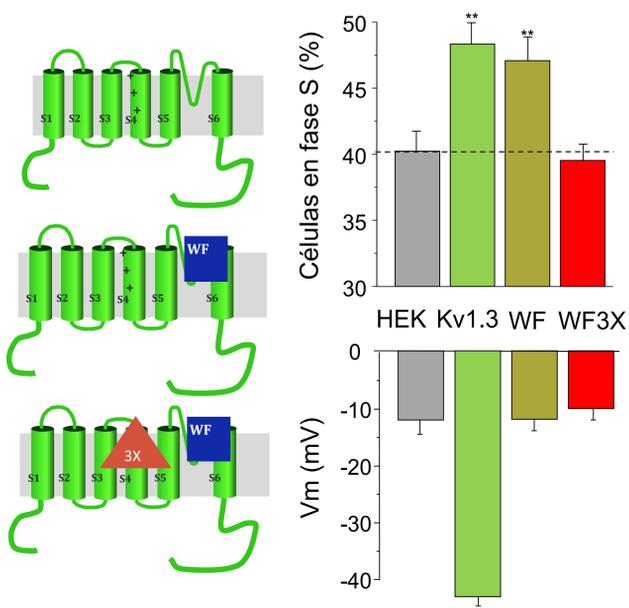
Kv1.3 es un canal dependiente de voltaje



Kv1.3 regula el ciclo celular y la proliferación



Kv1.3 induce proliferación por un mecanismo independiente del flujo de  $K^+$  en HEK293



## CONCLUSIONES

- La proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293 es abolida en presencia del canal  $K_{ATP}$ GD, que provoca una hiperpolarización del  $E_M$ .
- La proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293 que coexpresan  $K_{ATP}$ GD se recupera al revertir la hiperpolarización del  $E_M$  mediante incubación con alto  $K^+$  extracelular.
- La proliferación inducida por Kv1.3 en células HEK293 es independiente de su función primaria como canal, como demuestran los resultados con el canal mutante Kv1.3WF.
- Estos resultados nos permiten concluir que el canal Kv1.3 modula la proliferación actuando como un sensor de voltaje, que ante cambios en el  $E_M$  sufre cambios conformacionales que conducen a la activación de vías de señalización que favorecen la proliferación celular.

