

An. R. Acad. Nac. Farm., 2004, 70: 9-31

Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular

JUAN TAMARGO MENÉNDEZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

«Los canales iónicos son las proteínas responsables de la generación y orquestación de las señales eléctricas que atraviesan el cerebro que piensa, el corazón que late y el músculo que se contrae». Ackerman MJ et al. (1)

La Real Academia Sueca de las Ciencias ha concedido el Premio Nobel de Química 2003 a los Profesores Roderick MacKinnon por sus trabajos sobre «la estructura de los canales iónicos» y Peter Agre por «el descubrimiento de los canales para el agua o acuaporinas». Peter Agre (1949) se graduó en Química en Augsburg en 1970 y, en la actualidad, es profesor del Departamento de Bioquímica y director del programa de grado en Medicina Molecular y Celular en la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins. Roderick MacKinnon (1956), se graduó en Bioquímica por la Universidad de Brandeis y en Medicina por la Universidad de Tufts, es investigador del Howard Hughes Medical Institute y profesor de Neurobiología Molecular y Biofísica en la Universidad Rockefeller de Nueva York. Los estudios de ambos investigadores nos han permitido comprender la estructura y función de los canales de K^+ , Cl^- y agua, cómo se mueven los iones y las moléculas de agua a través de las membranas celulares, cómo se generan y propagan las señales eléctricas, el mecanismo de acción de numerosos fármacos ampliamente utilizados en la clínica o comprender como los riñones recuperan el 99% del agua filtrada por el glomérulo renal. A continuación analizaremos las principales contribuciones de estos investigadores.

CANALES IÓNICOS: DEFINICIÓN Y FUNCIÓN

La membrana celular es una barrera que separa dos medios acuosos de distinta composición, el extracelular y el intracelular, regulando su composición. Los iones son moléculas hidrofílicas inmiscibles en los lípidos de la membrana y que para atravesarla requieren de mecanismos específicos de transporte. En algunos casos, los iones pasan a través de poros hidrofílicos denominados *canales iónicos* y, en otros, se transportan a favor de su gradiente de concentración uniéndose a proteínas transportadoras o *carriers*; ambos sistemas de transporte son pasivos y, por tanto, no consumen energía. Otras veces, el transporte iónico se realiza contra un gradiente electroquímico, desde la zona más diluída a la más concentrada, utilizando unas proteínas denominadas *bombas iónicas*. Esta forma de transporte es activa y requiere el consumo de energía procedente del metabolismo energético celular.

Sin embargo, los canales iónicos no son simples poros acuosos conductores, sino que desarrollan 3 funciones fundamentales (2,3):

a) Permiten el flujo de iones a su través a una velocidad muy superior a la de cualquier otro sistema biológico (10^8 iones/seg frente a 10^3 iones/seg que mueve un transportador o una ATPasa con función de bomba iónica). El flujo de iones que atraviesa cada canal puede medirse como una corriente eléctrica, que puede producir rápidos cambios en el potencial de membrana.

b) Son capaces de discriminar qué iones pasan a su través, es decir, que presentan *selectividad iónica*.

c) En respuesta a un estímulo, las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales. En general, existe un estado conductor (estado abierto, que permite el paso de iones a su través) y dos no-conductores (estados inactivo y de reposo). A nivel del potencial de reposo celular, la probabilidad de apertura de algunos canales es mínima, es decir, que sólo un reducido número de canales puede abrirse al azar, pero sí pueden abrirse en respuesta a un estímulo adecuado. La despolarización celular aumenta la probabilidad de apertura del canal, pero si la despolarización se mantiene, la probabilidad de apertura disminuye como consecuencia del proceso de inactivación iniciado simultáneamente por el de activa-

ción; así el canal pasa al estado inactivo-cerrado desde el cual no puede volver a abrirse. Para que el canal vuelva a abrirse es necesario que el canal inactivado pase al estado de reposo, proceso al que denominamos reactivación del canal. Por tanto, la magnitud de la corriente que cruza la membrana depende de la densidad de canales, de la conductancia del canal abierto y de cuánto tiempo el canal permanece en dicho estado.

Atendiendo a sus propiedades cinéticas (activación-inactivación), características farmacológicas y al estímulo que determina el cambio conformacional, podemos clasificar los canales iónicos en: a) activados por cambios de voltaje (canales voltaje-dependientes K_v), b) activados tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular (canales receptor-dependientes), c) activados por mediadores intracelulares (Ca^{2+} , ATP, nucleótidos cíclicos, proteín-cinasas, ácido araquidónico y sus derivados) y d) activados tras deformación mecánica celular (canales activados por distensión o aumento del volumen celular). Sin embargo, esta división es muchas veces artificial, ya que la despolarización de la membrana puede inducir la liberación de neurotransmisores y ligandos endógenos y activar canales activados por receptores/mediadores, mientras que muchos ligandos endógenos pueden también modificar el potencial de membrana celular y activar canales voltaje-dependientes.

CANALES DE K^+

Los canales de K^+ representan el grupo más numeroso, heterogéneo y ubicuo de proteínas estructurales de membrana (4-8). En las células excitables, la apertura de los canales de K^+ facilita la salida de este catión a favor de su gradiente electroquímico y juega un importante papel en el mantenimiento del potencial de reposo celular, la frecuencia de disparo de las células automáticas, la morfología y duración de los potenciales de acción, la liberación de neurotransmisores y hormonas, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales, la contracción del músculo liso y la regulación del volumen celular. Además, los canales de K^+ constituyen la diana terapéutica de fármacos, toxinas y neurotransmisores.

res que modulan la función celular. En esta presentación me referiré solo a los Kv, ya que son en los que Robert McKinnon más ha trabajado.

Canales de K⁺ voltaje-dependientes

A este grupo pertenecen los canales voltaje-dependientes (Kv1-4), los *ether-a-go-go* (KCNH), los activados al aumentar la concentración intracelular de Ca²⁺ (KCNM y KCNN) y los KvLQT (KCNO). Estos canales se activan durante la despolarización celular y, por su distinta cinética de activación-inactivación, participan en las diferentes fases de la repolarización del potencial de acción celular, modulando la frecuencia y morfología del mismo. Los canales funcionales resultan del ensamblaje entre 4 subunidades α y 4 β , formando homo o heterotetrámeros (7,9). Cuando el canal es un homotetrámero, las cuatro subunidades α están codificadas por el mismo gen, mientras que los heterotetrámeros están constituidos por productos de distintos genes, pero siempre de la misma subfamilia. La homología de la secuencia aminoacídica de los canales Kv en las regiones transmembrana es de aproximadamente un 40% entre las subunidades α de las distintas subfamilias, mientras que dentro de cada subfamilia, Kv1-4, es de un 70%.

Subunidad α . Es la unidad central del canal, ya que contiene el poro conductor, el filtro de selectividad que permite el paso de K⁺ frente a otros cationes, el sensor de voltaje que controla los mecanismos que regulan la cinética de apertura y cierre del canal y los puntos de unión para los ligandos endógenos y fármacos. Presenta 6 segmentos que atraviesan la membrana (S1-S6) que se continúan por extremos carboxi (C-) y amino (N)-terminales intracelulares (figura 1). El segmento S4, actúa como sensor de voltaje (9,10), mientras que el lazo que une los segmentos S5 y S6 (segmento P) contiene la secuencia TVGYG que determina la selectividad del poro para el K⁺ (11). Los canales Kv contienen en el segmento S6 una secuencia Pro-X-Pro (PXP, posiciones 473-475) capaz de producir la torsión del mismo cerca de la superficie intracelular de la membrana, lo que aumenta la entrada del vestíbulo interno del poro.

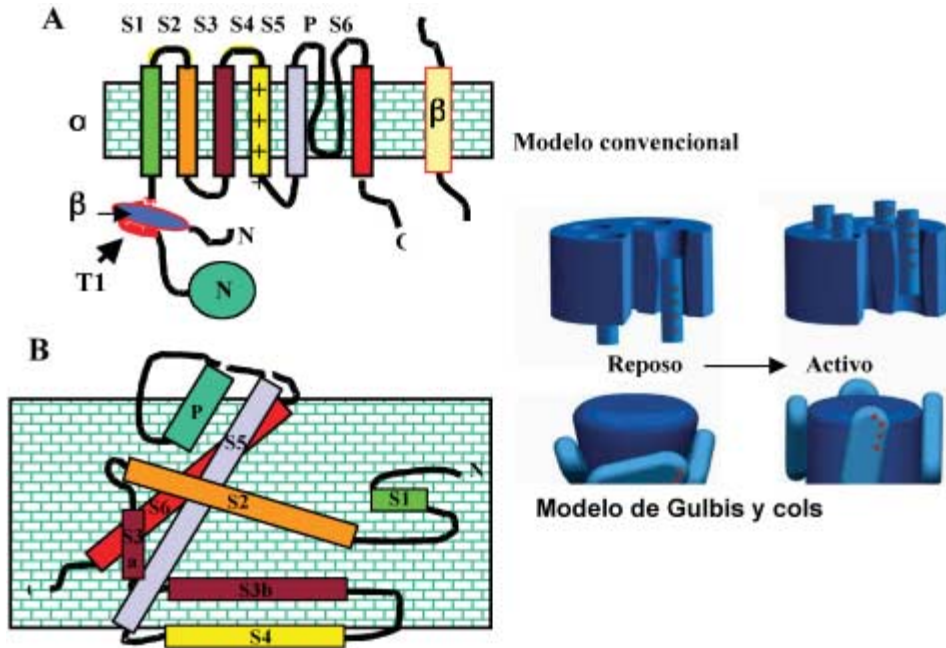


FIGURA 1. A) Representación clásica de las subunidades α y β de un canal voltaje-dependiente de K^+ . La subunidad α consta de 6 segmentos transmembrana (S1-S6) y en su extremo N-terminal presenta la zona de tetramerización (T1). Las subunidades β se disponen bien a nivel intracitoplasmático o en forma de un segmento transmembrana. B) Topología del canal KvAP aislado del *Aeropyrum pernix*. Modificado de Jiang y cols (20). C) Representación esquemática del movimiento de cargas a través de la membrana que acompaña a la apertura (paso del estado de reposo al abierto) de los canales voltaje-dependientes según el modelo convencional y el de Gulbis y cols (39).

El poro iónico. El poro del canal está formado por el lazo que une los segmentos S5 y S6, los segmentos S5 y S6 y la región peptídica que une S4 y S5 (11,12). La boca interna del canal está formado por el lazo que une los segmentos S4 y S5 y las regiones citoplasmáticas de los segmentos S5 y S6, mientras que la boca externa la forman la región P y la parte extracelular de los segmentos S5 y S6. El segmento de unión de S4-S5 forma parte del poro interno y del receptor para la partícula de inactivación.

En experimentos de mutagénesis dirigida, en los que se ha analizado la selectividad iónica, la cinética de activación-inactivación

y la sensibilidad a toxinas (charibdotoxina, dendrotoxina) y a tetrailamonio cuando se aplica a la superficie extracelular (TEAo) o intracelular (TEAi), se ha podido demostrar que la región P consta de 19 aminoácidos (D431-T449) y penetra en el interior de la membrana (12-14). Los primeros 8 aminoácidos (D431-V438) y los 3 últimos (D447-T449) se localizan a la entrada del poro, observándose que la sensibilidad al TEAo externa aumenta casi 50 veces cuando la T449 se reemplaza por tirosina (T449Y), cisteína (T449C) o fenilalanina (T449F)(15), mientras que la mutación de este residuo por lisina, arginina, glutamato o valina reduce la sensibilidad al TEAo y la amplitud de la corriente y suprime la rectificación del canal (12,14). En el centro del segmento P se encuentra la secuencia VTMTTV (438-443), habiéndose demostrado que la T441 se localiza en la porción más profunda del poro y contribuye a la unión del TEAi (12-14,16,17). La mutación T441S disminuye 10 veces la sensibilidad del canal al bloqueo producido tras la administración de TEAi, pero no altera la producida por el TEAo (12-14).

El sensor de voltaje. Los canales Kv disponen en su estructura dipolos que detectan las variaciones del potencial de membrana e inducen cambios conformacionales en la proteína del canal que conduzcan a su activación-apertura (figura 1). Estudios de mutagénesis dirigida y de neutralización de cargas y sustitución por residuos de Cys han demostrado que el sensor del voltaje está formado por el segmento S4, que presenta cada 3 residuos un aminoácido cargado positivamente [X-X-(A/L)] y las cargas negativas de los segmentos S2 y S3, que ejercen una acción electrostática con el segmento S4 (16-18). Mutaciones en las que se neutralizan los aminoácidos cargados en S4 desplazan el valor del punto medio de activación del canal, lo que indica que participa en el cambio conformacional que conlleva a su apertura (16,17).

Clásicamente se consideraba que cuando el canal se abría tenía lugar el movimiento de residuos cargados (arginina) a través del campo eléctrico transmembrana, acoplándose ambos procesos; se ha calculado que el movimiento de cargas equivale al de 14 electrones, lo que implica el movimiento de las 4 argininas que contiene cada una de las subunidades α que forman el canal (cada arginina contaría por un electrón) (19).

Sin embargo, este modelo ha sido drásticamente modificado por MacKinnon y cols (20,21). Estos autores analizaron la topología de la subunidad α del canal KvAp del *Aeropyrum pernix*, observando que presentan 6 segmentos transmembrana, pero cuya disposición era bien distinta a la previamente descrita (figura 1). Los segmentos S5 y S6 y el segmento de unión S5-S6 rodeaban el poro del canal, por fuera de ellos se disponían los segmentos S1 y S2 y, en la porción más externa, se disponían los segmentos S3 y S4. El segmento S3 presenta 2 hélices (S3a y S3b) separadas por un segmento de unión, observándose que S3b forma con el extremo N-terminal del S4 (que contiene los residuos de arginina) una estructura acodada a la que los autores denominaron sensor de voltaje. A continuación analizaron el movimiento de cargas durante la apertura del canal. Para ello, utilizaron fragmentos Fab monoclonales (que se fijan a la zona cargada) y la toxina VSTX1 y fijaron biotina a distintos residuos (101-127) y determinaron si la administración intra o extracelular de avidina tenía acceso a la biotina. Llegaron a la conclusión de que las argininas cargadas se disponían en la superficie externa del canal, al que se fijaban a través de los segmentos S3 y S4-S5 y que se movían en la interfase lípidoproteica. Cuando los canales están cerrados, el sensor de voltaje se dispone en el interior de la membrana cerca de la superficie citoplasmática, mientras que durante la apertura del canal se movía una gran distancia ($\approx 25\text{\AA}$) en sentido perpendicular a través de la membrana (figura 1); este movimiento permitía abrir los canales al tirar hacia afuera del segmento S4-S5.

Inactivación de los canales Kv. Tras la activación, algunos canales de K^+ se inactivan, es decir, pasan a un estado no conductor desde el cual el canal no puede volver a activarse. La inactivación tiene lugar por dos mecanismos, uno rápido o tipo N y otro lento o tipo C, que implican a los extremos correspondientes de la subunidad a que forma el canal (22,23).

La *inactivación* tipo-N se explica según el modelo de la «bola y la cadena» (Zagotta y cols., 1990; Hoshi y cols., 1990), por el que los primeros 22 aminoácidos de cada uno de los 4 extremos N-terminales formarían una «pelota de inactivación» que se une a través de una cadena de aminoácidos (residuos 23-83) a un receptor cargado negativamente, localizado en la boca intracitoplasmática del canal, que

puede ser ocupado tras la apertura del mismo, produciendo su rápida inactivación (22,24,25). MacKinnon demostró que existen 4 compuertas de inactivación (incluso con una sola el canal puede inactivarse), que cuando una obstruye el poro las demás ya no lo hacen y que la velocidad de reactivación del canal es independiente del número de compuertas de inactivación (26).

Diversos hallazgos han confirmado la hipótesis de la cadena y la pelota: 1) al reducir el número de aminoácidos existentes entre los residuos 23 y 80 del extremo N-terminal, se acelera la velocidad de inactivación, ya que se acorta la longitud de la cadena que sujeta la bola; por el contrario, al aumentar el número de residuos la inactivación se retrasa (25,27). 2) Se abole tras la administración de TEAi y por mutaciones que suprimen los primeros 22 aminoácidos del extremo N-terminal o rompen la secuencia de los segmentos hidrofóbicos S4-S5 y se restaura tras adicionar el péptido eliminado (22,24,27). 3) La mutación de los residuos cargados positivamente que forman la pelota retrasa la inactivación, lo que sugiere que la carga es responsable de la atracción de la pelota por el poro. 4) La inactivación tipo-N es insensible a mutaciones en la boca externa del poro iónico o del segmento S6 (27,28) y a la administración de TEAo (29).

La *inactivación lenta tipo C* de los canales Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 y KCNH2 se bloquea cuando se aumenta la concentración de K^+ extracelular (28) o se aplica TEA a la superficie externa del canal, pero no cuando se aplica a la superficie interna, lo que parece reflejar la lenta constricción en la boca externa del poro del canal (12,22,29). La inactivación tipo-C parece implicar cambios conformacionales cooperativos entre las cuatro subunidades α que forman el canal (30). Esta inactivación se acelera cuando la alanina en posición 469 del segmento S6 se reemplaza por valina y se retrasa cuando se reemplaza por histidina (Bush y cols., 1991). Los canales que presentan inactivación lenta se reactivan más rápido que aquéllos que se inactivan por un mecanismo intracelular-rápido.

Estructura de la subunidad α . En el año 1998, Doyle y cols (31) describieron la estructura cristalográfica de alta resolución (3.2 Å) del primer canal de K^+ , el canal KcsA procedente de *Streptomyces lividans*, lo que constituyó un gran hito en el conocimiento de

éstos y, en general, de todos los canales iónicos. La subunidad α de este canal bacteriano, que no es voltaje-dependiente, presenta sólo dos segmentos transmembrana (M1 y M2) que serían análogos a los segmentos S5 y S6 de los canales Kv, conectados por la región del poro de unos 30 aminoácidos, que incluye la *hélice del poro* (P) y el *filtro de selectividad* y se localiza en la superficie externa de la membrana (figura 2). A pesar de ello, su secuencia aminoacídica es similar a la de otros canales de K^+ , como los Kv, los Kir o los activados por ligandos. El segmento M1 mira hacia la membrana y el M2 está inclinado unos 25° con respecto al plano de la membrana, por lo que delimita la entrada citoplasmática del poro del canal. El resultado es una estructura que asemeja un cono invertido, cuya base se dispone hacia la superficie de la membrana celular. La longitud del poro es de 45 \AA , iniciándose en la cara citoplasmática por un túnel hidrofílico de 18 \AA de longitud, que se abre en una cavidad ancha de unos 10 \AA de diámetro, aproximadamente en el centro de la membrana; tras la cavidad, el poro se estrecha considerablemente, constituyendo esta barrera el filtro de selectividad. Éste está formado por las cadenas polares-carbonilo de las secuencias GYG y determina una región de 12 \AA de longitud con una luz tan estrecha que sólo pueden atravesarla los iones K^+ deshidratados que alcanzan el medio extracelular.

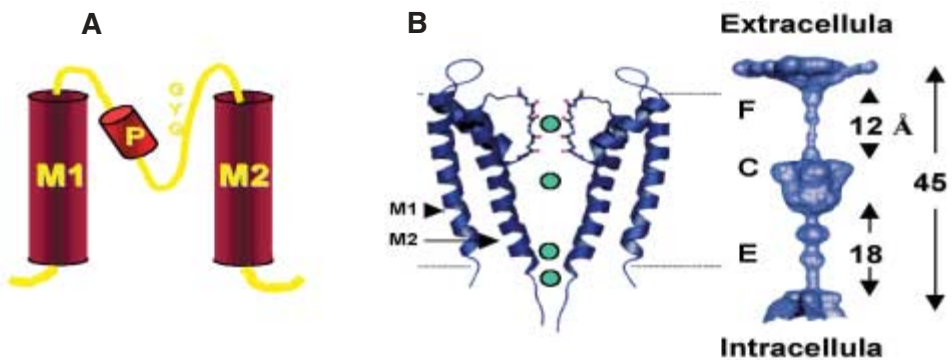


FIGURA 2. Estructura de la subunidad α del canal KcsA procedente de *Streptomyces lividans*. A) Topografía general, en la que se muestran los dos dominios transmembrana (M1, M2) y el poro (P), así como la secuencia GYG del filtro de selectividad. B) Representación tridimensional del tetrámero del canal KcsA. F, C y E indican, respectivamente, al filtro de selectividad, la cavidad y la entrada interna del canal.

Cuando el canal se abre, los iones de K^+ hidratados entran rápidamente en el tunel hidrofílico y desembocan en la cavidad; ambas estructuras están rodeadas de cadenas laterales hidrófobas, minimizándose la interacción electrostática del K^+ con el canal; se crea así una ruta de baja resistencia para el movimiento de K^+ desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad. A nivel de la cavidad, las hélices del poro (P) están orientadas de tal forma que dirigen sus extremos C-terminales electronegativos hacia el centro de la misma, lo que genera un campo eléctrico negativo que atrae y neutraliza la carga de los iones K^+ hidratados. Sin embargo, el filtro de selectividad está tapizado por átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de las cadenas de los aminoácidos que forman la secuencia GYG. Cuando un ión K^+ entra en el filtro de selectividad se deshidrata, y para compensar el coste energético de la pérdida de agua, los átomos de oxígeno entran en contacto con el ión y lo estabilizan. Una vez que los iones K^+ han penetrado en la parte final del poro, la fuerza de atracción entre el ión K^+ y el filtro de selectividad se ve perfectamente compensada por la fuerza de repulsión entre los iones y se produce su rápida salida hacia el espacio extracelular.

Subunidades β . Aunque la expresión heteróloga de las subunidades α es suficiente para generar canales de K^+ funcionales, para reproducir las características de los canales nativos es necesario su coexpresión con subunidades β (32,33). Algunas subunidades β (Kv β 1-4) carecen de segmentos transmembrana y de puntos de glicosilación, lo que sugiere que se trata de proteínas intracitoplasmáticas (Kv β 1-4), mientras que otras subunidades, codificadas por genes de la familia KCNE (MinK, MirP1) poseen un segmento transmembrana. Otro ejemplo de subunidades β son los receptores para sulfonilureas SUR de los canales Kv6.1 y Kv6.2, que contienen 12 segmentos transmembrana y dos puntos de unión para nucleótidos (34). La interacción entre las subunidades α y β de los canales *Shaker* implica el dominio N-terminal hidrofílico de la subunidad α y el C-terminal de la β (32,33).

Las subunidades Kv β 1.1-1.3, Kv β 2.1 y Kv β 3.1 se unen a las subunidades α de los canales Kv1, mientras que las Kv β 4 se asocian a los canales Kv2 (32,33). La subunidad Kv β 1.1 acelera la inactivación tipo-N de los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.4 y la tipo-C del canal Kv1.5 y desplaza la curva de activación hacia niveles más hiperpolarizados

de potencial de membrana; las subunidades Kv β 1.2 y Kv β 1.3 aceleran tanto la inactivación tipo N como la C, a la vez que modifican su dependencia de voltaje y la velocidad de deactivación de los canales Kv1.4. La Kv β 2.1 acelera la inactivación de los canales Kv1.4 y Kv1.5 y desplaza la curva de activación hacia niveles más hiperpolarizados.

La estructura de la subunidad Kv β 2.1 del canal KcsA ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 2.8Å por Gulbis y cols (35). Como otras proteínas integrantes de los canales de K⁺, las subunidades Kv β 2.1 son un homotetrámero de oxidoreductasas que contienen un punto activo con actividad catalítica y un cofactor NADPH (adenina nicotinamida adenina dinucleótido reducida). Sin embargo, se desconoce el sustrato específico del sitio activo de la subunidad β , su función biológica y la estequiometría α/β en los distintos canales Kv. Además, dichos autores proponen que la subunidad β podría funcionar como un sistema óxido-redox del canal de K⁺, de tal forma que la apertura-cierre del mismo podría estar regulado por transiciones NADPH-NADP⁺, lo que concuerda con el hallazgo de que la coexpresión de canales Kv con subunidades β confiere sensibilidad al O₂ (36).

Las subunidades Kv β 1.1, Kv β 2.1 y Kv β 4.1 pueden actuar como chaperones, facilitando el ensamblaje de las subunidades α y β y su tráfico hacia la superficie, facilitando la expresión de las subunidades α en determinados puntos de la membrana en los que se unen a una superfamilia de proteínas que presentan dominios PDZ y SH3 (37). Las subunidades KChIPs (*Kv Channel Interaction Protein*) regulan la función y expresión de los canales que generan corrientes transitorias sensibles a 4-aminopiridina (Kv2.1, Kv1.3 y Kv4.3) y la subunidad KChAP (*K⁺ Channel Associated Protein*) regula las de los canales Kv1.3, Kv2.1 y Kv4.3 (38).

Ensamblaje de las subunidades α del canal. La región T1 (de tetramerización) que precede al segmento S1 (residuos 83-196) y las cisteínas en posiciones 55, 96 y 505, están encargadas del ensamblaje de las 4 subunidades α para formar homotetrámeros en los canales de las familias *Shaker* y *Shal*, a la vez que impide el ensamblaje heteromérico de las subunidades α de distintas familias. Sin embargo en los canales de las subfamilias HERG y KCNQ serían los seg-

mentos transmembrana más próximos al extremo C-terminal, los implicados en el ensamblaje de las subunidades α .

Gulbis y cols (35,39) analizaron, con una resolución de 2.1 Å, la interacción citoplasmática entre la subunidad α Kv1.1 de rata y la subunidad Kv β 2.1, en concreto, la región correspondiente a los residuos 36 a 367, es decir, sin el extremo N-terminal. El importante papel de la región T1 en la interacción con la subunidad Kv β 2.1 quedó demostrado al comprobar que su supresión, pero no la del extremo C-terminal, impide el ensamblaje entre ambas subunidades. La estructura de la región central de Kv β 2.1 es un tetrámero, con cada monómero formado por un barril TIM de 90×90×40 Å y un corazón de ocho láminas β paralelas envueltas por hélices- α . La región T1 forma una plataforma de anclaje para la subunidad Kv β 2.1, formándose un complejo T1₄ β ₄ en el que los dominios T1 quedan mirando hacia la boca citoplasmática del poro y la subunidad β hacia el citoplasma. El poro se comunica con el citoplasma a través de unas aperturas laterales cargadas localizadas por encima de dicho complejo.

Canales que presentan dos segmentos transmembrana y un poro (2 TM-1P)

Dentro de este grupo existen 7 subfamilias (Kir1-Kir7) codificadas por genes KCNJ, que generan corrientes que presentan rectificación interna, es decir, que conducen más iones K⁺ hacia adentro que hacia fuera de la célula. La conductancia de los canales Kir al es máxima a potenciales cercanos al nivel del potencial de equilibrio para el K (-90 mV), pero disminuye con la despolarización, por lo que juegan un importante papel en el control del potencial de reposo celular, evitando una pérdida masiva del K⁺ intracelular. Los canales Kir están formados por homo o heterotetrámeros de 4 subunidades α y 4 β . La subunidad α está formada por dos segmentos transmembrana (M1, M2), similares a los S5 y S6 de la familia *Shaker*, entre los que se dispone la región P que contiene la secuencia G(Y/F)G y con los extremos N- y C-terminales citoplasmáticos (7,40). Aunque los Kir no presentan un dominio análogo al S4 de otros canales iónicos (sensor de voltaje) existe una región, denominada M0, con cierta homología y con repeticiones de residuos cargados. El domi-

nio C-terminal también participa en la selectividad iónica y en la rectificación interna del canal y presenta la secuencia serina/treonina-X-valina/isoleucina (S/T-X-V/I) que permite su unión a proteínas de anclaje (PDZ, PSD-95/SAP90) de la membrana (7).

La rectificación interna de los canales Kir se ha atribuido a la acción de Mg^{2+} y de poliaminas (espermina, espermidina, putrescina), que ocluyen el vestíbulo interno del poro tras la despolarización de la membrana (39). El Mg^{2+} bloquea los canales K1 ($K_D = 10.5 \mu M$ a +30 mV), por lo que en condiciones fisiológicas ($[Mg^{2+}]_i = \sim 0.5-2$ mM) el bloqueo del estado abierto del canal es casi instantáneo. La acción de Mg^{2+} y poliaminas se debe a su interacción con dos residuos cargados negativamente (D172, E224) localizados en M2 y en el extremo C-terminal.

A este grupo pertenecen también los canales que se activan por acetilcolina o adenosina ($\alpha/\beta = Kir3.1/Kir3.4$) o cuando disminuye la concentración intracelular de ATP ($\alpha/\beta = Kir6.2/SUR$), algo que sucede en situaciones de isquemia cardíaca o cerebral (4,7). Las subunidades SUR1/SUR2 presentan 3 dominios transmembrana (TMD0, TMD1, TMD2), que contienen 5, 5 y 6 segmentos transmembrana y dos puntos de unión intracitoplasmáticos para nucleótidos (NBF-1 y NBF-2), que se localizan en el segmento que une TMD1 y TMD2 y en el extremo C-terminal (34).

CANALES DE CLORO

Los canales de Cl^- juegan un importante papel en la regulación del potencial de membrana en las células excitables (p.ej. en el músculo esquelético, de la excitabilidad celular, el transporte transepitelial de agua y electrolitos y la regulación del volumen y del pH celulares y pueden ser activados por cambios de voltaje, ligandos endógenos (Ca^{2+} , AMPc, proteínas G) y fuerzas físicas (dilatación celular).

Recientemente, el grupo de MacKinnon ha analizado la estructura de un canal de Cl^- presente en la *Salmonella enterica* y en el *Escherichia coli* (40). Estos canales presentan 18 α -hélices (denominadas A-R, aunque la A no se inserta en la membrana), alguna de las

cuales puede no atravesar la membrana celular en su totalidad, y cuyos segmentos C- y N-terminales son intracitoplasmáticos. El canal CIC-1 parece estar formado por la dimerización de dos subunidades CIC-1, presenta 2 poros separados entre sí por una zona extracelular electronegativa que facilita la repulsión electrostática, 2 filtros de selectividad y 2 compuertas de activación, pero sólo una de inactivación.

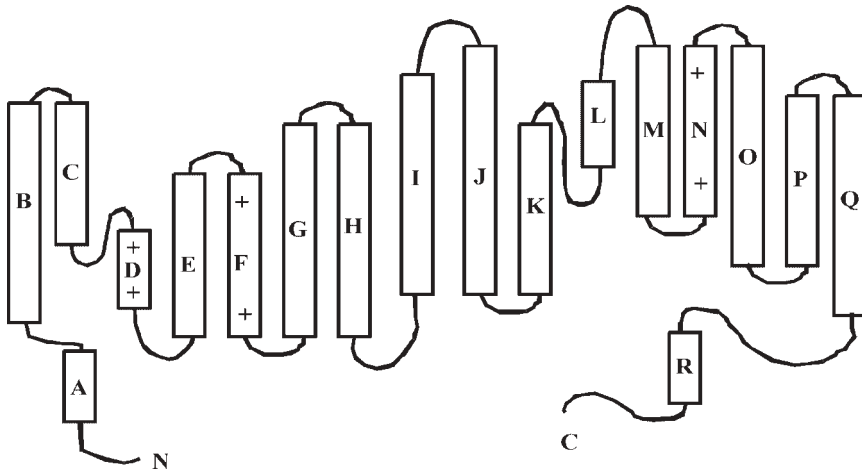


FIGURA 3. Estructura de la subunidad α del canal de cloro aislado de la *Salmonella enterica*. Modificada de Dutzler y cols (40).

La porción N-terminal incluye los segmentos B-I y exhibe una disposición antiparalela con la porción C-terminal (segmentos J-Q). El filtro de selectividad de los canales de Cl^- incluye las secuencias GSGIP (106-110, en el extremo citoplasmático del segmento D), G(K/R) GEP (146-150, entre E y F) y GXFXP (335-359 entre M y N), así como la T445 (al final de Q), todas ellas localizadas en los lazos que preceden a los segmentos D, F, N y R, respectivamente, mientras que los segmentos D, F y N, que están cargados, formarían parte del sensor de voltaje. Los segmentos N-terminal de ambos monómeros están cargados positivamente y se orientan de tal forma que crean un medio electrostático favorable para la unión del anión. El ión Cl^- es coordinado por los átomos de N^+ de la cadena amida de la I356 y F357 y los átomos de oxígeno de la cadena lateral de la S107 e Y445. El poro conductor (12 Å) está formado por las hélices F, N y

D y se accede a él desde unos vestíbulos intra y extracelulares más amplios. El residuo E148 situado entre las hélices F y N está altamente conservado en los canales de Cl^- y formaría parte del filtro de selectividad del canal desplazándose su cadena lateral para permitir el paso del ión Cl^- a través del poro. Los vestíbulos que conducen al filtro de selectividad contienen residuos de arginina (R147, R451), que crean un potencial electrostático que encauza los iones Cl^- hacia las entradas del poro iónico. La boca interna del poro presenta puntos de fosforilación para la PKC, lo que disminuye la conductancia del canal sin modificar su dependencia de voltaje.

ACUAPORINAS

El agua es el principal componente de todas las células y tejidos de los organismos vivos. Sin embargo, los mecanismos implicados en el transporte de agua a través de las membranas biológicas ha sido objeto de un gran debate. Si bien el agua difunde a través de la membrana, la difusión no es suficientemente rápida como para explicar muchos procesos fisiológicos. De hecho, diversos hallazgos sugerían la existencia de poros selectivos para el agua: a) la alta permeabilidad de los eritrocitos y los túbulos renales (41), b) el que la permeabilidad al agua se pudiera inhibir a estos niveles con Hg^{2+} y c) que las fluctuaciones en el transporte de agua fueran reguladas de forma específica por la vasopresina.

El aislamiento el 9 de octubre de 1991 de una proteína, denominada acuaporina-1 o AQ1 (28 kDa) en los eritrocitos y los túbulos renales, acabó la polémica (42). Que esta proteína regulaba el transporte de agua fue demostrado al comprobar que su expresión en oocitos de *Xenopus*, que presentan una pobre permeabilidad al agua, producía un marcado aumento de ésta, de tal forma que el oocito se hinchaba e incluso explotaba (43). Este aumento de la permeabilidad acuosa (de hasta 3×10^9 moléculas de agua/segundo) se inhibía con Hg^{2+} , presentaba una baja energía de activación y no se acompañaba de corrientes iónicas (44).

Los modelos estructurales de la AQ1 humana (45) y bovina (46) demuestran que la proteína constitutiva del canal existe como un homotetrámero con sus extremos C- y N-terminales a nivel intrace-

lular. La secuencia del ADNc demostró dos repeticiones en tandem, cada una de las cuales estaba compuesta de 3 segmentos transmembrana (figura 4)(47). Los lazos que conectaban los segmentos 2-3 (B) y 4-5 (E) penetraban en el interior de la membrana lipídica y contenían un triplete asparragina-prolina-arginina (NPA) característico. El tandem gira de tal forma que los tripletes, que están dispuestos a 180° uno del otro, contactan entre sí hacia la mitad de la bicapa y forman una esfera de reloj a través de la cual fluye el agua y que queda rodeada por los 6 segmentos transmembrana (42,48,49). A diferencia de otros canales, en los que las 4 subunidades α rodean el poro iónico, la AQP1 se dispone como un tetrámero en el que cada subunidad contiene su propio poro.

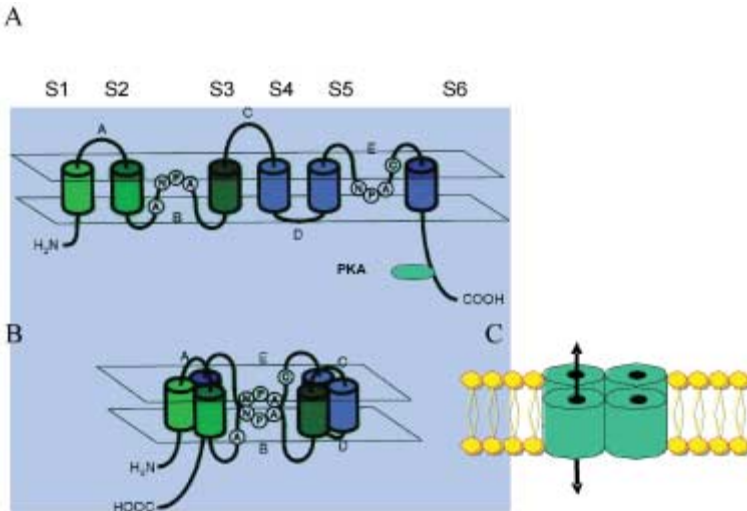


FIGURA 4. Estructura de la subunidad α de la acuaporina AQP1. A) Topografía general, en la que se muestran los segmentos transmembrana (S1-S6), la secuencia asparragina-prolina-alanina (NPA) y la cisteína 189. B) Representación del ensamblaje para formar el poro acuoso. C) El canal funcional está formado por un homotetrámero con cuatro poros a través de los cuales pasan las moléculas de agua.

Estructura de la AQP1

La AQP1 presenta dos amplios vestíbulos en forma de cono invertido rellenos de agua, que quedan separados por un estrecho tunel de 20 Å de longitud, a través del cual deben atravesar en fila las moléculas de agua (42,48). La entrada al segmento más estrecho del

canal (8 Å) es controlada por la restricción y la repulsión electrostática determinada por los residuos F56, R195, C189 y H180; los residuos R195 y H180 no permiten el paso de moléculas más voluminosas que el agua y sus cargas positivas repelen los protones (H_3O^+) y otros cationes. En el centro del canal existe otra barrera para la conductancia de protones, formada por dos asparraginas (N76 y N192) pertenecientes al triplete NPA, que contienen residuos polares para la formación de puentes de hidrógeno y producen una reorientación transitoria del dipolo de la molécula de agua (49). Así, las moléculas de agua que penetran en el canal disponen sus oxígenos hacia abajo, pero al interactuar con ambas asparraginas giran, y continúan su paso a través del canal con el oxígeno mirando hacia arriba. Además, los oxígenos de los grupos carbonilo de los residuos G188, C189, G190 y G1191 que limitan el poro del canal constituyen puntos para la formación de enlaces de hidrógeno (50). En la zona más estrecha del canal, al mismo nivel que H180 y R195, existe una cisteína (C189), cuyo grupo sulfhidrilo determina la sensibilidad a los iones Hg^{2+} .

Se desconocen los factores que regulan la cinética de apertura-cierre de las acuaporinas. La AQP0 se activa a pH ácido y se inactiva por iones Ca; la AQP3 se inactiva a pH bajos y la AQP6 localizada en las vesículas celulares de las células a intercalares de los túbulos colectores se activan a pH bajo (51,52).

Heterogeneidad de las acuaporinas

Desde la identificación de la AQP1 se han descrito otras 10 acuaporinas que pueden agruparse en dos grandes familias, aquéllas que son específicas para el transporte de agua (acuaporinas clásicas: AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, AQP8 y AqpZ del *E. coli*) y otras que permiten el transporte de agua y glicerol (acuagliceroporinas: AQP3, AQP7, AQP9, AQP10 y GlpF del *E. coli*) (42,53). El mantenimiento del potencial de membrana y del pH intracelular requiere que las acuaporinas inhiban el paso de ciertos iones, en particular, de protones.

Las acuaporinas se expresan en tejidos específicos, si bien no se han podido identificar a nivel neuronal y su localización se muestra

en la Tabla 1. En las células que expresan más de una acuaporina, los distintos homólogos se localizan en distintas zonas de la membrana; en las glándulas salivares, las AQP3 están presentes en las membranas basolaterales, donde facilitan el paso del agua desde el intersticio, mientras que las AQP5 se localizan en las membranas apicales, donde el agua se libera durante la salivación (42,44).

TABLA 1. *Localización preferencial de las distintas acuaporinas*

Canal	Tejido
AQ0	Cristalino
AQ1	Eritrocitos, túbulo proximal, epitelio ciliar y alveolar pulmonar, plexo coroideo
AQ2	Túbulo colector
AQ3	Túbulo colector, epitelio traqueal, gls lacrimales
AQ4	Túbulo colector, células endociliares, hipotálamo, epitelio bronquial
AQ5	Glándulas salivares y lacrimales
AQ6	Riñón
AQ7	Adipocitos, testículo, túbulo proximal
AQ8	Tracto gastrointestinal, colon, placenta
AQ9	Hígado, leucocitos

Papel fisiopatológico de las acuaporinas

La AQP0 se expresa en las células del cristalino, que son avasculares y anucleadas. Sin embargo, esta acuaporina exhibe poca permeabilidad acuosa, por lo que participaría como molécula de adhesión celular (42); ello explicaría porqué la rotura de estos contactos se traduce en una pérdida de la transparencia del cristalino. Pacientes con mutaciones en la AQP0 (Q134G, T138R) sufren cataratas congénitas (54,55); ambas mutaciones interrumpen el tráfico de las proteínas nacientes desde el retículo endoplásmico hacia la membrana. Llama la atención que ambas mutaciones corresponden a distintos fenotipos, opacidades lamelares en el momento del nacimiento en el caso de la mutación Q134G y opacidades progresivas a lo largo de la vida en la mutación T138R.

Las AQP1 son muy abundantes en las membranas apical y basolateral de los túbulos proximales y en otros tejidos con importantes

funciones secretoras, tales como los plexos corotídeos (líquido cefaloraquídeo), epitelio de la cámara anterior del ojo (humor acuoso), colangiocitos (bilis) y endotelio capilar (regulación del paso de agua a nivel capilar) (56). Su papel principal en el riñón es concentrar el filtrado glomerular desde los 180 L/día originales al volumen final de 1.5 L/día. Las AQP1 del túbulo proximal y de la porción fina descendente del asa de Henle participan en el mecanismo de contracorriente de concentración renal. Los pacientes que carecen de AQP1 no presentan alteraciones, si bien son incapaces de concentrar la orina hasta 450 mOsm tras depleción hídrica durante 24 horas o la administración de vasopresina y, además, presentan una permeabilidad acuosa en los plexos capilares peribronquiales (57). Los glucocorticoides aumentan hasta 10 veces la expresión de AQP1 en el endotelio capilar pulmonar (42).

La **AQP2** reside en las vesículas intracelulares de las células del túbulo colector, previniendo la reabsorción del agua filtrada. Ello explica porqué una ingesta excesiva de agua o la administración de cafeína produce un aumento de orina diluída. En personas normales, la AQP2 se encuentra en las vesículas intracelulares y la administración de vasopresina estimula su redistribución en la membrana apical celular, lo que se acompaña de un aumento de hasta 5 veces en la permeabilidad acuosa (44). La expresión de AQP2 está regulada por receptores acoplados a la activación de la vía AMPc-proteína cinasa A, que fosforila un residuo (S256) localizado en el dominio C-terminal (58). Sobreexpresión de las AQP2 y aumento de la reabsorción tubular de agua aparece en situaciones patológicas que cursan con retención hidrosalina (p.ej., insuficiencia cardíaca, eclampsia) (59).

Los pacientes con mutaciones de la AQP2 (Arg187Cys) muestran un cuadro de diabetes insípida nefrogénica, eliminado hasta 20 L de orina al día (60). Esta mutación produce alteraciones en el ensamblaje de la proteína que queda retenida en el retículo endoplásmico. Otra mutación (E258K) cercana al punto de activación por el AMPc, produce una proteína que queda retenida en el aparato de Golgi (61). También se ha observado una menor expresión de AQP2 en pacientes con defectos para concentrar la orina, tales como la diabetes insípida asociada a mutaciones en el receptor V2 de la vasopresina o con enuresis nocturna. Por el contrario, la expresión de la

AQP tiene lugar en situaciones asociadas a retención hídrica (insuficiencia cardíaca, cirrosis, embarazo, eclampsia).

La QP3 se localiza en las membranas basolaterales de las células principales del túbulo colector.

La AQP4 se concentra en la membrana perivascular de las células astrogiales, regulando el paso de agua entre el parénquima cerebral y el espacio vascular; también se localiza en retina y en regiones osmosensibles cerebrales, como el núcleo supraóptico (62). Dado que el tejido cerebral se encuentra rodeado por un cráneo rígido, la recuperación y supervivencia de los pacientes que han sufrido un traumatismo craneoencefálico o un ictus dependerá de la rápida reducción/prevenición del edema cerebral. Esto ha sido demostrado en modelos animales, lo que sugiere que la manipulación de la expresión de las AQP4 podría tener interés terapéutico en estas circunstancias.

La AQP5 se localiza en la membrana apical de múltiples glándulas secretoras (lacrimales, salivares, células epiteliales alveolares). También se expresa en el epitelio corneal, donde parece que contribuye a la hidratación, transparencia y reparación. Defectos del tráfico de AQP5 se han observado en las glándulas salivares de pacientes con síndrome de Sjögren (63).

La AQP6 se localiza en las células α intercalares secretoras de ácido de los túbulos colectores renales, donde la proteína se localiza a nivel intracelular; a este nivel se colocaliza en vesículas junto a ATPasa-H⁺ (52). La AQP6 apenas si participa en la permeabilidad acuosa, pero se activa a pH ácido, participando en la secreción de ácido por las células α intercalares (64,65). También se piensa que actuaría como un inhibidor negativo de la población intercelular de la ATPasa-H⁺, enzima que es inhibida por el óxido nítrico. Es posible que mutaciones de la AQP6 se asocien a alteraciones del equilibrio ácido-base.

Las acuagliceroporinas AQP3 se expresan en riñón, piel y ojo, la AQP7 en el tejido adiposo (donde transporta el glicerol generado tras la degradación metabólica de los triglicéridos) y la AQP9 se expresa en los hepatocitos (incorpora el glicerol en el hígado, donde se convierte en glucosa). La expresión hepática de la AQP9 aumenta marcadamente por el ayuno y en la diabetes no controlada (66).

CONCLUSIONES

El primer canal iónico fue clonado en 1982 y desde entonces los avances en biología celular y genética molecular han permitido identificar un número progresivamente creciente de genes que codifican los canales iónicos. animales y humanos. El conocimiento de las características biofísicas y farmacológicas de los canales iónicos es indispensable para conocer la fisiología, así como el mecanismo de acción de múltiples fármacos (p.ej. antiarrítmicos, anestésicos locales y generales, benzodiazepinas, hipoglucemiantes orales, vasodilatadores, etc). Por otro lado, las mutaciones de los canales iónicos dan lugar a canalopatías que están implicadas en la génesis de diversas miotonías, ataxias cerebelosas, parálisis musculares, convulsiones epilépticas, migraña, procesos neurodegenerativos, sordera, hipertermia maligna, taquiarritmias cardíacas, algunas formas de litiasis renal, osteopetrosis y muchas más, que serán descritas en los próximos años. El excelente trabajo de Roderick MacKinnon y Peter Agree nos ha ayudado a comprender mejor los canales iónicos, su papel en la regulación de múltiples procesos fisiológicos, en la aparición de diversas patologías y, lógicamente, ha diseñado de forma racional nuevos fármacos, más eficaces y seguros que los actuales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ACKERMAN MJ, CLAPHAM DE. (1997) *N Engl J Med*; 336: 1575-1586.
- (2) HILLE B. (Ed.). (2001) *Ionic Channels of Excitable Membranes* (3^a ed). Sunderland, MA: Sinauer.
- (3) TAMARGO J. (2003) Discurso de Ingreso en la Real Academia de Ciencias Veterinarias. Ed. Realigraf, Madrid: 1-140.
- (4) COETZEE W, AMARILLO Y, CHIU J Y COLS.(1999) *N Y Acad Sci USA*; 868: 233-285.
- (5) SHIEH C-C, COGHLAN M, SULLIVAN JP Y COLS. (2000) *Pharmacol Revs*; 52: 557-593.
- (6) WICKENDEN AD. (2002) *Pharmacol Ther*; 94: 157-182.
- (7) JAN LY, JAN YN. (1997) *Annu Rev Neurosci*; 20: 91-123.
- (8) TAMARGO J, CABALLERO R, VALENZUELA C Y COLS. (2004) *Cardiovasc Res* (en prensa)
- (9) MACKINNON R. (1991) *Nature*; 350: 232-236.
- (10) YOOL AJ, SCHWARZ T. (1991) *Nature*; 349: 700-704.
- (11) HEGINBOTHAM L, LU Z, ABRAMSON T Y COLS. (1994) *Biophys J*; 66: 1061-1067.
- (12) YELLEN G, JURMAN ME, ABRAMSON T Y COLS (1991). *Science*; 251: 939-942.

- (13) MACKINNON R, MILLER C. (1989) *Science*; 245: 1382-1385.
- (14) MACKINNON R, YELLEN G. (1990) *Science*; 250: 276-279.
- (15) HEGINBOTHAM L, MACKINNON R. (1992) *Neuron*; 8: 483-491.
- (16) PAPAIZIAN DM, TIMPE LC, JAN YN Y COLS. (1991) *Nature*; 349: 305-310.
- (17) LIMAN ER, HESS G. (1991) *Nature*; 353: 752-756.
- (18) PAPAIZIAN DM, SHAO XM, SEOH SA. (1995) *Neuron*; 14: 1293-1301.
- (19) AGGARWAL SK, MACKINNON R. (1996) *Neuron*; 16: 1169-1177.
- (20) JIANG J, LEE A, CHEN J Y COLS. (2003) *Nature*; 423: 33-42.
- (21) JIANG Y, RUTA V, CHEN J Y COLS.(2003) *Nature*; 423: 42-48.
- (22) HOSHI T, ZAGOTTA WN, ALDRICH RW. (1991) *Neuron*; 7: 547-556.
- (23) YELLEN G.(2002) *Nature*; 419: 35-42.
- (24) ZAGOTTA WN, HOSHI T, ALDRICH RW. (1990) *Science*; 250: 568-571.
- (25) ISACOFF EY, JAN YN, JAN LY. (1991) *Nature*; 353: 86-90.
- (26) MACKINNON R, ALDRICH RW, LEE AW. (1993) *Science*; 262: 757-759.
- (27) HOSHI T, ZAGOTTA WN, ALDRICH RW. (1990) *Science*; 250: 533-538.
- (28) LÓPEZ BARNEO J, HOSHI T. (1993) *Recept Channels*; 1: 61-71.
- (29) CHOI KL, ALDRICH RW, YELLEN G. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 5092-5095.
- (30) OGIELSKA EM, ZAGOTTA WN, HOSHI T Y COLS (1995) *Biophys J*; 69: 2449-2457.
- (31) DOYLE D, CABRAL J, PFUERTZNER R Y COLS.(1998) *Science*; 280: 69-77.
- (32) HANLON MR, WALLACE BA (2002) *Biochemistry*; 41: 2886-2894.
- (33) POURRIER M, SCHRAM G, NATTEL S. J MEMBRANE (2003) *Biol*; 194: 141-152.
- (34) SEINO S, MIKI T. (2003) *Prog Biophys Mol Biol*; 81: 133-176.
- (35) GULBIS JM, MANN S, MACKINNON R. (1999) *Cell*; 97: 943-952.
- (36) PÉREZ-GARCÍA MT, LÓPEZ-LÓPEZ JR, GONZÁLEZ C. (1999) *J Gen Physiol*; 113: 897-907.
- (37) SHI GK, NAKAHIRA K, HAMMOND S Y COLS. (1996) *Neuron* 1996; 16: 843-852.
- (38) KURYSHV YA, GUDZ TI, BROWN AM Y COLS. (2000) *J Physiol*; 278: C931-C941.
- (39) GULBIS JM, ZHOU M, MANN S Y COLS. (2000) *Science*; 289: 123-127.
- (40) DUTZLER R, CAMPBELL E, CADENE M Y COLS. (2002) *Nature*; 415: 287-294.
- (41) FINKELSTEIN A. (1987) *Water Movements through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes: Theory and Reality*, Wiley, New York.
- (42) AGRE P, KING L, YASUI M Y COLS. (2002) *J Physiol*; 542: 3-16.
- (43) PRESTON GM, CARROLL TP, GUGGINO WB Y COLS. (1992) *Science*; 256: 385-387.
- (44) NIELSEN S, FROKLER J, MARPLES D Y COLS. (2002) *Physiol Rev*; 82: 205-244.
- (45) MURATA K, MITSUOKA K, HIRAI T Y COLS. (2000) *Nature*; 407: 599-605.
- (46) SUI H, HAN BG, WALLAN P Y COLS. (2001) *Nature*; 414: 872-878.
- (47) SMITH BL, AGRE P. (1991) *J Biol Chem*; 266: 6407-6415.
- (48) JUNG JS, PRESTON GM, SMITH BL Y COLS. (1994) *J Biol Chem*; 269: 14648-14654.
- (49) TAJKHORSHID E, NOLLERT P, JENSEN MO Y COLS. (2002) *Science* 2002; 296: 525-530.
- (50) KOZONO D, YASUI M, KING LS Y COLS. (2002) *J Clin Invest*; 109: 1395-1399.
- (51) NEMETH-CAHALAN KI, HALL JE. (2000) *J Biol Chem*; 275: 6777-6782.
- (52) YASUI M, HAZAMA A, KWON TH Y COLS. (1999) *Nature*; 402: 184-187.
- (53) AGRE P, KOZONO D. (2003) *FEBS Lett*; 555: 72-78.

- (54) BERRY V, FRANCIS P, CAUSAL S Y COLS. (2000) *Nat Genetics*; 25: 15-17.
- (55) FRANCIS P, CHUNG J-J, YASUI M Y COLS. (2000) *Hum Mol Genet*; 9: 2329-2334.
- (56) NIELSEN S, SMITH BL, CHRISTENSEN EI Y COLS. (1993) *J Cell Biol*. 120: 371-383.
- (57) KING LS, CHOI M, FERNÁNDEZ PC Y COLS. (2001) *N Engl J Med*, 345: 175-179.
- (58) CHRISTENSEN BM, ZELENINA M, APERIA A Y COLS. (2000) *Am J Physiol*; 278: F29-F42.
- (59) SCHRIER RW, CADNAPAPHORNCHAI MA. (2003) *Prog Biophys Mol Biol*; 81: 117-131.
- (60) DEEN PM, VERDIJK MA, KNOERS NV Y COLS. (1994) *Science*; 264: 92-95.
- (61) MULDER SM, BICHET DG, RIJSS JP Y COLS. (1998) *J Clin Invest*; 102: 57-66.
- (62) NIELSEN S, NAGELHUS EA, AMIRY-MOGHADDAM M Y COLS. (1997) *J Neurosci*; 17: 171-180.
- (63) STEINFELD S, COGAN E, KING L Y COLS. (2001) *Laboratory Invest*; 81: 143-148.
- (64) HAZAMA A, KOZONO D, GUGGINO WB Y COLS. (2002) *J Biol. Chem*; 277: 29224-29230.
- (65) IKEDA M, BEITZ E, KOZONO D Y COLS. (2002) *J Biol. Chem*; 277: 39873-39879.
- (66) CARBREY JM, GORELICK-FELDMAN DA, KOZONO D Y COLS. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA*; 100: 2945-2950.