



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**El bloqueo de los canales de potasio  $K_v1.3$  con la toxina de alacrán Vm24 atenúa la respuesta de los linfocitos T de memoria efectora  $CD4^+$  a la estimulación a través del receptor de células T**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. C. José Ignacio Veytia Bucheli

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Lourival Domingos Possani Postay  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Yvonne Rosenstein  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Leopoldo Santos Argumedo  
Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional

Ciudad de México. Junio, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **COMITÉ TUTOR**

<sup>1</sup>Dr. Lourival Domingos Possani Postay

<sup>1</sup>Dra. Yvonne Rosenstein

<sup>2</sup>Dr. Leopoldo Santos Argumedo

## **JURADO DE EXAMEN**

<sup>1</sup>Dr. Alejandro Alagón Cano

<sup>1</sup>Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

<sup>1</sup>Dra. Liliana Pardo López

<sup>3</sup>Dra. Angélica Santana Calderón

<sup>4</sup>Dr. Roberto González Amaro

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología (IBt), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

<sup>2</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)

<sup>4</sup>Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB), Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP)

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Lourival Domingos Possani Postay y la cotutoría de la Dra. Yvonne Rosenstein. La Dra. Juana María Jiménez Vargas participó como tutor invitado. Este trabajo se financió parcialmente con los donativos SEP-CONACYT 237864 y DGAPA IN203416 concedidos al laboratorio del Dr. Lourival Possani y los donativos SEP-CONACYT 220990 y PAPIT-IN212716 concedidos al laboratorio de la Dra. Yvonne Rosenstein. Durante la realización de este trabajo el M. C. José Ignacio Veytia Bucheli contó con una beca de doctorado de CONACYT (CVU 515949, número de becario 289448) y con el apoyo para la asistencia a cursos y congresos del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lourival Possani y a la Dra. Yvonne Rosenstein por ser mis padres científicos, por confiar en mí, por su cariño y apoyo incondicional, por ser un gran ejemplo a seguir y una motivación a continuar aprendiendo.

A la Dra. María Jiménez y a la Dra. Rita Restano Cassulini por sus consejos profesionales y personales que me han ayudado a ser mejor estudiante y mejor persona, y por invaluable amistad, paciencia y cariño.

A los doctores Corzo y Becerril por sus consejos y aportaciones durante los seminarios de grupo y por su actitud siempre amable, que genera un ambiente de trabajo muy agradable en el laboratorio.

Al Dr. Roberto González Amaro por permitirme realizar una estancia muy productiva en su laboratorio en San Luis Potosí y así conocer gente muy valiosa y regresar por un momento a casa.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por aceptar formar parte de mi comité tutorial durante el doctorado y por sus aportaciones, que fueron de gran utilidad durante el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del jurado de examen: Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, Dra. Liliana Pardo López, Dra. Angélica Santana Calderón y Dr. Roberto González Amaro por su paciencia, amabilidad y consejos para la mejora de mi tesis.

Al Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (Cuernavaca, Morelos) por facilitarnos los concentrados leucocitarios que se utilizaron en este trabajo y a las personas que contribuyeron en la obtención, procesamiento y análisis de las muestras de sangre de los pacientes con AR: Dr. Carlos Abud Mendoza, Dr. Roberto González Amaro, M. C. Raquel Sánchez Gutiérrez, Dra. Lesly Doniz Padilla y Dra. Berenice Hernández Castro

A las personas que colaboraron directamente en este proyecto. A la Biól. Erika Melchy por enseñarme tantas técnicas, a la M. C. Monserrat Alba Sandoval Hernández por ayudarme a darle un sentido biológico adecuado al conjunto de datos generado, a la Dra. Georgina Gurrola por obsequiarnos la toxina Vm24 utilizada para este trabajo y por sus consejos a lo largo de mi formación, a la Dra. Rita Restano Cassulini por la ayuda en los ensayos de electrofisiología (*patch clamp*), al Dr. Denis Faubert, Dra. Rosario Vera Estrella y M. C. Daniela Vega Mendoza por sus sugerencias en el análisis de espectrometría de masas y a la M. C. Estefanía Alemán Navarro, Dr. Angel Flores Alcantar, Dra. María Teresa Romero Gutierrez, Dr. Ernesto Ortiz y Dr. Roberto González Amaro por el apoyo en el análisis de los datos.

A la unidad de docencia y a Carmen Martínez Segura por su apoyo en los trámites y por su amabilidad durante mis estudios de posgrado.

A mi familia. A mis padres a quienes debo mi formación y valores. Gracias por todo lo que han hecho por mí desde el día que nací. A Lupita y Dulce por siempre estar a mi lado y ser las mejores hermanas que alguien puede pedir. A mis tíos Güera, Caki y Chama por apoyarme siempre y quererme como si fueran mis segundos padres. A mis abuelos por darme los mejores consejos y ejemplos.

A mis compañeros del laboratorio del Dr. Possani y de la Dra. Yvonne: Beto, Gustavo, Leo, Hugo, Guille, Ilse, Kevin, Rita (Pavel, Anna y María), Jimena, Juancho, Guti, Erne, Linda, Carmen, Chano, Vianey, Fredy, Ale, Edson, Polo, Timo, Dra. Gina, Dr. Fernando, Dra. Lidia, Moni, Volkan, Gamze, Diogo, Carol, Andrea, Franklin, Mari, Rosby, Tere, Lilu, Majo, Rodrigo, Ever, Miriam, Eri, Mali, Monse, Steph, Pablo, Dani, Álvaro, Den, Iván, Eli, Ismael, Sara, Angel, Alicia y Pao. Gracias por su amistad y hacerme sentir en casa durante estos seis años y por todos los buenos momentos que hemos vivido.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Roberto y la Dra. Diana: Ale, Elenita, Ángel, Shere, Celeste, Nacho, Ney, Raquel, Silvia, Mariela, Oswaldo, Maggy, Victor, Manuel, Naye, Lidia, Vicky, Lesly y Bere. Gracias por aceptarme como parte de su grupo y por su apoyo y amistad.

A Carlos, Gil, Chema, Jessi, Moncada, Norman, Ale, Normis, Amaro, Daniel, Mike, Chiva, Ham, Pau, Pato, Rafa, Brenda, Martín, Memo, Miguelín, Dani Paz, Montse, Gus, Mafer, Manuel, Tona, Mei, Mel, Gemma, Ángel, Susy, Genny, Ambar, Grecia Francia, Lili, Miris, Jenny, Axel, Luiso y Andrés, porque ser parte de su vida me hace muy feliz.

A todos ustedes muchas gracias.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Sistema inmunológico.....	6
1.1. Células y moléculas de la respuesta inmune.....	6
1.2. Linfocitos T de memoria.....	8
2. Autoinmunidad.....	11
2.1. Mecanismos de patogenicidad en las enfermedades autoinmunes.....	11
2.2. Artritis reumatoide.....	14
2.3. Tratamientos actuales de las enfermedades autoinmunes.....	18
3. Activación de linfocitos T.....	20
3.1. Generación del repertorio y selección de linfocitos T.....	20
3.2. Las señales del TCR.....	21
3.3. Canales de K <sup>+</sup> en la señalización de linfocitos T.....	24
3.4. Bloqueadores de canales Kv1.3 en venenos animales.....	29
3.5. Toxina ShK.....	29
3.6. Toxina Vm24.....	31
II. HIPÓTESIS.....	36
III. OBJETIVO.....	38
IV. METODOLOGÍA.....	40
V. RESULTADOS PUBLICADOS.....	46
VI. RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	65
VII. DISCUSIÓN.....	72
VIII. PERSPECTIVAS.....	79
IX. REFERENCIAS.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Respuesta inmune innata y adaptativa.....	7
Diferenciación de linfocitos T vírgenes.....	8
Activación de linfocitos T vírgenes y efectores.....	9
Marcadores fenotípicos de superficie de linfocitos T vírgenes, de memoria central ( $T_{CM}$ ) y de memoria efectora ( $T_{EM}$ ).....	10
Activación de linfocitos $T_{EM}$ .....	11
Reacciones de hipersensibilidad de tipo IV mediadas por linfocitos T autorreactivos.....	13
Mecanismos implicados en la iniciación y progresión de la AR.....	17
Fosforilaciones tempranas durante la activación de linfocitos T.....	22
Canales iónicos en la activación de linfocitos T.....	24
Estructura de los canales $K_v1.3$ .....	25
Expresión diferencial de los canales $K_v1.3$ y $K_{Ca}3.1$ en linfocitos T en reposo y linfocitos T activados.....	27
Secuencia de aminoácidos de la toxina ShK.....	30
Efecto inmunomodulador del compuesto ShK-186 (Dalazatide®).....	31
Estructura de la toxina Vm24.....	33
Potencia y selectividad de la toxina Vm24 por el canal $K_v1.3$ .....	34
Estrategia de citometría de flujo para el análisis de subpoblaciones de linfocitos T.....	66
El bloqueo de los canales $K_v1.3$ modifica ligeramente la proporción de células en subpoblaciones particulares de linfocitos T.....	67
El bloqueo de los canales $K_v1.3$ disminuye la expresión de CD25 y CD40L, pero no la de CD69.....	69
Estrategia de citometría de flujo para el análisis de linfocitos $nT_{REG}$ y $T_{REG}$ $CD69^+$ .....	70
El bloqueo de los canales $K_v1.3$ modifica la proporción de linfocitos $T_{REG}$ $CD69^+$ en sujetos sanos, pero no en pacientes con AR.....	71
Procesos biológicos afectados por el bloqueo de los canales $K_v1.3$ en linfocitos $T_{EM}$ .....	76

## ABREVIATURAS

ACPA	Anticuerpos contra proteínas citrulinadas
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AR	Artritis reumatoide
BCR	Receptor de células B
CaMKK	Proteína cinasa dependiente de $Ca^{+2}$ /calmodulina
CDR	Región determinante de la complementariedad
CPA	Célula presentadora de antígeno
CRAC	Canales de $Ca^{+2}$ activados por liberación de $Ca^{+2}$
CRD	Dominios ricos en cisteína
CS- $\alpha/\beta$	Motivo estructural $\alpha/\beta$ estabilizado por cisteínas
DAG	Diacylglicéridos poliinsaturados
DMSO	Dimetilsulfóxido
emPAI	Índice de abundancia de proteínas modificado exponencialmente
FARME	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
Fisher's LSD	Diferencia Significativa Mínima de Fisher
FLS	Sinoviocitos de tipo fibroblasto
FR	Factor reumatoide
FSC	Dispersión frontal de la luz
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IKK	Complejo I $\kappa$ B quinasa
ILC	Célula linfoide innata
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisfosfato
InsP <sub>3</sub> R	Receptor de InsP <sub>3</sub>
IRF4	Factor regulador de interferón 4
ITAM	Motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina
K <sub>2P</sub>	Canales de potasio de doble dominio de poro
K <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por $Ca^{+2}$
K <sub>d</sub>	Constante de disociación
K <sub>IR</sub>	Canales de potasio rectificadores entrantes
K <sub>v</sub>	Canales de potasio regulados por voltaje
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad



MLS	Sinoviocitos de tipo macrófago
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NK	Célula asesina natural
nT <sub>REG</sub>	Linfocito T regulador natural
PBS	Amortiguador fosfato salino
PKC- $\theta$	Proteína cinasa C theta
PLC $\gamma$ 1	Fosfolipasa Cy1
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
T <sub>CM</sub>	Linfocito T de memoria central
TCR	Receptor de células T
T <sub>EM</sub>	Linfocito T de memoria efectora
T <sub>FH</sub>	Linfocito T cooperador folicular
T <sub>H</sub>	Linfocito T CD4 <sup>+</sup> cooperador
T <sub>Reg</sub>	Linfocito T regulador
T <sub>RM</sub>	Linfocito T de memoria residente
US	Células sin estimular

## RESUMEN

Las células del sistema inmunológico expresan una variedad de canales iónicos y transportadores que permiten el flujo de iones a través de la membrana plasmática y la membrana de los organelos intracelulares. El transporte de iones a través de canales iónicos es esencial para regular el potencial de membrana, la señalización por  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y otros cationes divalentes, así como regular la expresión génica, apoptosis, proliferación, desarrollo, diferenciación y migración. Los linfocitos T de memoria efectora ( $T_{EM}$ ) tienen un papel crítico en la respuesta inmune secundaria y en la patogénesis de diferentes enfermedades autoinmunes. Después de su activación, el número de canales  $K_v1.3$  en la membrana de los linfocitos  $T_{EM}$  aumenta dramáticamente. El bloqueo de los canales  $K_v1.3$  resulta en la inhibición de la señalización por  $\text{Ca}^{+2}$  en linfocitos  $T_{EM}$ , ejerciendo así un efecto inmunomodulador. Dado que observamos que la toxina peptídica Vm24, aislada del alacrán mexicano *Vaejovis mexicanus* bloquea por completo y selectivamente las corrientes de los canales  $K_v1.3$ , sin perjudicar la viabilidad de los linfocitos  $T_{EM}$ , decidimos utilizarla para investigar los eventos moleculares que siguen al bloqueo de los canales  $K_v1.3$  en linfocitos  $T_{EM} CD4^+$  humanos. Encontramos que tras la estimulación a través del TCR, Vm24 inhibió la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD40L (pero no de CD69), la secreción de las citocinas proinflamatorias IFN $\gamma$  y TNF, así como la liberación de las citocinas  $T_H2$  IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Un patrón inhibitorio similar fue ejercido por Vm24 en linfocitos T aislados de pacientes con artritis reumatoide. Por otro lado, un análisis proteómico de los linfocitos  $T_{EM}$  activados a través del TCR, indicó que los procesos biológicos principalmente afectados por el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  fueron la interacción citocina-receptor de citocina, el procesamiento del ARNm a través del espliceosoma, la respuesta a proteínas desplegadas y el transporte intracelular de vesículas, atenuando la maquinaria de síntesis de proteínas celulares. En conjunto, estos resultados subrayan el papel de los canales  $K_v1.3$  en la regulación de la función de los linfocitos  $T_{EM}$  y destacan el uso potencial del péptido Vm24 como agente inmunomodulador para el tratamiento de afecciones mediadas por los linfocitos  $T_H1$  y  $T_H2$ .

## ABSTRACT

Cells of the immune system express a variety of ion channels and transporters that allow the flux of ions across the plasma membrane and the membrane of the intracellular organelles. The transport of ions through ion channels is essential to regulate membrane potential, signaling by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and other divalent cations, as well as to regulate gene expression, apoptosis, proliferation, development, differentiation and migration. T effector memory ( $T_{EM}$ ) cells have a critical role in the secondary immune response and in the pathogenesis of different autoimmune diseases. Following activation, the number of  $K_v1.3$  channels on the  $T_{EM}$  cell membrane dramatically increases. Blockade of  $K_v1.3$  channels results in inhibition of  $\text{Ca}^{+2+}$  signaling in  $T_{EM}$  cells, thus exerting an immunomodulatory effect. Since we observed that the peptide toxin Vm24, isolated from the Mexican scorpion *Vaejovis mexicanus* completely and selectively blocked  $K_v1.3$  channels currents, without impairing  $T_{EM}$  cell viability, we decided to use it to investigate the molecular events that follow  $K_v1.3$  blockade in human  $\text{CD4}^+$   $T_{EM}$  lymphocytes. We found that under TCR stimulation, Vm24 inhibited the expression of the activation markers CD25 and CD40L (but not that of CD69), the secretion of the pro-inflammatory cytokines IFN $\gamma$  and TNF, as well as the release of the  $T_H2$  cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13. A similar inhibitory pattern was exerted by Vm24 on T cells isolated from patients with rheumatoid arthritis. On the other hand, a proteomic analysis of TCR-activated  $T_{EM}$  cells indicated that the biological processes mainly affected by the blockade of  $K_v1.3$  channels were cytokine-cytokine receptor interactions, mRNA processing via spliceosome, the response to unfolded proteins and intracellular vesicle transport, targeting the cell protein synthesis machinery. Altogether, these results underscore the role of  $K_v1.3$  channels in regulating  $T_{EM}$  lymphocyte function and highlight the potential use of the Vm24 peptide as an immunomodulatory agent for the therapy of conditions mediated by  $T_H1$  and  $T_H2$  lymphocytes.

# I. INTRODUCCIÓN

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Sistema inmunológico

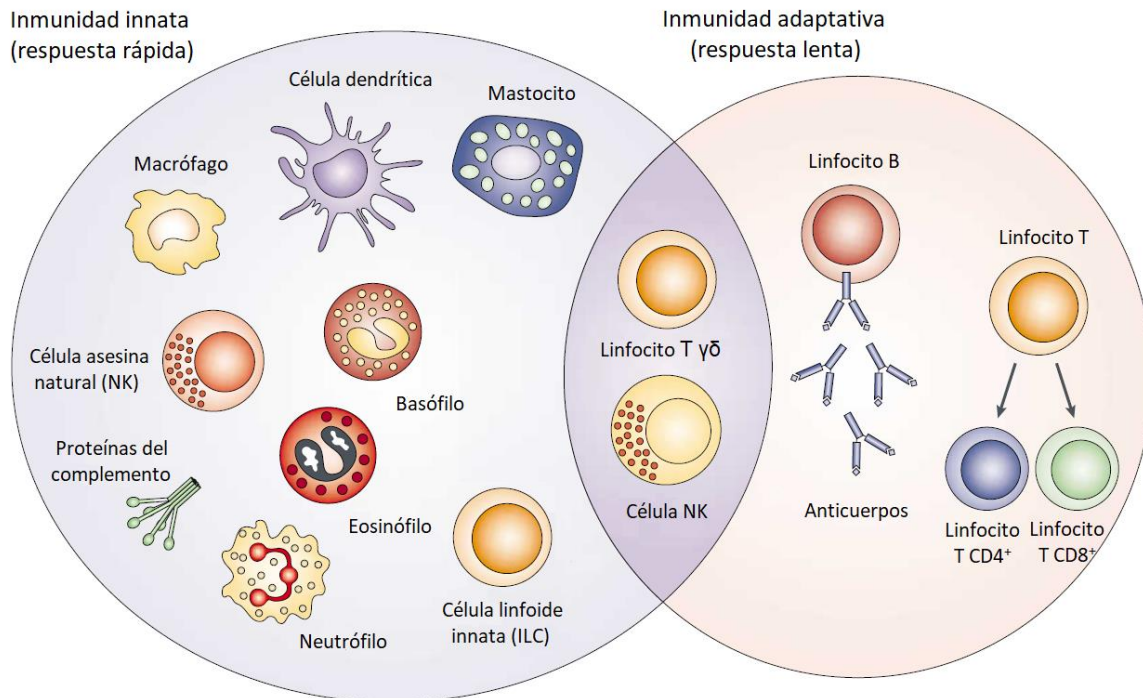
### 1.1. Células y moléculas de la respuesta inmune

El sistema inmunológico es una compleja red de células, tejidos y moléculas que trabajan en conjunto para defender a los organismos multicelulares de las enfermedades y preservar la homeostasis. El sistema inmunológico también participa en la eliminación de las células muertas y en la iniciación del proceso de reparación tisular. Para funcionar correctamente, debe tener la capacidad de distinguir el tejido sano del organismo de una gran variedad de agentes potencialmente nocivos como toxinas, virus, bacterias, hongos, gusanos parasitarios y células cancerosas y de generar una respuesta coordinada que los elimine. La tolerancia hacia lo propio es una propiedad fundamental del sistema inmunológico, y la generación de una respuesta inmune contra autoantígenos puede dar lugar a enfermedades autoinmunes.

El sistema inmunológico de diversas especies (incluido el humano) se ha dividido en componentes innatos y adaptativos (Figura 1), siendo que ambos tienen una comunicación extensa y trabajan en conjunto [1, 2]. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa en este sistema. Está mediada por efectores celulares y factores solubles. Dentro de los efectores celulares se encuentran las células epiteliales, granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), mastocitos, macrófagos, células dendríticas, células linfoides innatas (ILCs) y células asesinas naturales (NK). Las células de la respuesta inmune innata tienen receptores de reconocimiento de patrones moleculares codificados en la línea germinal, capaces de detectar diversos componentes microbianos y señales de estrés endógeno. Se estima que hay aproximadamente 100 receptores de reconocimiento de patrones moleculares que reconocen alrededor de 1000 tipos de estructuras diferentes [2]. Tras el reconocimiento de estos patrones, las células de la respuesta inmune innata incrementan su capacidad fagocítica y citotóxica y la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie celular y la producción de citocinas, las cuales a su vez son necesarias para la activación de las células de la respuesta inmune adaptativa. Asimismo, estas señales inducen la secreción de quimiocinas que reclutan y dirigen a las células de la respuesta inmune innata y adaptativa hacia los sitios de inflamación [1, 2, 3]. Entre los factores solubles de la respuesta inmune innata, se encuentran moléculas como las proteínas del complemento y los péptidos de defensa del hospedero (defensinas, catelicidinas), capaces de atacar la membrana de patógenos y células dañadas y regular la respuesta inflamatoria, facilitando la eliminación del agente nocivo.

Por su parte, la respuesta inmune adaptativa, mediada por linfocitos B y linfocitos T, manifiesta una exquisita especificidad que le permite reconocer una enorme diversidad de antígenos. Además, presenta memoria antigénica que le permite responder de manera rápida e intensa a una exposición subsecuente al mismo antígeno. Sin embargo, esta respuesta se desarrolla más

lentamente que la respuesta de la inmunidad innata. Esto refleja el requerimiento de la expansión y diferenciación de linfocitos que expresan receptores reorganizados somáticamente específicos para el reconocimiento de antígenos: el receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés) y el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés). Los linfocitos B tienen dos funciones principales: producir y secretar anticuerpos específicos y funcionar como células presentadoras de antígeno (CPA). Los linfocitos T por su parte, tienen múltiples funciones en la respuesta inmune adaptativa.



**Figura 1.** Respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta inmune innata funciona como la primera línea de defensa contra agentes nocivos. Incluye factores solubles, como proteínas del complemento y péptidos de defensa del hospedero y diversos componentes celulares, incluidos granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), mastocitos, macrófagos, células dendríticas, ILCs y células NK. La respuesta inmune adaptativa se desarrolla más lentamente, pero manifiesta una exquisita especificidad y posee memoria antigénica. Se compone de anticuerpos, células B y linfocitos T. Las células NKT y los linfocitos T  $\gamma\delta$  son linfocitos citotóxicos que se encuentran en la interfaz de la respuesta inmune innata y adaptativa. Modificado de [2].

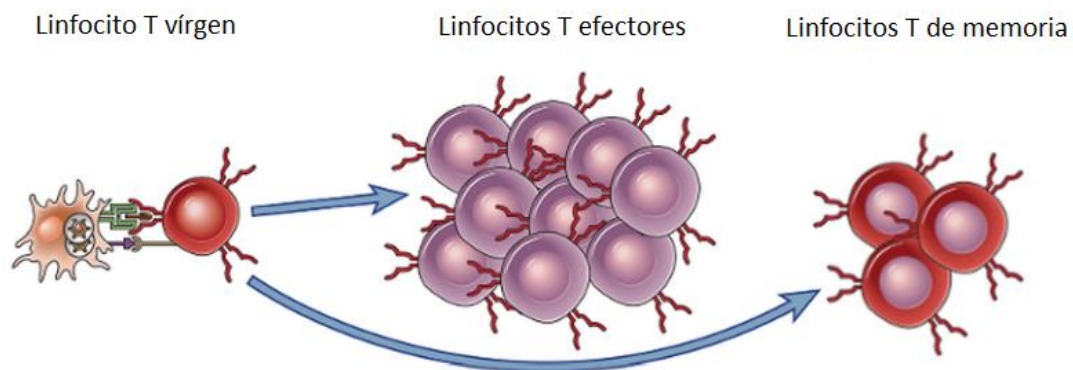
Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores (T<sub>H</sub>) ocupan un papel central en la configuración final de la respuesta inmune. La exposición de linfocitos T<sub>H</sub> a un entorno especializado de citocinas dicta su polarización hacia subgrupos funcionalmente diferentes que producen una vasta variedad de citocinas y quimiocinas que regulan la respuesta inmune innata y adaptativa. Entre los subgrupos de linfocitos T<sub>H</sub> se encuentran: T<sub>H</sub>1 que participan en la respuesta protectora frente a patógenos intracelulares, produciendo IFN $\gamma$  y LT $\alpha$ ; T<sub>H</sub>2 que promueven la eosinofilia, mastocitosis y respuestas humorales, confiriendo protección frente a patógenos extracelulares y helmintos

mediante la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10;  $T_H9$  que tienen un papel protector frente a tumores y helmintos, produciendo IL-9 e IL-10;  $T_H17$  que producen IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y CCL2 para combatir bacterias extracelulares y hongos, principalmente en las barreras epiteliales;  $T_H22$  que secretan IL-22 y participan en la inmunidad de las barreras epiteliales; linfocitos T cooperadores foliculares ( $T_{FH}$ ), productores de IL-4 e IL-21, que interactúan con linfocitos B, promoviendo el cambio de isotipo y la hipermutación somática en los centros germinales; y linfocitos T reguladores ( $T_{Reg}$ ) que promueven la homeostasis y las respuestas tolerogénicas mediante la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  y mecanismos dependientes de contacto [4-7]. Por su parte, los linfocitos T  $CD8^+$  se diferencian a efectores citolíticos que reconocen células cancerosas e infectadas por virus o bacterias y las matan induciendo apoptosis, ya sea a través de la secreción de gránulos citotóxicos o mediante la interacción de la proteína FasL en las células  $CD8^+$  activadas con Fas en la célula blanco. Además, secretan en abundancia citocinas como IFN $\gamma$  y TNF [1, 5].

En la interfase de la respuesta inmune innata y adaptativa, se encuentran las células NKT y los linfocitos T  $\gamma\delta$ . Estas células expresan receptores de antígeno reorganizados somáticamente y responden a las infecciones en formas que son características de la inmunidad adaptativa (secreción de citocinas y gránulos citotóxicos), pero tienen características de inmunidad innata como una respuesta rápida y diversidad limitada de los receptores de antígeno.

## 1.2. Linfocitos T de memoria

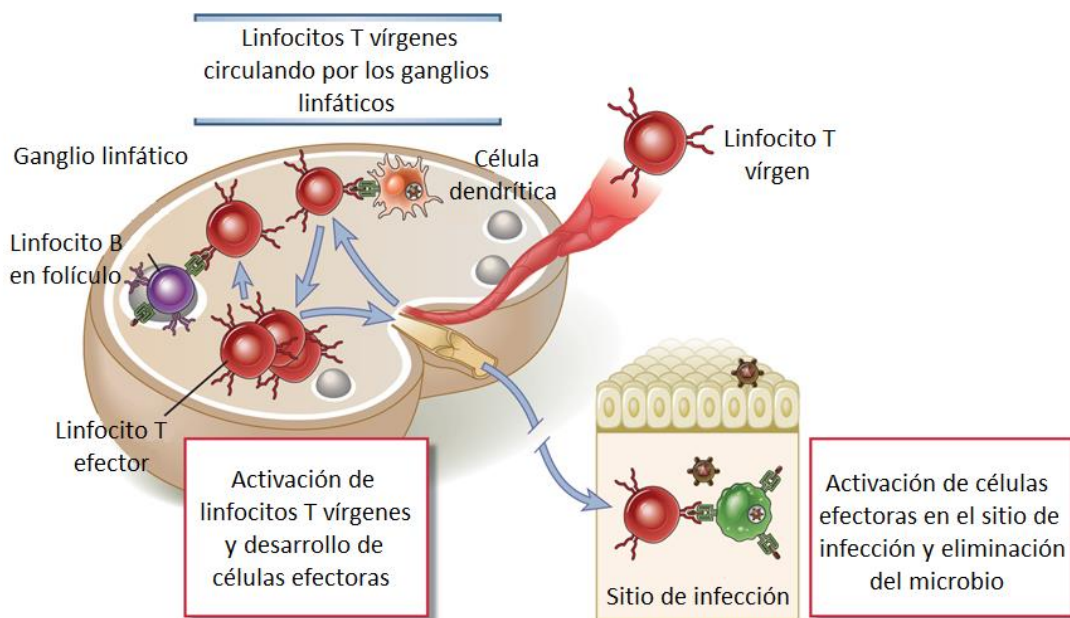
Un sello distintivo de la respuesta inmune adaptativa es la generación de linfocitos T de memoria autorrenovables y de larga duración en respuesta a estímulos antigénicos.



**Figura 2.** Diferenciación de linfocitos T vírgenes. Tras el reconocimiento del antígeno y la coestimulación por parte de las CPA, los linfocitos T vírgenes se activan y diferencian en células efectoras y de memoria. Modificado de [2].

Cuando las CPA, principalmente células dendríticas, fagocitan un antígeno, migran a los órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos o el bazo, en donde linfocitos T específicos reconocen péptidos procesado del antígeno en la superficie de las CPA y se activan. Los linfocitos T

virgenes activados proliferan y se diferencian en linfocitos efectores o de memoria (Figura 2) [2]. Los linfocitos efectores migran a los focos infecciosos o inflamatorios, donde encuentran al antígeno y lo erradican (Figura 3). Una vez eliminado el antígeno, la mayoría de los linfocitos T efectores mueren por apoptosis (fase de contracción de la respuesta inmune). Sin embargo, una parte de la población antígeno específica permanece como linfocitos T de memoria y recirculan entre la sangre, linfa y órganos periféricos por largo tiempo. Conforme aumenta la edad del individuo, la proporción de este tipo de linfocitos se incrementa, de forma que más de la mitad de los linfocitos T maduros en un adulto son de memoria [2]. Existe además una población de linfocitos T de memoria residentes ( $T_{RM}$ ) que no recircula que más bien esta confinada a tejidos particulares [8]. Estas poblaciones de linfocitos T de memoria están listas para responder a una futura exposición al antígeno de manera más rápida e intensa y los requerimientos para su activación son menos estrictos que para los linfocitos T vírgenes, presentando una sensibilidad aumentada a la estimulación a través del TCR tanto en presencia como en ausencia de coestimulación [2, 9, 10].



**Figura 3.** Activación de linfocitos T vírgenes y efectores. Los linfocitos T vírgenes en los órganos linfoides secundarios reconocen antígenos que las células dendríticas transportan y exponen en su superficie. Los linfocitos T vírgenes se activan para diferenciarse en células efectoras y de memoria, que pueden permanecer en los órganos linfoides secundarios y activar linfocitos B o migrar a los tejidos periféricos. En los sitios de inflamación, las células efectoras se activan por los antígenos y los erradican. Modificado de [2].

Los linfocitos T de memoria son heterogéneos en su capacidad funcional y de migración, y con base en la expresión diferencial de isoformas de la fosfatasa CD45, del receptor de quimiocinas

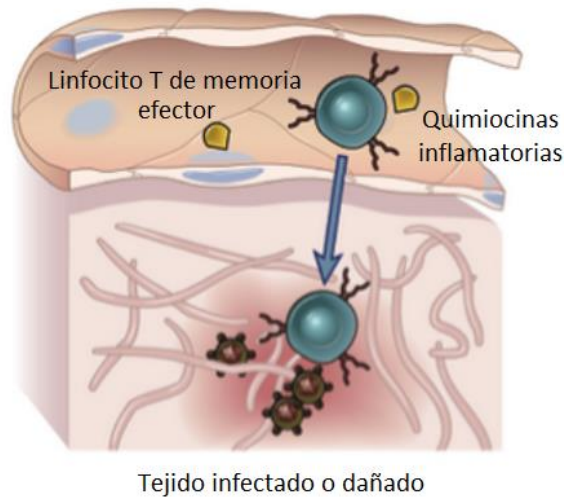


CCR7 y de la molécula de adhesión celular selectina-L (CD62L), en humanos pueden distinguirse los subgrupos mencionados en la Tabla 1 [2, 9, 10].

**Tabla 1.** Marcadores fenotípicos de superficie de linfocitos T vírgenes, de memoria central (T<sub>CM</sub>) y de memoria efectora (T<sub>EM</sub>).

Marcador	Linfocitos T vírgenes	Linfocitos T <sub>CM</sub>	Linfocitos T <sub>EM</sub>
CD45RA	+	-	-
CD45RO	-	+	+
CCR7	+	+	-
CD62L	+	+	-

- Linfocitos T<sub>CM</sub>: Al igual que los linfocitos T vírgenes, expresan CD62L para ingresar a los órganos linfoides secundarios a través de las vénulas de endotelio alto. También expresan el receptor de quimiocinas CCR7, por lo que migran preferentemente a los órganos linfoides secundarios en donde se producen constitutivamente las quimiocinas CCL19 y CCL21, que son ligandos de este receptor. En los órganos linfoides secundarios, estas células son activadas para luego migrar a los sitios inflamatorios. Su notable capacidad para inducir la expresión CD40L tras la activación, les permite estimular de manera eficiente a células dendríticas y linfocitos B en los ganglios linfáticos. Esta subpoblación de células de memoria produce cantidades limitadas de citocinas efectoras como IFN $\gamma$  e IL-4 tras su activación; sin embargo, proliferan rápidamente ante una nueva exposición al antígeno y pueden diferenciarse en linfocitos T de memoria efectora (T<sub>EM</sub>) [9, 10].
- Linfocitos T<sub>EM</sub>: No expresan CD62L ni CCR7, pero la expresión de los receptores CCR1, CCR3 y CCR5 para quimiocinas inflamatorias les permite migrar preferentemente desde la sangre a los focos inflamatorios, sin necesidad de ser previamente activados en los órganos linfoides secundarios. Eliminan eficientemente al antígeno, pues producen y liberan rápida y abundantemente mediadores inflamatorios y citotóxicos como IFN $\gamma$ , IL-4 y perforina (Figura 4) [8-12].



**Figura 4.** Activación de linfocitos  $T_{EM}$ . Los linfocitos  $T_{EM}$  expresan receptores para quimiocinas inflamatorias, por lo que migran preferentemente a los focos infecciosos o inflamatorios y eliminan eficientemente al antígeno, pues producen y liberan rápida y abundantemente mediadores inflamatorios y citotóxicos. Modificado de [2].

## 2. Autoinmunidad

### 2.1. Mecanismos de patogenicidad en las enfermedades autoinmunes

La tolerancia inmunológica se define como la ausencia de una respuesta inmune hacia un antígeno, inducida por la exposición previa a ese antígeno. Cuando los linfocitos específicos se encuentran con sus antígenos pueden activarse, desencadenando una respuesta inmune, o pueden inactivarse o eliminarse, lo que lleva a la tolerancia. Diferentes formas del mismo antígeno pueden inducir una respuesta inmune o tolerancia inmunológica. Los antígenos que inducen tolerancia se denominan tolerógenos, para distinguirlos de los inmunógenos, que generan una respuesta inmune. Un solo antígeno puede ser inmunógeno o tolerógeno, dependiendo del contexto en que se muestre a los linfocitos específicos, por ejemplo, en presencia o no de inflamación y de respuestas inmunitarias innatas [2].

Las anomalías en la inducción o mantenimiento de tolerancia frente a lo propio, llevan a respuestas inmunitarias contra antígenos propios, lo que puede dar lugar a trastornos denominados enfermedades autoinmunes. La autoinmunidad contribuye a más de 100 enfermedades graves y crónicas, en las que se genera una respuesta inmune adaptativa contra antígenos propios, afectando diversos órganos y tejidos como articulaciones, sistema nervioso central, glándulas endócrinas, riñones y piel. Estas enfermedades a menudo están marcadas por períodos de remisión que se alternan con exacerbaciones incapacitantes. Se estima que estas enfermedades tienen una prevalencia de 7.6–9.4% en la población [13], haciéndolas más comunes que el cáncer o las enfermedades cardíacas. Más del 75% de los pacientes son mujeres [14].

Cuando se desarrolla una respuesta inmune adaptativa en contra de autoantígenos, por lo general es imposible eliminarlos completamente. Esto se debe a que son componentes intrínsecos del organismo y existe un suministro constante de nuevo autoantígeno. Es por ello que la magnitud y duración de la respuesta se amplifican, generando daño tisular e inflamación crónica [2, 15]. Se piensa que, al igual que la respuesta inmune protectora, la autoinmunidad se inicia por la activación de linfocitos T antígeno-específicos, a consecuencia de la gran diversidad en el repertorio de receptores de antígeno de los linfocitos B y T. Aunque durante el desarrollo, el repertorio se purga de la mayoría de los receptores que unen con alta afinidad a los antígenos propios, todavía circulan linfocitos que expresan receptores de baja afinidad hacia algunos autoantígenos.

Los individuos sanos no montan respuestas inmunes adaptativas contra sus propios antígenos. Sin embargo, en algunos individuos la pérdida de tolerancia a lo propio genera respuestas inmunes sostenidas. No se sabe qué desencadena la autoinmunidad, pero factores ambientales como el mimetismo molecular de algunos patógenos, y factores genéticos como el genotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), son claramente importantes. Se piensa que algunos alelos particulares del MHC son especialmente efectivos en la presentación de autopéptidos a los linfocitos T autorreactivos, o son ineficientes en la presentación de ciertos antígenos propios en el timo, lo que conduce a defectos en el proceso de selección negativa durante el desarrollo de los linfocitos T [2, 15].

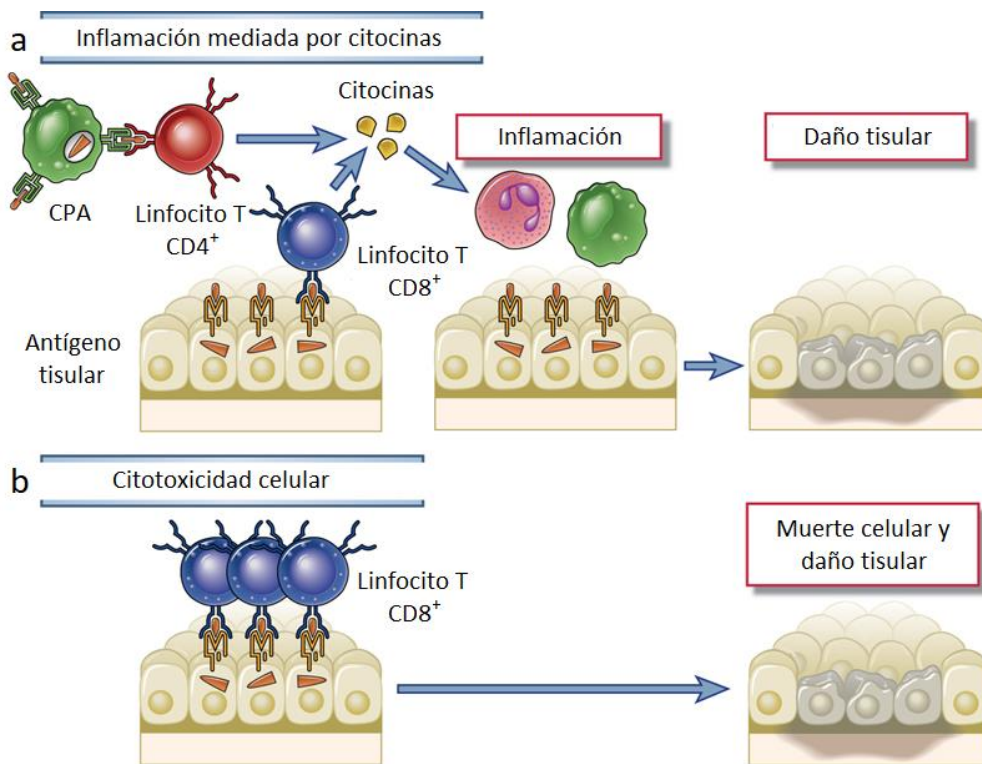
Las enfermedades autoinmunes pueden clasificarse en dos categorías, dependiendo de la distribución de los autoantígenos que se reconozcan [2, 15]:

- Específicas de órgano: La expresión de autoinmunidad se restringe a órganos específicos. Por ejemplo, la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves, donde se afecta predominantemente a la glándula tiroides; la diabetes mellitus tipo I, donde se afectan los islotes pancreáticos y la esclerosis múltiple que daña al sistema nervioso central.
- Sistémicas: En estas enfermedades se afectan diversos tejidos. Por ejemplo, en el lupus eritematoso sistémico y en el síndrome de Sjögren primario, pueden afectarse órganos tan diversos como la piel, los riñones y el cerebro. Estas enfermedades se caracterizan por la presencia de anticuerpos contra antígenos ubicuos y abundantes, como anticuerpos anti-cromatina, anti-ribonucleoproteínas, anti-anticuerpos y anti-proteínas de la maquinaria de *splicing*.

Los mecanismos por los cuales se genera daño tisular en las enfermedades autoinmunes son esencialmente los mismos que operan en la respuesta inmune protectora [2, 15]:

- Reacción de hipersensibilidad de tipo II: Se generan anticuerpos IgG o IgM contra autoantígenos ubicados en las superficies celulares o la matriz extracelular, causando lesiones.

- Reacción de hipersensibilidad de tipo III: En este caso, participan complejos inmunes (complejos antígeno-anticuerpo). Los autoanticuerpos generados se entrecruzan con antígenos solubles y causan reacciones de precipitación muy extensas, haciendo que estos complejos se depositen en vasos sanguíneos, glomérulos y articulaciones. Estas enfermedades son sistémicas y se caracterizan por generar vasculitis autoinmune.
- Reacción de hipersensibilidad de tipo IV: La respuesta de células T está directamente involucrada en el daño tisular. Los linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  autorreactivos crónicamente estimulados adquieren un fenotipo de memoria y secretan quimiocinas inflamatorias que reclutan células de la respuesta inmune innata y citocinas como  $IFN\gamma$ , que activa macrófagos y TNF, que induce inflamación. A su vez los macrófagos activados liberan enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos de oxígeno y citocinas proinflamatorias que lesionan los tejidos (Figura 5a). Los linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$  destruyen directamente las células diana que portan antígenos propios (Figura 5b). Además, la cooperación inapropiada de linfocitos T con linfocitos B autorreactivos puede iniciar una respuesta de anticuerpos dañina.



**Figura 5.** Reacciones de hipersensibilidad de tipo IV mediadas por linfocitos T autorreactivos. **a)** Los linfocitos T  $CD4^+$  y los linfocitos T  $CD8^+$  secretan quimiocinas inflamatorias que reclutan células de la respuesta inmune innata y citocinas que activan macrófagos e inducen inflamación. **b)** Los linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$  destruyen directamente las células diana que portan antígenos propios. Modificado de [2].

En la mayoría de las enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus tipo I), varios mecanismos de patogenicidad operan en paralelo y tanto las vías mediadas por linfocitos T como por anticuerpos causan lesión tisular [2, 15].

## 2.2. Artritis reumatoide

Entre las enfermedades autoinmunes en las que los linfocitos T de memoria crónicamente activados tienen una participación importante en la fisiopatología, se encuentra la artritis reumatoide (AR). La AR es una enfermedad articular inflamatoria crónica de naturaleza autoinmune y etiología indeterminada. Se estima que la AR afecta a 0.5-1.0% de la población adulta alrededor del mundo. Particularmente en México se estima una prevalencia del 1.6% [16, 17].

Es una enfermedad heterogénea, con presentación clínica y mecanismos patogénicos diversos entre individuos con el mismo diagnóstico formal o en diferentes etapas de la enfermedad. Si se trata de manera insuficiente, la AR puede llevar a la acumulación de daño articular y discapacidad irreversible. Aunque todavía no es una enfermedad curable, la remisión es un objetivo alcanzable [16]. La AR se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos contra la porción Fc de las IgGs, denominados factor reumatoide (FR), y anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, aunque los autoanticuerpos son una característica importante de la AR, algunos individuos son negativos para estos (AR seronegativa) [16].

La AR es una enfermedad compleja que involucra factores ambientales como el tabaquismo, exposición a sílice, deficiencia de vitamina D, obesidad, enfermedad periodontal, agentes infecciosos y cambios en la microbiota que desencadenan la enfermedad en individuos genéticamente susceptibles [16-18].

Esta enfermedad tiene un fuerte componente genético. Los individuos con moléculas MHC clase II que contienen el “epítipo compartido” en su estructura, tienen un fuerte riesgo de desarrollar AR. Además, la presencia del “epítipo compartido”, se asocia con manifestaciones extraarticulares, mayor severidad del daño articular y títulos elevados del FR. El “epítipo compartido” es un motivo de aminoácidos específico codificado por algunos alelos del *locus* HLA-DR, especialmente HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*04. A la inversa, los alelos que carecen del “epítipo compartido”, como HLA-DRB1\*07, HLA-DRB1\*08 y HLA-DRB1\*11 se han asociado con protección a desarrollar AR. Estos últimos codifican un aspartato en la posición 70 (D<sup>70+</sup>) del HLA-DRB1, en comparación con la glutamina o arginina en los alelos que contienen el “epítipo compartido” [19]. En un estudio con pacientes mexicanos mestizos con artritis reumatoide y controles sanos, se encontró que la proporción de individuos que portan al menos un alelo HLA-DRB1 que codifica el “epítipo compartido” aumentó significativamente en los casos de AR en comparación con los controles ( $p = 0.0004$ , OR = 4.1, 95% CI = 2.2–7.7). El alelo con mayor frecuencia en los pacientes con AR fue HLA-DRB1\*0404 (0.161 vs 0.045). Además, se observó una proporción significativamente mayor

de pacientes positivos para el “epítipo compartido” con títulos de FR por encima de la mediana ( $p = 0.005$ ). A la inversa, la proporción de individuos que portan al menos un alelo HLA-DRB1 que codifica el D<sup>70+</sup>, disminuyó significativamente entre los pacientes con AR en comparación con los controles ( $p = 0.004$ , OR = 0.4, 95% CI 0.2–0.7) [19].

Además del “epítipo compartido”, se han identificado alrededor de 100 *loci* en el genoma que albergan variantes de susceptibilidad a la AR [20]. Diversas variantes genéticas asociadas con AR están enriquecidas en marcas epigenéticas de cromatina activa en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> [16, 21]. En general, las mujeres tienen dos o tres veces más probabilidades de desarrollar AR que los hombres. La mayor frecuencia de AR en las mujeres se atribuye, en parte, a los efectos estimulantes de los estrógenos en el sistema inmunológico; sin embargo, el papel de los factores hormonales en el desarrollo de la AR sigue siendo controvertido [16].

En la mayoría de los pacientes, la patogenia de la AR comienza años antes de ser evidente la enfermedad clínica. Se considera que factores estresantes como el humo del cigarrillo actúan sobre las células en las mucosas y promueven la conversión postraduccional del aminoácido arginina a citrulina en diversas proteínas intracelulares y de la matriz extracelular a través de la inducción de deiminasa de peptidil arginina en un proceso llamado citrulinación. La microbiota también puede inducir citrulinación de proteínas (Figura 6a) [16, 22].

Después de la citrulinación u otras modificaciones postraduccionales como acetilación o carbamilación, los péptidos alterados se unen a las moléculas MHC, particularmente a las que contienen el “epítipo compartido”, lo que lleva a la presentación de neo-antígenos a los linfocitos T, que a su vez estimulan a las células B a sintetizar una gama de anticuerpos (como FR y ACPA) que reconocen proteínas propias (Figura 6b) [16, 20]. Conceptualmente, este proceso podría considerarse una respuesta inmune normal a un antígeno alterado en lugar de una verdadera autoinmunidad.

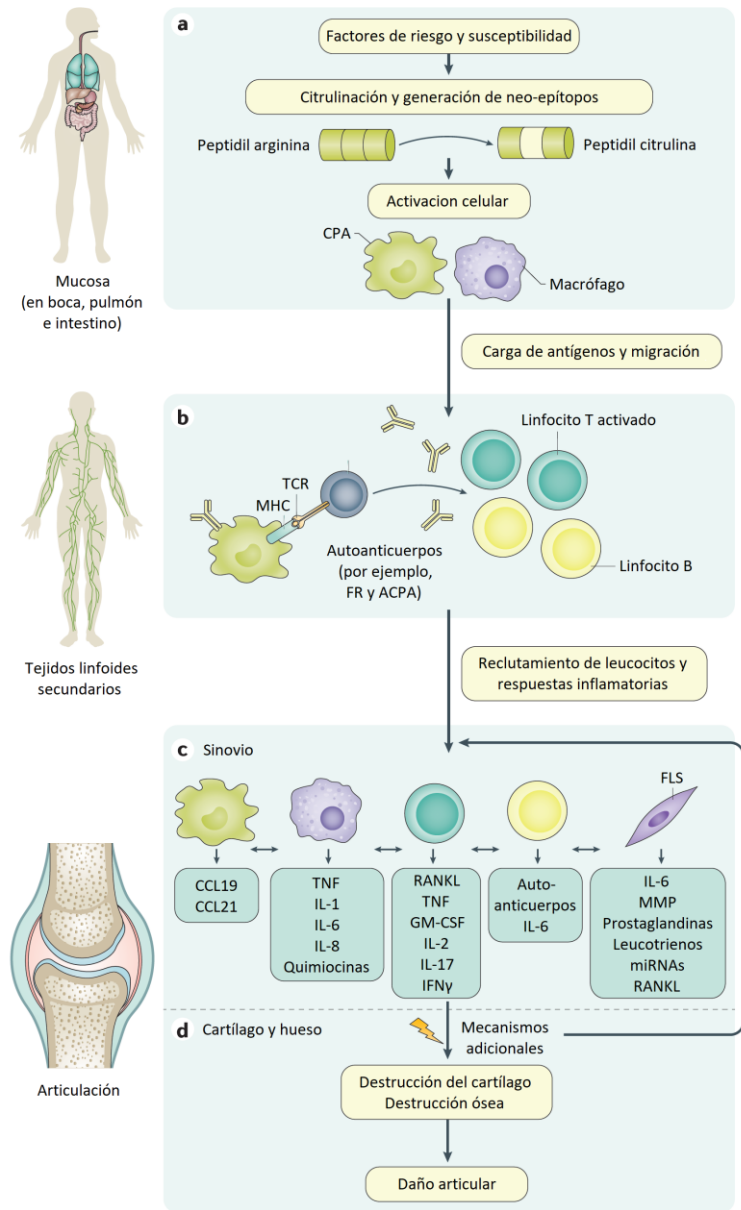
La presencia de FR, ACPA y citocinas y quimiocinas proinflamatorias circulantes se puede detectar hasta 10 años antes del inicio de la enfermedad clínica, lo que apunta a la activación inmune durante el período preclínico. La presencia de ACPA por sí sola no es suficiente para generar sinovitis. Es probable que se requieran factores adicionales como la formación de complejos inmunes, la activación del complemento o lesión microvascular para iniciar una sinovitis clínica caracterizada por el aumento de la permeabilidad vascular y la entrada de células inflamatorias en el sinovio [16]. La AR temprana se caracteriza por inflamación sinovial basada en la infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos, junto con la activación temprana de células estromales. Los linfocitos T pueden mostrar clonalidad en la enfermedad temprana, pero se vuelven mucho más policlonales a medida que la enfermedad evoluciona. El papel de los macrófagos y los fibroblastos en la perpetuación de la sinovitis es más prominente en la enfermedad establecida [16, 23].

Aunque la AR es una enfermedad sistémica y se produce una variedad de eventos inmunológicos en las mucosas y en los tejidos linfoides, el sinovio es un actor central. Dos cambios patogénicos

clave en el sinovio son evidentes en la AR. Primero, la íntima sinovial se expande en gran medida debido a un aumento y activación de sinoviocitos de tipo fibroblasto (FLS, por sus siglas en inglés) y sinoviocitos de tipo macrófago (MLS, por sus siglas en inglés), que son fuente importante de citocinas y proteasas. Los MLS producen variedad de citocinas proinflamatorias, que incluyen IL-1, IL-6 y TNF. Aunque los FLS expresan IL-6, su característica más destacada es la producción de grandes cantidades de metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés) y moléculas pequeñas mediadoras de la inflamación como prostaglandinas y leucotrienos. Los FLS asumen un fenotipo invasivo y pueden migrar potencialmente de una articulación a otra para propagar la enfermedad (Figura 6c) [16, 23, 24]. El segundo cambio en el sinovio asociado con la AR es la infiltración de células de la respuesta inmune adaptativa en la subíntima sinovial. Aproximadamente la mitad de las células esta capa son linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup> que pueden infiltrarse de manera difusa en el tejido o formar centros germinales ectópicos en los que las células B maduran, proliferan y se diferencian en células plasmáticas, muchas de las cuales producen FR o ACPA. Células dendríticas foliculares, macrófagos y mastocitos también se distribuyen en la subíntima sinovial. Los neutrófilos curiosamente están ausentes en este tejido [16, 23].

El daño al cartílago y al hueso generados por la invasión sinovial hacia las estructuras articulares adyacentes es un signo cardinal de la AR (Figura 6d). Los macrófagos, neutrófilos (particularmente en el espacio del líquido sinovial) y los mastocitos contribuyen al daño articular a través de la liberación de citocinas y MMP. Sin embargo, el tipo de célula destructiva dominante para el cartílago es el FLS positivo a cadherina-11 productor de MMP [16, 23].

Las redes de citocinas tienen un papel fundamental en esta enfermedad, pues integran las actividades proinflamatorias y las actividades celulares dañinas para los tejidos en la sinovitis. Los circuitos de retroalimentación aseguran el reclutamiento continuo de nuevas células, mantienen la activación celular y limitan la apoptosis dentro del microambiente. Por ejemplo, TNF participa en la activación de leucocitos, la producción de MMP, la angiogénesis y la promoción del dolor. Los macrófagos producen citocinas que activan FLS adyacentes, linfocitos T y células dendríticas. La liberación de IL-8 por los osteoclastos inducida por ACPA podría jugar un papel particularmente importante en la enfermedad temprana al conducir el reclutamiento de neutrófilos al líquido sinovial. Aunque inhibidores endógenos como la proteína antagonista del receptor de IL-1, los receptores de TNF solubles, IL-10 e IL-35 también son producidos localmente por macrófagos, neutrófilos y fibroblastos, los niveles son insuficientes para mitigar la respuesta inflamatoria [16].



**Figura 6.** Mecanismos implicados en la iniciación y progresión de la AR. **a)** Modificaciones postraduccionales como la citrulinación en proteínas de las mucosas crean neo-epitopos. **b)** Estos péptidos alterados son presentados por CPA y activan células de la respuesta inmune adaptativa en los tejidos linfoides secundarios y provocan la formación de autoanticuerpos. **c)** Las células estromales (como FLS), las CPA y los macrófagos se activan localmente y producen factores inflamatorios. La respuesta inmune desencadena una inflamación sinovial. Mecanismos adicionales como la formación de complejos inmunes y la activación del complemento pueden inducir o aumentar la producción de citocinas y aumentar de la permeabilidad vascular, contribuyendo a la inflamación sinovial. **d)** Las acciones autocrinas y paracrinas de las citocinas, junto con las respuestas inmunes adaptativas persistentes, pueden perpetuar la enfermedad y en última instancia, conducir a la destrucción de cartilago y hueso. Modificado de [16].



Las erosiones óseas se deben en gran medida a la maduración y activación de osteoclastos (células que reabsorben los huesos) por la citocina RANKL producida por linfocitos T, y por TNF, IL-6 e IL-1 producidas por macrófagos y FLS en el revestimiento sinovial. Los osteoclastos degradan la matriz ósea mineralizada al producir proteasas, incluida la cathepsina K. También se ha sugerido que los ACPA interactúan con péptidos citrulinados expresados por osteoclastos y precursores de osteoclastos, lo que lleva a su maduración y activación. Esta interacción proporciona nuevos mecanismos mediante los cuales los autoanticuerpos contribuyen a la inflamación y remodelación de los tejidos más allá de sus funciones tradicionales de activación del complemento [16, 23].

### **2.3. Tratamientos actuales de las enfermedades autoinmunes**

El tratamiento de las enfermedades autoinmunes depende del tipo y severidad de la afección y se enfoca principalmente en el manejo de los síntomas y el logro de la remisión. Las recomendaciones incluyen modificaciones en el estilo de vida, como ejercicio regular, una dieta balanceada y control del estrés. Actualmente no se dispone de tratamientos curativos para estas enfermedades.

Hasta hace poco, el tratamiento farmacológico se limitaba a la administración de analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticosteroides. Sin embargo, desde que se introdujeron los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), muchos pacientes han experimentado un mejor control de los síntomas. Los agentes sintomáticos, como los analgésicos y los AINEs, mejoran los signos y síntomas, pero no modifican el proceso subyacente y, por lo tanto, no interfieren con los mecanismos que conducen al daño articular, aunque alivian el dolor y la hinchazón, generalmente debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Los glucocorticoides tienen actividad modificadora de la enfermedad, pero sus efectos adversos impiden su uso a largo plazo [16, 25].

Los FARME son una categoría de fármacos no relacionados, que se caracterizan por disminuir la progresión de la enfermedad. Estos son esencialmente fármacos sintéticos y productos biofarmacéuticos, muchos de los cuales se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de cáncer. Los medicamentos sintéticos se administran en dosis más bajas que las utilizadas para el tratamiento de cáncer. Estos fármacos causan la muerte de las células que se dividen rápidamente. Comúnmente causan neutropenia, un efecto secundario indeseable en el tratamiento del cáncer, que puede ser positivo en los pacientes con enfermedades autoinmunes. Algunos de los fármacos sintéticos utilizados son metotrexato, ciclofosfamida, mercaptopurina, azatioprina y mitoxantrona. Estos fármacos afectan procesos biológicos compartidos por todas las células del organismo por lo que tienen múltiples efectos adversos como malestar general, pérdida de cabello, náuseas, vómitos, fatiga, cistitis hemorrágica, cardiotoxicidad y supresión de la médula ósea [25, 26].

Dentro de esta categoría, recientemente se han desarrollado los fármacos sintéticos inhibidores de la quinasa Janus (JAK) denominados Jakinibs, los cuales inhiben la actividad de una o más

enzimas de la familia JAK, interfiriendo la transducción de señales a través de la vía JAK-STAT. Muchas citocinas, incluidos los miembros de la familia IL-6, los interferones y las citocinas cuyo receptor contiene la cadena  $\gamma_c$  común como IL-7 e IL-15, señalizan a través de las quinasas JAK, después de unirse a sus receptores de superficie. Algunos ejemplos de Jakinibs son tofacitinib, ruxolitinib y baricitinib. Estos fármacos han resultado ser muy efectivos en el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes. Sin embargo, al producirse una inmunosupresión generalizada, pueden favorecer el establecimiento de infecciones graves como la tuberculosis u de infecciones bacterianas y micóticas invasivas, además de aumentar el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer [16, 27, 28].

En cuanto a los productos biofarmacéuticos utilizados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, la mayoría son anticuerpos monoclonales que se unen a proteínas solubles extracelulares o a proteínas asociadas a la membrana celular y modulan la respuesta inmune. Algunos de estos son rituximab, un anticuerpo anti-CD20 eficaz en el tratamiento de enfermedades con un componente de células B, infliximab, un anti-TNF con potente acción antiinflamatoria y natalizumab, un anticuerpo dirigido contra la  $\alpha_4$  integrina, reduciendo la capacidad de las células de la respuesta inmune para migrar de un tejido a otro. Los anticuerpos monoclonales pueden generar efectos adversos como supresión de la médula ósea, infecciones severas durante la terapia o reacciones relacionadas con la perfusión que pueden ser potencialmente letales. Dentro de estas últimas se encuentran la anafilaxia y el síndrome de liberación de citocinas, generado por la unión de los anticuerpos con las células blanco [25, 26].

Actualmente, la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes con menores efectos adversos continúa. Particularmente, en las enfermedades autoinmunes donde operan reacciones de hipersensibilidad de tipo IV, los linfocitos T vírgenes específicos de autoantígenos escapan a los procesos de selección y en la periferia son estimulados repetidamente por el antígeno durante el curso de la enfermedad. Los tejidos afectados están fuertemente infiltrados con macrófagos activados y linfocitos T autorreactivos que exhiben un fenotipo de linfocitos  $T_{EM}$  coestimulación-independientes terminalmente diferenciados y que son mediadores claves de la patogénesis de estas enfermedades [2, 15, 29-32]. Es por ello que estrategias que supriman de manera específica la activación de los linfocitos  $T_{EM}$  sin comprometer la función de otras poblaciones de linfocitos T (linfocitos T vírgenes y linfocitos  $T_{CM}$ ), son de gran valor en el tratamiento, pues los fármacos inmunosupresores generalizados impiden la producción de una adecuada respuesta protectora.

Particularmente el camino que conduce al establecimiento de la AR crea muchas oportunidades para la intervención terapéutica. En el tratamiento de la AR, numerosos agentes terapéuticos se han dirigido hacia las citocinas y sus receptores. Los productos biofarmacéuticos contra TNF, IL-6 y GM-CSF y las moléculas sintéticas Jakinibs han sido exitosos en el tratamiento de la AR. Por el contrario, agentes contra IL-1 e IL-17 han tenido menos éxito. Además, la jerarquía de importancia de citocinas varía mucho entre pacientes. Por lo tanto, es un gran desafío la selección de las citocinas fundamentales en medio de redes tan complejas [16, 25, 27].

### 3. Activación de linfocitos T

#### 3.1. Generación del repertorio y selección de linfocitos T

Para su activación, los linfocitos T acoplan los estímulos externos a una compleja red de transducción de señales que controla programas transcripcionales y metabólicos que determinan su función [5]. Cada linfocito T expresa múltiples copias de un receptor de antígeno (TCR) único, con una especificidad única. El TCR es un dímero formado por las cadenas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Cada cadena contiene una región altamente variable de unión al antígeno (determinada por tres regiones determinantes de la complementariedad, o CDRs) y un dominio constante.

Los linfocitos T se originan a partir de células troncales hematopoyéticas en la médula ósea. Estas se diferencian a células progenitoras linfoides que migran al timo donde se expanden y sufren una serie de transformaciones, convirtiéndose de linfocitos T inmaduros en linfocitos T maduros, listos para salir a la circulación [2, 33]. Durante las primeras etapas de maduración en el timo, se llevan a cabo procesos de recombinación somática en los timocitos, donde ocurren rearrreglos en el ADN de los genes que codifican para las distintas cadenas del TCR. En este proceso, denominado “recombinación V(D)J”, se ensamblan de un modo estocástico diferentes segmentos génicos [variable (V), diversidad (D) y unión funcional (J)] para formar la región de unión al antígeno del TCR. El resultado de este proceso es la gran diversidad en el repertorio de los receptores de antígeno. Posteriormente se lleva a cabo la transcripción y maduración del transcrito, donde mediante *splicing* se une la región VDJ (para el caso de cadenas  $\beta$  y  $\delta$ ) o VJ (para el caso de cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$ ) recombinada con la región constante (C) correspondiente. El transcrito maduro da lugar a una cadena proteica que formará parte de un TCR funcional. De esta manera, cada linfocito T expresa un solo tipo de receptor recombinado en su superficie [2, 34].

En pasos posteriores de maduración en el timo, se lleva a cabo la selección positiva. En este proceso, se seleccionan linfocitos T capaces de interactuar con el MHC. Los timocitos con doble positividad ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) son presentados con autoantígenos unidos a moléculas MHC. Solo aquellos timocitos cuyo TCR interactúe con MHC-I o MHC-II de manera apropiada (no demasiado fuerte o demasiado débil) recibirán una señal de supervivencia y los que no reciban esta señal, sufrirán una “muerte por abandono”. Este proceso garantiza que los linfocitos T seleccionados sean capaces de interactuar en el futuro con complejos MHC-péptido para ejercer una respuesta inmune. Al mismo tiempo, el destino de los timocitos se determina durante la selección positiva. Las células con doble positividad ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) cuyo TCR reconoce las moléculas MHC de clase II eventualmente se convertirán en células  $CD4^+$ , mientras que los timocitos que reconocen moléculas MHC de clase I maduran en células  $CD8^+$ . La mayoría de los timocitos en desarrollo morirán durante este proceso [2, 35].

Los timocitos que sobreviven a la selección positiva, son sometidos a un proceso de selección negativa, en donde se eliminan las células cuyo TCR se une fuertemente con los complejos MHC-péptido propios. En esta ocasión se les presentan autoantígenos de todos los tejidos del cuerpo

unidos al complejo MHC y los timocitos que interactúan con elevada afinidad con estos antígenos, reciben una señal apoptótica. Este proceso es un componente fundamental de la tolerancia central y previene la supervivencia de linfocitos T autorreactivos capaces de inducir autoinmunidad [2, 35]. Al final, la proporción de timocitos que alcanzan la madurez (es decir, que sobrevive a la selección tanto positiva como negativa) se acepta que es del 5% o menos [36].

Potencialmente, la diversidad del TCR se ubica en el orden de  $10^{61}$  variantes diferentes. Sin embargo, el cuerpo humano alberga solo  $5 \times 10^{11}$  linfocitos T [37]. El número de receptores distintos únicos es muy difícil de estimar pues, aunque cada célula expresa un solo tipo de receptor, las células proliferan y forman clonas, por lo que células distintas pueden compartir un receptor común. Además, los rearrreglos de ADN no ocurren completamente al azar y la mayoría de los receptores generados por recombinación no pasan los procesos de selección positiva y negativa en el timo, por lo que se piensa que el número de TCRs en el repertorio humano está en el rango de  $10^8$  -  $10^{10}$  variantes diferentes [38]. Aun así, el límite inferior del rango es mucho mayor que el número de genes en el genoma humano ( $\sim 20,000$  genes).

Los linfocitos T maduros que expresan complejos TCR- $\alpha\beta$  normalmente recirculan entre la sangre, los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos) y el sistema linfático. Los ligandos para el TCR- $\alpha\beta$  no son antígenos libres, sino péptidos cortos (8-25 residuos de aminoácidos) derivados de antígenos presentados por moléculas MHC en la superficie de las CPA como son las células dendríticas, macrófagos o linfocitos B. [5, 39]. Por su parte, los linfocitos T que expresan complejos TCR- $\gamma\delta$  se encuentran predominantemente en las barreras epiteliales (por ejemplo, piel y epitelio intestinal) donde se piensa que participan en el combate de patógenos. La mayoría de las células T  $\gamma\delta$  se activan de manera independiente de MHC y sus ligandos pueden ser antígenos bacterianos o autoantígenos inducidos por estrés celular. Estos ligandos no están bien definidos y varían mucho en tamaño, composición y estructura molecular, reconociéndose hasta ahora péptidos, proteínas, lípidos, sulfolípidos, alquilaminas y fosfoantígenos [5, 40, 41].

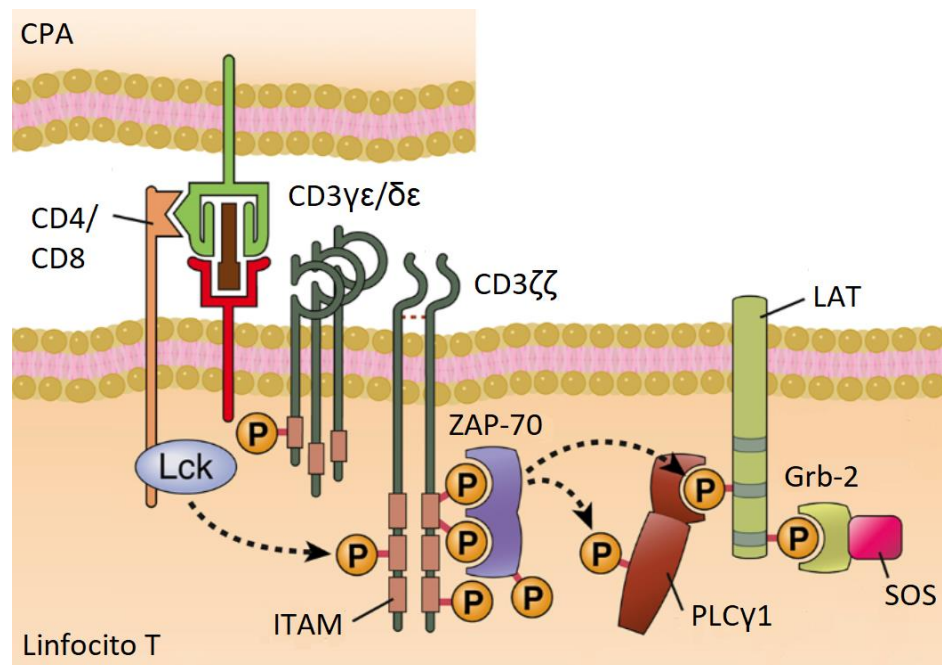
El complejo TCR-CD3 es un complejo octamérico que consta de la subunidad de reconocimiento del antígeno (TCR- $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ), acoplada a subunidades invariantes CD3 (dímeros  $\gamma\epsilon$ ,  $\delta\epsilon$  y  $\zeta\zeta$ ) unidas de manera no covalente. El complejo CD3 es esencial para el tráfico y estabilidad de las cadenas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  en la membrana, además de mediar la transducción de las señales. Las cadenas CD3 no tienen actividad enzimática intrínseca, pero todas contienen el motivo YxxL/I-X6-8-YxxL/I, denominado motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). Los dominios ITAM acoplan el complejo TCR-CD3 a tirosina cinasas intracelulares. En conjunto, el complejo TCR-CD3 tiene 10 motivos ITAM. Cada subunidad CD3 $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  contiene un único ITAM y cada subunidad  $\zeta$  contiene tres [5].

### **3.2. Las señales del TCR**

Durante el reconocimiento del antígeno por el TCR- $\alpha\beta$ , los correceptores CD4 y CD8 presentes en el linfocito T se unen respectivamente a las moléculas MHC clase I y II de las CPA, formándose un

complejo multiproteico [TCR-CD3]-péptido-CD4/CD8-MHC (Figura 7). Esto produce una agrupación local del complejo TCR-CD3 con los correceptores CD4 o CD8 en la membrana plasmática. La señalización a través del TCR se inicia cuando la fosfatasa CD45 desfosforila una tirosina inhibitoria y activa a la cinasa Lck (familia Src), asociada a los dominios intracelulares de los correceptores. Lck entonces fosforila tirosinas presentes en los dominios ITAM intracelulares de las cadenas CD3, formando sitios de unión de alta afinidad para la tirosin cinasa ZAP-70 (familia Syk), lo cual resulta en la translocación de ZAP-70 del citosol a la membrana plasmática. Una vez unida a las tirosinas fosforiladas de los ITAM, ZAP-70 es fosforilada por Lck, activándose y ejerciendo su función enzimática en varias moléculas, entre las cuales está la molécula adaptadora LAT [2, 5].

LAT es una proteína integral de membrana con nueve residuos de tirosina en su porción intracelular. Cuando se fosforilan estos residuos, LAT se convierte en sitio de anclaje y activación de moléculas citosólicas con dominios SH2. Entre las proteínas que se reclutan hacia la cara interna de la membrana plasmática están moléculas adaptadoras como Grb-2 y la enzima fosfolipasa Cy1 (PLC $\gamma$ 1).



**Figura 7.** Fosforilaciones tempranas durante la activación de linfocitos T. Cuando se reconoce el antígeno por el TCR, la cinasa Lck asociada a los correceptores (CD4/CD8) se activa y fosforila tirosinas en los dominios intracelulares de las cadenas CD3. Posteriormente, la cinasa ZAP-70 se recluta del citosol a la membrana plasmática y se une a fosfotirosinas en las cadenas CD3 $\zeta$  del complejo TCR. Lck fosforila a ZAP-70 y una vez activa, fosforila tirosinas en varias moléculas adaptadoras como LAT. LAT se convierten en sitio de anclaje y activación de moléculas citosólicas como Grb-2 y PLC $\gamma$ 1. Modificado de [2].

Cuando la molécula adaptadora Grb-2 se une a LAT, Grb-2 recluta a la proteína SOS, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina. SOS cataliza el intercambio de GDP por GTP en el sitio de unión a nucleótidos de guanina de la proteína Ras. Ras es una pequeña GTPasa, unida a la cara interna de la membrana plasmática a través de lípidos enlazados covalentemente. Cuando el GDP unido a Ras es reemplazado por GTP, Ras sufre un cambio conformacional y puede reclutar y activar varias enzimas. Particularmente Ras activa una cascada enzimática, que culmina en la fosforilación y activación de ERK (familia MAP cinasas). La cinasa ERK activada entonces se transloca al núcleo y fosforila a la proteína Elk. Finalmente, Elk estimula la transcripción de c-Fos, un componente del factor de transcripción AP-1 [2, 5].

Una ruta paralela recluta a Vav, otro factor de intercambio GTP/GDP. Vav entonces activa a Rac, otra pequeña GTPasa. Esto resulta en la activación de una cascada enzimática que culmina en la fosforilación y activación JNK, otra MAP cinasa. Finalmente, JNK fosforila y activa a c-Jun, el segundo componente del factor de transcripción AP-1. c-Fos y c-Jun fosforilado se combinan entonces para formar el factor de transcripción AP-1, lo que promueve la transcripción de varios genes. Un tercer miembro de la familia de las MAP cinasas (además de ERK y JNK), llamado p38, también es activado por Rac y a su vez, activa otros factores de transcripción [2, 5].

Por otro lado, la proteína adaptadora LAT fosforilada recluta a la enzima PLC $\gamma$ 1, específica de fosfolípidos inositolícos. Cuando esta se une a LAT, se convierte en un sustrato de ZAP-70 y otras cinasas reclutadas como Itk (familia Tec). Una vez activa, la PLC $\gamma$ 1 cataliza la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P $_2$ ) y genera diacilglicéridos poliinsaturados (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (InsP $_3$ ) (Figura 8) [2, 5]. Los DAG son segundos mensajeros, que quedan anclados a la cara interna de la membrana plasmática y forma sitios de unión de alta afinidad para proteínas que contienen dominios ricos en cisteína (CRD, por sus siglas en inglés). Los DAG generados por la PLC $\gamma$ 1 reclutan y activan a la proteína cinasa C theta (PKC- $\theta$ ), una serin/treonin cinasa. Una de las funciones mejor caracterizadas de PKC- $\theta$  en linfocitos T, es el control de la expresión génica a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B1. En linfocitos T en reposo, NF- $\kappa$ B1 existe en el citoplasma en forma inactiva, formando un complejo con el inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Las señales río abajo de PKC- $\theta$  reclutan y activan un complejo enzimático heterotrimérico denominado complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK), que fosforila a I $\kappa$ B y desencadena su rápida ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma. Como resultado, se desenmascara en NF- $\kappa$ B1 una secuencia de localización nuclear, por lo que se transloca al núcleo, en donde se une a secuencias específicas en los promotores de distintos genes y regula su transcripción [2, 5].

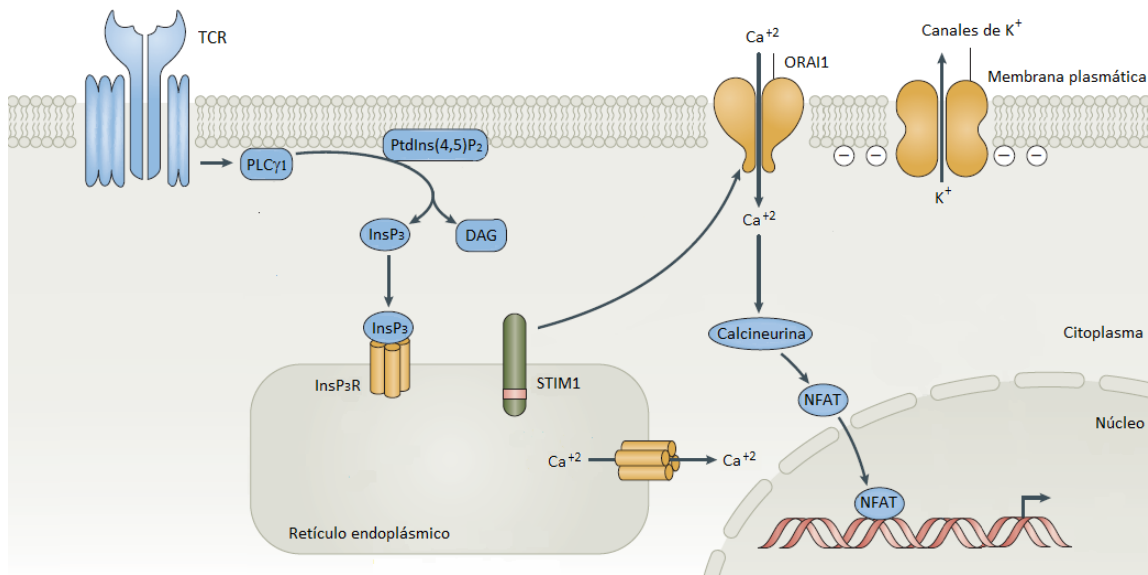
El otro producto de hidrólisis del PtdIns(4,5)P $_2$  generado por la enzima PLC $\gamma$ 1 es el InsP $_3$ . Este segundo mensajero difunde libremente en el citosol y se une a su receptor (InsP $_3$ R) en el retículo endoplásmico, estimulando la liberación de Ca $^{+2}$  de los depósitos intracelulares. El agotamiento de Ca $^{+2}$  en el retículo endoplásmico es detectado por la proteína STIM1 que se agrupa en la cara interna de la membrana plasmática, interactuando con los canales iónicos altamente selectivos de Ca $^{+2}$  ORAI1 y generando su apertura, permitiendo el influjo de Ca $^{+2}$  extracelular. De esta manera se

genera en unos pocos minutos un aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  libre citosólico desde un nivel basal de 100 nM hasta aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  [2, 42]. El  $\text{Ca}^{+2}$  libre actúa como una molécula de señalización al unirse a la proteína calmodulina. El complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina, inicia la señalización a través de las proteína cinasa cinasa dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina (CaMKKs). Además, el complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina activa a la serina/treonina fosfatasa calcineurina. La calcineurina activada, desfosforila factores de transcripción de la familia NFAT, lo que descubre sitios de localización nuclear y permite su translocación del citosol al núcleo, promoviendo la expresión de genes efectores como IL-2, IL-4, IFN $\gamma$  y TNF (Figura 8) [2, 5, 42].

En conjunto, los factores de transcripción que se inducen o activan en los linfocitos T tras el reconocimiento del antígeno, incluyendo AP-1, NF- $\kappa$ B1 y NFAT forman complejos que regulan la transcripción y la producción subsiguiente de citocinas, receptores de citocinas, moléculas efectoras como CD40L y proteínas que controlan la supervivencia y el ciclo celular [2, 5].

### 3.3. Canales de $\text{K}^+$ en la señalización de linfocitos T

Las células del sistema inmunológico expresan una variedad de canales iónicos y transportadores que permiten el flujo de iones a través de la membrana plasmática y la membrana de los organelos intracelulares. El transporte de iones a través de canales iónicos es esencial para regular el potencial de membrana, la señalización por  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y otros cationes divalentes, así como regular la expresión génica, apoptosis, proliferación, desarrollo, diferenciación y migración [43, 44]. Además de los canales ORAI1, selectivos para  $\text{Ca}^{+2}$  mencionados en el apartado anterior, los canales de  $\text{K}^+$  son fundamentales para la regulación del proceso de activación de los linfocitos T.

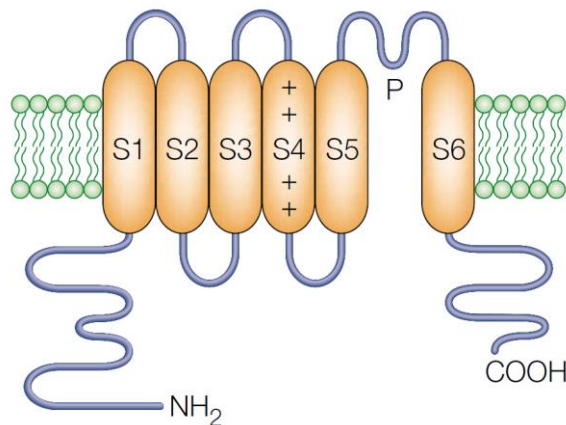


**Figura 8.** Canales iónicos en la activación de linfocitos T. Cuando los linfocitos T reconocen un antígeno a través del TCR, la enzima PLC $\gamma$ 1 se activa e hidroliza el fosfolípido de membrana

*PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y genera InsP<sub>3</sub> y DAG. El InsP<sub>3</sub> difunde en el citosol y se une su receptor InsP<sub>3</sub>R en el retículo endoplásmico, estimulando la liberación de Ca<sup>+2</sup> de los depósitos intracelulares. El agotamiento de Ca<sup>+2</sup> de las pozas internas se detecta por la proteína STIM1, que interactúa con los canales iónicos ORAI1 en la membrana plasmática, generando su apertura y permitiendo el influjo de Ca<sup>+2</sup> extracelular. El Ca<sup>+2</sup> libre se une a la proteína calmodulina y el complejo Ca<sup>+2</sup>-calmodulina activa la enzima calcineurina que desfosforila factores de transcripción de la familia NFAT, lo que permite su translocación al núcleo, estimulando la expresión de citocinas efectoras. Los canales de K<sup>+</sup> son fundamentales en este proceso, pues mediante el eflujo catiónico generan el potencial electroquímico requerido para promover la entrada de Ca<sup>+2</sup>. Modificado de [42].*

Los canales selectivos de K<sup>+</sup> conforman el grupo más grande y diverso de canales iónicos, representado por 79 *loci* conocidos en el genoma de los mamíferos [45]. Éstos se clasifican en canales regulados por voltaje (K<sub>v</sub>) [46], activados por Ca<sup>+2</sup> (K<sub>Ca</sub>) [47], rectificadores entrantes (K<sub>IR</sub>) [48] y canales de doble dominio de poro (K<sub>2P</sub>) [49]. La familia K<sub>v</sub>, la más grande de canales de K<sup>+</sup> en el genoma humano, representada por 40 genes conocidos [45]. Cada subunidad (6TM/P) contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6), dominios C- y N- terminales intracelulares, un segmento S4 con carga positiva que le confiere sensibilidad a voltaje y un dominio de poro (P) (Figura 9) [46] [50]. Cuatro subunidades son necesarias para formar un canal funcional, con el poro conductor de K<sup>+</sup> en el centro del tetrámero. Estos canales son activados por despolarización de la membrana. Las subunidades K<sub>v</sub>1.3 pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros con diferentes subunidades pertenecientes a la misma familia (K<sub>v</sub>1) [46].

Todos los genes de la familia K<sub>v</sub>1 (*Shaker-related family*), contienen regiones codificantes sin intrones. Las modificaciones postraduccionales de los canales (fosforilación, ubiquitinación y palmitoilación) y la asociación con otros péptidos como las proteínas accesorias K<sub>v</sub>β que se asocian con tetrámeros de la familia K<sub>v</sub>1 modifican sus propiedades biofísicas [46].



**Figura 9.** Estructura de los canales K<sub>v</sub>1.3. Cada subunidad (6TM/P) contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6), dominios C- y N- terminales intracelulares, un segmento S4 con carga positiva que le confiere sensibilidad a voltaje y un dominio de poro (P). Reproducido de [50].



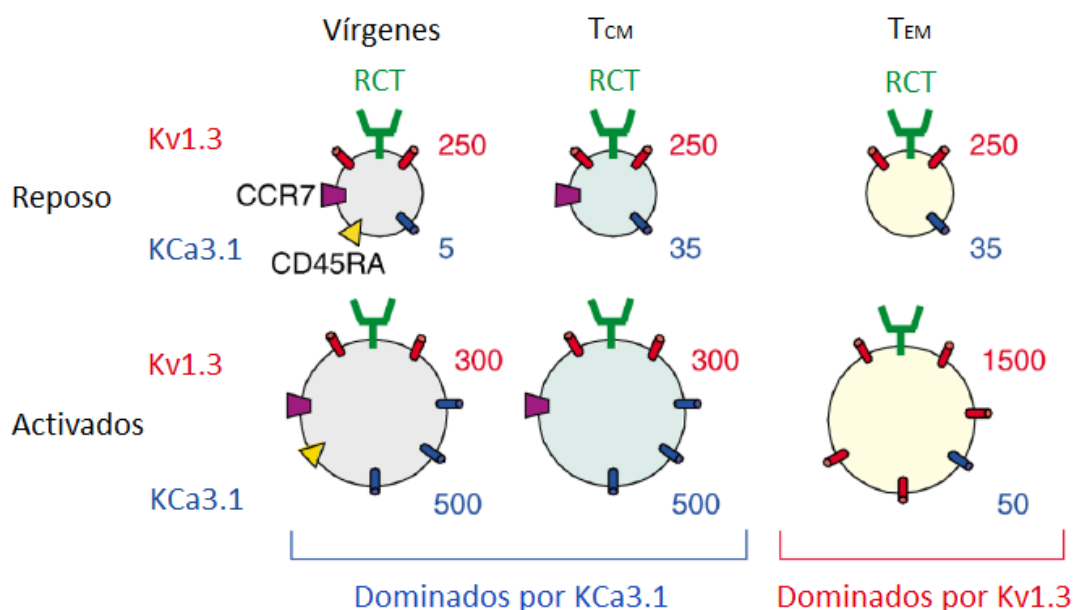
Las primeras observaciones de la importancia de los canales de  $K^+$  en linfocitos T se remontan a 1984, cuando se registró una corriente derivada de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje parecida a la encontrada en células nerviosas y musculares. Esta corriente era casi completamente inactivada con despolarizaciones largas, y se le atribuyó un papel importante en la síntesis de proteínas y la proliferación celular. Se observó además que la estimulación de linfocitos T con fitohemaglutinina a concentraciones mitogénicas, alteraba la apertura de los canales de  $K^+$  tras un minuto de adición, causando que los canales se abrieran con una cinética más rápida y a potenciales de membrana más negativos [51-53]. Posteriormente, en 1990 se identificó y clonó al gen (*KCNA3*) que codifica la proteína responsable ( $K_v1.3$ ) [54].

Los linfocitos T también expresan canales  $K_{Ca}3.1$  de "conductancia intermedia". Estos canales son insensibles al voltaje y se activan por bajas concentraciones de  $Ca^{+2}$  intercelular ( $< 1.0 \mu M$ ), el cual es detectado por la calmodulina que está unida constitutivamente a la región C-terminal del canal. La unión del  $Ca^{+2}$  da como resultado cambios conformacionales que son responsables de la apertura del canal [47].

En linfocitos T humanos, el canal de  $K^+$  regulado por voltaje  $K_v1.3$  junto con el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{+2}$   $K_{Ca}3.1$  regulan el potencial de membrana y son fundamentales para mantener un influjo prolongado de  $Ca^{+2}$ . Ambos canales, junto con el canal de  $Ca^{+2}$  ORAI1, se agrupan en la sinapsis inmunológica y regulan la función de este último durante el reconocimiento del antígeno [42, 31]. Al ser la concentración intracelular ( $\approx 145 \text{ mM}$ ) de  $K^+$  más alta que en el compartimento extracelular ( $\approx 5 \text{ mM}$ ), la apertura de los canales de  $K^+$  permite el eflujo de iones  $K^+$  al espacio extracelular, lo que genera el potencial electroquímico adecuado para promover la entrada de  $Ca^{+2}$  a través de los canales ORAI1 (Figura 8). Los patrones de  $Ca^{+2}$  pueden aumentar de manera transiente o sostenida y exhibir oscilaciones que son interpretados de manera distinta por la célula. Diferencias en la proporción de canales  $K_v1.3$  y  $K_{Ca}3.1$  contribuyen a la variación en la forma y amplitud de estas señales [55]. Los bloqueadores de canales de  $K^+$  inhiben la mitosis en linfocitos T si se añaden durante las primeras 20-30 horas después de la estimulación, pero no más tarde, lo que indica un requerimiento de canales de  $K^+$  funcionales durante este período [53]. Si estos canales se bloquean, se inhibe la entrada sostenida de  $Ca^{+2}$  y por consecuencia se impide la transcripción génica mediada por factores de transcripción de la familia NFAT [31, 56].

Recientemente se ha observado que la elevada concentración de  $K^+$  extracelular en las áreas necróticas de los tumores, genera disfunción en los linfocitos T infiltrados específicos hacia antígenos tumorales. Mayores densidades de necrosis se correlacionan inversamente con la supervivencia de los pacientes. En estas áreas, la liberación del contenido intracelular eleva las concentraciones de  $K^+$  intersticial, pudiendo superar los 40 mM. Esto altera el gradiente electroquímico transmembrana, disminuyendo la absorción de nutrientes por los linfocitos T [57]. Adicionalmente, la disrupción del gradiente provoca la acumulación de  $K^+$  intracelular, inhibiendo la vía de señalización AKT/mTOR [58], la cual controla numerosos procesos metabólicos, la traducción de proteínas y el crecimiento celular, causando una supresión profunda de la función efectora de los linfocitos T.

Las distintas poblaciones de linfocitos T humanos expresan de manera diferencial los canales  $K_v1.3$  y  $K_{Ca3.1}$ . Los linfocitos T en reposo expresan aproximadamente 200-400 canales  $K_v1.3$  y 5–35 canales  $K_{Ca3.1}$  en su membrana plasmática [44]. Tras la activación de linfocitos T vírgenes y linfocitos  $T_{CM}$ , la expresión del canal  $K_{Ca3.1}$  aumenta ( $\approx 500$  canales/célula) por un mecanismo dependiente de AP-1 [29], mientras que el número de canales  $K_v1.3$  permanece casi constante. En contraste, tras varias rondas de reestimulación por el antígeno, los linfocitos  $T_{EM}$  adquieren un fenotipo crónicamente activado, donde la expresión del canal  $K_v1.3$  aumenta de manera importante ( $\approx 1500$  canales/célula), por un mecanismo dependiente de PKC y  $Ca^{+2}$ , manteniendo una baja expresión de canales  $K_{Ca3.1}$  ( $\approx 50$ –120 canales/célula) (Figura 10) [29, 59, 60].



**Figura 10.** Expresión diferencial de los canales  $K_v1.3$  y  $K_{Ca3.1}$  en linfocitos T en reposo y linfocitos T activados. Se muestra el número de canales por célula. Tras la activación de linfocitos T vírgenes y linfocitos  $T_{CM}$ , la expresión del canal  $K_{Ca3.1}$  aumenta, mientras que el número de canales  $K_v1.3$  permanece casi constante. En contraste, tras la activación de linfocitos  $T_{EM}$  siguiendo varias rondas de reestimulación por el antígeno, estos adquieren un fenotipo crónicamente activado, donde la expresión del canal  $K_v1.3$  aumenta de manera importante, con una baja expresión de canales  $K_{Ca3.1}$ . Las proteínas de membrana CCR7 y CD45RA pueden utilizarse para distinguir las distintas poblaciones de linfocitos T. Modificado de [31].

Así, se considera que en los linfocitos T vírgenes y  $T_{CM}$  activados, el canal  $K_{Ca3.1}$  es el principal encargado de regular el potencial de membrana, mientras que en linfocitos  $T_{EM}$  activados crónicamente el canal  $K_v1.3$  juega este papel [29, 31, 59, 61], por lo que bloqueadores específicos de los canales  $K_v1.3$  causan una supresión persistente y profunda en las células  $T_{EM}$  (proliferación, producción de citocinas, migración *in vivo*) mientras que los linfocitos T vírgenes y  $T_{CM}$  son inicialmente menos sensibles a este bloqueo y después escapan a esta inhibición, aumentando la

expresión de canales  $K_{Ca3.1}$ , sin comprometerse sus funciones efectoras. La predominancia funcional de los canales  $K_v1.3$  o  $K_{Ca3.1}$  depende del historial de exposición al antígeno, y la dominancia de  $K_v1.3$  parece ser parte de un proceso de diferenciación progresiva impulsada por la estimulación repetida de las células. De esta manera, los linfocitos T autorreactivos infiltrados en las lesiones de los pacientes con autoinmunidad, son estimulados de manera repetida debido al suministro constante de autoantígeno y exhiben un fenotipo de linfocitos  $T_{EM}$  terminalmente diferenciados con una elevada expresión y dependencia funcional de canales  $K_v1.3$  [30-32]. Esto hace de los bloqueadores de canales  $K_v1.3$  potenciales inmunosupresores de uso clínico, donde la selectividad es importante para evitar efectos secundarios no deseados. A pesar de que los bloqueadores de canales  $K_v1.3$  pueden suprimir células  $T_{EM}$  específicas para agentes infecciosos crónicos o antígenos de vacunas, pueden tener una ventaja significativa sobre los inmunomoduladores generalizados [29, 31, 56, 60, 61-63]

Es importante señalar que en linfocitos T vírgenes estimulados crónicamente con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 no se lleva a cabo la conversión de dependencia de canales  $K_{Ca3.1}$  a  $K_v1.3$ , pues la función de las células generadas no se inhibe por bloqueadores específicos de canales  $K_v1.3$ , a pesar de que adquieren el fenotipo convencional de células  $T_{EM}$  ( $CD45RO^+$ ,  $CCR7^-$ ). Esto sugiere que la estimulación específica con el antígeno procesado y presentado por las CPA es un requisito clave en el proceso de diferenciación hacia un fenotipo dependiente de  $K_v1.3$  [59].

Cabe destacar que las respuestas máximas de linfocitos T requieren tanto a  $K_v1.3$  como  $K_{Ca3.1}$ , ya que la inhibición funcional mediada por bloqueadores de un solo canal es incompleta y se requiere una combinación de bloqueadores farmacológicos o RNAs de interferencia específicos para ambos canales para lograr la abrogación completa de respuestas de linfocitos T. Esto sugiere que ambos canales tienen papeles complementarios y compensatorios, y que proporcionan mecanismos redundantes para garantizar la activación de los linfocitos T. Además, esto sugiere que  $K_v1.3$  y  $K_{Ca3.1}$  son suficientes para regular la respuesta de linfocitos T, y que otros canales de  $K^+$  también presentes como los canales  $K_{2p}$  y el canal TASK1 no juegan un papel fundamental en la activación de estas células [59].

El patrón de expresión de estos canales en linfocitos T es especie-específico. La expresión relativa de los canales  $K_v1.3$  y  $K_{Ca3.1}$  en linfocitos T de rata fenocopia a las células T humanas [59]. Sin embargo, en los linfocitos T de ratón, se expresan conjuntamente miembros adicionales de la familia de canales  $K_v1$ , incluyendo  $K_v1.1$ ,  $K_v1.4$  y  $K_v1.6$ , lo que hace que  $K_v1.3$  sea redundante, y por lo tanto el modelo de ratón no resulta apropiado para reproducir fenotipos humanos [59]. Se han generado ratas y ratones nulos para el canal  $K_v1.3$ , con resultados interesantes pero contradictorios. En el caso de las ratas nulas para  $K_v1.3$ , los estudios son escasos por ser un modelo más reciente. En estos animales, la expresión de canales  $K_{Ca3.1}$  en linfocitos T aumenta y compensa la ausencia de canales  $K_v1.3$ . Estas células son funcionalmente competentes y montan respuestas inmunes normales *in vivo* al ser retadas con ovoalbúmina en una reacción de hipersensibilidad retardada [29]. Por otro lado, los ratones nulos para canales  $K_v1.3$  son resistentes a la encefalomielitis autoinmune experimental, disminuyendo la migración de linfocitos T  $CD4^+$  al

sistema nervioso central, su proliferación y producción de INF $\gamma$  e IL-17. Además, las células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas aumentan la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10, lo que las predispone a un fenotipo inmunorregulador, independiente de Foxp3. En estas células, la estimulación antígeno específica aumenta la expresión de CD25, CTLA-4 y GATA-1, la fosforilación de SMAD3 y STAT5 y la localización nuclear de FOXO1. Al parecer, estos cambios fenotípicos dependen de la señalización a través de receptor de IL-2. Además, a diferencia de los linfocitos T<sub>REG</sub> canónicos, estas células secretan grandes cantidades de IL-2 *in vitro*, lo que puede convertirlas en una población de células reguladoras autosuficiente. Esto sugiere que los canales iónicos tienen funciones críticas en la diferenciación y plasticidad de los linfocitos T y que la ausencia de canales K<sub>v</sub>1.3 dirige la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia un fenotipo inmunorregulador y refuerza el concepto de considerar a los canales K<sub>v</sub>1.3 como un buen blanco terapéutico, en donde su ausencia suprime la función de los linfocitos T<sub>EM</sub> patogénicos, mientras que de manera simultánea promueve la tolerancia inmune a largo plazo por la inducción de linfocitos supresores específicos hacia el autoantígeno [64, 65].

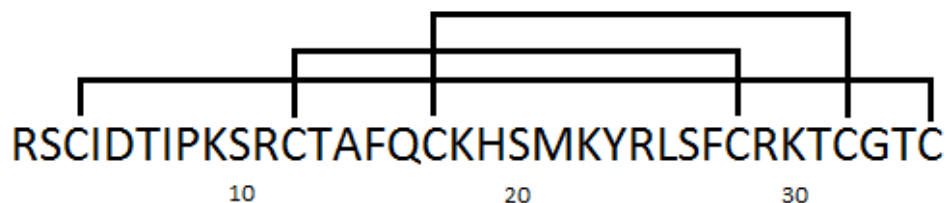
### 3.4. Bloqueadores de canales K<sub>v</sub>1.3 en venenos animales

Se han descrito varios péptidos animales que tienen una alta afinidad por los canales K<sub>v</sub>1.3. Entre las toxinas con afinidades pico- o nanomolares identificadas en este grupo se incluyen algunas toxinas de alacrán (margatoxina de *Centruroides margaritatus*, noxiustoxina de *Centruroides noxius*, kaliotoxina de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, caribdotoxina y agitoxina-2 de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, OSK1 de *Orthochirus scrobiculosus*, hongotoxina de *Centruroides limbatus*, anuroctoxina de *Anuroctonus phaiodactylus* entre otras), toxinas de anémona (ShK de *Stichodactyla helianthus*) e incluso péptidos derivados de gusanos parásitos (AcK1, BmK1). No obstante, todas estas toxinas son promiscuas y afectan también otros canales de K<sup>+</sup>, importantes para la actividad específica de ciertas células como neuronas y células musculares (K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2, K<sub>v</sub>1.6, K<sub>v</sub>1.7, K<sub>Ca</sub>3.1, etc), eventualmente causando severos efectos adversos e incluso la muerte [56, 61, 66-71]. Por esta razón, se ha hecho un esfuerzo por generar bloqueadores más selectivos del canal K<sub>v</sub>1.3.

### 3.5. Toxina ShK

Aunque la mayoría de los péptidos derivados de veneno no evolucionaron para bloquear de manera específica receptores de mamífero con interés terapéutico, ha habido grandes esfuerzos para aumentar su potencia y selectividad hacia estos blancos. Un ejemplo de esto es el caso de la toxina ShK aislada de la anémona del mar Caribe *Stichodactyla helianthus*, que en los últimos años se ha estudiado profundamente y de la cual se han generado derivados mediante síntesis química, debido a su potencial uso como inmunomoduladores. La toxina ShK nativa es un péptido de 35 aminoácidos, estabilizado por tres enlaces disulfuro (Figura 11) [31, 61]. Este péptido bloquea el canal K<sub>v</sub>1.3 a concentraciones picomolares (K<sub>d</sub> = 10 pM) e inhibe de manera preferencial la función de linfocitos T<sub>EM</sub>, por lo que sería un fármaco atractivo para el tratamiento de enfermedades

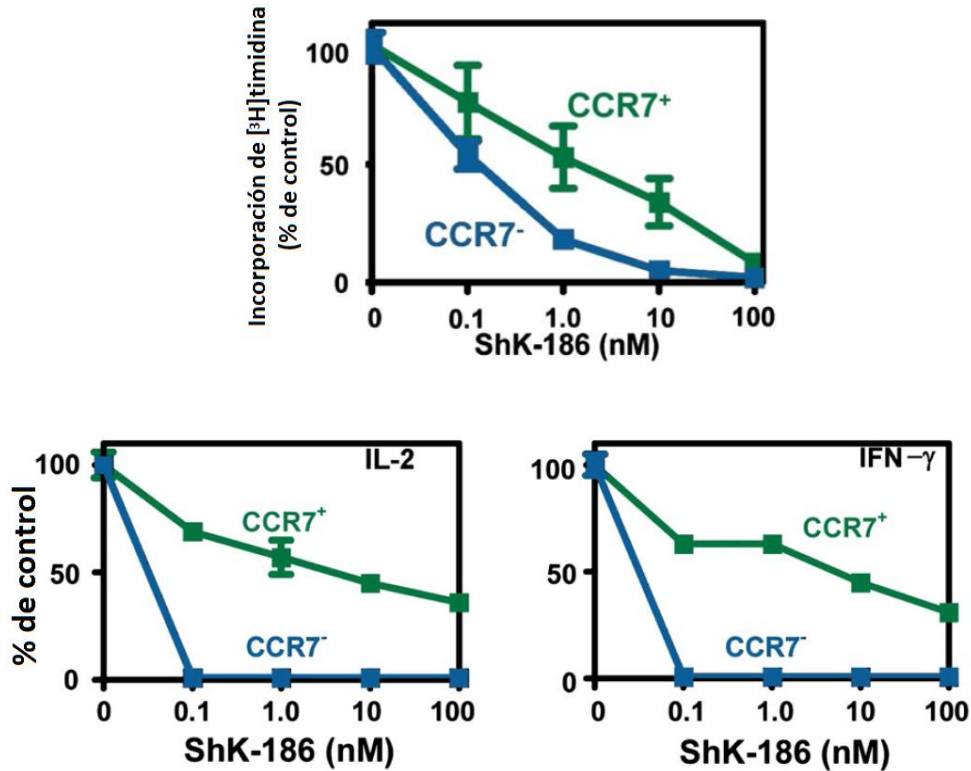
autoinmunes [29, 72]. Sin embargo, es poco selectiva pues bloquea también los canales  $K_v1.1$  ( $K_d = 28$  pM) y  $K_v1.6$  ( $K_d = 200$  pM) neuronales y el canal  $K_v1.4$  ( $K_d = 312$  pM) cardiaco a concentraciones bajas. La administración de la toxina en ratones por vía intraperitoneal induce hipersensibilidad al sonido y a la presión, salivación, lagrimeo, sudoración, pérdida de la coordinación motora, parálisis y muerte [61, 73]. Por esta razón, se ha hecho un esfuerzo por sintetizar bloqueadores más selectivos a partir del templado de ShK.



**Figura 11.** Secuencia de aminoácidos de la toxina ShK. Se indican los enlaces disulfuro entre cisteínas. Secuencia tomada de [61].

Entre la gran cantidad de derivados de la toxina ShK generados por síntesis química, resalta el compuesto ShK-186 (Dalazatide®). Éste tiene una L-fosfotirosina enlazada a través de un grupo enlazador aminoetoxietoxiacetil (AeeA) al nitrógeno amino terminal de la ShK. Además, a diferencia de ShK, su extremo carboxilo terminal se encuentra amidado, protegiéndolo de la degradación por carboxipeptidasas. Este derivado bloquea el canal  $K_v1.3$  a concentraciones picomolares ( $K_d = 69$  pM) y es por lo menos 100 veces más selectivo hacia el canal  $K_v1.3$  que hacia otros canales de  $K^+$  [61]. En ensayos *in vitro*, el derivado ShK-186 es más efectivo suprimiendo la proliferación y la producción de IL-2 e IFN $\gamma$  en linfocitos  $T_{EM}$  que en linfocitos T vírgenes y  $T_{CM}$  (Figura 12) [61].

En experimentos *in vivo*, se ha demostrado que ShK-186 disminuye la movilidad de las células  $T_{EM}$  antígeno-específicas en la red de colágeno de los tejidos retados antigénicamente y evita su unión con las CPA, su activación y motilidad en los tejidos inflamados, pero no afecta la recirculación y motilidad de células T vírgenes y  $T_{CM}$  en ganglios linfáticos [63]. En modelos de autoinmunidad, como encefalomiелitis autoinmune experimental [60, 62], diabetes autoinmune experimental [30], artritis inducida por pristano [30, 74], dermatitis por contacto [75, 76], asma [77] y resorción ósea en periodontitis experimental [78] el tratamiento con ShK-186 u otros bloqueadores de canales  $K_v1.3$  reduce la severidad de las reacciones de hipersensibilidad retardada, confirmando la participación de los canales  $K_v1.3$  en la función de los linfocitos autorreactivos presentes en las lesiones. Además, en los animales tratados con dosis repetidas de bloqueadores de canales  $K_v1.3$ , no se presentan signos evidentes de toxicidad sistémica [30, 74], ni se compromete la respuesta inmune protectora contra agentes infecciosos comunes y de importancia médica como son el virus de la influenza y la bacteria intracelular obligada *Chlamydia trachomatis* [63].



**Figura 12.** Efecto inmunomodulador del compuesto ShK-186 (Dalazatide®). ShK-186 reduce la proliferación (incorporación de  $[^3\text{H}]$ timidina) y la producción de IL-2 e IFN $\gamma$  en linfocitos  $T_{EM}$  (CCR7<sup>-</sup>) y en linfocitos T vírgenes y  $T_{CM}$  (CCR7<sup>+</sup>) activados con un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Se observa una mayor sensibilidad de los linfocitos  $T_{EM}$  hacia la toxina. Modificado de [61].

### 3.6. Toxina Vm24

Entre los animales capaces de producir potentes toxinas bloqueadoras de canales  $K_v1.3$  se encuentran los alacranes. Los alacranes se clasifican entre los artrópodos terrestres más antiguos y conservados. Aparecieron como organismos acuáticos durante el Silúrico, hace aproximadamente 450 millones de años y han experimentado pocos cambios morfológicos desde entonces [79]. En la actualidad se conocen 2437 especies (junio de 2019) [80].

Los alacranes tienen una distribución mundial, a excepción de la Antártida, algunas zonas boreales y algunas islas del Pacífico. Se encuentran en todo tipo de hábitats terrestres, desde los bosques hasta los desiertos y desde las cuevas más profundas de Oaxaca, México a 900 m bajo el nivel del suelo hasta algunos de los picos más altos en la Cordillera de los Andes a 4910 m. La mayor diversidad de escorpiones ocurre en áreas subtropicales y disminuye hacia el ecuador y los polos [81, 82]. México alberga la mayor diversidad de escorpiones en el mundo, con 281 especies descritas a octubre de 2015, presentes en todas las entidades federativas de la República Mexicana y el número continúa creciendo, lo que representa más del 12% de la diversidad

mundial [81, 83]. En México, hasta el año pasado solo se habían reportado 13 especies de alacranes tóxicas para mamíferos [84]. Sin embargo, un reporte reciente [85] incrementó esta cifra a por lo menos 21 especies diferentes.

El veneno de alacrán es una compleja mezcla de componentes que incluye sales, lípidos, aminoácidos, nucleótidos, mucopolisacáridos y proteínas que van desde péptidos hasta enzimas de alto peso molecular [86]. Los péptidos en el veneno son los responsables del fenómeno de intoxicación producido por la picadura de alacrán. Estos interactúan con canales iónicos, modulando las propiedades eléctricas de las membranas celulares [86]. De acuerdo a su especificidad hacia los diferentes tipos de canales iónicos, las toxinas de alacrán pueden clasificarse en cuatro familias:

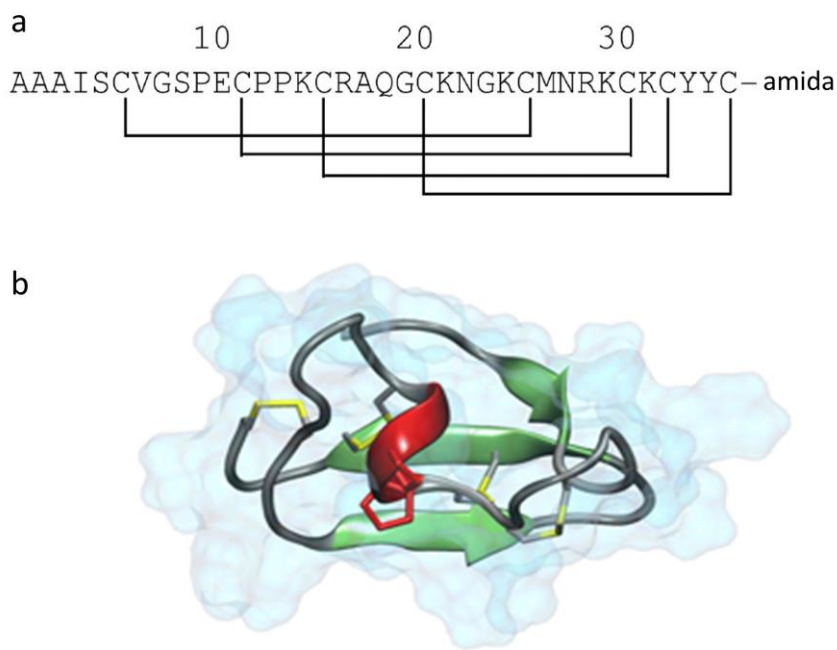
- Toxinas de canales de  $\text{Na}^+$ : Modulan la actividad de canales de  $\text{Na}^+$ , inhibiendo el proceso de inactivación de los canales (toxinas  $\alpha$ ) o desplazando su umbral de activación hacia potenciales de membrana más negativos (toxinas  $\beta$ ). Ejemplos: AaH II de *Androctonus australis* Hector, Lqh II de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* y Cn2 de *Centruroides noxius* [87-90].
- Toxinas de canales de  $\text{K}^+$ : Bloquean el poro de conducción del canal, evitando el paso de iones a través de este. Ejemplos: ChTx de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, noxiustoxina de *Centruroides noxius* y tamapina de *Mesobuthus tamalus* [70, 86, 91].
- Toxinas de canales de  $\text{Ca}^{+2}$ : Modulan la actividad de los receptores de rianodina en la membrana del retículo sarcoplásmico/endoplásmico, modificando la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de las reservas intracelulares. Ejemplos: Imperatoxina A de *Pandinus imperator* y maurocalcina de *Scorpio maurus palmatus* [86].
- Toxinas de canales de  $\text{Cl}^-$ : En la actualidad solo se conoce un miembro de esta familia, la clorotoxina de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Esta toxina inhibe de manera irreversible e indirecta la corriente de canales de  $\text{Cl}^-$  de baja conductancia CIC-3, uniéndose e induciendo la endocitosis del complejo proteico que contiene la metaloproteinasas-2 de matriz y los canales CIC-3 [92-94].

La mayor parte de estas toxinas moduladoras de canales iónicos presenta un motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas (CS- $\alpha/\beta$ ) que consta de una o dos  $\alpha$ -hélices cortas y una hoja- $\beta$  plegada de dos o tres cadenas, y están unidas por tres o cuatro enlaces disulfuro intramoleculares [66, 86].

Recientemente en el laboratorio del Dr. Lourival Possani se llevó a cabo el análisis proteómico del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi*, una especie nativa del estado de Morelos (México) que no es peligrosa para el ser humano. En este veneno, se identificaron más de 200 péptidos, entre los cuales se encontró la toxina Vm24 bloqueadora de canales de  $\text{K}^+$ . Este péptido de 36 aminoácidos y una masa molecular de 3864 Da, muestra menos de 50% de identidad y una

estructura terciaria considerablemente diferente respecto a la de otras toxinas de  $K^+$  conocidas. Es por ello que la toxina Vm24 se definió como el primer miembro ( $\alpha$ -KTx 23.1) de la nueva subfamilia  $\alpha$ -KTx 23 de toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$  [95].

Al igual que otras toxinas de alacrán, este péptido presenta su extremo carboxilo terminal amidado, lo que lo protege de carboxipeptidasas (Figura 13a) [61]. En cuanto a su estructura tridimensional, la toxina Vm24 es similar a otras toxinas moduladoras de canales iónicos de alacrán, pues presenta un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ , formado por una  $\alpha$ -hélice corta unida por cuatro enlaces disulfuro a una hoja- $\beta$  plegada de tres cadenas antiparalelas (Figura 13b) [86, 95]. Este motivo estructural, en combinación con la amidación C-terminal, confiere estabilidad a la toxina [95].



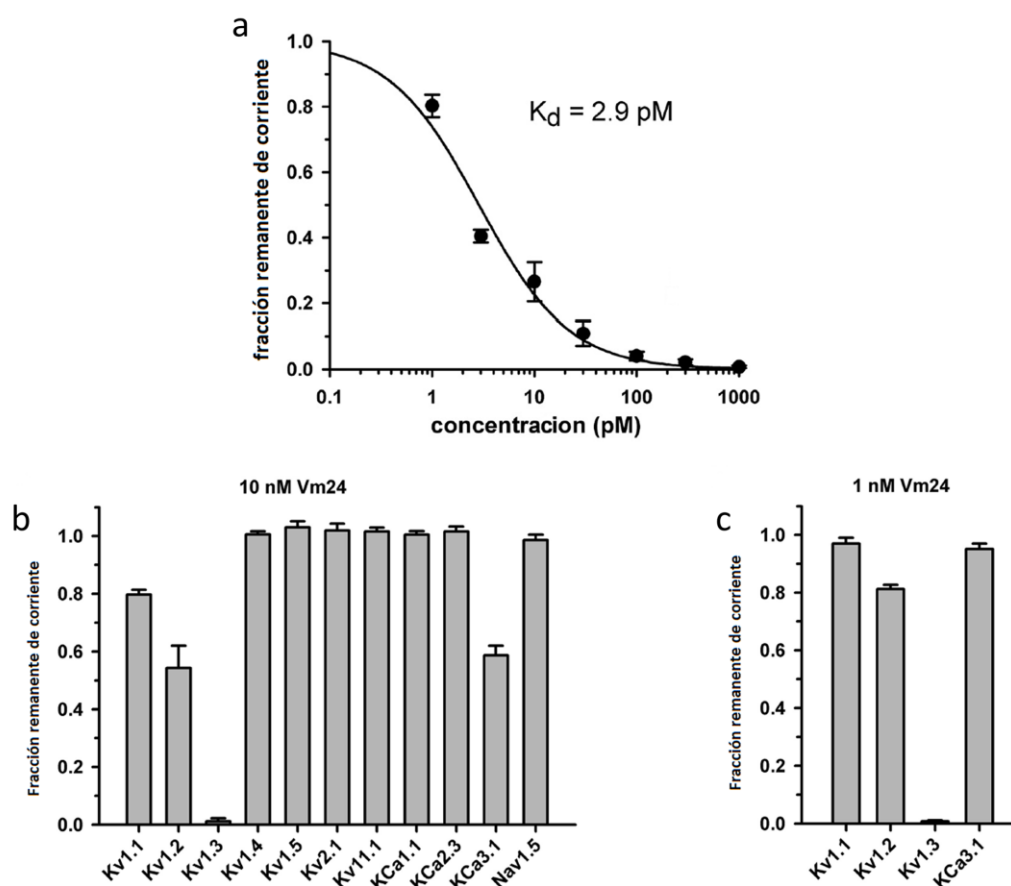
**Figura 13.** Estructura de la toxina Vm24. **a)** Secuencia de aminoácidos de la toxina Vm24. Se indican los enlaces disulfuro entre cisteínas. **b)** Estructura tridimensional de la toxina Vm24. Los enlaces disulfuro se muestran en amarillo, la  $\alpha$ -hélice en rojo, las cadenas- $\beta$  en verde, y el mapa de potencial electrostático en azul. Modificado de [95].

El sitio de unión de las toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de  $K^+$  ( $K_v1$ ,  $K_{Ca1}$ , y  $K_{Ca3}$ ) es el vestíbulo externo de los canales, que a pesar de ser filogenéticamente distantes, exhiben similitudes en esta región [96-98]. La mayoría de toxinas bloquean el canal a través de un farmacóforo conservado denominado “diada funcional”, formado por una lisina y un residuo hidrofóbico (aromático o alifático) localizado aproximadamente a 7 Å [66, 86]. La lisina interactúa con residuos ácidos en el vestíbulo y el poro del canal, colocándose como un corcho en una botella y evitando el paso de iones a través de él. Algunos péptidos bloqueadores carecen de ésta diada



funcional, pero aun así conservan una lisina bloqueadora [99, 100]. Otras interacciones secundarias anclan a estos péptidos en el vestíbulo de los canales y contribuyen a su potencia y selectividad. La estructura tridimensional de la toxina Vm24 contiene la diada funcional, con la lisina 25 y la tirosina 34 situadas a una distancia de 6 Å, por lo que se piensa que la interacción con el canal K<sub>v</sub>1.3 se da de esta manera [95].

El estudio de la toxina Vm24 sobre la actividad los canales K<sub>v</sub>1.3 expresados en linfocitos T muestra una inhibición completa de la corriente, con una afinidad de la toxina por el canal ( $K_d$ ) de 2.9 pM (Figura 14a) [68]. Esta toxina es por lo menos 1500 veces más selectiva hacia el canal K<sub>v</sub>1.3 que hacia otros canales de K<sup>+</sup> (orden de selectividad: K<sub>v</sub>1.3 >> K<sub>v</sub>1.2 > K<sub>Ca</sub>3.1 > K<sub>v</sub>1.1 >> K<sub>v</sub>1.4 ≈ K<sub>v</sub>1.5 ≈ K<sub>v</sub>2.1 ≈ K<sub>v</sub>11.1 ≈ K<sub>Ca</sub>1.1 ≈ K<sub>Ca</sub>2.3 ≈ Nav1.5) (Figura 14b) [68]. Entre los péptidos naturales bloqueadores de canales K<sub>v</sub>1.3, la toxina Vm24 es el péptido más potente y selectivo hacia este canal que se conoce en la actualidad [31, 68], por lo que es un candidato muy promisorio para su uso en la clínica.



**Figura 14.** Potencia y selectividad de la toxina Vm24 por el canal K<sub>v</sub>1.3. **a)** Curva dosis-respuesta del bloqueo de canales K<sub>v</sub>1.3 por la toxina Vm24. Las mediciones se realizaron mediante patch clamp en su modalidad de célula completa en linfocitos T. Se determinó una constante de disociación ( $K_d$ ) del complejo canal-toxina de 2.9 pM. **b)** Se muestra la fracción de corriente remanente de distintos

*canales iónicos perfundidos con una concentración de 10 nM de Vm24. c) Los canales parcialmente bloqueados a la concentración de 10 nM, se ensayaron a una concentración de 1 nM de la toxina, viéndose bloqueado totalmente solo el canal  $K_v1.3$ . Modificado de [68].*

Con la finalidad de lograr una comprensión más profunda del papel de los canales  $K_v1.3$  en la respuesta inmune, identificar los procesos biológicos afectados por el bloqueo de  $K_v1.3$  y fundamentar mejor el potencial uso farmacológico del péptido Vm24, realizamos un análisis proteómico para identificar procesos celulares afectados por el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  en linfocitos  $T_{EM}$  humanos de donadores sanos. Complementamos este análisis evaluando el efecto del péptido Vm24 sobre distintos parámetros como son la viabilidad celular, la capacidad de responder a un estímulo dependiente del TCR y la producción de citocinas en linfocitos  $T_{EM} CD4^+$  de sujetos sanos y de pacientes con AR.

## **II. HIPÓTESIS**

## II. HIPÓTESIS

El bloqueo selectivo de los canales  $K_v1.3$  con la toxina Vm24 en linfocitos  $T_{EM}$  afectará la función celular a diferentes niveles, modulando la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de activación.

# **III. OBJETIVO**

### **III. OBJETIVO**

#### **Objetivo general**

Identificar procesos biológicos afectados por el bloqueo del canal  $K_v1.3$  por la toxina Vm24 en linfocitos  $T_{EM}$ .

#### **Objetivos particulares**

1. Evaluar en linfocitos  $T_{EM}$   $CD4^+$  de donadores sanos estimulados a través del TCR, en presencia o ausencia de la toxina Vm24, la viabilidad celular, la expresión de marcadores de activación, el perfil de secreción de citocinas/quimiocinas y el perfil proteómico.
2. Validar mediante ensayos inmunológicos la expresión diferencial de proteínas representativas encontradas en el análisis proteómico.
3. Identificar e integrar procesos biológicos afectados por el bloqueo del canal  $K_v1.3$  en linfocitos  $T_{EM}$ .
4. Evaluar el efecto inmunomodulador de la toxina Vm24 en linfocitos T de pacientes con AR.

# **IV. METODOLOGÍA**

## IV. METODOLOGÍA

### *Bloqueadores de canales de K<sup>+</sup>*

La toxina Vm24 sintética fue un generoso regalo de la Dra. Georgina Gurrola-Briones y se preparó mediante síntesis química en fase sólida de acuerdo con un trabajo publicado anteriormente [95]. La toxina ShK se adquirió en Alomone Labs (Jerusalén, Israel).

### *Purificación de linfocitos T y linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> de sujetos sanos y pacientes con AR*

Para la purificación de linfocitos T, se obtuvieron 25 mL de sangre venosa periférica de 10 donadores sanos y 10 pacientes con AR diagnosticados según los criterios del *American College of Rheumatology*. El Comité de Bioética del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto (San Luis Potosí, San Luis Potosí, México), aprobó este estudio y se obtuvo un consentimiento informado firmado de todos los pacientes. Para la purificación de linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> se obtuvieron concentrados leucocitarios de donadores sanos anonimizados del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (Cuernavaca, Morelos, México). Se separaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Las células obtenidas se resuspendieron en medio RPMI-1640 (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, EE. UU.) suplementado con 10% de suero bovino fetal (By Products, Guadalajara, Jalisco, México) y se incubaron en placas de cultivo celular de poliestireno de 100 mm (hasta 8x10<sup>7</sup> células/caja) a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche. Las células no adherentes se recuperaron y los linfocitos T y linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> se purificaron por selección magnética (selección negativa) con el Pan T Cell Isolation Kit y el CD4<sup>+</sup> Effector Memory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) respectivamente. Las preparaciones se incubaron con los cocteles de anticuerpos monoclonales correspondientes (anti-CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, y CD235a conjugados con biotina para la purificación de linfocitos T y anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD45RA, CD56, CD123, CD235a, TCRγ/δ conjugados con biotina, y anti-CCR7 conjugado con APC para la purificación de linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup>) y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con microperlas magnéticas (anti-biotina para la purificación de linfocitos T y anti-biotina y anti-APC para la purificación de linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup>). Las suspensiones celulares se transfirieron a columnas LD (Miltenyi Biotec GmbH) colocadas en un imán permanente MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec GmbH) y los linfocitos T y T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> se recuperaron por elución, eliminando las células no deseadas marcadas magnéticamente. La pureza de las células obtenidas (expresión de CD3 para linfocitos T y de CD3, CD4, CD45RO y CCR7 para linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup>) se determinó mediante citometría de flujo.

### *Estudio electrofisiológico*

El bloqueo de los canales K<sub>v</sub>1.3 por la toxina Vm24 se evaluó por *patch clamp* en linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> purificados como se describe en la sección anterior. Las corrientes de células completas se



midieron mediante fijación de voltaje utilizando un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, EE. UU.) conectado a una computadora con el equipo digitalizador Digidata 1440A (Molecular Devices, LLC). Para el análisis de datos, se utilizó el paquete de software pCLAMP 10 (Molecular Devices, LLC). Las células se observaron con un microscopio invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EE. UU.). Las pipetas se fabricaron con capilares de vidrio de borosilicato G120T-4 (Warner Instruments, LLC, Hamden, CT, EE. UU.) jalados en dos etapas, lo que dio electrodos con una resistencia de 3-5 MΩ en el baño. La solución de baño consistió en NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, glucosa 5.5 mM y HEPES 10 mM (pH 7.35). La solución de llenado de la pipeta contenía KF 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM y EGTA 11 mM (pH 7.22). Para la medición de corriente de canales K<sub>v</sub>1.3, se aplicó un pulso de despolarización a +50 mV durante 14 milisegundos desde un potencial de mantenimiento de -120 mV. El protocolo se repitió cada 15 segundos. La toxina Vm24 se perfundió a las células a una concentración de 1 nM, diluida en solución de baño.

#### *Estimulación de linfocitos T y linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup>*

Los linfocitos T y linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> se dividieron en cinco grupos: a) células no estimuladas, b) células no estimuladas + Vm24 (1 nM), c) células estimuladas con anti-CD3, d) células estimuladas con anti-CD3 + Vm24 (1 nM) y e) células estimuladas con anti-CD3 + ShK (1 nM). Para la estimulación específica a través del TCR, el anticuerpo monoclonal anti-CD3e (clona OKT3, purificado en el laboratorio de la Dra. Yvonne Rosenstein) se unió a la superficie de placas de cultivo celular de poliestireno de 24 pozos a 2 µg/cm<sup>2</sup>, durante dos horas a 37 °C en amortiguador fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Los pozos se lavaron tres veces con PBS para eliminar el anticuerpo no unido y se sembró 1 mL de la suspensión celular (1 x 10<sup>6</sup> células/mL en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal) por pozo. Las células se incubaron con las toxinas Vm24 o ShK (1 nM) cinco minutos antes del inicio de la estimulación. Las placas se incubaron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante los tiempos indicados. Como los experimentos se realizaron con células de diferentes donadores, la expresión del marcador de activación CD25 de células estimuladas en presencia o ausencia de Vm24, se usó como control de calidad interno para todas las muestras.

#### *Perfil de secreción de citocinas*

Se recogieron los sobrenadantes de linfocitos T y linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> activados como se indicó anteriormente, y se evaluó la secreción de citocinas/quimiocinas con el LEGENDplex Human Th Cytokine Panel 13-plex (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.) y citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se colectaron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) con el software BD FACSDiva (versión 6.1.3, BD Biosciences) y se analizaron con el LEGENDplex Data Analysis Software (BioLegend).

### *Análisis proteómico cuantitativo*

El análisis proteómico cuantitativo se realizó con linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> de tres donadores independientes. Las células de cada donador se dividieron en cuatro condiciones (2x10<sup>6</sup> células/condición): a) células no estimuladas, b) células no estimuladas + Vm24 (1 nM), c) células estimuladas con anti-CD3, y d) células estimuladas con anti-CD3 + Vm24 (1 nM), dando un total de 12 muestras. Después de un período de incubación de 24 horas, las células se lavaron con PBS y se disgregaron en 200 µL de solución de lisis (urea 2 M, tiourea 7 M, CHAPS al 4%, DTT 50 mM) suplementado con el cóctel inhibidor de proteasas cOmplete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y el cóctel inhibidor de fosfatasas PhosSTOP (Roche Diagnostics GmbH). Las preparaciones se incubaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 17,000 x g a 4 °C durante 5 minutos para eliminar el material insoluble. La proteína total en el sobrenadante se cuantificó con el 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EE. UU.). Se tomaron 30 µg de proteína de cada muestra y se llevaron a 250 µL con 10x de *buffer* TE (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), se agregaron 100 µL de desoxicolato de sodio al 0.3% y la proteína se precipitó secuencialmente con ácido tricloroacético al 72%, seguido de acetona al 90% como se reportó anteriormente [101, 102]. Las muestras se secaron al vacío y se enviaron a las instalaciones de proteómica del *Institut de Recherches Cliniques* (Montreal, Canadá). Las proteínas se redujeron con DTT, se alquilaron con yodoacetamida y se digirieron con tripsina, y los péptidos resultantes se analizaron mediante un sistema de nano-cromatografía de líquidos de alta eficacia (nano-HPLC, por sus siglas en inglés) acoplado a espectrometría de masas en tándem (MS/MS, por sus siglas en inglés) como se reportó anteriormente [101, 102]. El software Scaffold (versión 4.4.7, Proteome Software, Inc., Portland, OR, EE. UU.) se utilizó para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basadas en espectrometría de masas. Se aceptaron las identificaciones de péptidos si excedían los umbrales específicos del motor de búsqueda de la base de datos, calculados como  $-10\log(p)$ , donde  $p$  es la probabilidad de que la coincidencia observada entre los datos experimentales y la secuencia de la base de datos sea un evento aleatorio. La identificación con el software Mascot (Matrix Science Inc., Boston, MA, EE. UU.) requería que las puntuaciones de iones sean al menos mayores que las puntuaciones de identidad asociadas y 20, 15 y 15 para péptidos con cargas dobles, triples y cuádruples, respectivamente. La identificación con el software X! Tandem (The Global Proteome Machine, [103]) requería al menos puntuaciones  $-\log$  (esperado) superiores a 2.0. Se aceptaron identificaciones de péptidos si pudieron establecerse con una probabilidad superior al 95% según lo especificado por el algoritmo PeptideProphet [104]. Se aceptaron identificaciones de proteínas si pudieron establecerse con una probabilidad superior al 99% [105]. Las proteínas que contenían péptidos similares y no pudieron diferenciarse según el análisis de MS/MS solamente, se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia. Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el índice de abundancia de proteínas modificado exponencialmente (emPAI, por sus siglas en inglés) [106].

### *Redes de interacción*

Para la identificación de las redes de interacción física/funcional de proteínas y los enriquecimientos funcionales específicos para Proceso Biológico (GO) y KEGG Pathways, se utilizó la base de datos STRING (versión 10.5, [107]). Para las redes de interacción, las proteínas se vincularon según la vecindad, la fusión de genes, la coexpresión, la coexistencia, las evidencias experimentales, las bases de datos existentes y los criterios de minería de textos con una puntuación de interacción mínima requerida de 0.7 (alta confianza).

### *Citometría de flujo*

La viabilidad celular se evaluó con el Fixable Viability Dye eFluor 780 (Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). Las células se incubaron con el colorante (500  $\mu$ L de una dilución 1:100,000 en PBS) a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad, antes del análisis por citometría de flujo. Los cambios en la dispersión frontal de la luz (FSC, por sus siglas en inglés) y la tinción positiva con el colorante de viabilidad se consideraron como marcadores de muerte celular. Para la tinción con anticuerpos fluorescentes, las células se lavaron con solución FACS (PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 0.5% y  $\text{NaN}_3$  al 0.1%). Los receptores Fc se bloquearon con 100  $\mu$ L de suero humano al 10% durante 30 minutos a 4 °C, y las células se tiñeron en un volumen final de 150  $\mu$ L con los anticuerpos fluorescentes anti-CD3d humano-PE (clona 7D6, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.), anti-CD3e humano-PerCP (clona SK7, BioLegend), anti-CD4 humano-APC/Cy7 (clona OKT4, BioLegend), anti-CD4 humano-TC (clona S3.5, Invitrogen, Camarillo, CA, EE. UU.), anti-CD4 humano FITC (clona OKT4, eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.), anti-CD45RO humano-PE (clona UCHL1, BioLegend), anti-CCR7 humano-APC (clona G043H7, BioLegend), anti-CCR7 humano-PerCP (clona G043H7, BioLegend), anti-CD25 humano-APC (clona BC96, BioLegend), anti-CD25 humano-APC/Cy7 (clona M-A251, BD Biosciences), anti-CD69 humano-PE (clona FN50, BioLegend), anti-CD69 humano APC (clona FN50, eBioscience), anti-CD40L humano-APC (clona 24-31, eBioscience), anti-CD40L humano FITC (clona 24-31, BioLegend), a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad y se lavaron con PBS. Para la detección de IRF4 y Hsp90, las células se fijaron con 100  $\mu$ L de paraformaldehído al 2% en PBS a 37 °C durante 10 minutos, se lavaron con PBS y se incubaron en hielo con 500  $\mu$ L de *buffer* de permeabilización (Triton X-100 0.5%, EDTA 0.2  $\mu$ g/mL y albúmina de suero bovino al 1% en PBS) durante 15 minutos. Después se eliminó la solución detergente y las células se permeabilizaron adicionalmente con metanol al 90% durante una hora a -20 °C. Las células se lavaron dos veces con solución FACS y se tiñeron con anti-IRF4-PE (clona IRF4.3E4, BioLegend) o anti-Hsp90 $\alpha/\beta$  (clona 3H3C27, BioLegend), seguido por un paso con anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.) y se lavaron con solución FACS. Para la detección de Foxp3, las células se fijaron y se permeabilizaron con el FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) según las instrucciones del fabricante, y se tiñeron con los anticuerpos fluorescentes anti-Foxp3 humano-PE/Cy7 (clona PCH101, eBioscience). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences) con el software BD FACSDiva (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el software FlowJo (versión 8.7, FlowJo, LLC, Ashland, OR, EE. UU.).

### *Análisis estadístico*

Se utilizaron los softwares OriginPro 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.) y GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, EE. UU.) para el análisis de los datos y la creación de los gráficos. El mapa de calor se generó utilizando el software MultiExperiment Viewer (versión 4.9.0, [108]). Los datos fueron representados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Para la comparación de dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student. Para la comparación de 3 o más grupos se utilizó ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Diferencia Significativa Mínima de Fisher (LSD, por sus siglas en inglés) o comparaciones múltiples de Tukey según se indique. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.


# **V. RESULTADOS PUBLICADOS**

SHORT REPORT

Open Access



# K<sub>v</sub>1.3 channel blockade with the Vm24 scorpion toxin attenuates the CD4<sup>+</sup> effector memory T cell response to TCR stimulation

José Ignacio Veytia-Bucheli<sup>1,2</sup>, Juana María Jiménez-Vargas<sup>1</sup>, Erika Isabel Melchy-Pérez<sup>1</sup>,  
Monserrat Alba Sandoval-Hernández<sup>1,2</sup>, Lourival Domingos Possani<sup>1\*</sup> and Yvonne Rosenstein<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** In T cells, the K<sub>v</sub>1.3 and the K<sub>Ca</sub>3.1 potassium channels regulate the membrane potential and calcium homeostasis. Notably, during T<sub>EM</sub> cell activation, the number of K<sub>v</sub>1.3 channels on the cell membrane dramatically increases. K<sub>v</sub>1.3 blockade results in inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling in T<sub>EM</sub> cells, thus eliciting an immunomodulatory effect. Among the naturally occurring peptides, the Vm24 toxin from the Mexican scorpion *Vaejovis mexicanus* is the most potent and selective K<sub>v</sub>1.3 channel blocker known, which makes it a promissory candidate for its use in the clinic. We have shown that addition of Vm24 to TCR-activated human T cells inhibits CD25 expression, cell proliferation and reduces delayed-type hypersensitivity reactions in a chronic inflammation model. Here, we used the Vm24 toxin as a tool to investigate the molecular events that follow K<sub>v</sub>1.3 blockade specifically on human CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells as they are actively involved in inflammation and are key mediators of autoimmune diseases.

**Methods:** We combined cell viability, activation, and multiplex cytokine assays with a proteomic analysis to identify the biological processes affected by K<sub>v</sub>1.3 blockade on healthy donors CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells, following TCR activation in the presence or absence of the Vm24 toxin.

**Results:** The peptide completely blocked K<sub>v</sub>1.3 channels currents without impairing T<sub>EM</sub> cell viability, and in response to TCR stimulation, it inhibited the expression of the activation markers CD25 and CD40L (but not that of CD69), as well as the secretion of the pro-inflammatory cytokines IFN-γ and TNF and the anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13. These results, in combination with data from the proteomic analysis, indicate that the biological processes most affected by the blockade of K<sub>v</sub>1.3 channels in a T cell activation context were cytokine-cytokine receptor interaction, mRNA processing via spliceosome, response to unfolded proteins and intracellular vesicle transport, targeting the cell protein synthesis machinery.

**Conclusions:** The Vm24 toxin, a highly specific inhibitor of K<sub>v</sub>1.3 channels allowed us to define downstream functions of the K<sub>v</sub>1.3 channels in human CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes. Blocking K<sub>v</sub>1.3 channels profoundly affects the mRNA synthesis machinery, the unfolded protein response and the intracellular vesicle transport, impairing the synthesis and secretion of cytokines in response to TCR engagement, underscoring the role of K<sub>v</sub>1.3 channels in regulating T<sub>EM</sub> lymphocyte function.

**Keywords:** K<sub>v</sub>1.3 potassium channel, Vm24 toxin, Effector memory T cells, Proteomics, Autoimmune disease

\* Correspondence: [possani@ibt.unam.mx](mailto:possani@ibt.unam.mx); [yvonne@ibt.unam.mx](mailto:yvonne@ibt.unam.mx)

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico  
Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Ion transport through ion channels is essential to regulate the membrane potential, the signaling by calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesium, zinc and other divalent cations, as well as downstream events such as gene expression, apoptosis, proliferation, development, and migration [1, 2]. Immune cells express a variety of ion channels and transporters that allow the flux of ions across the plasma membrane and the membrane of intracellular organelles. In T cells, the interaction of the T cell receptor (TCR) with its cognate antigen leads to an increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, regulating numerous downstream signaling pathways that control clonal expansion, differentiation and cytokine production [1]. Following intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores depletion, the electrochemical potential required for  $\text{Ca}^{2+}$  entry through  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (CRAC) in the plasma membrane is regulated by the efflux of potassium cations to the extracellular space, a process controlled by potassium channels [3]. In T lymphocytes, the voltage-gated potassium channel  $\text{K}_v1.3$  and the calcium-activated potassium channel  $\text{K}_{Ca}3.1$  regulate the membrane potential and calcium homeostasis [4] by operating at different levels of the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway. Furthermore, the  $\text{K}_v1.3$  and the  $\text{K}_{Ca}3.1$  potassium channels cluster with the CRAC calcium channel at the immunological synapse and regulate its function [3, 4]. The  $\text{K}_v1.3$  channels four identical subunits contain a voltage sensor and are activated by membrane depolarization [5]. Notably, upon activation, the number of  $\text{K}_v1.3$  channels of effector memory T ( $\text{T}_{EM}$ ) cells dramatically increases, while that of  $\text{K}_{Ca}3.1$  channels remains constant, underscoring a role of  $\text{K}_v1.3$  channels in the decision making process of  $\text{T}_{EM}$  lymphocytes [6].  $\text{T}_{EM}$  lymphocytes rapidly and copiously produce and release inflammatory and cytotoxic mediators such as  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-4, and perforin. They lack CCR7 and CD62L, two receptors involved in homing to the lymph nodes, but the expression of the receptors for inflammatory cytokines CCR1, CCR3 and, CCR5 allows them to recirculate between the blood and inflammatory foci [7–11]. Blocking  $\text{K}_v1.3$  channels in  $\text{T}_{EM}$  cells has been reported to reduce the influx of  $\text{Ca}^{2+}$ , resulting in a  $\text{T}_{EM}$ -specific immunomodulatory effect [4, 12, 13], without compromising naïve and central memory T ( $\text{T}_{CM}$ ) lymphocytes' effector functions, such as protection against pathogens, and T and B cells crosstalk for the generation of high affinity protective antibodies and isotype switching [14, 15]. Autoreactive cells found in multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and type I diabetes mellitus lesions exhibit a  $\text{T}_{EM}$  phenotype and are key mediators

in the pathogenesis of these autoimmune diseases [6, 16], stressing the need for restraining these cells.

Potent  $\text{K}_v1.3$  channel blockers have been found in animal venoms. These molecules interact with the channel through a pharmacophore called “functional dyad”, consisting of a blocking lysine and an aromatic residue located around 7 Å apart. The lysine interacts with acidic residues on the channel selectivity filter, blocking the conduction pore, and preventing the passage of ions through it [17]. Several scorpion toxins (margatoxin, noxiustoxin, kaliotoxin, charybdotoxin, agitoxin-2, OSK1, hongotoxin, anuroctoxin), anemone toxins (ShK) and even peptides from parasitic worms (AcK1, BmK1) have been shown to block the  $\text{K}_v1.3$  potassium channel with pico- or nanomolar affinities. Particularly, the anemone ShK peptide has been reported to suppress the  $\text{T}_{EM}$  cell proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion without affecting naïve or  $\text{T}_{CM}$  lymphocytes [6, 16, 18]. Unfortunately, these toxins are promiscuous and affect other related potassium channels ( $\text{K}_v1.1$ ,  $\text{K}_v1.2$ ,  $\text{K}_v1.6$ ,  $\text{K}_v1.7$ ) necessary for the activity of neurons and muscle cells, eventually causing severe adverse effects and even death [17, 19–24].

Among the naturally occurring peptides, the 36 amino acid toxin Vm24, isolated from the Mexican scorpion *Vaejovis mexicanus*, is the most potent ( $K_d = 2.9$  pM) and selective (> 1500-fold affinity over other assayed potassium channels)  $\text{K}_v1.3$  channel blocker known, what makes it a very promissory candidate for its use in the clinic [23]. This peptide, similar to other scorpion ion channel modulating toxins, has a cysteine-stabilized  $\alpha/\beta$  structural motif, formed by a short  $\alpha$ -helix joined by four disulfide bridges to a triple-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet. This structural motif, in combination with the C-terminal amidation, confers stability to the toxin [25]. We have shown that addition of Vm24 to TCR-activated human T cells inhibits calcium-mediated cell signaling and generates a dose-dependent inhibition of CD25 expression and cell proliferation. Furthermore, it reduces delayed-type hypersensitivity reactions in rats in a chronic inflammation model [23]. To achieve a deeper understanding of the role of  $\text{K}_v1.3$  ion channels in the immune response, to identify the biological processes affected by  $\text{K}_v1.3$  blockade, and to better characterize the potential pharmacological use of the Vm24 peptide, we evaluated the cytokine secretion and proteomic profiles of  $\text{CD4}^+$   $\text{T}_{EM}$  cells isolated from healthy donors following TCR activation, in the presence or absence of the Vm24 toxin.

## Methods

### Vm24 and ShK toxins

The Vm24 peptide, the generous gift of Dr. Georgina Gurrola-Briones, was prepared by chemical synthesis

according to previously published work [25]. The ShK toxin was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel).

#### CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes purification

This procedure was approved by the Bioethics Committee of the Instituto de Biotecnología. Buffy coats from anonymized healthy donors were obtained from the *Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea* (Cuernavaca, Morelos, Mexico). Mononuclear cells were separated through Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation. Cells obtained were resuspended in RPMI-1640 medium (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (By Products, Guadalajara, Jalisco, Mexico) and incubated in 100 mm tissue-culture treated polystyrene dishes ( $8 \times 10^7$  cells/dish) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> overnight. Non-adherent cells were recovered in arrest medium (RPMI-1640 medium supplemented with 2% fetal calf serum), and incubated in the same medium at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes were purified by magnetic cell sorting (negative selection) with the CD4<sup>+</sup> Effector Memory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly, non-CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells were labeled with a monoclonal antibody cocktail (biotin-conjugated anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD45RA, CD56, CD123, CD235a, TCR $\gamma/\delta$  and APC-conjugated anti-CCR7). Subsequently, the preparation was incubated with anti-biotin and anti-APC secondary antibodies conjugated with magnetic MicroBeads. The cell suspension was transferred to an LD Column (Miltenyi Biotec GmbH) placed on a MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec GmbH) permanent magnet. The CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes were recovered by elution, and purity (CD3, CD4, CD45RO and CCR7 expression) was determined by flow cytometry.

#### Electrophysiological studies

Blockade of K<sub>v</sub>1.3 potassium channels by the Vm24 toxin was evaluated on purified CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes. Whole-cell currents were measured in voltage-clamped cells using a MultiClamp 700B (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) amplifier connected to a computer with Digidata 1440A (Molecular Devices, LLC) digitizer hardware. For data analysis, the pCLAMP 10 (Molecular Devices, LLC) software package was used. Cells were observed with an Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) inverted microscope. Pipettes were pulled from G120 T-4 borosilicate glass capillaries (Warner Instruments, LLC, Hamden, CT, USA) in two stages, which resulted in electrodes with 3 to 5 M $\Omega$  resistance in the bath. The bath solution consisted of

145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose and 10 mM HEPES (pH 7.35). The pipette filling solution contained 140 mM KF, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES and 11 mM EGTA (pH 7.22). For currents measurements from K<sub>v</sub>1.3 channels, a depolarizing pulse to +50 mV was applied for 14 milliseconds from a holding potential of -120 mV. The protocol was repeated every 15 s. The Vm24 toxin was perfused to the cells at a concentration of 1 nM.

#### CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes stimulation

CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes were divided in five groups: a) unstimulated cells, b) unstimulated cells + Vm24 (1 nM), c) anti-CD3 stimulated cells, d) anti-CD3 stimulated cells + Vm24 (1 nM), and e) anti-CD3 stimulated cells + ShK (1 nM). For TCR-specific stimulation, anti-human CD3e (clone OKT3, home purified) monoclonal antibody was bound to the surface of 24-well polystyrene cell culture plates at 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , for two hours at 37 °C in phosphate-buffered saline (PBS). Wells were washed three times with PBS to remove the unbound antibody and 1 mL of the cell suspension ( $1 \times 10^6$  cells/mL) per well was plated. When indicated, cells were incubated with the Vm24 or ShK toxins (1 nM) five minutes before the onset of stimulation. Plates were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for the indicated times. As experiments were performed with cells from different donors, the expression of the activation marker CD25 (evaluated by flow cytometry) of cells stimulated in the presence or absence of Vm24, was used as internal quality control for all samples.

#### Cytokine secretion profile

The supernatants from CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes activated as indicated above were collected, and the secretion of cytokines was evaluated with the LEGENDplex Human Th Cytokine Panel 13-plex (BioLegend, San Diego, CA, USA) and flow cytometry, following the manufacturer's instructions. Data were collected on a BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer with the BD FACSDiva (version 6.1.3, BD Biosciences) software, and analyzed with the LEGENDplex Data Analysis Software (BioLegend).

#### Quantitative proteomic analysis

The quantitative proteomic analysis was performed on CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes from three independent donors. Cells from each donor were divided in four conditions ( $2 \times 10^6$  cells/condition): a) unstimulated cells, b) unstimulated cells + Vm24 (1 nM), c) anti-CD3 stimulated cells, and d) anti-CD3 stimulated cells + Vm24 (1 nM), yielding a total of 12 samples. After a 24 h incubation period, cells were washed with PBS and disrupted in 200  $\mu\text{L}$  of lysis solution (2 M urea, 7 M thiourea, 4% CHAPS,



50 mM DTT) supplemented with cOmplete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) protease inhibitor cocktail and PhosSTOP (Roche Diagnostics GmbH) phosphatase inhibitor cocktail. The preparations were incubated on ice for 20 min and centrifuged at  $17,000 \times g$  at 4 °C for 5 min to remove insoluble material. Total protein in the supernatant was quantified with the 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA), and 30 µg of protein were taken from each sample and brought to 250 µL with 10× TE buffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0), 100 µL of 0.3% sodium deoxycholate were added and protein was sequentially precipitated with 72% trichloroacetic acid, followed by 90% acetone as previously reported [26, 27]. Samples were vacuum-dried and sent to the Proteomics Facility of the *Institut de Recherches Cliniques* (Montreal, Canada). Proteins were reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and digested with trypsin, and the resulting peptides were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) as previously reported [26, 27]. The Scaffold (version 4.4.7, Proteome Software, Inc., Portland, OR, USA) software was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they exceeded the specific database search engine thresholds, calculated as  $-10\log(p)$ , where  $p$  is the probability that the observed match between the experimental data and the database sequence is a random event. Mascot (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) identification requires that ion scores be at least greater than the associated identity scores and 20, 15 and 15 for peptides with double, triple, and quadruple charges, respectively. X! Tandem (The Global Proteome Machine, [28]) identifications required at least  $-\log(\text{expected})$  scores greater than 2.0. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95% probability as specified by the PeptideProphet algorithm [29]. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99% probability [30]. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. For protein quantitation, the exponentially modified protein abundance index (emPAI) value was used [31].

### Interaction networks

For protein physical/functional interaction networks identification and functional enrichments specific for Biological Process (GO) and KEGG Pathways, the STRING database (version 10.5, [32]) was used. For interaction networks, proteins were linked based on neighborhood, gene fusion, co-expression, co-occurrence, experimental evidences, existing databases and text-mining

criteria with a minimum required interaction score of 0.7 (high confidence).

### Flow cytometry

Cell viability was assessed with the Fixable Viability Dye eFluor 780 (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Cells were incubated with the dye (500 µL of a 1:100,000 dilution in PBS) at 4 °C for 30 min in the dark, before analysis by flow cytometry. Changes in forward scatter (FSC) and positive staining with the viability dye were considered as markers of cell death. For fluorescent antibody staining, cells were washed with FACS solution (PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide). Fc receptors were blocked with 100 µL of 10% human serum at 4 °C for 30 min, and cells were stained in a 150 µL final volume with the PE anti-human CD3d (clone 7D6, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), PerCP anti-human CD3e (clone SK7, BioLegend), TC anti-human CD4 (clone S3.5, Invitrogen Camarillo, CA, USA), PE anti-human CD45RO (clone UCHL1, BioLegend), APC anti-human CCR7 (clone G043H7, BioLegend), APC anti-human CD25 (clone BC96, BioLegend), PE anti-human CD69 (clone FN50, BioLegend), and APC anti-human CD40L (clone 24–31, eBioscience, San Diego, CA, USA) fluorescent antibodies where indicated at 4 °C for 30 min and washed. For IRF4 and Hsp90 detection, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS at 37 °C for 10 min, washed and incubated on ice with 500 µL of permeabilization buffer (0.5% Triton X-100, 0.2 µg/mL EDTA and 1% bovine serum albumin in PBS) for 15 min. After removal of the detergent solution, cells were further permeabilized with 90% methanol for an additional hour at  $-20$  °C and stained with PE anti-IRF4 (clone IRF4.3E4, BioLegend) or anti-Hsp90 $\alpha/\beta$  (clone 3H3C27, BioLegend) antibodies, followed by Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Eugene, OR, USA) second step. Samples were acquired on a BD FACSCanto II (BD Biosciences) flow cytometer with the BD FACSDiva (BD Biosciences) software and analyzed using the FlowJo (version 8.7, FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) software.

### Statistical analysis

Data analysis and graphics creation were performed with the OriginPro 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) software. The heat map was generated using the open-source software MultiExperiment Viewer (version 4.9.0, [33]). For statistical significance, one-way ANOVA test ( $p < 0.05$ ) was used as a first threshold for differences across treatment groups, followed by a Fisher's Least Significant Difference (LSD) post-hoc test ( $p < 0.05$ ).

## Results

### $K_v1.3$ channel blockade by the Vm24 toxin does not compromise cell viability but decreases the activation of $T_{EM}$ cells

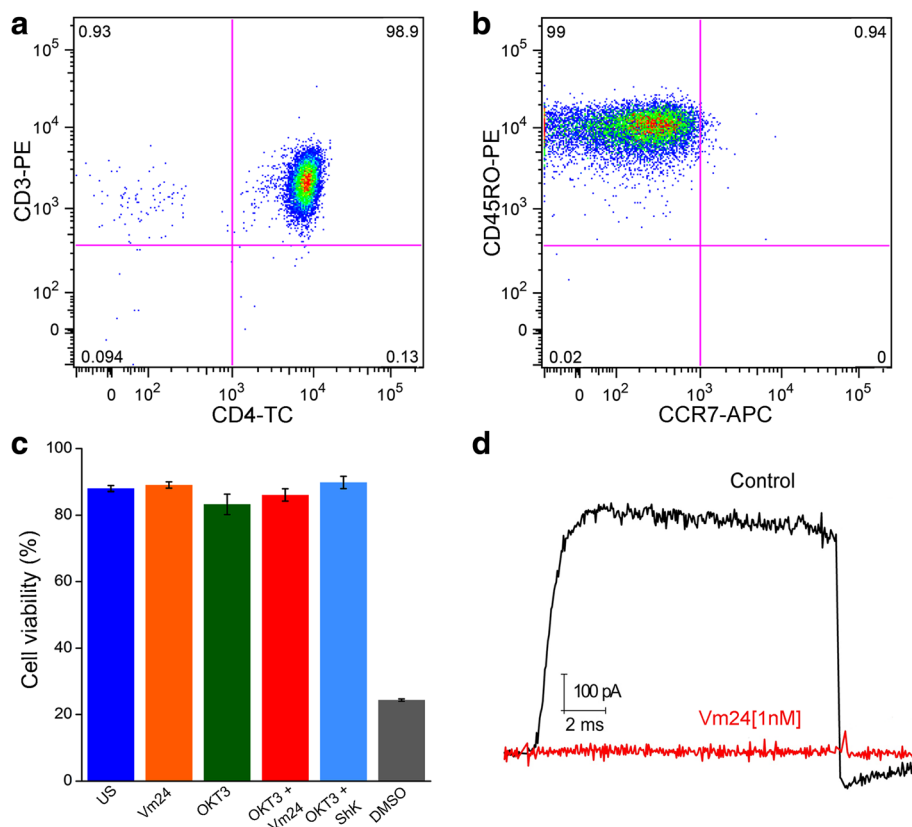
$K_v1.3$  is the dominating potassium channel in  $T_{EM}$  cells, and a potential target to treat chronic inflammation by selectively compromising  $T_{EM}$  cells without undermining the function of naïve and  $T_{CM}$  cells that rather depend on the  $K_{Ca}3.1$  channels [6]. We previously reported that by specifically blocking the  $K_v1.3$  channel, the Vm24 toxin inhibited T cell activation and proliferation [8]. As these results were obtained with total T cells, here we evaluated the capacity of the Vm24 peptide to specifically inhibit the  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells function. As a control for  $K_v1.3$  channel blockade, we used the ShK toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*, a recognized  $K_v1.3$  channels inhibitor [21].

$CD4^+$   $T_{EM}$  cells isolated from peripheral blood of healthy donors were positive (>95%) for the CD3, CD4 and CD45RO surface markers and negative for the CCR7 chemokine receptor (Fig. 1a, b). These markers

were verified before and after activation, and under all conditions, the terminally differentiated  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells maintained their phenotype ( $CD45RO^+$  and  $CCR7^-$ ), as previously reported [34, 35]. Since the main goal of this study was to perform a functional analysis of TCR-activated  $T_{EM}$  cells in the presence of the Vm24 peptide, we first evaluated whether blocking  $K_v1.3$  compromised cell viability.

Following a 24, 48 and 96 h culture period in the presence of the Vm24 peptide or the ShK toxin,  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells viability was not impaired either in quiescent or OKT3-activated cells. As death positive control, 30% dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells for 30 min (Fig. 1c and Additional file 1a, b).

The ability of the synthetic Vm24 toxin to block  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells  $K_v1.3$  channels was measured by patch clamp in whole cell mode. Consistent with our previous report [23], the Vm24 toxin (1 nM) completely inhibited the current of  $K_v1.3$  channels in  $CD4^+$   $T_{EM}$  lymphocytes. Moreover, the  $K_v1.3$  channel current was not recovered after a 10 min wash-out period, indicative of the slow



**Fig. 1**  $K_v1.3$  channel blockade does not compromise cell viability. Purified  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells were stained for the (a) CD3, CD4 and (b) CD45RO and CCR7 surface markers. (c) Cell viability was assessed following a 24 h culture period with the Fixable Viability Dye eFluor 780. Changes in FSC and positive staining with the viability dye were considered as cell death markers. For death positive control, 30% dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells for 30 min. Data from three independent experiments are shown as mean  $\pm$  SEM (standard error of mean). (d)  $K_v1.3$  channels currents were measured by patch clamp in whole cell mode. Currents were evoked by a depolarizing pulse to +50 mV from a -120 mV holding potential. The Vm24 toxin was perfused to the cells at a concentration of 1 nM

dissociation rate of the channel-toxin complex (Fig. 1d). Although concentrations below 100 pM of the Vm24 toxin completely block  $K_v1.3$  currents [23], a 1 nM concentration was used to ensure complete blockade of the channels throughout the entire culture time. Considering that the estimated  $K_d$  for  $K_{Ca3.1}$  channels (also present in T cells) is at least 4500-fold higher than that for the  $K_v1.3$  channels [23], it is expected that the remaining current on  $K_{Ca3.1}$  channels is still 95% in the presence of 1 nM Vm24, strongly indicating that the effects observed on the  $T_{EM}$  cells result exclusively of  $K_v1.3$  channel blockade.

Finally, we evaluated the effect of blocking  $K_v1.3$  channels on the expression of the early activation markers CD25 (*IL2RA*), CD40L (*CD40LG*) and CD69 (*CD69*) in response to TCR ligation for 24 h. The Vm24 toxin significantly prevented the TCR-mediated CD25 upregulation, similar to the ShK toxin (Fig. 2a, b). Vm24 also prevented the upregulation of CD40L in all subjects (Fig. 2c, d), although this was not statistically significant ( $p = 0.06$ ). Contrary to what we expected, CD69 upregulation was not affected by Vm24 (Fig. 2e, f), suggesting that the  $K_v1.3$  channels do not participate in the cytoplasm to the plasma membrane translocation of this molecule. Altogether these data indicate that the Vm24 toxin did not compromise cell viability, though it effectively blocked the  $K_v1.3$  channels on  $T_{EM}$  cells, resulting in diminished activation.

#### **$K_v1.3$ channel blockade by the Vm24 toxin decreases the production of pro- and anti-inflammatory cytokines**

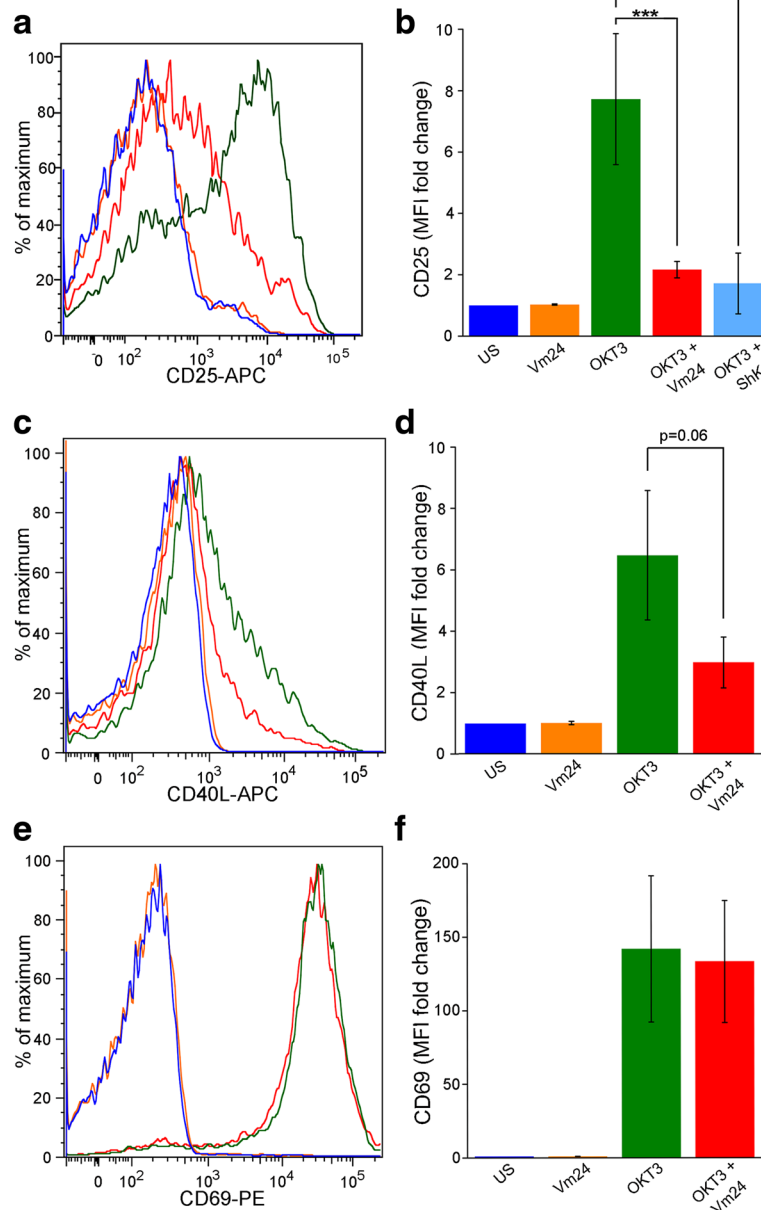
To characterize the impact of blocking the  $K_v1.3$  channel on TCR activated  $CD4^+ T_{EM}$  lymphocytes function, we analyzed their cytokine secretion profile in the presence of the Vm24 and ShK peptides. Cells were left unstimulated or were activated for 24 h with plate-bound OKT3 in the presence or absence of the toxins, and the presence of cytokines in the supernatant was evaluated with a multiplex assay. Cytokines that showed at least 1.5-fold change and statistically significant differences ( $p < 0.05$ ), were identified. Consistent with previous reports [7, 8, 36], stimulating purified  $CD4^+ T_{EM}$  cells through the TCR induced the secretion of high quantities of the pro-inflammatory cytokine IFN- $\gamma$  (*IFNG*) as well as that of the anti-inflammatory cytokines IL-4 (*IL4*), IL-5 (*IL5*), IL-9 (*IL9*), IL-10 (*IL10*) and IL-13 (*IL13*), but reduced levels of IL-2 (*IL2*). The level of the pro-inflammatory cytokine TNF (*TNF*) was also markedly increased in all samples, yet not in a statistically significant manner, probably reflecting variability between individuals (Fig. 3a). Although  $CD4^+ T_{EM}$  cells are the principal IL-17-producing population [37], under our experimental conditions (24 h post-OKT3 stimulation), we detected very low levels of IL-17A (*IL17A*) and IL-17F (*IL17F*), likely resulting of the

fact that this is a family of late expression cytokines, with secretion peaking around day 6 after activation (Fig. 3a). Pairwise comparison between the OKT3 and the OKT3 + Vm24-treated group showed that activating the cells in the presence of the Vm24 toxin resulted in significantly lower levels in the secretion of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 and IL-13. Vm24 also reduced the TNF increase by at least 50% in all subjects, although this was not statistically significant, probably due also to inter-individual variation (Fig. 3b). Similar to Vm24, the ShK toxin lowered cytokine production resulting of TCR-mediated activation of  $CD4^+ T_{EM}$  cells.

#### **$K_v1.3$ channel blockade targets the protein synthesis machinery**

To gain a more in-depth view of the role that  $K_v1.3$  channels play in  $T_{EM}$  cell activation, we performed a gel-free and label-free mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis. As for previous experiments,  $CD4^+ T_{EM}$  cells from three independent donors were left unstimulated or were activated for 24 h with plate-bound OKT3, both in the presence or absence of the Vm24 toxin. The proteomic analysis yielded 1013 different proteins across the dataset (Additional file 2). Comparison between the four experimental groups using one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) as a first threshold, uncovered 90 proteins differentially expressed across the dataset. The comparison of the unstimulated and the OKT3-stimulated group detected those proteins with at least 1.5-fold change in either direction that were significantly ( $p < 0.05$ ) different, and are indicated in the upper right and left segments of the volcano plot (Fig. 4a). Out of the 53 proteins modified upon TCR engagement, 38 were upregulated and 15 were downregulated (Table 1), a list consistent (81.1% agreement) with previously published proteomic data from TCR activated T cells [38, 39]. Within the OKT3-regulated proteins, a pairwise comparison between the OKT3 and the OKT3 + Vm24-treated group identified 27 proteins (red spots in the volcano plot,  $p < 0.05$ ) affected by  $K_v1.3$  channel blockade in a T cell activation context. Overall, these 27 proteins preserved the same trend of change than when cells were stimulated with OKT3 only. However, the amplitude of the change was reduced, evidencing an inhibition of the TCR-mediated signals as a result of  $K_v1.3$  blockade (Fig. 4a and Table 1).

To gain a wider view of the cellular functions affected by blocking the  $K_v1.3$  channels in a T cell activation context, the 27 proteins were combined with the activation markers and the cytokine data set, to generate a protein-protein interaction network and to perform a functional enrichment analysis with the STRING database. The biological processes most affected by blocking the  $K_v1.3$  channel with the Vm24



**Fig. 2**  $K_v1.3$  channel blockade decreases the expression of CD25 and CD40L, but not that of CD69.  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells were stimulated through the TCR with plate-bound OKT3 in the presence or absence of Vm24 or ShK (1 nM) toxins. After 24 h of culture, cells were stained for (a) CD25, (c) CD40L and (e) CD69. The histogram of a representative donor for each marker is shown. (b, d, f) Data from 3 to 6 independent experiments are shown as mean  $\pm$  SEM. The color coding for histograms and bars is maintained. Significance of pairwise comparisons between groups is indicated with stars (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

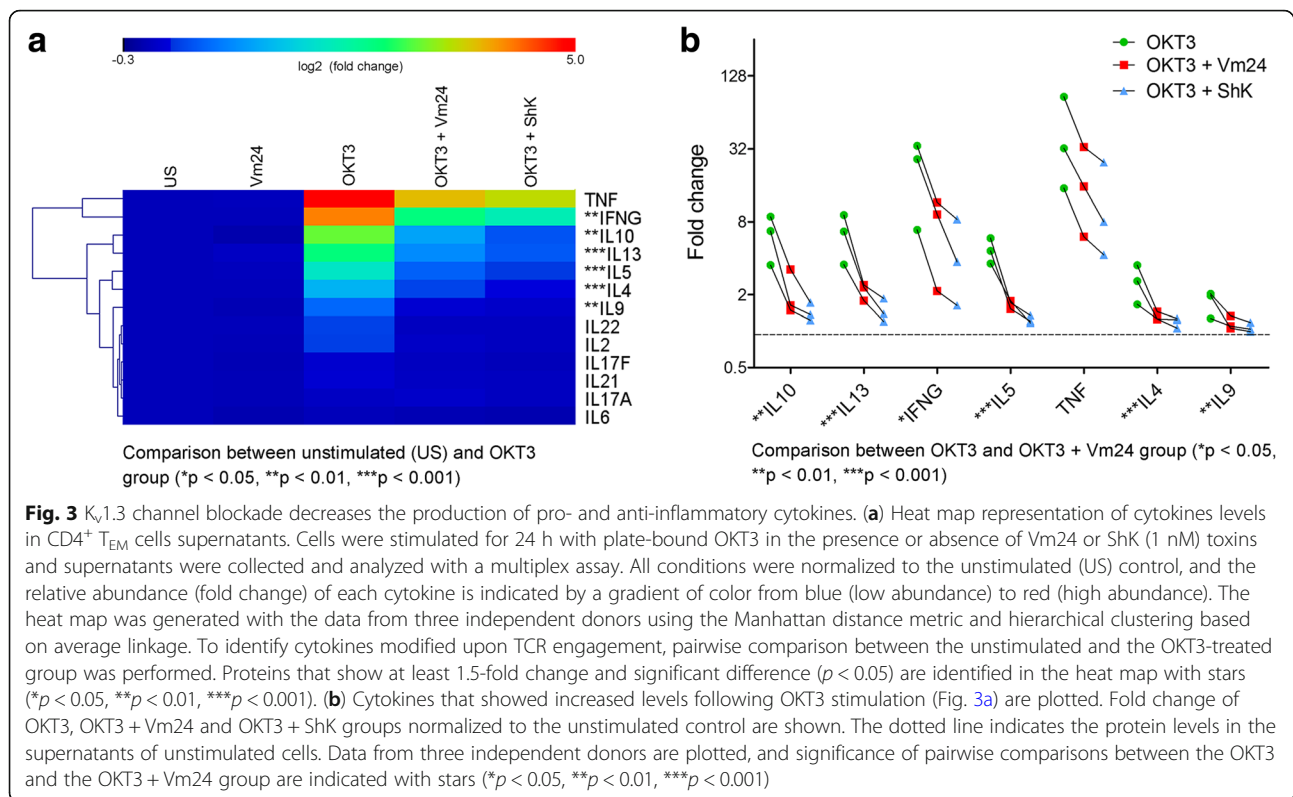
toxin in a T cell activation context were cytokine-cytokine receptor interaction, mRNA processing, response to unfolded proteins and intracellular vesicle transport (Fig. 4b).

All proteins in the connected clusters were upregulated upon TCR engagement, and the addition of Vm24 partially prevented their upregulation. This data highlights the role of  $K_v1.3$  channels in reinforcing the TCR-mediated signals, and unravels regulatory functions for these channels in the

protein synthesis machinery of  $T_{EM}$  cells, further compromising their effector functions at different levels.

Only the TCR-mediated downregulation of four proteins (*RPS3A*, *PDCD4*, *UBE2N* and *MYO1F*) was prevented by the addition of Vm24 (Fig. 4a upper left segment of the volcano plot and Table 1). These proteins are not part of any of the indicated functional clusters.

The comparison of the unstimulated and the Vm24-only treated group, using the same analytical



criteria (at least 1.5-fold change in either direction and  $p < 0.05$ ), showed that incubating the unstimulated cells with the Vm24 toxin resulted in the upregulation of three proteins and the downregulation of 11 proteins (Additional file 3). Although these proteins are not involved together in a clear canonical biological process according to the enrichment analysis, they participate in transcriptional activation, DNA repair, RNA stability, ribosomal function, and cytokinesis, suggesting that, in resting T<sub>EM</sub> lymphocytes, K<sub>v</sub>1.3-mediated signaling also controls essential biological processes.

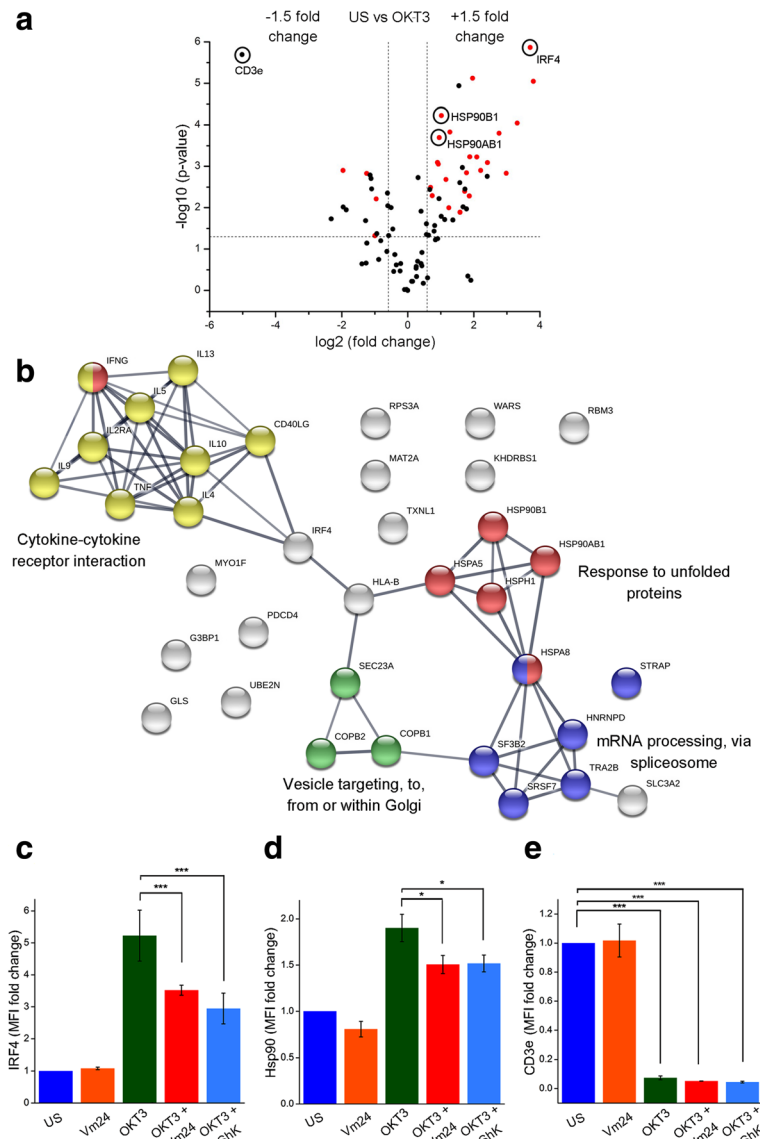
To validate the proteomic data set, we analyzed the expression level of interferon regulatory factor 4 (*IRF4*) and heat shock protein 90 (Hsp90), as their expression augmented in a TCR-dependent activation context, and when T cells were activated with OKT3 in the presence of the Vm24 toxin this increase was reduced. IRF4, a transcription factor linking the “cytokine-cytokine receptor interaction” cluster with the “intracellular vesicle transport” and “response to unfolded proteins” clusters, is expressed in all CD4<sup>+</sup> T cell subsets following TCR engagement and it is crucial for cytokine production by effector cells [40]. Hsp90, a fundamental member of the “response to unfolded protein” cluster, participates in the correct folding of the numerous nascent proteins produced during the T lymphocyte effector response and in the regulation of NF- $\kappa$ B signaling and inflammatory responses [41]. Both, IRF4 (Fig. 4c and Additional file 4a)

and Hsp90 (Fig. 4d and Additional file 4b) followed the same expression pattern by mass spectrometry and flow cytometry: a marked upregulation following TCR ligation and a partial reduction of this increase in the presence of either Vm24 or ShK toxins, indicating that K<sub>v</sub>1.3 channel function is important for their upregulation. We also evaluated CD3e (*CD3E*) since TCR stimulation either by antigen, anti-CD3 antibodies, or pharmacological activators of protein kinase C, results in increased TCR-CD3 internalization and therefore, a down-modulation of its surface levels [42, 43]. Under our experimental conditions, the OKT3-dependent T<sub>EM</sub> cell activation resulted in an almost complete disappearance of CD3e from the T<sub>EM</sub> cells surface, regardless of the presence of Vm24 or ShK, suggesting that the molecular events regulating CD3e down-modulation are not dependent on the activity of the K<sub>v</sub>1.3 channels (Fig. 4e and Additional file 4c).

Altogether, our results identified a number of proteins targeted by the K<sub>v</sub>1.3 channel-dependent signaling in TCR-activated CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> lymphocytes, uncovering regulatory roles for K<sub>v</sub>1.3 channels in mRNA processing, response to unfolded proteins, intracellular vesicle transport and cytokine-cytokine receptor interaction.

## Discussion

The potassium channels K<sub>v</sub>1.3 and K<sub>Ca</sub>3.1 promote the sustained Ca<sup>2+</sup> influx necessary for complete T cell activation. Particularly, K<sub>v</sub>1.3 channels are highly expressed



**Fig. 4**  $K_v1.3$  channel blockade modifies the proteome, targeting the protein synthesis machinery. **(a)** Mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis on  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells. Cells from three independent donors were stimulated for 24 h with plate-bound OKT3 in the presence or absence of Vm24 (1 nM) and total proteins were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to MS/MS. All conditions were normalized to the unstimulated (US) control. Pairwise comparison between the unstimulated and the OKT3-treated group was performed to identify proteins modified upon TCR engagement. Proteins that show at least 1.5-fold change in either direction, and significant difference ( $p < 0.05$ ) are identified in the upper right and left segments of the volcano plot. Within the OKT3-regulated proteins, a pairwise comparison ( $p < 0.05$ ) between the OKT3 and the OKT3 + Vm24-treated group was performed to identify proteins (red spots) affected by  $K_v1.3$  channel blockade, in a T cell activation context. Note that these 27 proteins preserved the same trend of change than when cells were stimulated with OKT3 only, yet the amplitude of the change was reduced. **(b)** Protein-protein interaction network from significantly ( $p < 0.05$ ) modified proteins affected by  $K_v1.3$  channel blockade in a T cell activation context. The combination of the proteomic data set with the activation markers and the cytokine profile was used to generate a protein physical/functional interaction network and to perform a functional enrichment analysis specific for Biological Process (GO) and KEGG Pathways, using the STRING database. Line thickness on the interaction network indicates the strength of data support. Proteins were clustered and enriched functions are indicated. The expression of **(c)** IRF4, **(d)** Hsp90 and **(e)** CD3e was assessed by flow cytometry to validate proteins identified through the proteomic analysis. Data from three independent individuals are shown as mean  $\pm$  SEM. Significance of pairwise comparisons between groups is indicated with stars (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

in  $T_{EM}$  cells and regulate their activity [6]. Inhibition of  $K_v1.3$  channels by pharmacological blockers has been shown to inhibit the  $Ca^{2+}$ -dependent response to antigen

stimulation and to ameliorate autoimmune diseases such as multiple sclerosis and psoriasis in animal models [13, 44]. In the present study, we used the Vm24

**Table 1** Proteins identified in the quantitative proteomic analysis differentially expressed across the dataset

UniProt KB	Gene	Protein	Fisher's LSD (p) US vs. OKT3	Fisher's LSD (p) OKT3 vs. OKT3 + Vm24	Fold change OKT3/US	Fold change OKT3 + Vm24/US	Concordance with other proteomic studies <sup>a</sup>
Q15306	<b>IRF4</b>	Interferon regulatory factor 4	1.4E-06	1.53E-04	13.04	6.71	1, 2
Q13283	<b>G3BP1</b>	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	7.5E-06	1.72E-05	3.90	1.31	1, 2
Q9Y3F4	<b>STRAP</b>	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	8.98E-06	8.98E-06	13.95	1.00	1, 2
P14625	<b>HSP90B1</b>	Endoplasmic	5.94E-05	2.39E-04	2.03	1.19	1, 2
P08238	<b>HSP90AB1</b>	Heat shock protein HSP 90-beta	2.02E-04	1.26E-03	1.94	1.23	1, 2
P98179	<b>RBM3</b>	RNA-binding protein 3	1.49E-04	3.11E-04	2.43	1.15	1, 2
P35606	<b>COPB2</b>	Coatomer subunit beta'	8.85E-04	1.20E-03	1.90	1.04	1, 2
Q92598	<b>HSPH1</b>	Heat shock protein 105 kDa	5.92E-04	2.44E-02	4.26	2.61	1, 2
P53618	<b>COPB1</b>	Coatomer subunit beta	5.90E-04	1.05E-02	3.67	2.05	1, 2
P11142	<b>HSPA8</b>	Heat shock cognate 71 kDa protein	8.09E-04	4.05E-03	1.87	1.20	1, 2
P31153	<b>MAT2A</b>	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	1.47E-03	5.27E-03	7.91	2.37	1, 2
Q2YHR9	<b>HLA-B</b>	HLA class I histocompatibility antigen	2.08E-03	4.51E-03	2.23	1.16	1
P62995	<b>TRA2B</b>	Transformer-2 protein homolog beta	1.43E-03	7.12E-03	3.43	1.60	2
P11021	<b>HSPA5</b>	78 kDa glucose-regulated protein	3.24E-03	1.32E-02	1.62	1.14	1, 2
O43396	<b>TXNL1</b>	Thioredoxin-like protein 1	1.26E-03	3.45E-02	4.61	2.72	1, 2
Q14103	<b>HNRNPD</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	5.12E-03	1.60E-02	1.67	1.14	2
Q13435	<b>SF3B2</b>	Splicing factor 3B subunit 2	4.02E-03	3.16E-02	3.30	1.80	1, 2
Q15436	<b>SEC23A</b>	Protein transport protein Sec23A	5.22E-03	2.28E-02	3.64	1.69	2
Q07666	<b>KHDRBS1</b>	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	1E-02	8.73E-03	2.36	0.96	2
Q16629	<b>SRSF7</b>	Serine/arginine-rich splicing factor 7	1.28E-02	1.56E-02	2.99	1.08	2
P08195	<b>SLC3A2</b>	4F2 cell-surface antigen heavy chain	9.01E-05	1.88E-02	9.94	6.31	1, 2
O94925	<b>GLS</b>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	1.59E-04	4.37E-02	6.80	4.72	2
P23381	<b>WARS</b>	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	8.15E-04	4.82E-02	5.32	3.39	1, 2
O60763	<b>USO1</b>	General vesicular transport factor p115	1.07E-03	1.31E-01	3.15	2.42	2
P42224	<b>STAT1</b>	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	2.48E-03	1.26E-01	2.98	2.20	2
P10515	<b>DLAT</b>	Dihydrolipoylysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	1.75E-03	9.08E-02	5.30	3.50	2
P23246	<b>SFPQ</b>	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	3.63E-03	3.23E-01	1.59	1.44	2
O00571	<b>DDX3X</b>	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	1.07E-02	2.31E-01	3.43	2.48	1, 2
P24534	<b>EEF1B2</b>	Elongation factor 1-beta	4.62E-02	1.9E-01	1.54	1.88	1, 2
P17980	<b>PSMC3</b>	26S proteasome regulatory subunit 6A	3.69E-02	9.95E-01	1.74	1.73	1, 2
P27708	<b>CAD</b>	CAD protein	6.06E-03	1.14E-01	1.93	1.48	1, 2
P17987	<b>TCP1</b>	T-complex protein 1 subunit alpha	1.98E-02	3.51E-01	2.58	2.04	1, 2
Q99613	<b>EIF3C</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	3.55E-03	5.77E-02	3.33	2.06	1, 2
Q9UN86	<b>G3BP2</b>	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	9.56E-03	1.17E-01	3.20	2.06	1, 2
P67809	<b>YBX1</b>	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	1.61E-02	7.19E-02	2.02	1.32	1, 2
P26641	<b>EEF1G</b>	Elongation factor 1-gamma	2.7E-02	8E-02	1.76	1.20	1, 2
P34932	<b>HSPA4</b>	Heat shock 70 kDa protein 4	1.93E-02	9.42E-02	2.17	1.41	1, 2
P11940	<b>PABPC1</b>	Polyadenylate-binding protein 1	1.15E-05	7.50E-02	2.92	2.51	1, 2
P61088	<b>UBE2N</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	4.75E-02	1.82E-03	0.50	1.48	-
P61247	<b>RPS3A</b>	40S ribosomal protein S3a	1.48E-03	1.65E-02	0.42	0.79	-

**Table 1** Proteins identified in the quantitative proteomic analysis differentially expressed across the dataset (Continued)

UniProt KB	Gene	Protein	Fisher's LSD (p) US vs. OKT3	Fisher's LSD (p) OKT3 vs. OKT3 + Vm24	Fold change OKT3/US	Fold change OKT3 + Vm24/US	Concordance with other proteomic studies <sup>a</sup>
Q53EL6	<b>PDCD4</b>	Programmed cell death protein 4	1.26E-03	2.79E-02	0.26	0.67	1, 2
O00160	<b>MYO1F</b>	Unconventional myosin-1f	6.13E-03	3.84E-02	0.52	0.84	–
Q5JSL3	<i>DOCK11</i>	Dedicator of cytokinesis protein 11	1.63E-03	8.98E-01	0.45	0.44	1
Q92522	<i>H1FX</i>	Histone H1x	1.97E-03	6.06E-02	0.46	0.72	–
P07737	<i>PFN1</i>	Profilin-1	3.51E-03	5.64E-01	0.47	0.55	1
O43390	<i>HNRNPR</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	4.43E-03	1.9E-01	0.65	0.78	–
Q13561	<i>DCTN2</i>	Dynactin subunit 2	1.12E-02	2.14E-01	0.27	0.57	–
P16104	<i>H2AFX</i>	Histone H2AX	4.24E-02	9.79E-02	0.52	0.89	–
O94906	<i>PRPF6</i>	Pre-mRNA-processing factor 6	2.05E-02	8.37E-02	0.41	0.82	–
P62906	<i>RPL10A</i>	60S ribosomal protein L10a	9.61E-03	7.94E-02	0.26	0.70	–
P07766	<i>CD3E</i>	T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain	2.02E-06	1	0.03	0.03	1
Q9UGI8	<i>TES</i>	Testin	9.03E-03	4.25E-01	0.66	0.74	–
Q6JBY9	<i>RCSD1</i>	CapZ-interacting protein	1.86E-02	2.26E-01	0.20	0.56	1

Proteins with at least 1.5-fold change in either direction that were significantly ( $p < 0.05$ ) different comparing the unstimulated and the OKT3-stimulated group. Concordance with other T cell activation proteomic studies is indicated. Within the OKT3-regulated proteins, comparison between the OKT3 and the OKT3 + Vm24-treated group is indicated and proteins that showed a statistically significant reduction on the amplitude of the TCR-mediated change as a result of the addition of the Vm24 toxin are indicated in bold

a) Concordance with other proteomic studies:

<sup>1</sup>Tan H, Yang K, Li Y, Shaw TI, Wang Y, Blanco DB, et al. Integrative Proteomics and Phosphoproteomics Profiling Reveals Dynamic Signaling Networks and Bioenergetics Pathways Underlying T Cell Activation. *Immunity*. 2017;46:488–503

<sup>2</sup>Ron-Harel N, Santos D, Ghergurovich JM, Sage PT, Reddy A, Lovitch SB, et al. Mitochondrial Biogenesis and Proteome Remodeling Promote One-Carbon Metabolism for T Cell Activation. *Cell Metab*. 2016;24:104–17

toxin, a highly specific blocker of the  $K_v1.3$  channels to identify the cellular processes that depend on the activity of these channels in TCR-activated human  $T_{EM}$  lymphocytes as well as to validate the use of the Vm24 peptide to downregulate  $T_{EM}$  cell function.

Consistent with previous reports [23], and with the high dependency of  $T_{EM}$  lymphocytes on  $K_v1.3$  channel function for sustained activation, the addition of Vm24 to CD3-activated  $T_{EM}$  lymphocytes resulted in a pronounced inhibition of CD25 and CD40L expression, probably as a consequence of the lack of activation of calcineurin and the subsequent translocation of the NFAT transcription factor to the CD25 and CD40L promoters [45] [46]. Interestingly, under our experimental conditions, Vm24 did not prevent the OKT3-induced expression of CD69, a negative regulator of chronic inflammation [47, 48].

In consonance with the inhibition of the expression of early activation markers, the addition of the Vm24 peptide to OKT3-activated  $T_{EM}$  lymphocytes inhibited the secretion of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF, as well as that of the Th2 cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 and IL-13, all of which are dependent on the availability of NFAT [49–59].

We previously reported that administration of the Vm24 peptide lessened the severity of inflammation

in a delayed-type hypersensitivity model [23]. Other studies in animal models of human diseases (allergic asthma, experimental autoimmune encephalomyelitis) have shown that the abatement of the  $K_v1.3$  channel currents in vivo (by knocking out the channel or by treatment with ShK derivatives) ameliorates the progression of the disease and decreases the production of the effector cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 and IL-17, but enhances that of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [60, 61]. Contrary to these reports, under our experimental conditions, the blockade of  $K_v1.3$  channels in isolated human  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells from healthy donors reduced IL-10 production, consistent with a downstream inhibition of NFATc2 and IRF4 recruitment, two transcription factors that synergistically augment the activity of the Th2-specific enhancer CNS-9 (a cis-regulatory element upstream of the IL-10 gene locus) [62, 63]. Whether this discrepancy reflects species-specific differences or differences that result from different experimental settings (knocking out the channel or an in vivo T cell activation versus in vitro anti-CD3  $CD4^+$   $T_{EM}$  activation) remains to be investigated.

Also, it is important to consider that although IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 are classified as anti-inflammatory



cytokines due to their down-modulatory effect on inflammatory phenomena mediated by Th1/Th17 cells, these cytokines mediate type I hypersensitivity inflammatory conditions and significantly contribute to the pathogenesis mediated by immune complexes, through their important effect on the activation and proliferation of B cells and antibody synthesis [64].

Furthermore, consistent with the fact that the signaling pathways that activate the transcription of those genes are also dependent on NFAT availability, our data suggest that the inhibition of the  $K_v1.3$  channel exerts a down-regulatory effect on the different  $T_{EM}$  lymphocyte subsets, including Th1 and Th2 cells. In this regard, it would be expected that  $K_v1.3$  blockers could act as a wide spectrum immunosuppressive molecule, with a significant effect on different immune-mediated conditions.

The proteomic analysis revealed that, in agreement with the large secretory demand of TCR-activated  $T_{EM}$  cells, the protein synthesis machinery is prepared to generate a robust immune response by regulating the expression level of transcription factors specific for inflammatory mediators, such as IRF4, as well as that of proteins involved in the splicing machinery, the unfolded protein response and vesicular transport of the novel synthesized mediators. IRF4 is expressed across all T cell subsets within a few hours following TCR engagement, and it is necessary for optimal T cell proliferation in response to mitogenic stimuli. In cooperation with transcriptional partners such as NFAT, it controls the expression of IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IFN- $\gamma$  and TNF [40, 65–67]. Furthermore, the calcineurin inhibitor cyclosporine A [65] as well as defects in CRAC channels function [68] result in impaired IRF4 expression, implicating NFAT in IRF4 upregulation. Our data show that in a T cell activation context, the expression level of IRF4 is diminished following Vm24 treatment, suggesting that blocking the  $K_v1.3$  channel hinders downstream events such as NFAT activation and IRF4 expression, resulting in impaired cytokine production, in consonance with a previously assigned function for  $K_v1.3$ -dependent signals in secretory functions [14, 69].

The unfolded protein response allows cells to manage the endoplasmic reticulum stress resulting of the increased folding demand imposed by the requirements of activated T lymphocytes engaged in secretory functions. Especially, the molecular chaperone Hsp90 regulates the stability and function of IRE1, an endoplasmic reticulum transmembrane kinase that activates the unfolded protein response to maintain the endoplasmic reticulum function [70]. Upon treatment with the Vm24 peptide or the ShK toxin, the expression level of the Hsp90 chaperone as well as that of other members of the heat shock family of proteins was strongly diminished. In addition, we found

that  $K_v1.3$  channels-dependent signals are necessary for the up-regulation of the amino acid transporter *SLC3A2*. Nutrient transporters such as *SLC3A2* ensure and coordinate the supply of nutrients necessary for the increased metabolic requirements of effector lymphocytes. Thus,  $K_v1.3$  channels participate in regulating basic metabolic requirements in  $T_{EM}$  cells. In concordance with our results, a recent proteomic study performed on activated microglia also revealed that blocking  $K_v1.3$  channels attenuates biological processes related to the regulation of the immune response and the intracellular protein transport [71]. Assessing if this extends to other cell types becomes critical to appreciate better the potential side effects of blocking the  $K_v1.3$  channels to control autoimmune disorders.

Interestingly, we found that blocking the  $K_v1.3$  channels with Vm24 on OKT3-activated  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells does not entirely block the anti-CD3 induced cytokines synthesis or proteomic changes; it prevents the changes from reaching the highest level. Residual potassium fluxes from the few  $K_{Ca}3.1$  channels present on these cells may contribute to the “incomplete” inhibition [35]. In support of the relative abundance of  $K_v1.3$  channels as compared to that of  $K_{Ca}3.1$  channels on  $T_{EM}$  cells, our data indicate that  $K_v1.3$  channels are the major providers of potassium efflux; they are not indispensable for  $CD4^+$   $T_{EM}$  cell response, yet they are central for regulating the amplitude of the response.

Although less is known about the function of the  $K_v1.3$  channels in human  $CD8^+$  cells, the decrease of  $K_v1.3$  currents by genetic or pharmacological approaches inhibits the differentiation of  $T_{CM}$  to  $T_{EM}$  cells and in the latter, it severely impairs the proliferation, the secretion of IL-2, TNF and granzyme B (but not of IFN- $\gamma$ ), ultimately dampening their ability to kill target cells [69, 72]. Interestingly, NFATc1-deficient  $CD8^+$  T cells show diminished RNA levels of granzyme B and of genes encoding cytokines and chemokines in addition to genes controlling glycolysis [73], further underscoring the importance of  $K_v1.3$  channels on the calcium/calcineurin/NFAT network.

In addition to exploring the function of  $K_v1.3$  channels in activated  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells, the experiments we performed allowed us to compare the efficacy of two  $K_v1.3$  channel blockers: the Vm24 toxin, isolated from the Mexican scorpion *Vaejovis mexicanus* and the ShK toxin, from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Their capacity to hinder  $T_{EM}$  cells functions showed that both toxins were very effective to block the  $K_v1.3$  potassium channels-dependent signaling as they both inhibited the production of INF- $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-5, IL9, IL10 and IL13 following TCR ligation. Although not statistically significant, the inhibitory capacity of the ShK peptide was always higher than that of Vm24. The ShK peptide is a very potent ( $K_d = 10$  pM)  $K_v1.3$  blocker.

However, it has a low selectivity for the  $K_v1.3$  channels (only 2.8-fold affinity over other channels), as a result of which it is very toxic to mammals [21, 74]. Dalazatide<sup>®</sup> (formerly ShK-186), a molecule derived from the ShK toxin, is a  $K_v1.3$  channel blocker that has gone into clinical phase trials, has been shown to reduce the levels of plasmatic and  $T_{EM}$  inflammation markers, and to improve psoriatic skin lesions from mild to moderate plaque psoriasis patients [13, 16, 75]. In comparison with Dalazatide<sup>®</sup>, the Vm24 peptide has the advantage of a greater potency ( $K_d$  2.9 vs. 69 pM) and selectivity (1500 vs. 100-fold affinity over other channels) towards  $K_v1.3$  channels [21, 23], which improves the safety index in conditions where the blood-brain barrier (such as multiple sclerosis) is compromised and the presence of high concentrations of non-specific blockers (such as neuronal  $K_v1.1$  channels blockers) in the central nervous system can bring severe neurotoxicity. Interestingly, although Dalazatide<sup>®</sup> was well tolerated during clinical trials, the most common adverse events were temporary hypoesthesia and paresthesia involving hands, feet, or perioral area which may be prevented with more selective  $K_v1.3$  blockers such as Vm24 or other second-generation blockers derived from ShK toxin that have been recently developed [76].

## Conclusions

Our results show that blocking  $K_v1.3$  channels with the Vm24 peptide profoundly affects the mRNA synthesis machinery, the unfolded protein response and the intracellular vesicle transport, thus impairing the synthesis and secretion of cytokines in response to TCR engagement, highlighting the importance of  $K_v1.3$  channels for  $T_{EM}$  cell function. As  $T_{EM}$  cells are considered to be main players in the pathology of autoimmune diseases, further studies are needed to better characterize the molecular mechanisms affected by the blockade of  $K_v1.3$  channels by toxins such as the Vm24 peptide.

## Additional files

**Additional file 1:**  $K_v1.3$  channel blockade does not compromise cell viability. (a) Cell viability of cells treated under the same experimental conditions as for Fig. 1 was assessed following a 24, 48 and 96 h culture period with the Fixable Viability Dye eFluor 780. The dot plot of a representative donor after 24 h of culture is shown. Changes in forward scatter (FSC) and positive staining with the viability dye were considered as cell death markers. As death positive control, 30% dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells for 30 min. The cell death area is enclosed in the gate. (b) Data from three independent experiments with  $CD4^+ T_{EM}$  cells from independent donors are shown as mean  $\pm$  SEM. (TIF 6948 kb)

**Additional file 2:** Proteins identified in the mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95% probability as specified by the PeptideProphet algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99% probability. (XLSX 427 kb)

**Additional file 3:** Proteins differentially expressed when incubating the unstimulated cells with the Vm24 toxin. Proteins identified with the mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis, with at least 1.5-fold change in either direction and that were significantly ( $p < 0.05$ ) different, comparing the unstimulated and the Vm24-treated group. (PDF 150 kb)

**Additional file 4:** Validation of proteomic analysis results by flow cytometry.  $CD4^+ T_{EM}$  cells were stimulated through the TCR with plate-bound OKT3 in the presence or absence of Vm24 or ShK (1 nM) toxins, as indicated in the methods section. After 24 h of culture, cells were stained for (a) IRF4, (b) Hsp90 and (c) CD3e. The histogram of one representative donor for each staining is shown. (TIF 4252 kb)

## Abbreviations

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; CRAC:  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channels; DMSO: Dimethyl sulfoxide; emPAI: Exponentially modified protein abundance index; Fisher's LSD: Fisher's Least Significant Difference post-hoc test; FSC: Forward scatter; Hsp90: Heat shock protein 90; IRE1: Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1; IRF4: Interferon regulatory factor 4;  $K_d$ : Dissociation constant; MS/MS: Tandem mass spectrometry; NFAT: Nuclear factor of activated T-cells; SEM: Standard error of mean; TCR: T cell receptor;  $T_{EM}$ : Effector memory T cells

## Acknowledgements

The authors are indebted to Dr. Georgina Gurrola-Briones for the generous gift of the Vm24 toxin used in this work and to Dr. Rita Restano-Cassulini for support during the electrophysiological (patch clamp) experiments with Vm24. The authors thank Dr. Denis Faubert and Dr. Rosario Vera-Estrella for their helpful suggestions for MS analysis and Estefanía Alemán-Navarro, M. Sc., María Teresa Romero-Gutierrez, M. Sc., Dr. Ernesto Ortiz, and Dr. Roberto González-Amaro for help with data analysis. JIV is the recipient of a graduate student fellowship from CONACYT (fellowship holder number 289448).

## Funding

This work was partially supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) SEP-CONACYT 237864 (LDP) and SEP-CONACYT 220990 (YR). The funding sources had no role in the design of the study, in collection, analysis, and interpretation of the data or in writing of the manuscript.

## Authors' contributions

JIVB, JMUJ, LDP and YR designed the experiments and wrote the manuscript with input from all other authors; JIVB and EIMP conducted the experiments; JIVB, JMUJ, MASH and YR undertook the analysis. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The Vm24 peptide and its use are protected by an international patent application WO2008139243 A1 in the name of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The same subject was protected in several countries. In addition, a license was granted to a Mexican pharmaceutical company for commercial exploitation; however, the authors kept the right to continuing research in the field involving this peptide. The financing of this work came from the declared funding institutions only. No other possible conflicts of interest are involved.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad

2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico. <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

Received: 1 June 2018 Accepted: 2 August 2018

Published online: 14 August 2018

## References

- Feske S, Wulff H, Skolnik EY. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:291–353.
- Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev*. 2009;231:59–87.
- Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:690–702.
- George Chandy K, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. K+ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:280–9.
- Gutman GA. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57:473–508.
- Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, et al. The voltage-gated Kv1.3 K+ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest*. 2003;111:1703–13.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708–12.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745–63.
- Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. 2001;410:101–5.
- Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity*. 2014;41:886–97.
- Gerlach C, Moseman EA, Loughhead SM, Alvarez D, Zwijnenburg AJ, Waanders L, et al. The chemokine receptor CX3CR1 defines three antigen-experienced CD8 T cell subsets with distinct roles in immune surveillance and homeostasis. *Immunity*. 2016;45:1270–84.
- Beeton C, Barbara J, Giraud P, Devaux J, Benoliel A-M, Gola M, et al. Selective blocking of voltage-gated K+ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol*. 2001;166:936–44.
- Tarcha EJ, Chi V, Munoz-Elias EJ, Bailey D, Londono LM, Upadhyay SK, et al. Durable pharmacological responses from the peptide ShK-186, a specific Kv1.3 channel inhibitor that suppresses T cell mediators of autoimmune disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342:642–53.
- Beeton C. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol*. 2005;67:1369–81.
- Matheu MP, Beeton C, Garcia A, Chi V, Rangaraju S, Safrina O, et al. Imaging of effector memory T cells during a delayed-type hypersensitivity reaction and suppression by Kv1.3 channel block. *Immunity*. 2008;29:602–14.
- Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:17414–9.
- Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013;76:328–42.
- Hu L, Pennington M, Jiang Q, Whartenby KA, Calabresi PA. Characterization of the Functional Properties of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 in Human CD4+ T Lymphocytes. *J Immunol*. 2007;179:4563–70.
- Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. Selective blockage of voltage-dependent K+ channels by a novel scorpion toxin. *Nature*. 1982;296:90–1.
- Chhabra S, Chang SC, Nguyen HM, Huq R, Tanner MR, Londono LM, et al. Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: implications for autoimmune diseases. *FASEB J*. 2014;28:3952–64.
- Chi V, Pennington MW, Norton RS, Tarcha EJ, Londono LM, Sims-Fahey B, et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*. 2012;59:529–46.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K+ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol*. 1994;45:1227–34.
- Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, de la Vega RC R, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, et al. Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol Pharmacol*. 2012;82:372–82.
- Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8:982–1001.
- Gurrola GB, Hernández-López RA, de la Vega RC R, Varga Z, CVF B, Salas-Castillo SP, et al. Structure, function, and chemical synthesis of Vaejovis mexicanus peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry*. 2012;51:4049–61.
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O. Protein profiling of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Proteomics*. 2012;12:2862–5.
- Murillo A, Vera-Estrella R, Barkla BJ, Méndez E, Arias CF. Identification of host cell factors associated with Astrovirus replication in Caco-2 cells. *J Virol*. 2015;89:10359–70.
- Beavis RC. Using the global proteome machine for protein identification. In: Nedelkov D, Nelson RW, editors. *New and emerging proteomic techniques*. New Jersey: Humana Press; 2006. p. 217–28.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*. 2002;74:5383–92.
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2003;75:4646–58.
- Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4:1265–72.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D447–52.
- Howe E, Holton K, Nair S, Schlauch D, Sinha R, Quackenbush J. *Biomedical Informatics for Cancer Research*. In: Ochs MF, Casagrande JT, Davuluri R V., editors. *Biomedical Informatics for Cancer Research*. Boston, MA: Springer US; 2010. p. 267–277.
- Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med*. 2010;8:104.
- Chiang EY, Li T, Jeet S, Peng I, Zhang J, Lee WP, et al. Potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 cooperatively and compensatorily regulate antigen-specific memory T cell functions. *Nat Commun*. 2017;8:14644.
- Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:24–35.
- Liu H, Rohowsky-Kochan C. Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J Immunol*. 2008;180:7948–57.
- Tan H, Yang K, Li Y, Shaw TI, Wang Y, Blanco DB, et al. Integrative proteomics and phosphoproteomics profiling reveals dynamic signaling networks and bioenergetics pathways underlying T cell activation. *Immunity*. 2017;46:488–503.
- Ron-Harel N, Santos D, Ghergurovich JM, Sage PT, Reddy A, Lovitch SB, et al. Mitochondrial biogenesis and proteome remodeling promote one-carbon metabolism for T cell activation. *Cell Metab*. 2016;24:104–17.
- Huber M, Lohoff M. IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur J Immunol*. 2014;44:1886–95.
- Knowlton AA. NFκB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2006;69:7–8.
- Boyer C, Auphan N, Luton F, Malburet J-M, Barad M, Bizozzero J-P, et al. T cell receptor/CD3 complex internalization following activation of a cytolytic T cell clone: evidence for a protein kinase C-independent staurosporine-sensitive step. *Eur J Immunol*. 1991;21:1623–34.
- José ES, Borroto A, Niedergang F, Alcover A, Alarcón B. Triggering the TCR complex causes the Downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity*. 2000;12:161–70.
- Kundu-Raychaudhuri S, Chen Y-J, Wulff H, Raychaudhuri SP. Kv1.3 in psoriatic disease: PAP-1, a small molecule inhibitor of Kv1.3 is effective

- in the SCID mouse psoriasis – Xenograft model. *J Autoimmun.* 2014;55:63–72.
45. Schuh K, Twardzik T, Kneitz B, Heyer J, Schimpl A, Serfling E. The interleukin 2 receptor  $\alpha$  chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells. *J Exp Med.* 1998;188:1369–73.
  46. Tsytsykova AV, Tsitsikov EN, Geha RS. The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription. *J Biol Chem.* 1996;271:3763–70.
  47. Martín P, Gómez M, Lamana A, Marín AM, Cortés JR, Ramírez-Huesca M, et al. The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:355–65.e3.
  48. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005;26:136–40.
  49. Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, et al. Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the interferon- $\gamma$  promoter. *J Biol Chem.* 1997;272:30412–20.
  50. Kaminuma O, Kitamura F, Kitamura N, Hiroi T, Miyoshi H, Miyawaki A, et al. Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- gene expression in T cells. *J Immunol.* 2008;180:319–26.
  51. Goldfeld AE. Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. *J Exp Med.* 1993;178:1365–79.
  52. McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A. The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- $\alpha$  gene transcription. *J Biol Chem.* 1994;269:30445–50.
  53. Szabo SJ, Gold JS, Murphy TL, Murphy KM. Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-ATc. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4793–805.
  54. Chuvpilo S, Schomburg C, Gerwig R, Heinfling A, Reeves R, Grummt F, et al. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:5694–704.
  55. Rooney JW, Hodge MR, McCaffrey PG, Rao A, Glimcher LH. A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression. *EMBO J.* 1994;13:625–33.
  56. Stranick KS, Zambas DN, Uss AS, Egan RW, Billah MM, Umland SP. Identification of transcription factor binding sites important in the regulation of the human Interleukin-5 gene. *J Biol Chem.* 1997;272:16453–65.
  57. Lee HJ, Masuda ES, Arai N, Arai K, Yokota T. Definition of cis -regulatory elements of the mouse Interleukin-5 gene promoter. *J Biol Chem.* 1995;270:17541–50.
  58. Jash A, Sahoo A, Kim G-C, Chae C-S, Hwang J-S, Kim J-E, et al. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-mediated Interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J Biol Chem.* 2012;287:15445–57.
  59. Macian F. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J.* 2000;19:4783–95.
  60. Gocke AR, Lebson LA, Grishkan IV, Hu L, Nguyen HM, Whartenby KA, et al. Kv1.3 deletion biases T cells toward an immunoregulatory phenotype and renders mice resistant to autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2012;188:5877–86.
  61. Koshy S, Huq R, Tanner MR, Atik MA, Porter PC, Khan FS, et al. Blocking Kv 1.3 channels inhibits Th2 lymphocyte function and treats a rat model of asthma. *J Biol Chem.* 2014;289:12623–32.
  62. Im S-H, Hueber A, Monticelli S, Kang K-H, Rao A. Chromatin-level regulation of the IL10 gene in T cells. *J Biol Chem.* 2004;279:46818–25.
  63. Lee C-G, Kang K-H, So J-S, Kwon H-K, Son J-S, Song M-K, et al. A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Mol Immunol.* 2009;46:613–21.
  64. Shachar I, Karin N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol.* 2013;93:51–61.
  65. Biswas PS, Bhagat G, Pernis AB. IRF4 and its regulators: evolving insights into the pathogenesis of inflammatory arthritis? *Immunol Rev.* 2010;233:79–96.
  66. Raczkowski F, Ritter J, Heesch K, Schumacher V, Guralnik A, Hocker L, et al. The transcription factor interferon regulatory factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110:15019–24.
  67. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* 2010;33:192–202.
  68. Vaeth M, Eckstein M, Shaw PJ, Kozhaya L, Yang J, Berberich-Siebelt F, et al. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in follicular T cells controls Humoral immune responses and autoimmunity. *Immunity.* 2016;44:1350–64.
  69. Hu L, Wang T, Gocke AR, Nath A, Zhang H, Margolick JB, et al. Blockade of Kv1.3 potassium channels inhibits differentiation and Granzyme B secretion of human CD8+ T effector memory lymphocytes. *PLoS One.* 2013;8:e54267.
  70. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:469–84.
  71. Rangaraju S, Raza SA, Pennati A, Deng Q, Dammer EB, Duong D, et al. A systems pharmacology-based approach to identify novel Kv1.3 channel-dependent mechanisms in microglial activation. *J Neuroinflammation.* 2017;14:128.
  72. Sim JH, Kim KS, Park H, Kim K-J, Lin H, Kim T-J, et al. Differentially Expressed Potassium Channels Are Associated with Function of Human Effector Memory CD8+ T Cells. *Front Immunol.* 2017;8:859.
  73. Klein-Hessling S, Muhammad K, Klein M, Pusch T, Rudolf R, Flöter J, et al. NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. *Nat Commun.* 2017;8:511.
  74. Castañeda O, Sotolongo V, Amor AM, Stöcklin R, Anderson AJ, Harvey AL, et al. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 1995;33:603–13.
  75. Tarcha EJ, Olsen CM, Probst P, Peckham D, Muñoz-Elias EJ, Kruger JG, et al. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *PLoS One.* 2017;12:e0180762.
  76. Pennington M, Chang S, Chauhan S, Huq R, Tajhya R, Chhabra S, et al. Development of Highly Selective Kv1.3-Blocking Peptides Based on the Sea Anemone Peptide ShK. *Mar Drugs.* 2015;13:529–42.

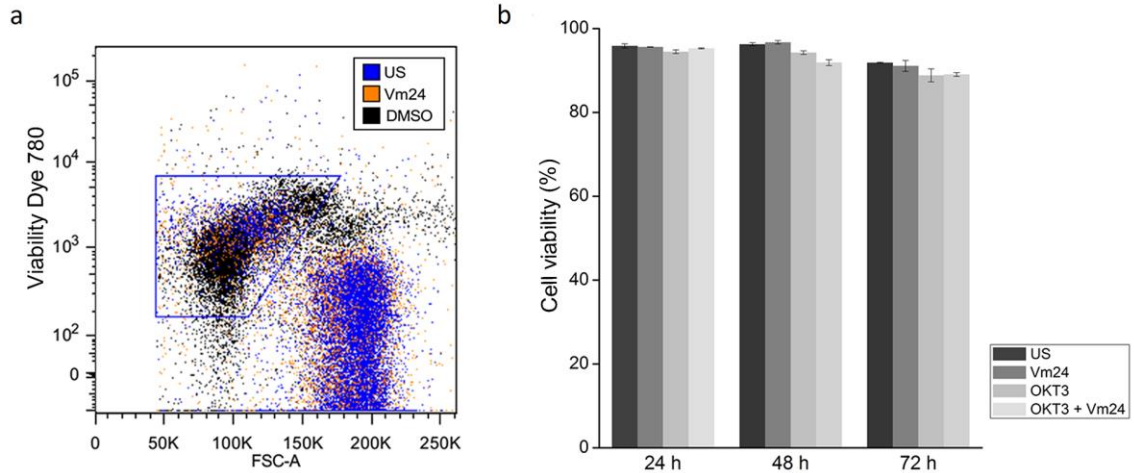
**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





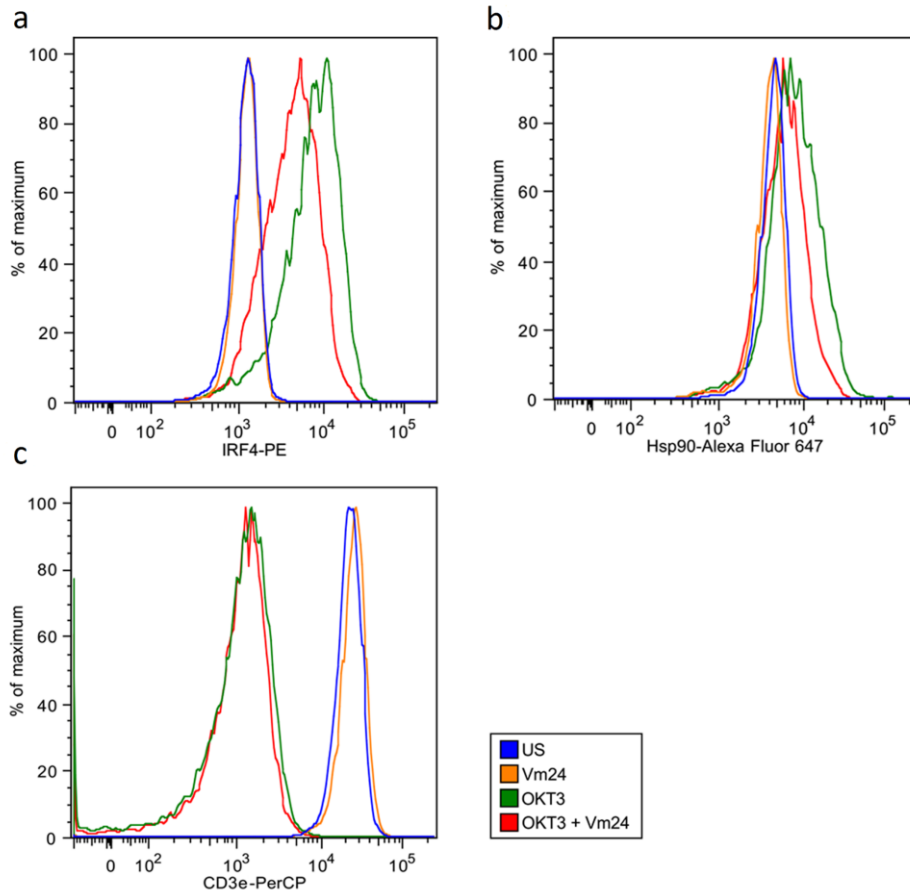
**Additional file 1.** *K<sub>v</sub>1.3* channel blockade does not compromise cell viability. **a)** Cell viability of cells treated under the same experimental conditions as for Fig. 1 was assessed following a 24, 48 and 72 h culture period with the Fixable Viability Dye eFluor 780. The dot plot of a representative donor after 24 h of culture is shown. Changes in forward scatter (FSC) and positive staining with the viability dye were considered as cell death markers. As death positive control, 30% dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells for 30 min. The cell death area is enclosed in the gate. **b)** Data from three independent experiments with CD4<sup>+</sup> TEM cells from independent donors are shown as mean  $\pm$  SEM.

*Additional file 2*, correspondiente a una hoja de cálculo en Microsoft Excel, puede encontrarse en la liga: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-018-0257-7>

**Additional file 2.** *Proteins identified in the mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95% probability as specified by the PeptideProphet algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99% probability.*

UniProtKB	Gene	Protein	Fisher's LSD ( <i>p</i> ) US vs. Vm24	Fold change Vm24/US
P61254	<i>RPL26</i>	60S ribosomal protein L26	4.8E-02	1.84
P61604	<i>HSPE1</i>	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	1.6E-03	2.68
P61088	<i>UBE2N</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	1.5E-02	1.66
Q5JSL3	<i>DOCK11</i>	Dedicator of cytokinesis protein 11	3.8E-03	0.53
Q92522	<i>H1FX</i>	Histone H1x	2.1E-02	0.66
Q9Y3L3	<i>SH3BP1</i>	SH3 domain-binding protein 1	7.3E-03	0.50
Q13561	<i>DCTN2</i>	Dynactin subunit 2	1.9E-02	0.35
P61247	<i>RPS3A</i>	40S ribosomal protein S3a	5.0E-03	0.53
P16104	<i>H2AFX</i>	Histone H2AX	1.3E-02	0.37
O94906	<i>PRPF6</i>	Pre-mRNA-processing factor 6	1.6E-02	0.38
Q93VT9	<i>RPL10A</i>	60S ribosomal protein L10-1	3.5E-02	0.44
Q9NYF8	<i>BCLAF1</i>	Bcl-2-associated transcription factor 1	2.1E-03	0.24
P61224	<i>RAP1B</i>	Ras-related protein Rap-1b	8.9E-03	0.50
Q13283	<i>G3BP1</i>	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	4.0E-02	0.30

**Additional file 3.** *Proteins differentially expressed when incubating the unstimulated cells with the Vm24 toxin. Proteins identified with the mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis, with at least 1.5-fold change in either direction and that were significantly ( $p < 0.05$ ) different, comparing the unstimulated and the Vm24-treated group.*



**Additional file 4.** Validation of proteomic analysis results by flow cytometry. CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells were stimulated through the TCR with plate-bound OKT3 in the presence or absence of Vm24 or ShK (1 nM) toxins, as indicated in the methods section. After 24 h of culture, cells were stained for **a)** IRF4, **b)** Hsp90 and **c)** CD3e. The histogram of one representative donor for each staining is shown.

# **VI. RESULTADOS NO PUBLICADOS**

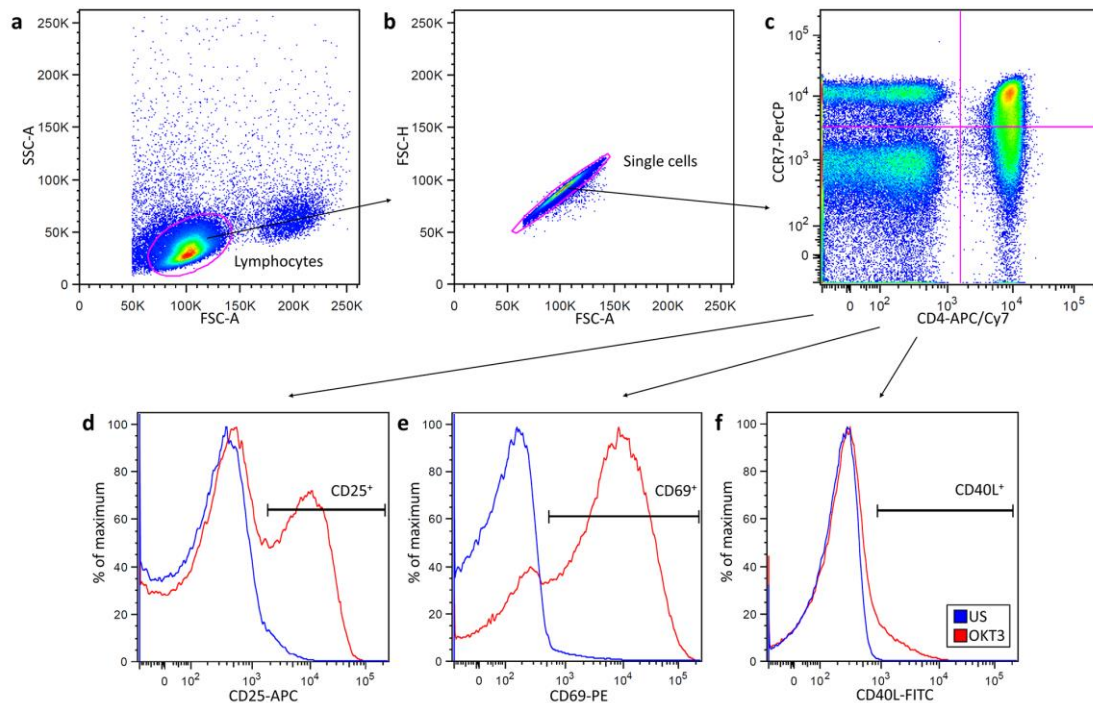


## VI. RESULTADOS NO PUBLICADOS

### *El bloqueo de los canales $K_v1.3$ por la toxina Vm24 disminuye la activación de linfocitos T de pacientes con AR y sujetos sanos*

Debido a que los ensayos anteriores fueron realizados con linfocitos  $T_{EM}$   $CD4^+$  purificados, provenientes de donadores sanos, evaluamos el efecto del bloqueo de los canales  $K_v1.3$  en linfocitos provenientes de pacientes con AR, una enfermedad autoinmune en la que las células  $T_{EM}$   $CD4^+$  tienen una importante participación en la patogénesis [16, 30].

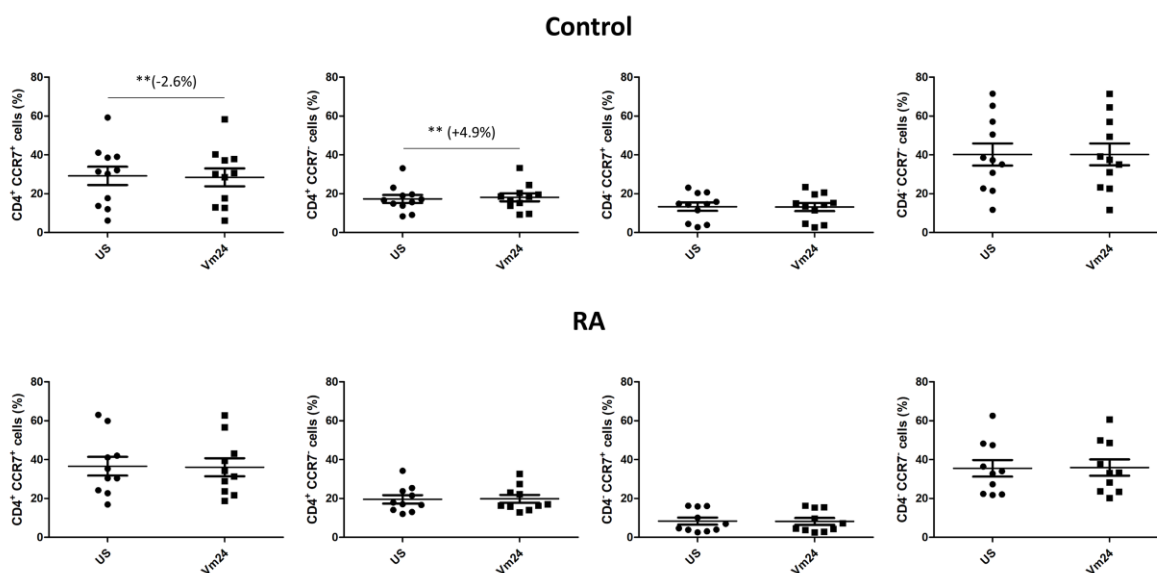
Evaluamos si la toxina Vm24 modifica la proporción de subpoblaciones particulares de linfocitos T y la expresión de los marcadores de activación temprana CD25, CD40L y CD69 en respuesta a la estimulación a través del TCR. Debido a la cantidad limitada de sangre que puede obtenerse de los pacientes con AR, decidimos purificar linfocitos T totales, y mediante citometría de flujo multiparamétrica, analizar los *gates* correspondientes a las poblaciones celulares de interés (Figura 15): a) células  $CD4^+$   $CCR7^+$  enriquecida en linfocitos T vírgenes y  $T_{CM}$   $CD4^+$ , b) células  $CD4^+$   $CCR7^-$  enriquecida en linfocitos  $T_{EM}$   $CD4^+$ , c) células  $CD4^-$   $CCR7^+$  enriquecida en linfocitos T vírgenes y  $T_{CM}$   $CD8^+$  y linfocitos T  $\gamma\delta$  y d) células  $CD4^-$   $CCR7^-$  enriquecida en linfocitos  $T_{EM}$   $CD8^+$  y linfocitos T  $\gamma\delta$ .



**Figura 15.** Estrategia de citometría de flujo para el análisis de subpoblaciones de linfocitos T. Se purificaron linfocitos T a partir de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con AR, y después de cultivarlos como se describe en la sección de metodología, se marcaron con anticuerpos monoclonales fluorescentes contra CD4, CCR7, CD25, CD69 y CD40L. **a)** El

gate correspondiente a linfocitos se eligió en función del tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de las células, y a partir de este, **b)** se seleccionaron las células únicas y se adquirieron 150,000 eventos para el análisis. **c)** La población se dividió en cuadrantes de acuerdo a la expresión de CD4 y CCR7, y los marcadores de activación temprana **d)** CD25, **e)** CD69 y **f)** CD40L se evaluaron en cada subpoblación. Se muestran los gráficos correspondientes a un donador.

Debido a que los resultados anteriores sugieren que las toxinas Vm24 y ShK no son citotóxicas para los linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup>, cultivamos linfocitos T durante de 24 horas en presencia o ausencia de la toxina Vm24 (1 nM) para determinar si el bloqueo de los canales K<sub>v</sub>1.3 modifica las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos T indicadas anteriormente. Tras el periodo de incubación, la toxina Vm24 disminuyó la proporción de células CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> y aumentó la de células CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> en sujetos sanos, mientras que en los pacientes con AR no se modificaron estas proporciones (Figura 16). Aunque estos cambios tienen significancia estadística, la variación es tan ligera que probablemente no tenga relevancia biológica.

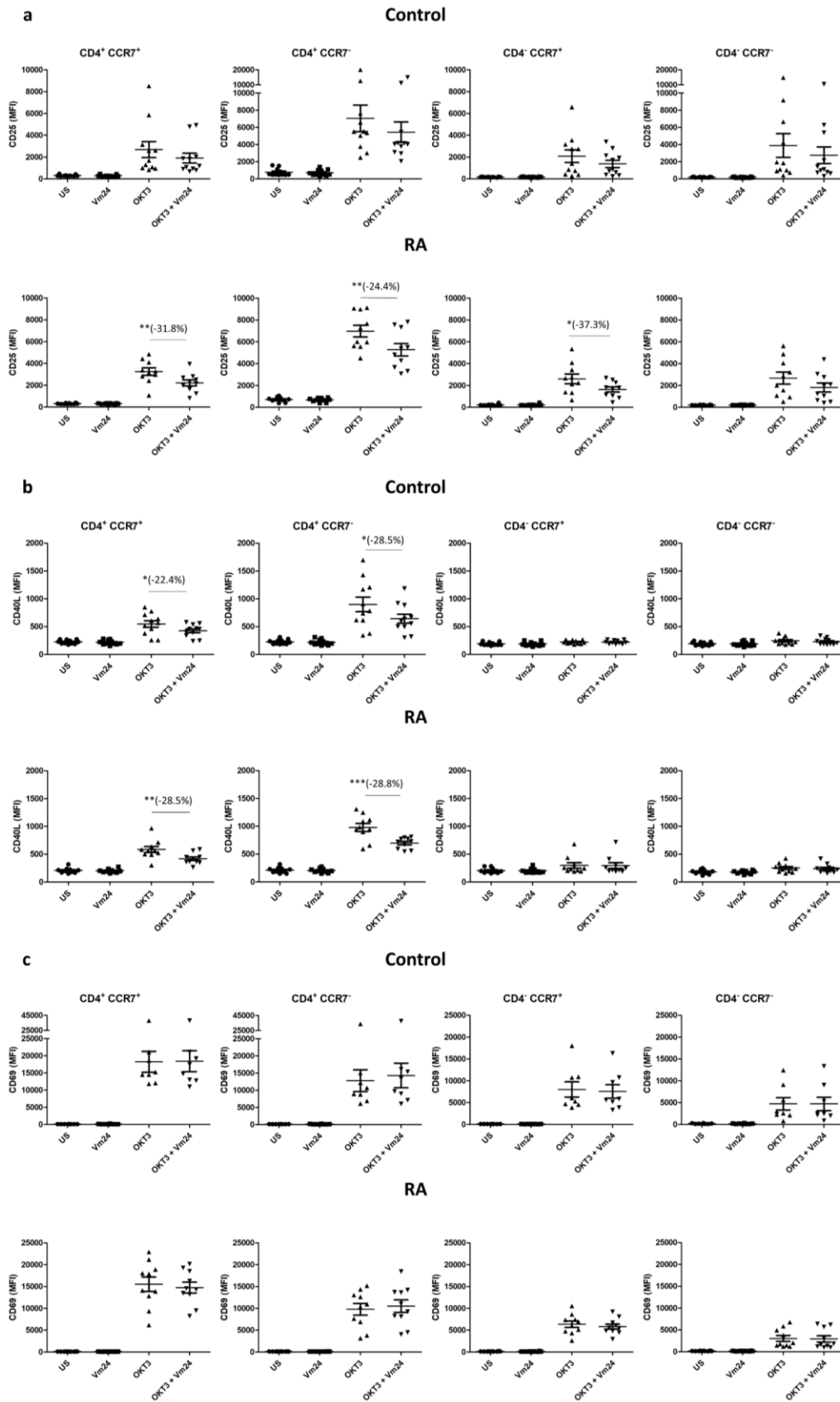


**Figura 16.** El bloqueo de los canales K<sub>v</sub>1.3 modifica ligeramente la proporción de células en subpoblaciones particulares de linfocitos T. Se cultivaron linfocitos T de sujetos sanos y de pacientes con AR en presencia o ausencia de la toxina Vm24 (1 nM). Después de 24 horas, las células se tiñeron como se indica en la figura 15 y se evaluó la proporción de las subpoblaciones indicadas en el gate de células únicas. Los datos de al menos 10 experimentos independientes se muestran como media ± EEM. El cambio porcentual respecto al grupo de células sin estimular se muestra entre paréntesis y la significancia de las comparaciones por pares se indica con estrellas (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

En cuanto a la expresión de los marcadores de activación temprana, la toxina Vm24 previno la regulación positiva de CD25 mediada por el TCR en las células CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> de pacientes con AR. En los sujetos sanos, aunque esta tendencia se mantiene, la inhibición

mediada por la toxina es ligeramente menor y no alcanza la significancia estadística (Figura 17a). La toxina Vm24 también evitó la regulación positiva de CD40L en las células CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> de pacientes con AR y de sujetos sanos (Figura 17b). Finalmente, de la misma manera que en los experimentos anteriores con linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> purificados, la regulación positiva de CD69 no se vio afectada por la presencia de la toxina Vm24 (Figura 17c).

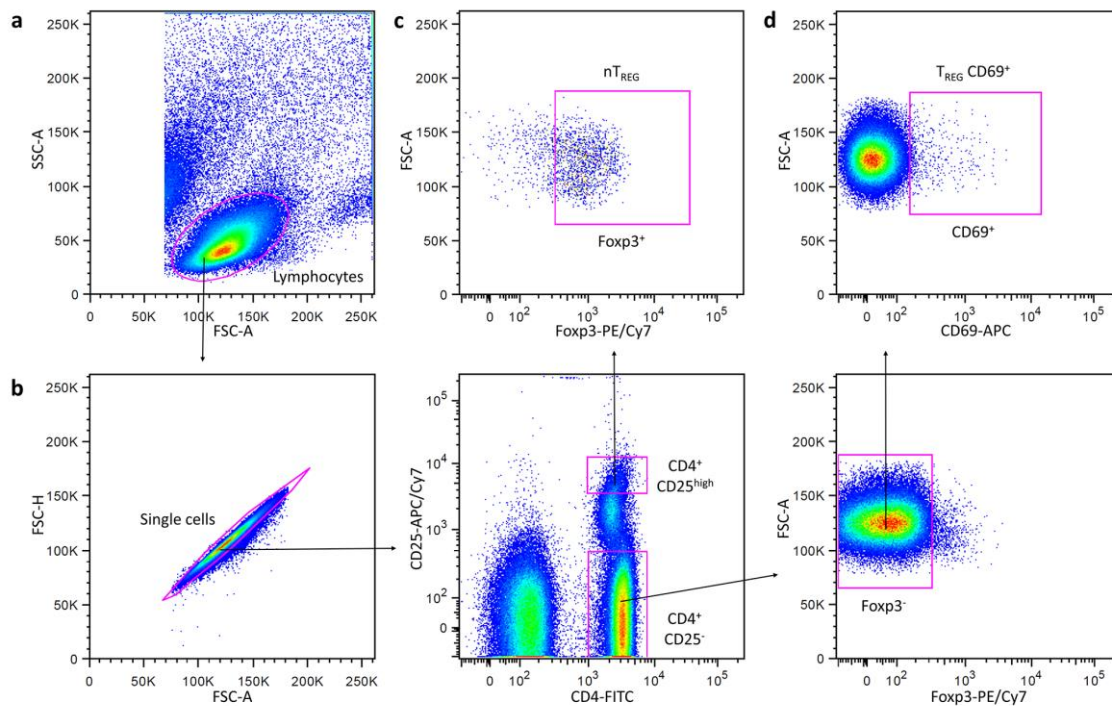
Es importante resaltar que no se observó una inhibición preferencial de las células T<sub>EM</sub> respecto a los linfocitos T vírgenes y T<sub>CM</sub>, probablemente en parte debido a la heterogeneidad de las células utilizadas y a que los linfocitos obtenidos de sangre periférica pueden no reflejar el fenotipo de las células T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> autorreactivas crónicamente estimuladas, presentes en el sinovio de los pacientes con AR, que tienen una clara dependencia funcional de los canales K<sub>v</sub>1.3. Es por ello, que un acercamiento con linfocitos T obtenidos directamente del sinovio de pacientes con AR o un modelo de linfocitos T antígeno específicos estimulados crónicamente, podrían ser más valiosos en el contexto de la aplicación de los bloqueadores de canales K<sub>v</sub>1.3 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.



**Figura 17.** El bloqueo de los canales  $K_v1.3$  disminuye la expresión de CD25 y CD40L, pero no la de CD69. Se estimularon linfocitos T de sujetos sanos y de pacientes con AR a través del TCR con OKT3 unido a la placa de cultivo en presencia o ausencia de la toxina Vm24 (1 nM). Después de 24 horas, las células se tiñeron como se indica en la figura 15 y se evaluó la expresión de **a)** CD25, **b)** CD40L y **c)** CD69 en las subpoblaciones indicadas. Los datos de al menos 10 experimentos independientes se muestran como media  $\pm$  EEM. El cambio porcentual de la comparación por pares entre OKT3 y OKT3 + Vm24 se muestra entre paréntesis y la significancia de las comparaciones se indica con estrellas (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**El bloqueo de los canales  $K_v1.3$  por la toxina Vm24 modifica la proporción de linfocitos  $T_{REG}$  CD69<sup>+</sup> en sujetos sanos, pero no en pacientes con AR**

Finalmente, evaluamos si el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  modifica la proporción de dos poblaciones de linfocitos  $T_{REG}$ ; los linfocitos T reguladores naturales ( $nT_{REG}$ ) y los linfocitos  $T_{REG}$  CD69<sup>+</sup>. Estos linfocitos suprimen la actividad de otras células en el sistema inmunológico, manteniendo la tolerancia hacia los antígenos propios y previniendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

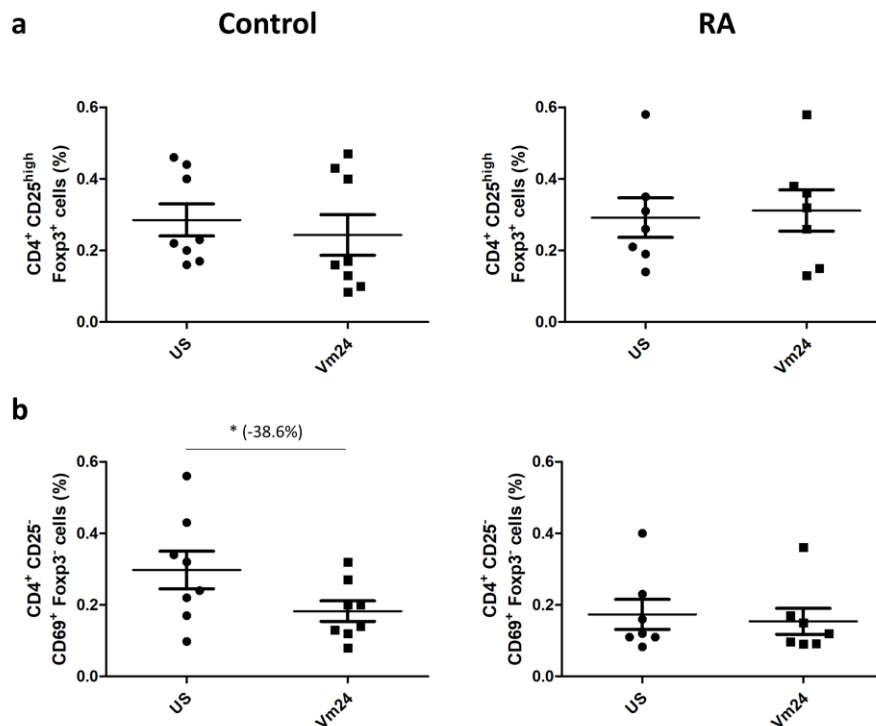


**Figura 18.** Estrategia de citometría de flujo para el análisis de linfocitos  $nT_{REG}$  y  $T_{REG}$  CD69<sup>+</sup>. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con AR, como se describe en la sección de metodología y se marcaron con anticuerpos monoclonales fluorescentes contra CD4, CD25 y CD69. Las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron para Foxp3. **a)** El gate correspondiente a linfocitos se eligió en función del tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de las células, y a partir de este, **b)** se seleccionaron las células únicas y se adquirieron 500,000 eventos para el

análisis. A partir de esta población, se establecieron los gates correspondientes a **c)** linfocitos  $nT_{REG}$  ( $CD4^+ CD25^{high} Foxp3^+$ ) y **d)** linfocitos  $T_{REG} CD69^+$  ( $CD4^+ CD25^- Foxp3^- CD69^+$ ). Se muestran los gráficos correspondientes a un donador.

Cultivamos células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes con AR durante 72 horas en presencia o ausencia de la toxina Vm24 (1 nM) y mediante citometría de flujo multiparamétrica, analizamos los *gates* correspondientes a las poblaciones de interés (Figura 18): a) Linfocitos  $nT_{REG}$ :  $CD4^+ CD25^{high} Foxp3^+$ , b) Linfocitos  $T_{REG} CD69^+$ :  $CD4^+ CD25^- Foxp3^- CD69^+$ .

Tras el periodo de incubación, la toxina Vm24 no modificó la proporción de linfocitos  $nT_{REG}$  en sujetos sanos ni en pacientes con AR (Figura 19a). Sin embargo, disminuyó la proporción de linfocitos  $T_{REG} CD69^+$  en los sujetos sanos, mientras que esta proporción no se alteró en los pacientes con AR (Figura 19b). Determinar si la disminución en el número de linfocitos  $T_{REG} CD69^+$  *in vivo* por el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  tiene relevancia biológica sería de utilidad.



**Figura 19.** El bloqueo de los canales  $K_v1.3$  modifica la proporción de linfocitos  $T_{REG} CD69^+$  en sujetos sanos, pero no en pacientes con AR. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con AR en presencia o ausencia de la toxina Vm24 (1 nM). Después de 72 horas, las células se tiñeron como se indica en la figura 18 y se evaluó la proporción de linfocitos **a)**  $CD4^+ CD25^{high} Foxp3^+$  ( $nT_{REG}$ ) y **b)**  $CD4^+ CD25^- Foxp3^- CD69^+$  ( $T_{REG} CD69^+$ ) en el gate de células únicas. Los datos de al menos 8 experimentos independientes se muestran como media  $\pm$  EEM. El cambio porcentual respecto al grupo de células sin estimular se muestra entre paréntesis y la significancia de las comparaciones por pares se indica con estrellas (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

# VII. DISCUSIÓN

## VII. DISCUSIÓN

Los canales  $K_v1.3$  y  $K_{Ca3.1}$  promueven la entrada sostenida de  $Ca^{+2}$  necesaria para la activación completa de los linfocitos T. Particularmente, los canales  $K_v1.3$  se expresan de forma abundante en linfocitos  $T_{EM}$  humanos crónicamente activados y regulan su actividad [29]. En estas células, la inhibición de los canales  $K_v1.3$  por bloqueadores farmacológicos inhibe las respuestas a la estimulación antigénica dependientes de  $Ca^{+2}$  y mejora el curso de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple y psoriasis en modelos animales [62, 109]. En el presente estudio, utilizamos la toxina Vm24, un bloqueador altamente específico de los canales  $K_v1.3$  para identificar los procesos celulares que dependen de la actividad de estos canales en linfocitos  $T_{EM}$  humanos activados a través del TCR, así como para validar el uso de esta toxina para regular negativamente la función de los linfocitos  $T_{EM}$ .

Consistente con nuestro reporte anterior [68], y con la dependencia de los linfocitos  $T_{EM}$  hacia los canales  $K_v1.3$  para una activación sostenida, la adición de Vm24 a los linfocitos  $T_{EM}$  activados a través del TCR, resultó en una inhibición pronunciada de la expresión de CD25 y CD40L, probablemente como consecuencia de la falta de activación de la calcineurina y la posterior translocación de factores de transcripción de la familia NFAT a los promotores de CD25 y CD40L [110, 111]. Consistente con la inhibición de la expresión de los marcadores de activación temprana, la adición del péptido Vm24 a los linfocitos  $T_{EM}$  activados con OKT3, disminuyó la secreción de las citocinas proinflamatorias IFN $\gamma$  y TNF, así como la de las citocinas tipo  $T_H2$  IL 4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, todos los cuales dependen de la disponibilidad de NFAT [112-122]. Interesantemente, en nuestras condiciones experimentales, la toxina Vm24 no impidió la expresión inducida por OKT3 de CD69, un regulador negativo de la inflamación crónica [123, 124].

Cuando se utiliza la población de linfocitos T totales, se observa una inhibición más discreta, pues en esta población existen células que son funcionalmente más dependientes de los canales  $K_{Ca3.1}$  y que pueden escapar al efecto inhibitorio de la toxina Vm24. Es posible que, en estos experimentos, las señales por contacto directo o por citocinas liberadas por estas células, cooperen con las señales generadas a través del TCR y que se atenúe el efecto inhibitorio de la toxina Vm24 sobre los linfocitos  $T_{EM}$ .

Anteriormente informamos que la administración del péptido Vm24 en ratas, disminuía la severidad de la inflamación en un modelo de hipersensibilidad retardada [68]. Otros estudios en modelos animales de enfermedades humanas (asma alérgica, encefalomiелitis autoinmune experimental) han demostrado que el bloqueo de las corrientes de los canales  $K_v1.3$  *in vivo* (eliminando genéticamente el canal o mediante el tratamiento con derivados de la toxina ShK), mejora el curso de la enfermedad y disminuye la producción de las citocinas efectoras IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-17, pero aumenta la de la citocina antiinflamatoria IL-10 [64, 77]. Contrario a estos informes, en nuestras condiciones experimentales con células humanas, el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  en linfocitos  $T_{EM}$   $CD4^+$  aislados de donadores sanos, redujo la producción de IL-10,



consistente con una inhibición del reclutamiento de NFATc2 e IRF4, dos factores de transcripción que aumentan sinérgicamente la actividad del *enhancer* específico de T<sub>H</sub>2, CNS-9 (un elemento regulador en *cis*, río arriba del *locus* del gen *IL10*) [125, 126]. Aún queda por investigar si esta discrepancia refleja diferencias específicas de especie o resulta de la disparidad de las configuraciones experimentales (la eliminación genética de los canales K<sub>v</sub>1.3, o la activación antígeno específica de células T *in vivo* contra la activación con anti-CD3 *in vitro* en nuestro caso de linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> aislados).

Además, es importante tener en cuenta que aunque IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 se clasifican como citocinas antiinflamatorias debido a su efecto modulador negativo sobre los fenómenos inflamatorios mediados por las células T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17, estas citocinas median las afecciones inflamatorias en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I y contribuyen significativamente a la patogénesis mediada por complejos inmunes, a través de su efecto sobre la activación y proliferación de células B y la síntesis de anticuerpos [127].

Consistente con el hecho de que las vías de señalización que activan la transcripción de estos genes también dependen de la disponibilidad de factores de transcripción de la familia NFAT, nuestros datos sugieren que la inhibición de los canales K<sub>v</sub>1.3, ejerce un efecto regulador negativo en los diferentes subconjuntos de linfocitos T<sub>EM</sub>, incluidas las células T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2. En este sentido, se esperaría que los bloqueadores de canales K<sub>v</sub>1.3 pudieran actuar como una molécula inmunosupresora de amplio espectro, con un efecto significativo en diferentes afecciones mediadas por el sistema inmunológico.

El análisis proteómico reveló que, de acuerdo con la gran demanda secretora de los linfocitos T<sub>EM</sub> activados a través del TCR, la maquinaria de síntesis de proteínas está preparada para generar una respuesta inmunitaria robusta mediante la regulación del nivel de expresión de factores de transcripción específicos para mediadores inflamatorios, como IRF4, así como de proteínas involucradas en la maquinaria de *splicing*, en la respuesta a proteínas desplegadas y en el transporte vesicular de los nuevos mediadores sintetizados. De particular interés es que el factor de transcripción IRF4 se expresa en todos los subtipos de linfocitos T en unas pocas horas tras la activación a través del TCR, y es necesario para la proliferación óptima de las células T en respuesta a estímulos mitogénicos. En cooperación con otros factores de transcripción como NFAT, controla la expresión de IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IFN $\gamma$  y TNF [6, 128-130]. Además, la ciclosporina A, un inhibidor de la calcineurina [128], así como los defectos en la función de los canales de Ca<sup>+2</sup> CRAC [135], resultan en una expresión disminuida de IRF4, lo que implica a NFAT en la regulación positiva de IRF4. Nuestros datos muestran que en un contexto de activación de linfocitos T, el nivel de expresión de IRF4 disminuye en respuesta al tratamiento con Vm24, lo que sugiere que el bloqueo de los canales K<sub>v</sub>1.3 impide eventos río abajo como la activación de NFAT y la expresión de IRF4, lo que resulta en una producción deficiente de citocinas, en consonancia con las señales dependientes de K<sub>v</sub>1.3 regulando las funciones secretoras.

La respuesta a proteínas desplegadas permite a las células manejar el estrés del retículo endoplásmico resultante de la mayor demanda de plegamiento impuesta por los requisitos de los linfocitos T activados que participan en las funciones secretoras. Especialmente, las chaperonas moleculares de la familia Hsp90 regulan la estabilidad y la función de IRE1, una quinasa transmembranal del retículo endoplásmico que activa la respuesta a proteínas desplegadas para mantener la función del retículo endoplásmico [131]. Tras el tratamiento con el péptido Vm24 o la toxina ShK, el nivel de expresión de la chaperona Hsp90, así como el de otros miembros de la familia de proteínas de choque térmico, disminuyó considerablemente, poniendo en evidencia una participación importante de la función de los canales  $K_v1.3$  en el plegamiento de proteínas nacientes.

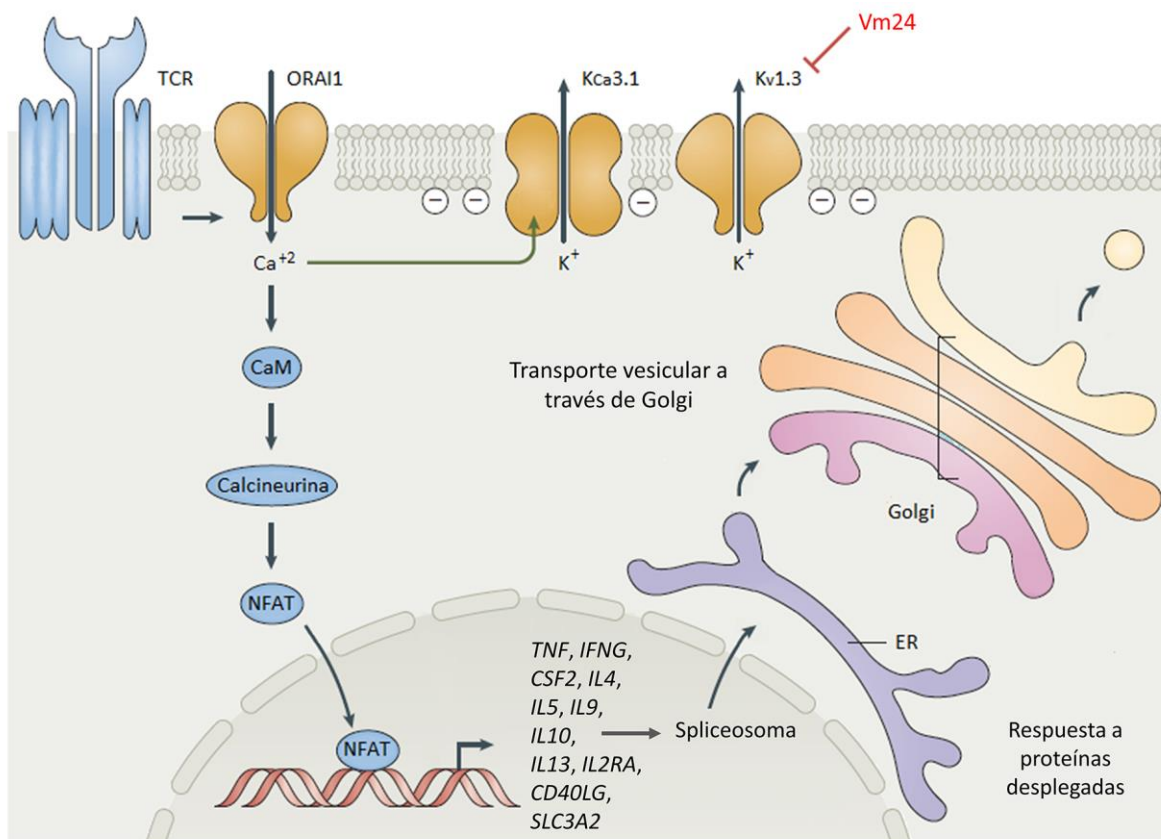
Por otro lado, encontramos que las señales dependientes de los canales  $K_v1.3$  son necesarias para la regulación positiva de CD98 (*SLC3A2*). CD98 conforma la cadena pesada de un heterodímero, unido a través de enlaces disulfuro a una de varias posibles cadenas ligeras. Por ejemplo, el heterodímero CD98/LAT1 forma un transportador de aminoácidos, siendo LAT1 la unidad funcional del complejo y CD98 la chaperona que estabiliza y facilita la translocación de LAT1 a la membrana plasmática. Este transportador bidireccional de aminoácidos regula el intercambio simultáneo de L-glutamina (el aminoácido no esencial más abundante) intracelular por aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina e histidina) extracelulares. La activación de linfocitos T humanos induce dramáticamente la expresión de LAT1, y acelera la captación de aminoácidos esenciales [132]. Además, el ambiente intracelular rico en aminoácidos esenciales generado por LAT1, regula positivamente la vía de señalización de mTOR, promoviendo la supervivencia el crecimiento celular e inhibiendo la autofagia [133]. De esta manera, los canales  $K_v1.3$  aseguran el suministro suficiente y continuo de nutrientes y coordinan vías de señalización que soportan los requerimientos metabólicos aumentados para la generación de una respuesta efectora por parte de los linfocitos  $T_{EM}$ .

En concordancia con nuestros resultados, un estudio proteómico reciente realizado en microglía activada, reveló que el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  atenúa procesos biológicos relacionados con la regulación de la respuesta inmune y el transporte de proteínas intracelulares [134]. Evaluar si esto se extiende a otros tipos celulares se vuelve crítico para apreciar mejor los efectos secundarios potenciales de bloquear los canales  $K_v1.3$  para el tratamiento de trastornos autoinmunes.

Es notable que, de manera general en los experimentos realizados, el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  con la toxina Vm24 en linfocitos  $T_{EM}$   $CD4^+$  activados con OKT3, no impidió por completo la síntesis de moléculas efectoras y citocinas o los cambios proteómicos inducidos por la estimulación a través del TCR, solo evitó que los cambios alcanzaran los niveles más altos. Es posible que los flujos de  $K^+$  residuales a través de los pocos canales  $K_{Ca}3.1$  presentes en estas células, hayan contribuido a esta inhibición "incompleta" [59]. En apoyo de la abundancia relativa de canales  $K_v1.3$  en comparación con la de los canales  $K_{Ca}3.1$  en células  $T_{EM}$ , nuestros datos indican que los canales

K<sub>v</sub>1.3 son los encargados principales del eflujo de K<sup>+</sup>, y aunque no son indispensables para la respuesta de los linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup>, son importantes en la regulación de la amplitud de la respuesta.

Aunque se sabe menos acerca de la función de los canales K<sub>v</sub>1.3 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> humanos, la disminución de las corrientes de K<sub>v</sub>1.3 por enfoques genéticos o farmacológicos, afecta negativamente la diferenciación de linfocitos T<sub>CM</sub> a linfocitos T<sub>EM</sub> y, en estos últimos, dificulta gravemente la proliferación, la secreción de IL-2, TNF y granzima B (pero no la de IFN $\gamma$ ), disminuyendo en última instancia su capacidad para matar células diana [135, 136]. De manera interesante, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> deficientes en NFATc1, muestran niveles disminuidos de ARNm de granzima B y de genes que codifican citocinas y quimiocinas, además de genes que controlan la glucólisis [137], lo que subraya aún más la importancia de los canales K<sub>v</sub>1.3 en la red de señalización Ca<sup>2+</sup>/calcineurina/NFAT.



**Figura 20.** Procesos biológicos afectados por el bloqueo de los canales K<sub>v</sub>1.3 en linfocitos T<sub>EM</sub>. El bloqueo de los canales K<sub>v</sub>1.3 con la toxina Vm24 afecta profundamente la síntesis de moléculas efectoras y citocinas en linfocitos T<sub>EM</sub> estimulados a través del TCR y en consecuencia disminuye la demanda de proteínas que participan en procesos biológicos relacionados con la síntesis de proteínas de novo como la maduración del ARNm, la respuesta a proteínas desplegadas y el transporte de vesículas intracelulares.

Además de explorar la función de los canales  $K_v1.3$  en linfocitos  $T_{EM} CD4^+$  activados, los experimentos que realizamos nos permitieron comparar la eficacia de dos bloqueadores de canales  $K_v1.3$ : la toxina Vm24, aislada del alacrán mexicano *Vaejovis mexicanus* y la toxina ShK, de la anémona *Stichodactyla helianthus*. Su capacidad para atenuar la función de los linfocitos  $T_{EM} CD4^+$  humanos, mostró que ambas toxinas son muy efectivas bloqueando la señalización dependiente de  $K_v1.3$ , ya que ambas inhiben la producción de INF $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 tras la estimulación a través del TCR. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, la capacidad inhibitoria del péptido ShK siempre fue mayor que la de Vm24. El péptido ShK es un bloqueador de canales  $K_v1.3$  muy potente ( $K_d = 10$  pM). Sin embargo, tiene una baja selectividad hacia  $K_v1.3$  (una afinidad de 2.8 veces hacia  $K_v1.3$  sobre otros canales), por lo que es muy tóxico para mamíferos [61, 138]. Dalazatide<sup>®</sup> (anteriormente ShK-186), una molécula derivada de la toxina ShK, es un bloqueador de canales  $K_v1.3$  que ha entrado en ensayos de fase clínica, y ha reducido los niveles de marcadores inflamatorios en plasma y en linfocitos  $T_{EM}$ , y mejorado las lesiones cutáneas leves y moderadas de pacientes con psoriasis [30, 62, 139]. En comparación con Dalazatide<sup>®</sup>, el péptido Vm24 tiene la ventaja de una mayor potencia ( $K_d$  2.9 frente a 69 pM) y selectividad (1,500 veces frente a 100 veces la afinidad hacia  $K_v1.3$  sobre otros canales) [61, 68], lo que mejora el índice de seguridad en condiciones en las que la barrera hematoencefálica (como en esclerosis múltiple) está comprometida, y la presencia de altas concentraciones de bloqueadores inespecíficos (que puedan afectar canales neuronales como  $K_v1.1$ ) en el sistema nervioso central, puede provocar neurotoxicidad grave. Curiosamente, aunque Dalazatide<sup>®</sup> fue bien tolerado durante los ensayos clínicos, los eventos adversos más comunes fueron hipostesia temporal y parestesia en las manos, pies o área perioral, que potencialmente se pueden prevenir con bloqueadores más selectivos de canales  $K_v1.3$ , como la toxina Vm24 u otros bloqueadores de segunda generación derivados de ShK que se han desarrollado recientemente [140].

Debido a su bajo peso molecular, los péptidos bloqueadores de canales  $K_v1.3$  son propensos a una rápida eliminación renal, por lo que se han hecho también esfuerzos para aumentar su masa molecular y prolongar su semivida en plasma, vía conjugación con polietilenglicol (que además reduce su inmunogenicidad, lo protege de proteólisis y de adsorción no específica a superficies inertes) [74], o uniéndolo a proteínas mayores o dominios proteicos (por ejemplo, fusionarlos a albúmina humana o fragmento Fc de anticuerpos). Resulta interesante que estos péptidos son muy poco inmunogénicos, pues probablemente sus estructuras unidas por enlaces disulfuro impiden el adecuado procesamiento y presentación por las CPA [32]. Por otra parte, debido a los altos puntos isoeléctricos de estos péptidos, su absorción por vía oral es difícil. Estos requieren ser depositadas en el tejido subcutáneo, por lo que también se han hecho esfuerzos para generar formulaciones inyectables de liberación lenta para disminuir la frecuencia de aplicación del producto [32].

Recientemente, también se han ensayado formulaciones de absorción en mucosa oral [141] o pulmonar [142] de péptidos bloqueadores de canales  $K_v1.3$ . La mucosa bucal, ofrece fácil acceso, baja actividad enzimática y gran irrigación sanguínea, por lo que las formulaciones pueden

absorberse rápidamente, llegando a la circulación general a través de la vena yugular, evitando el efecto de primer paso en el hígado. A su vez, los pulmones tienen baja actividad enzimática, vascularización muy extensa, epitelio alveolar delgado y una gran superficie de absorción. Con estas novedosas formulaciones, se han alcanzado niveles sanguíneos nanomolares de los péptidos (más altos que las concentraciones picomolares requeridas para tener actividad) y buena biodisponibilidad (alrededor de 40% del péptido administrado alcanza la circulación sistémica) [32].

Finalmente, respecto al tratamiento de la AR con bloqueadores de canales  $K_v1.3$ , las células T autorreactivas patogénicas infiltradas en el sinovio son principalmente linfocitos  $T_{EM}$   $CD4^+$  con una expresión elevada de canales  $K_v1.3$ . En contraste, las células T de los pacientes con AR que tienen otras especificidades antigénicas son en su mayoría linfocitos vírgenes o  $T_{CM}$  que expresan niveles bajos de canales  $K_v1.3$  [30]. En cuanto al uso de Dalazatide® para el tratamiento de AR, este se ha probado en linfocitos  $T_{EM}$  infiltrados en las articulaciones de pacientes, y aunque no impide la formación de la sinapsis inmunológica, suprime la señalización por  $Ca^{+2}$ , la proliferación y la producción de IL-2 e INF $\gamma$  (y en menor medida de IL-4 y TNF) sin afectar la función de otras clases de linfocitos T [30]. Además, los bloqueadores de canales  $K_v1.3$  reducen los signos de enfermedad en la artritis experimental inducida por pristano. En este modelo, la inyección de pristano, un alcano saturado de 19 carbonos (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) induce artritis recurrente crónica en ratas. Autoantígenos restringidos a moléculas MHC clase II inician la respuesta inmune y las células T  $CD4^+$  perpetúan la enfermedad. Desgraciadamente, poco se sabe acerca de las especificidades de estos autoantígenos [143]. En dos estudios previos, ratas inyectadas con pristano y tratadas con vehículo, mostraron periostitis, erosión y deformidad ósea en el análisis radiológico y signos de sinovitis grave con infiltración de células inflamatorias y ulceración de cartílago en los estudios histopatológicos. Por otro lado, las ratas tratadas con bloqueadores de canales  $K_v1.3$  tuvieron puntajes clínicos reducidos, menos articulaciones afectadas durante el curso del tratamiento y mostraron una mejoría significativa en los hallazgos radiológicos e histopatológicos, haciendo de los canales  $K_v1.3$  un buen blanco terapéutico para el tratamiento de AR y posiblemente otras enfermedades autoinmunes [30, 74].

Nuestros resultados muestran que el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  con la toxina Vm24, afecta profundamente la síntesis de moléculas efectoras y citocinas en linfocitos  $T_{EM}$  estimulados a través del TCR y en consecuencia disminuye la demanda de proteínas que participan en procesos biológicos relacionados con la síntesis proteica *de novo* como la maduración del ARNm, la respuesta a proteínas desplegadas y el transporte de vesículas intracelulares. Además, disminuye la expresión de marcadores de activación en linfocitos T de pacientes con AR. Las células  $T_{EM}$  se consideran actores principales en la patología de las enfermedades autoinmunes, por lo que se requieren más estudios para caracterizar los mecanismos moleculares afectados por el bloqueo de los canales  $K_v1.3$  por péptidos como la toxina Vm24.

# **VIII. PERSPECTIVAS**

## VIII. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto inmunomodulador de la toxina Vm24 en:
  - a. Linfocitos T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> aislados de sangre periférica.
  - b. Linfocitos T infiltrados en el sinovio de pacientes con AR.
  - c. Linfocitos T<sub>EM</sub> antígeno-específicos crónicamente estimulados.
2. Evaluar mediante un análisis proteómico el secretoma de linfocitos T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados en presencia o ausencia de la toxina Vm24.

# **IX. REFERENCIAS**



## IX. REFERENCIAS

1. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:11–22. doi:10.1038/nrc1252.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier; 2012.
3. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science (80- )*. 2015;348:aaa6566-aaa6566. doi:10.1126/science.aaa6566.
4. Dong C, Martinez GJ. T cells: the usual subsets. *Nat Rev Immunol*. 2010.
5. Cantrell D. Signaling in Lymphocyte Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7:a018788. doi:10.1101/cshperspect.a018788.
6. Huber M, Lohoff M. IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur J Immunol*. 2014;44:1886–95. doi:10.1002/eji.201344279.
7. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:295–307. doi:10.1038/nri3824.
8. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity*. 2014;41:886–97. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.007.
9. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708–12. doi:10.1038/44385.
10. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745–63. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
11. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. 2001;410:101–5. doi:10.1038/35065111.
12. Gerlach C, Moseman EA, Loughhead SM, Alvarez D, Zwijnenburg AJ, Waanders L, et al. The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity*. 2016;45:1270–84. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.018.
13. Cooper GS, Bynum MLK, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun*. 2009;33:197–207. doi:10.1016/j.jaut.2009.09.008.
14. American Autoimmune Related Diseases Association, Inc. <https://www.aarda.org/>.

15. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Garland Science; 2001.
16. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4:18001. doi:10.1038/nrdp.2018.1.
17. Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Sanin LH, Pérez-Barbosa L, Trejo-Valdivia B, Santana N, et al. Association of Regional and Cultural Factors With the Prevalence of Rheumatoid Arthritis in the Mexican Population. *JCR J Clin Rheumatol*. 2015;21:57–62. doi:10.1097/RHU.000000000000223.
18. Meng W, Zhu Z, Jiang X, Too CL, Uebe S, Jagodic M, et al. DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19:71. doi:10.1186/s13075-017-1276-2.
19. Ruiz-Morales J, Vargas-Alarcón G, Flores-Villanueva P, Villarreal-Garza C, Hernández-Pacheco G, Yamamoto-Furusho J, et al. HLA-DRB1 alleles encoding the “shared epitope” are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the  $\beta$ -chain are protective in Mexican mestizos. *Hum Immunol*. 2004;65:262–9. doi:10.1016/j.humimm.2003.12.009.
20. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA–DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22:293–8. doi:10.1097/BOR.0b013e328336ba63.
21. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol*. 2013;31:142–7. doi:10.1038/nbt.2487.
22. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren A, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:1488–92. doi:10.1136/ard.2007.075192.
23. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365:2205–19. doi:10.1056/NEJMra1004965.
24. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*. 2009;15. doi:10.1038/nm.2050.
25. Chemotherapy and Biotherapy Drugs for Autoimmune Disease. <https://www.americannursestoday.com/chemotherapy-and-biotherapy-drugs-for-autoimmune-disease/>.
26. Zack E. Chemotherapy and Biotherapeutic Agents for Autoimmune Diseases. *Clin J Oncol Nurs*. 2012;16:E125–32. doi:10.1188/12.CJON.E125-E132.

27. Kontzias A, Kotlyar A, Laurence A, Changelian P, O'Shea JJ. Jakinibs: a new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12:464–70. doi:10.1016/j.coph.2012.06.008.
28. American College of Rheumatology. <https://www.rheumatology.org/I-Am-A/Patient-Caregiver/Tratamientos/Citrato-de-Tofacitinib-Xeljanz>.
29. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, et al. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest.* 2003;111:1703–13. doi:10.1172/JCI16921.
30. Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:17414–9. doi:10.1073/pnas.0605136103.
31. George Chandy K, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:280–9. doi:10.1016/j.tips.2004.03.010.
32. Chandy KG, Norton RS. Peptide blockers of Kv1.3 channels in T cells as therapeutics for autoimmune disease. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;38:97–107. doi:10.1016/j.cbpa.2017.02.015.
33. Slavov SN, Gimenes Teixeira HL, Rego EM. The role of micro-ribonucleic acids in normal hematopoiesis and leukemic T-lymphogenesis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2010;43:619–26. doi:10.1590/S0100-879X2010007500057.
34. Attaf M, Legut M, Cole DK, Sewell AK. The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune system. *Clin Exp Immunol.* 2015;181:1–18. doi:10.1111/cei.12622.
35. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and Negative Selection of T Cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139–76. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107.
36. Yates AJ. Theories and Quantification of Thymic Selection. *Front Immunol.* 2014;5 February:1–15. doi:10.3389/fimmu.2014.00013.
37. Mora T, Walczak A. Quantifying lymphocyte receptor diversity. 2016;:1–10. doi:10.1101/046870.
38. Elhanati Y, Sethna Z, Callan CG, Mora T, Walczak AM. Predicting the spectrum of TCR repertoire sharing with a data-driven model of recombination. *Immunol Rev.* 2018;284:167–79. doi:10.1111/imr.12665.
39. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 2017;8 March:1–16. doi:10.3389/fimmu.2017.00292.

40. Dopfer EP, Hartl FA, Oberg H-H, Siegers GM, Yousefi OS, Kock S, et al. The CD3 Conformational Change in the  $\gamma\delta$  T Cell Receptor Is Not Triggered by Antigens but Can Be Enforced to Enhance Tumor Killing. *Cell Rep.* 2014;7:1704–15. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.049.
41. Born WK, Kemal Aydintug M, O'Brien RL. Diversity of  $\gamma\delta$  T-cell antigens. *Cell Mol Immunol.* 2013;10:13–20. doi:10.1038/cmi.2012.45.
42. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:690–702. doi:10.1038/nri2152.
43. Feske S, Wulff H, Skolnik EY. Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:291–353. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112212.
44. Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev.* 2009;231:59–87. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x.
45. HGNC HUGO Gene Nomenclature Committee. <https://www.genenames.org/>.
46. Gutman GA. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57:473–508. doi:10.1124/pr.57.4.10.
47. Wei AD. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57:463–72. doi:10.1124/pr.57.4.9.
48. Kubo Y. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57:509–26. doi:10.1124/pr.57.4.11.
49. Goldstein S a N. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57:527–40. doi:10.1124/pr.57.4.12.
50. Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:115–21. doi:10.1038/nrn727.
51. DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature.* 1984;307:465–8. doi:10.1038/307465a0.
52. Matteson DR, Deutsch C. K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature.* 1984;307:468–71. doi:10.1038/307468a0.
53. Chandy KG. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med.* 1984;160:369–85. doi:10.1084/jem.160.2.369.
54. Grissmer S, Dethlefs B, Wasmuth JJ, Goldin AL, Gutman GA, Cahalan MD, et al. Expression and

chromosomal localization of a lymphocyte K<sup>+</sup> channel gene. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:9411–5. doi:10.1073/pnas.87.23.9411.

55. Verheugen JAH, Vijverberg HPM. Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations and membrane potential fluctuations in intact human T lymphocytes: role of K<sup>+</sup> channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium.* 1995;17:287–300. doi:10.1016/0143-4160(95)90075-6.

56. Beeton C. Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases. *Mol Pharmacol.* 2005;67:1369–81. doi:10.1124/mol.104.008193.

57. Vodnala SK, Eil R, Kishton RJ, Sukumar M, Yamamoto TN, Ha N, et al. T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism. *Science (80- ).* 2019;363:eaau0135. doi:10.1126/science.aau0135.

58. Eil R, Vodnala SK, Clever D, Klebanoff CA, Sukumar M, Pan JH, et al. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature.* 2016;537:539–43. doi:10.1038/nature19364.

59. Chiang EY, Li T, Jeet S, Peng I, Zhang J, Lee WP, et al. Potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 cooperatively and compensatorily regulate antigen-specific memory T cell functions. *Nat Commun.* 2017;8:14644. doi:10.1038/ncomms14644.

60. Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, et al. Selective blockade of T lymphocyte K<sup>+</sup> channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:13942–7. doi:10.1073/pnas.241497298.

61. Chi V, Pennington MW, Norton RS, Tarcha EJ, Londono LM, Sims-Fahey B, et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon.* 2012;59:529–46. doi:10.1016/j.toxicon.2011.07.016.

62. Tarcha EJ, Chi V, Munoz-Elias EJ, Bailey D, Londono LM, Upadhyay SK, et al. Durable Pharmacological Responses from the Peptide ShK-186, a Specific Kv1.3 Channel Inhibitor That Suppresses T Cell Mediators of Autoimmune Disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342:642–53. doi:10.1124/jpet.112.191890.

63. Matheu MP, Beeton C, Garcia A, Chi V, Rangaraju S, Safrina O, et al. Imaging of Effector Memory T Cells during a Delayed-Type Hypersensitivity Reaction and Suppression by Kv1.3 Channel Block. *Immunity.* 2008;29:602–14. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.015.

64. Gocke AR, Lebson LA, Grishkan I V, Hu L, Nguyen HM, Whartenby KA, et al. Kv1.3 Deletion Biases T Cells toward an Immunoregulatory Phenotype and Renders Mice Resistant to Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2012;188:5877–86. doi:10.4049/jimmunol.1103095.

65. Grishkan I V, Tosi DM, Bowman MD, Harary M, Calabresi PA, Gocke AR. Antigenic Stimulation

of Kv1.3-Deficient Th Cells Gives Rise to a Population of Foxp3-Independent T Cells with Suppressive Properties. *J Immunol.* 2015;195:1399–407. doi:10.4049/jimmunol.1403024.

66. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon.* 2013;76:328–42. doi:10.1016/j.toxicon.2013.07.012.

67. Chhabra S, Chang SC, Nguyen HM, Huq R, Tanner MR, Londono LM, et al. Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: implications for autoimmune diseases. *FASEB J.* 2014;28:3952–64. doi:10.1096/fj.14-251967.

68. Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodriguez de la Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, et al. Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells. *Mol Pharmacol.* 2012;82:372–82. doi:10.1124/mol.112.078006.

69. Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:982–1001. doi:10.1038/nrd2983.

70. Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature.* 1982;296:90–1. doi:10.1038/296090a0.

71. Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol.* 1994;45:1227–34.

72. Hu L, Pennington M, Jiang Q, Whartenby KA, Calabresi PA. Characterization of the Functional Properties of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 in Human CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes. *J Immunol.* 2007;179:4563–70. doi:10.4049/jimmunol.179.7.4563.

73. Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, et al. ShK-Dap 22 , a Potent Kv1.3-specific Immunosuppressive Polypeptide. *J Biol Chem.* 1998;273:32697–707. doi:10.1074/jbc.273.49.32697.

74. Tanner MR, Tajhya RB, Huq R, Gehrmann EJ, Rodarte KE, Atik MA, et al. Prolonged immunomodulation in inflammatory arthritis using the selective Kv1.3 channel blocker HsTX1[R14A] and its PEGylated analog. *Clin Immunol.* 2017;180:45–57. doi:10.1016/j.clim.2017.03.014.

75. Azam P, Sankaranarayanan A, Homerick D, Griffey S, Wulff H. Targeting Effector Memory T Cells with the Small Molecule Kv1.3 Blocker PAP-1 Suppresses Allergic Contact Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1419–29. doi:10.1038/sj.jid.5700717.

76. Ueyama A, Imura K, Kasai-Yamamoto E, Tai N, Nagira M, Shichijo M, et al. Kv1.3 blockers ameliorate allergic contact dermatitis by preferentially suppressing effector memory T cells in a rat model. *Clin Exp Dermatol.* 2013;38:897–903. doi:10.1111/ced.12097.

77. Koshy S, Huq R, Tanner MR, Atik MA, Porter PC, Khan FS, et al. Blocking Kv 1.3 Channels Inhibits Th2 Lymphocyte Function and Treats a Rat Model of Asthma. *J Biol Chem*. 2014;289:12623–32. doi:10.1074/jbc.M113.517037.
78. Valverde P, Kawai T, Taubman MA. Selective Blockade of Voltage-Gated Potassium Channels Reduces Inflammatory Bone Resorption in Experimental Periodontal Disease. *J Bone Miner Res*. 2003;19:155–64. doi:10.1359/jbmr.0301213.
79. Lourenço WR. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2018;24:1. doi:10.1186/s40409-017-0138-3.
80. The Scorpion Files. <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>.
81. Santibáñez-López C, Francke O, Ureta C, Possani L. Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity. *Toxins (Basel)*. 2015;8:2. doi:10.3390/toxins8010002.
82. Santibáñez-López CE, Francke OF, Prendini L. Shining a light into the world's deepest caves: phylogenetic systematics of the troglobiotic scorpion genus *Alacran* Francke, 1982 (Typhlochactidae : Alacraninae). *Invertebr Syst*. 2014;28:643. doi:10.1071/IS14035.
83. Francke OF. Biodiversidad de Arthropoda (Chelicerata: Arachnida ex Acari) en México. *Rev Mex Biodivers*. 2014;85:408–18. doi:10.7550/rmb.31914.
84. Riaño-Umbarila L, Rodríguez-Rodríguez ER, Santibáñez-López CE, Güereca L, Uribe-Romero SJ, Gómez-Ramírez I V., et al. Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*. 2017;138:130–7. doi:10.1016/j.toxicon.2017.08.022.
85. González-Santillán E, Possani LD. North American scorpion species of public health importance with a reappraisal of historical epidemiology. *Acta Trop*. 2018;187 May:264–74. doi:10.1016/j.actatropica.2018.08.002.
86. Handbook of Biologically Active Peptides. Elsevier; 2006. doi:10.1016/B978-0-12-369442-3.X5001-6.
87. Koppenhöfer E, Schmidt H. Incomplete sodium inactivation in nodes of ranvier treated with scorpion venom. *Experientia*. 1968;24:41–2. doi:10.1007/BF02136780.
88. Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion  $\alpha$ -toxins. *Toxicon*. 2007;49:142–58. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.023.
89. Pedraza-Escalona M, Possani LD. Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Front Biosci Landmark*. 2013;0926:77–81.
90. Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. 2007;49:124–41. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.022.

91. Pedarzani P, D'hoedt D, Doorty KB, Wadsworth JDF, Joseph JS, Jeyaseelan K, et al. Tamapin, a Venom Peptide from the Indian Red Scorpion ( *Mesobuthus tamulus* ) That Targets Small Conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> Channels and Afterhyperpolarization Currents in Central Neurons. *J Biol Chem.* 2002;277:46101–9. doi:10.1074/jbc.M206465200.
92. Dardevet L, Rani D, Aziz T, Bazin I, Sabatier J-M, Fadl M, et al. Chlorotoxin: A Helpful Natural Scorpion Peptide to Diagnose Glioma and Fight Tumor Invasion. *Toxins (Basel).* 2015;7:1079–101. doi:10.3390/toxins7041079.
93. Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. *Glia.* 2002;39:162–73. doi:10.1002/glia.10083.
94. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin Inhibits Glioma Cell Invasion via Matrix Metalloproteinase-2. *J Biol Chem.* 2003;278:4135–44. doi:10.1074/jbc.M205662200.
95. Gurrola GB, Hernández-López RA, Rodríguez de la Vega RC, Varga Z, Batista CVF, Salas-Castillo SP, et al. Structure, Function, and Chemical Synthesis of *Vaejovis mexicanus* Peptide 24: A Novel Potent Blocker of Kv1.3 Potassium Channels of Human T Lymphocytes. *Biochemistry.* 2012;51:4049–61. doi:10.1021/bi300060n.
96. Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, et al. Topology of the pore-region of a K<sup>+</sup> channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron.* 1995;15:1169–81. doi:10.1016/0896-6273(95)90104-3.
97. Aiyar J, Rizzi JP, Gutman GA, Chandy KG. The Signature Sequence of Voltage-gated Potassium Channels Projects into the External Vestibule. *J Biol Chem.* 1996;271:31013–6. doi:10.1074/jbc.271.49.31013.
98. Rauer H, Pennington M, Cahalan M, Chandy KG. Structural Conservation of the Pores of Calcium-activated and Voltage-gated Potassium Channels Determined by a Sea Anemone Toxin. *J Biol Chem.* 1999;274:21885–92. doi:10.1074/jbc.274.31.21885.
99. Stehling EG, Sforça ML, Zanchin NIT, Oyama S, Pignatelli A, Belluzzi O, et al. Looking over Toxin–K<sup>+</sup> Channel Interactions. Clues from the Structural and Functional Characterization of  $\alpha$ -KTx Toxin Tc32, a Kv1.3 Channel Blocker. *Biochemistry.* 2012;51:1885–94. doi:10.1021/bi201713z.
100. Mouhat S, Mosbah A, Visan V, Wulff H, Delepierre M, Darbon H, et al. The functional dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *Biochem J.* 2004;377:25–36. doi:10.1042/bj20030115.
101. Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O. Protein profiling of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Proteomics.* 2012;12:2862–5. doi:10.1002/pmic.201200152.
102. Murillo A, Vera-Estrella R, Barkla BJ, Méndez E, Arias CF. Identification of Host Cell Factors



Associated with Astrovirus Replication in Caco-2 Cells. *J Virol.* 2015;89:10359–70. doi:10.1128/JVI.01225-15.

103. Beavis RC. Using the Global Proteome Machine for Protein Identification. In: Nedelkov D, Nelson RW, editors. *New and Emerging Proteomic Techniques*. New Jersey: Humana Press; 2006. p. 217–28. doi:10.1385/1-59745-026-X:217.

104. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search. *Anal Chem.* 2002;74:5383–92. doi:10.1021/ac025747h.

105. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A Statistical Model for Identifying Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2003;75:4646–58. doi:10.1021/ac0341261.

106. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4:1265–72. doi:10.1074/mcp.M500061-MCP200.

107. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D447–52. doi:10.1093/nar/gku1003.

108. Howe E, Holton K, Nair S, Schlauch D, Sinha R, Quackenbush J. Biomedical Informatics for Cancer Research. In: Ochs MF, Casagrande JT, Davuluri R V., editors. *Biomedical Informatics for Cancer Research*. Boston, MA: Springer US; 2010. p. 267–77. doi:10.1007/978-1-4419-5714-6.

109. Kundu-Raychaudhuri S, Chen Y-J, Wulff H, Raychaudhuri SP. Kv1.3 in psoriatic disease: PAP-1, a small molecule inhibitor of Kv1.3 is effective in the SCID mouse psoriasis – Xenograft model. *J Autoimmun.* 2014;55:63–72. doi:10.1016/j.jaut.2014.07.003.

110. Schuh K, Twardzik T, Kneitz B, Heyer J, Schimpl A, Serfling E. The Interleukin 2 Receptor  $\alpha$  Chain/CD25 Promoter Is a Target for Nuclear Factor of Activated T Cells. *J Exp Med.* 1998;188:1369–73. doi:10.1084/jem.188.7.1369.

111. Tsytsykova A V., Tsitsikov EN, Geha RS. The CD40L Promoter Contains Nuclear Factor of Activated T Cells-binding Motifs Which Require AP-1 Binding for Activation of Transcription. *J Biol Chem.* 1996;271:3763–70. doi:10.1074/jbc.271.7.3763.

112. Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, et al. Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the Interferon- $\gamma$  Promoter. *J Biol Chem.* 1997;272:30412–20. doi:10.1074/jbc.272.48.30412.

113. Kaminuma O, Kitamura F, Kitamura N, Hiroi T, Miyoshi H, Miyawaki A, et al. Differential Contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- $\alpha$  Gene Expression in T Cells. *J Immunol.*

2008;180:319–26. doi:10.4049/jimmunol.180.1.319.

114. Goldfeld AE. Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. *J Exp Med*. 1993;178:1365–79. doi:10.1084/jem.178.4.1365.

115. McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A. The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- $\alpha$  gene transcription. *J Biol Chem*. 1994;269:30445–50.

116. Szabo SJ, Gold JS, Murphy TL, Murphy KM. Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF- $\kappa$ B and NF-ATc. *Mol Cell Biol*. 1993;13:4793–805. doi:10.1128/MCB.13.8.4793.

117. Chuvpilo S, Schomberg C, Gerwig R, Heinfling A, Reeves R, Grummt F, et al. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:5694–704. doi:10.1093/nar/21.24.5694.

118. Rooney JW, Hodge MR, McCaffrey PG, Rao A, Glimcher LH. A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression. *EMBO J*. 1994;13:625–33. doi:https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06300.x.

119. Stranick KS, Zambas DN, Uss AS, Egan RW, Billah MM, Umland SP. Identification of Transcription Factor Binding Sites Important in the Regulation of the Human Interleukin-5 Gene. *J Biol Chem*. 1997;272:16453–65. doi:10.1074/jbc.272.26.16453.

120. Lee HJ, Masuda ES, Arai N, Arai K, Yokota T. Definition of cis -Regulatory Elements of the Mouse Interleukin-5 Gene Promoter. *J Biol Chem*. 1995;270:17541–50. doi:10.1074/jbc.270.29.17541.

121. Jash A, Sahoo A, Kim G-C, Chae C-S, Hwang J-S, Kim J-E, et al. Nuclear Factor of Activated T Cells 1 (NFAT1)-induced Permissive Chromatin Modification Facilitates Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-mediated Interleukin-9 (IL-9) Transactivation. *J Biol Chem*. 2012;287:15445–57. doi:10.1074/jbc.M112.340356.

122. Macian F. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J*. 2000;19:4783–95. doi:10.1093/emboj/19.17.4783.

123. Martín P, Gómez M, Lamana A, Marín AM, Cortés JR, Ramírez-Huesca M, et al. The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:355–365.e3. doi:10.1016/j.jaci.2010.05.010.

124. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*. 2005;26:136–40. doi:10.1016/j.it.2004.12.006.

125. Im S-H, Hueber A, Monticelli S, Kang K-H, Rao A. Chromatin-level Regulation of the IL10 Gene in T Cells. *J Biol Chem*. 2004;279:46818–25. doi:10.1074/jbc.M401722200.

126. Lee C-G, Kang K-H, So J-S, Kwon H-K, Son J-S, Song M-K, et al. A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Mol Immunol*. 2009;46:613–21. doi:10.1016/j.molimm.2008.07.037.
127. Shachar I, Karin N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol*. 2013;93:51–61. doi:10.1189/jlb.0612293.
128. Biswas PS, Bhagat G, Pernis AB. IRF4 and its regulators: evolving insights into the pathogenesis of inflammatory arthritis? *Immunol Rev*. 2010;233:79–96. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00864.x.
129. Raczkowski F, Ritter J, Heesch K, Schumacher V, Guralnik A, Hocker L, et al. The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:15019–24. doi:10.1073/pnas.1309378110.
130. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells. *Immunity*. 2010;33:192–202. doi:10.1016/j.immuni.2010.07.014.
131. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:469–84. doi:10.1038/nri.2016.62.
132. Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Sagara H, Anzai N. LAT1 Is a Critical Transporter of Essential Amino Acids for Immune Reactions in Activated Human T Cells. *J Immunol*. 2013;191:4080–5. doi:10.4049/jimmunol.1300923.
133. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell*. 2009;136:521–34. doi:10.1016/j.cell.2008.11.044.
134. Rangaraju S, Raza SA, Pennati A, Deng Q, Dammer EB, Duong D, et al. A systems pharmacology-based approach to identify novel Kv1.3 channel-dependent mechanisms in microglial activation. *J Neuroinflammation*. 2017;14:128. doi:10.1186/s12974-017-0906-6.
135. Hu L, Wang T, Gocke AR, Nath A, Zhang H, Margolick JB, et al. Blockade of Kv1.3 Potassium Channels Inhibits Differentiation and Granzyme B Secretion of Human CD8+ T Effector Memory Lymphocytes. *PLoS One*. 2013;8:e54267. doi:10.1371/journal.pone.0054267.
136. Sim JH, Kim KS, Park H, Kim K-J, Lin H, Kim T-J, et al. Differentially Expressed Potassium Channels Are Associated with Function of Human Effector Memory CD8+ T Cells. *Front Immunol*. 2017;8:1–12. doi:10.3389/fimmu.2017.00859.
137. Klein-Hessling S, Muhammad K, Klein M, Pusch T, Rudolf R, Flöter J, et al. NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. *Nat Commun*. 2017;8:511. doi:10.1038/s41467-017-00612-6.

138. Castañeda O, Sotolongo V, Amor AM, Stöcklin R, Anderson AJ, Harvey AL, et al. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 1995;33:603–13. doi:10.1016/0041-0101(95)00013-C.
139. Tarcha EJ, Olsen CM, Probst P, Peckham D, Muñoz-Elías EJ, Kruger JG, et al. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *PLoS One*. 2017;12:e0180762. doi:10.1371/journal.pone.0180762.
140. Pennington M, Chang S, Chauhan S, Huq R, Tajhya R, Chhabra S, et al. Development of Highly Selective Kv1.3-Blocking Peptides Based on the Sea Anemone Peptide ShK. *Mar Drugs*. 2015;13:529–42. doi:10.3390/md13010529.
141. Jin L, Boyd BJ, Larson IC, Pennington MW, Norton RS, Nicolazzo JA. Enabling Noninvasive Systemic Delivery of the Kv1.3-Blocking Peptide HsTX1[R14A] via the Buccal Mucosa. *J Pharm Sci*. 2016;105:2173–9. doi:10.1016/j.xphs.2016.05.008.
142. Jin L, Zhou QT, Chan H-K, Larson IC, Pennington MW, Morales RAV, et al. Pulmonary Delivery of the Kv1.3-Blocking Peptide HsTX1[R14A] for the Treatment of Autoimmune Diseases. *J Pharm Sci*. 2016;105:650–6. doi:10.1016/j.xphs.2015.10.025.
143. Tuncel J, Haag S, Hoffmann MH, Yau ACY, Hultqvist M, Olofsson P, et al. Animal Models of Rheumatoid Arthritis (I): Pristane-Induced Arthritis in the Rat. *PLoS One*. 2016;11:e0155936. doi:10.1371/journal.pone.0155936.