



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Cuando Rod MacKinnon despertó el día de Año Nuevo de 1998, temió que todo hubiera sido únicamente un sueño. Hasta altas horas de la noche, había tomado datos de la fuente de radiación de sincrotrón en la Universidad Cornell en Ithaca (Nueva York). Buscaba determinar la estructura de un canal de potasio de la membrana celular; una especie de conducto para las partículas cargadas. Sus colaboradores ya se habían retirado, y él continuó trabajando solo. Era pasada la medianoche y, con cada nuevo cálculo de los datos, la imagen del canal iba ganando nitidez en la pan-

gas habían tenido serias dudas acerca de las posibilidades de éxito de su proyecto, que buscaba revelar la estructura de los canales iónicos. Se consideraba extremadamente difícil cristalizar proteínas de membrana celular animal o vegetal utilizando **criсталografía de rayos X (véase cuadro de la página 4)**. De hecho, las proteínas de la membrana- que habitualmente se incorporan de forma individual a una capa lipídica- parecían poco propensas a acoplarse con sus pares en un cristal. ¿Por qué el norteamericano llegó al éxito donde otros habían fracasado?

Tensión en todos los canales

Cómo los iones se deslizan a través de la membrana celular

talla de su ordenador. Finalmente comenzó a visualizarse el contorno de varios iones de potasio, alineados como las pelotas en una máquina de pinball. Al igual que casi cincuenta años antes había predicho Alan Hodgkin: *"Los iones deben estar obligados a moverse en una fila única y en promedio debería haber varios iones en el canal en todo momento"*. MacKinnon estaba enloquecido ...

ENCARCELADA: UNA MOLÉCULA CON ESPOSAS

No era un sueño. Rod MacKinnon realmente había logrado un hito científico que cinco años más tarde le significaría el Premio Nobel de Química. Sin embargo, muchos cole-

En primer lugar, MacKinnon eligió para su trabajo un canal iónico que proviene de una bacteria que disfruta de altas temperaturas (hipertermófila). Las proteínas de estos organismos obtienen la flexibilidad necesaria para cumplir su función, sólo con altas temperaturas. A los 20° C son mucho más rígidas que las moléculas evolutivamente relacionadas de otros organismos. Por lo tanto, es algo más fácil llevarlas a una forma común. Sin embargo, a estos primeros cristales les faltaba el exacto orden interno. Los investigadores tuvieron que recurrir a otro truco: para fijar definitivamente la molécula proteica, desarrollaron un **anticuerpo monoclonal** que, con un sitio de unión especial, →

A

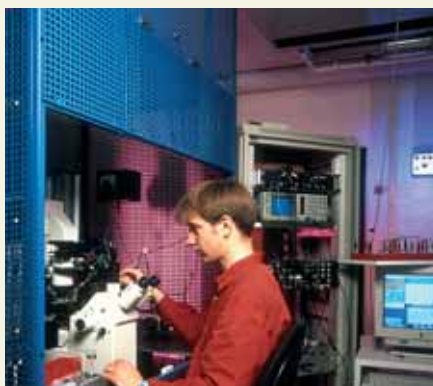
► Los canales iónicos (naranja) son proteínas especializadas en el transporte de iones inorgánicos (rojo o verde oscuro), que están embutidas en la membrana de las células (verde).

→ se acopla justamente en la región de la proteína canal en la cual aparentemente existe la mayor movilidad. Los fragmentos inespecíficos del anticuerpo fueron descartados; para sus ensayos de cristalización utilizaron sólo la sección específica, llamada fragmento Fab. Los cristales así producidos suministraron los datos en la difracción de rayos X, que permitieron dilucidar la estructura de los canales iónicos en alta resolución, honrando en mayo de 1998 la portada de la prestigiosa revista *Nature*.

Eso fue casi medio siglo después que, en el Reino Unido, Alan Hodgkin, Andrew Huxley y Bernard Katz analizaran el **potencial de acción** en el axón gigante del calamar. Sus mediciones confirmaron el llamado concepto de membrana: éste dice que todas las señales eléctricas conocidas (potencial de acción, potencial receptor y señales sinápticas) se basan en cambios de **permeabilidad de la membrana**, es decir del pasaje de iones a través de ésta. Hodgkin y Huxley desarrollaron la idea de canales iónicos regulados por tensión, para describir formalmente los cambios en la conductividad de la membrana que ocurren durante un potencial de acción. A los dos fisiólogos de Cambridge esto les valió el Premio Nobel de Medicina en 1963. La denominación de canales de sodio y potasio ha sido ampliamente utilizada desde entonces, aunque no había pruebas directas de la existencia de dichos canales, que estuvieran basadas en preparados biológicos.

En el caso de las membranas artificiales esto era diferente. Las llamadas “membranas

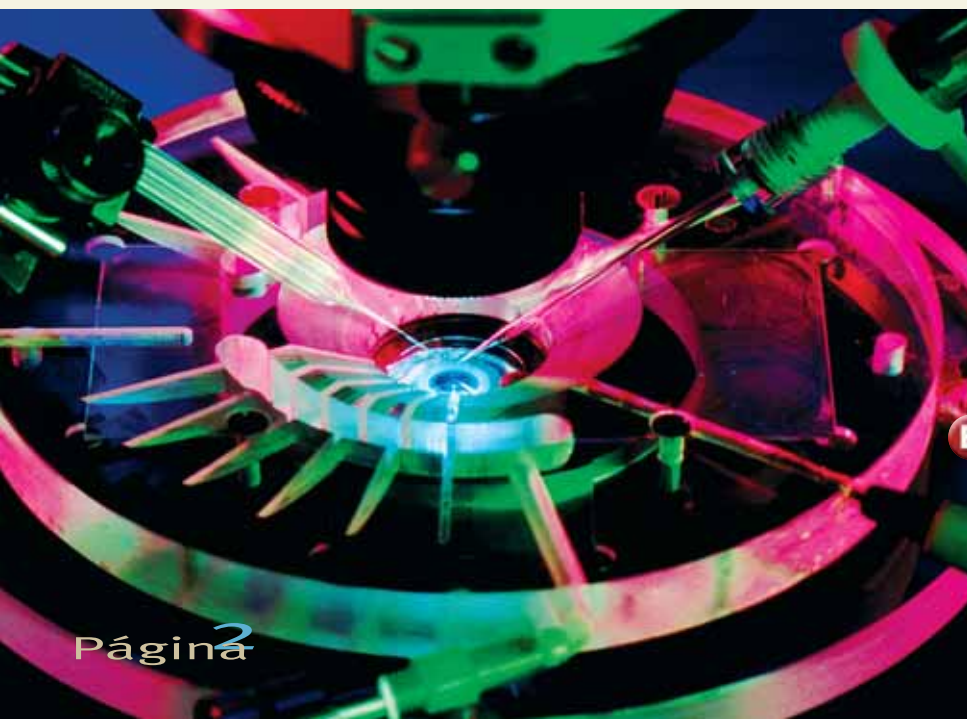
negras” servían desde finales de 1960 como un modelo experimental que emulaba en muchos aspectos la **membrana lipídica** de células vivas. Éstas actuaban como muy buen aislante, pero tratadas con antibióticos o proteínas, se volvían conductoras eléctricas. Debido a que la corriente que fluía a través de estas membranas negras variaba en forma escalonada, los investigadores sospecharon que moléculas proteicas individuales generaban canales a través de ellas, donde los escalones correspondían a la apertura y cierre de estos canales. En ese entonces, aún no se habían podido llevar a cabo estudios equivalentes sobre membranas biológicas. Los métodos para medir las corrientes eléctricas en células vivas generaban un ruido de fondo, que aunque sólo era de cien billonésimas partes de amperio (100 pA), todavía era un centenar de veces mayor que la observada en **corrientes de un solo canal** de membranas artificiales. Por eso, los investigadores tuvieron que pensar en nuevos métodos de medición.



Eso fue lo que hicieron Erwin Neher y Bert Sakmann en el Instituto Max Planck de Múnich a comienzos de la década de 1970. Los dos científicos creían que el instrumental de medición sólo alcanzaría la sensibilidad deseada cuando pudieran aislar un área muy pequeña de la membrana celular (un parche de membrana o “patch”). Para ello montaron una pipeta de vidrio con un líquido conductor sobre una fibra muscular enzimáticamente purificada. Tenían la esperanza de poder aislar algunos de los canales iónicos del resto de la membrana y así obtener una señal claramente mensurable. Sin embargo, resultó extremadamente difícil establecer una estrecha relación entre la pipeta de vidrio y la membrana. Los dos investigadores del Instituto Max Planck luchaban contra las fugas que permitían el contacto entre los fluidos dentro y fuera de la pipeta. Así fue que mejoraron la punta de la pipeta y limpiaron la superficie de la célula con más cuidado aún.

ESPIONAJE ACÚSTICO EN LA MEMBRANA CELULAR

En 1976 sus esfuerzos se vieron finalmente recompensados: por primera vez, los científicos pudieron observar las corrientes a través de canales individuales en la sinapsis neuromuscular, el punto de contacto entre fibras nerviosas y células musculares. Estas primeras mediciones confirmaron muchos supuestos previos acerca de las corrientes de un solo canal; en particular la presunción de que las señales eléctricas se dan en impulsos que poseen siempre la misma amplitud (flujo), pero de distinta duración. Años más tarde Neher y Sakmann descubrieron, por casualidad, que la resistencia eléctrica de la fuente de señal podía amplificarse en varios órdenes de magnitud, a más de mil millones de ohmios ($G\Omega$), si se generaba una pequeña presión negativa en la pipeta de vidrio y de esa manera se absorbía ligeramente el parche de membrana. Así, el ruido de fondo se redujo todavía más, y los investigadores pudieron examinar canales de iones de otros tipos de sinapsis. Por este método, llamado **técnica de pinzamiento** (o patch clamp), que mientras tanto es un



B ◀ En el laboratorio, el instrumental está protegido contra perturbaciones eléctricas por medio de una jaula parcialmente abierta (arriba). Imagen en detalle (izquierda) de la pipeta de medición y sostén, bajo el objetivo del microscopio durante la técnica de pinzamiento. (Fotos: Wolfgang Filser)

estándar en los laboratorios de electrofisiología, los dos alemanes obtuvieron el Premio Nobel de medicina en 1991 (Fig. B).

UN TÚNEL PARA IONES HECHO A MEDIDA

También el premio Nobel Rod MacKinnon inicialmente había intentado estudiar las propiedades de los canales iónicos con la técnica de pinzamiento. Para ello modificó partes clave mediante métodos de ingeniería genética (cambió ciertos aminoácidos), y evaluó cómo esto afectaba las propiedades del canal (por ejemplo, la capacidad de pasaje). De este modo, pudo hacer constataciones fundamentales sobre la estructura del canal de potasio bacteriano: esta esclusa de iones se compone de cuatro subunidades, que atraviesan la membrana celular agrupándose alrededor de un poro central. MacKinnon pudo demostrar exactamente qué aminoácidos determinan la selectividad del canal, haciéndolo permeable tan sólo a los iones de potasio y no a iones con otra carga eléctrica. Anteriormente se había llegado a similares conclusiones en el estudio de los canales de sodio. Pero todos estos resultados planteaban nuevas preguntas que los métodos de la electrofisiología y la biología molecular no podían responder por sí solos. ¿Cómo estaban organizadas espacialmente las subunidades? ¿Y cómo era posible que estos canales fueran altamente selectivos por un lado, pero por el otro permitieran enormes tasas de pasaje? Sucede que los iones de potasio fluyen cien veces mejor que los iones de sodio más pequeños (a través de la membrana pasan alrededor de 10.000 iones de potasio por milisegundo).

Para responder a estas preguntas, MacKinnon comenzó a utilizar la **crystalografía**; condición ineludible para los análisis estructurales de rayos X. El resultado de sus investigaciones reveló finalmente las bases moleculares del fenómeno que durante décadas había sido un enigma para los investigadores: el poro del canal debe ser lo suficientemente estrecho como para que los iones fluyan en contacto con las paredes del canal, de modo que sólo los iones de un determinado tamaño y carga puedan pasar a través del mismo. Para atravesar la parte más angosta del canal, el **filtro de selectividad**, los iones deben antes desprenderse de casi todas las moléculas de agua que los envuelven. Esto lo hacen de muy mala gana, porque para los

iones, la capa de hidratación significa un estado termodinámico muy favorable. Pero la naturaleza es ingeniosa: las cadenas de polipéptidos que forman el canal, revisten el interior de la pared del filtro de selectividad con sus átomos de oxígeno, similar a un túnel. Los átomos de oxígeno son muy electronegativos, es decir, que atraen a los electrones de otros átomos, ganando una carga negativa. Los iones de potasio poseen carga positiva y, por lo tanto, son atraídos por los átomos de oxígeno de carga opuesta. Así, el túnel cuasi imita el "abrazo" que las moléculas de agua dan a los iones. Eso explica porqué el potasio se muestra tan dispuesto a "desvestirse" para entrar en forma deshidratada en el poro del canal. Así y todo, para que esta atracción electrostática funcione, la distancia entre los átomos de oxígeno y los iones positivos no puede ser demasiado grande. En el canal de potasio, los átomos de oxígeno están posicionados de manera justa para alojar un ion de potasio. En cambio los iones de sodio más pequeños, quedan demasiado alejados de los átomos; una desventaja energética. El ion es excluido, porque no puede compensar el gasto energético que implica la pérdida de moléculas de agua para ingresar al poro del canal (Fig. C).

MOLÉCULAS CLAVE EN LA RUTINA CELULAR

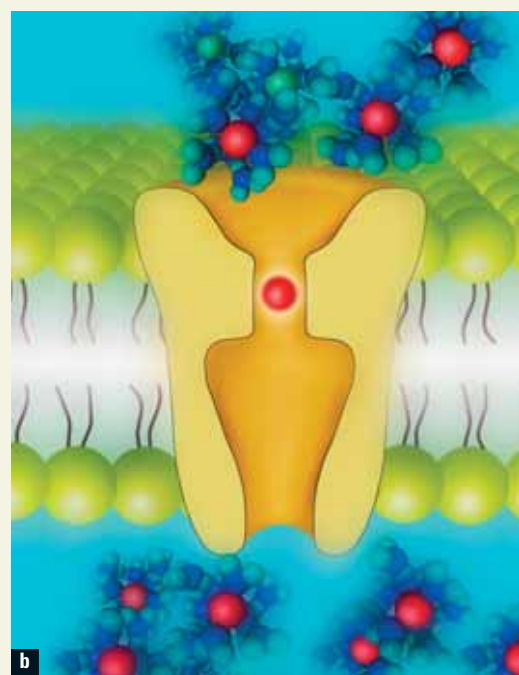
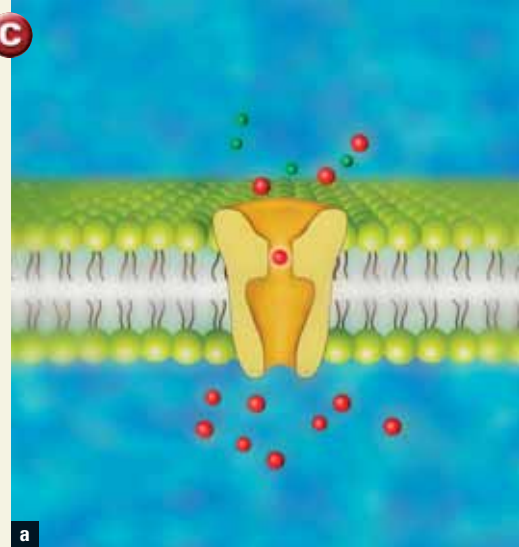
Los canales iónicos juegan un papel universal en la "red informática" de un organismo: sus tareas van desde el procesamiento de señales eléctricas en el cerebro, hasta procesos más lentos como la recuperación de sales en el riñón. La secuenciación del genoma humano

► (a) Corte transversal de un canal iónico embutido en la membrana celular. Los canales iónicos pueden transportar partículas de carga en ambas direcciones. El poro del canal representa el filtro de selectividad: aquí se decide qué iones pueden pasar y cuáles no.

► (b) Los iones están unidos a un complejo de moléculas de agua. Para que los iones fluyan a través del poro del canal, esta cubierta hidratante debe ser removida, ya que el diámetro de los poros es apenas mayor que el ion a transportar.

► (c) Los átomos de oxígeno del filtro de selección (lila), imitan el entorno que tenía el ión potasio (rojo) fuera del filtro, para lograr su entrada. De esta manera, los iones de potasio pueden desprenderse de su cubierta hidratante sin resistencia aparente.

► (d) El ión de sodio más pequeño (verde oscuro) no se ajusta exactamente a la disposición de los átomos de oxígeno del filtro. Las fuerzas de atracción electrostáticas (amarillo) no son suficientes y, por lo tanto, los iones permanecen en su ambiente acuoso fuera del canal.



→ demostró, de manera impresionante, la cantidad de canales iónicos diferentes que existen en el cuerpo humano. Los canales de potasio son probablemente la mayor familia de proteínas entre todos ellos. Se encuentran en las membranas de la mayor parte de las células; una prueba de su papel crucial en la transmisión de señales. Su función más conocida es la de regular el potencial de membrana en las células nerviosas, es decir, construir y mantener una diferencia de voltaje entre el interior y el exterior de una célula. Pero también están presentes en células no estimulables. Los canales de potasio denominados ATP dependientes, por ejemplo, se encuentran en la mayoría de los órganos y están vinculados a muchos procesos metabólicos: la secreción de insulina, el control del tono muscular de los vasos sanguíneos o las respuestas del organismo a un ataque cardíaco o a un accidente cerebrovascular. Entender la función de los canales iónicos es, por ende, extremadamente importante para contestar las preguntas de la medicina.

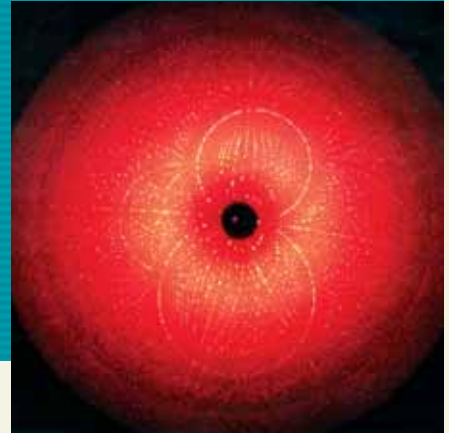
CONSECUENCIAS DE UN CANAL DE POTASIO FUERA DE LUGAR

A comienzos de la década de 1990 Walter Stühmer y sus colaboradores del Instituto Max Planck de Medicina Experimental en Gotinga, colocaron un canal de potasio bajo la lupa, cuyo original nombre es "Éter-A-Go-Go", abreviado EAG. En mutantes de la mosca *Drosophila*, la supresión de este canal conduce a que las pequeñas moscas puestas bajo la influencia del éter anestésico se muevan rítmicamente; de ahí el nombre. Este canal había sido descubierto ya en 1969 por investigadores norteamericanos. Veinte años más tarde, los estudios de secuenciación proveyeron la primera evidencia de que EAG efectivamente era un canal de potasio. Posteriormente se demostró la existencia de genes y proteínas análogos en ratas y, finalmente, en seres humanos. En estos mamíferos, las instrucciones genéticamente determinadas para la construcción del canal, normalmente sólo se expresan en las células nerviosas del cerebro, es decir, sólo allí se produce efectivamente la proteína correspondiente.

Investigadores del Instituto Max Planck, en Gotinga, examinaron células que no tenían el gen EAG1, y las alteraron genéticamente de manera tal que pudieran producir la proteína EAG1 correspondiente. Las células manipuladas no sólo se desarrollaron más

LUZ SOBRE CRISTALES DE PROTEINA

Para determinar la estructura tridimensional de las moléculas, los investigadores utilizan la llamada cristalografía de rayos X. En esta técnica se focaliza un haz de rayos X sobre una muestra de proteína pura. La mayor parte de ellos pasan a través de la muestra sin alteraciones, pero una pequeña fracción es dispersada por los átomos de la muestra. Si se trata de un cristal muy ordenado, en algunos puntos las ondas dispersadas se refuerzan entre sí y aparece una mancha de difracción en el instrumental. La ubicación y la intensidad de las manchas de difracción contienen información sobre las posiciones de los átomos en el cristal. Del patrón de manchas de difracción (véase la fotografía), los investigadores pueden desarrollar un mapa tridimensional de la densidad en la distribución de los electrones. Una vez revelada la secuencia de aminoácidos de la proteína, se calcula un modelo atómico informatizado. La computadora busca la mayor similitud posible entre la secuencia proteica y la densidad en la distribución de los electrones. La fiabilidad del modelo depende de la resolución de los datos originales de la cristalografía: una resolución de 0,5 nanómetros genera un mapa de resolución débil de la estructura del polipéptido; 0,15 nanómetros permite en cambio una asignación fiable de todos aquellos átomos de la molécula que no sean de hidrógeno.



rápido, sino que también comenzaron a dividirse de forma independiente a los factores de crecimiento. Inyectando estas células en ratones con deficiencia inmunológica, los investigadores pudieron inducir la formación de tumores individuales. Evidentemente, la proteína EAG1 interviene en la división celular cuando, por error, es producida en los tejidos fuera del cerebro: el canal se vuelve un **oncogén** potencial, lo que significa que pueden causar cáncer. Estos resultados pusieron en alerta a los investigadores, que comenzaron a examinar varias líneas celulares de tejidos tumorales humanos. Efectivamente, encontraron la proteína EAG1 en diferentes muestras de tumores extraídas del pulmón, hígado, tiroides, estómago y páncreas, entre otros. De ahí que los científicos concluyeran que la aparición de EAG1 en tejidos fuera del cerebro, puede ser un indicador de cáncer. El canal de potasio podría servir como proteína marcadora para el diagnóstico de esa patología.

Pero la proteína EAG1 incluso despierta esperanzas para el tratamiento del cáncer: "bloqueando" deliberadamente el canal, posiblemente se pueda reducir la tasa de división de células tumorales y, en consecuencia, el crecimiento de tumores. En un ensayo, los biólogos descubrieron que el funcionamiento del canal iónico es un prerrequisito para el crecimiento del tumor.

Por ello, los investigadores del Instituto Max Planck están en busca de una sustancia que neutralice ese canal. Mientras tanto han identificado un compuesto que lo bloquea, incluso en concentraciones nanomolares. Este compuesto, si se pudiera aplicar con fines terapéuticos, tendría la ventaja que sus efectos secundarios son improbables. Esto es así porque, en su lugar de origen, el sistema nervioso central, la proteína EAG1, permanece aislada gracias a la llamada barrera hematoencefálica.

PIE DE IMPRENTA

Sociedad Max-Planck, Departamento de Información y Relaciones públicas, Hofgartenstraße 8, 80539 München / e-mail: presse@gv.mpg.de

Texto: Dra. Christina Beck

Traducción: Ing. Agr. Roberto Neuwald

Diseño: www.haak-nakat.de

La Versión en español se hizo con el apoyo del DAAD y con fondos del Ministerio de Relaciones Exteriores de Alemania.

DAAD

Deutscher Akademischer Austausch Dienst
Servicio Alemán de Intercambio Académico

explora
Un Programa CONICYT

