

Universidad Miguel Hernández de Elche

Grado en Biotecnología

Área de Bioquímica y Biología Molecular



**Generación de una línea celular
que expresa establemente los
canales Kv7.2 y Kv7.3**

Trabajo Fin de Grado

Curso 2015/2016

Autor

Eva María Villalba Riquelme

Tutores

Antonio Ferrer Montiel

Roberto de la Torre Martínez

Verónica Rivero Hernández

Resumen

Actualmente, el dolor crónico se ha convertido en una de las enfermedades con mayor impacto en la sociedad, afectando aproximadamente a un 20% de la población europea. A pesar de su gran relevancia, aún no se ha desarrollado un tratamiento satisfactorio para esta patología, debido a los efectos secundarios de los analgésicos utilizados.

Consecuentemente, se requiere el desarrollo de analgésicos con mejor índice terapéutico. Para ello, conviene explorar nuevos blancos terapéuticos, como los canales de potasio. Entre éstos, los canales Kv7.2 y Kv7.3 han surgido como primordiales en el control de la excitabilidad de los nociceptores. Con el fin de identificar activadores de estos canales, hemos puesto a punto un método de cribado de alto rendimiento, basado en la obtención de una línea celular que expresa establemente estos canales.

Palabras clave

Dolor crónico, Kv7.2, Kv7.3, línea celular

Abstract

At present, chronic pain has become one of the highest-impact diseases in society, affecting around 20% of European population. Despite of its high relevance, any satisfactory treatment for this pathology has been developed yet, due to secondary effects of the analgesics employed.

Consequently, the development of analgesics with a better therapeutic index is required. To that end, it is necessary to explore new therapeutic targets, as potassium channels. Amongst them, Kv7.2 and Kv7.3 channels have emerged as crucial regulators of nociceptor excitability. With the aim to identify specific activators for these channels, herein, it has been set up a high throughput screening method, based on the generation of a cell line stably expressing both channels.

Keywords

Chronic pain, Kv7.2, Kv7.3, cell line

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

BNFC: Convulsiones Neonatales Familiares Benignas

BK_{Ca}: Canales de potasio activados por calcio

CF: Contraste de Fases

CMV: Promotor inmediato-temprano del citomegalovirus humano

CO₂: Dióxido de carbono

DMEM: *Dubelcco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC₅₀: Concentración de compuesto que produce la mitad de la respuesta máxima

FBS: Suero Fetal Bovino

G: Conductancia

GABA: Ácido gamma-butírico

HEK293: *Human Embryonic Kidney 293*

I_{70mV}: Intensidad de corriente medida a un voltaje de 70 mV

K⁺: Cation potasio

K2P: Canales de potasio de dos poros

K_{ir}: Canales de potasio rectificadores de entrada

Kv: Canales iónicos de potasio dependientes de voltaje

LD₅₀: Dosis de un compuesto que produce el 50% de letalidad

mEYFP: ADNc que codifica la proteína YFP potenciada con la mutación A206K

N: Número de experimentos distintos

n: Número de células

Na⁺: Cation sodio

NeoR: secuencia que codifica una fosfotransfera que confiere resistencia a diversos antibióticos entre los que se encuentra la geneticina

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RTG: Retigabina

T^a: Temperatura

V: Voltaje

V_{0.5}: Voltaje que produce la activación de la mitad de una población de canales iónicos

V_h: Voltaje umbral

YFP: Proteína Fluorescente Amarilla

Agradecimientos

La vida te da sorpresas y, sin duda, una de ellas, ha sido encontrarme con este gran grupo. A los ferrerines y sus allegados: Antonio Ferrer, Ángeles, Antonio Zafra, Asia, Cloti, Cristoph, Gema, Isa, Jan Albert, Jose, Laura, Magdalena, Maite, Mónica, Maria Grazia, Nuria, Paco, Roberto cp, Roberto sp, Sakthi, Sergio y Vero. Porque hasta los peores días en el laboratorio son maravillosos gracias a vosotros.

A Antonio Ferrer, por haberme dado un sueño: la oportunidad de acercarme a la ciencia, de ilusionarme con un proyecto, de aprender, de estrellarme y de volverme a levantar. Por todas tus enseñanzas y por tu apoyo. Ha sido una experiencia increíble que no puedo definir con palabras.

A Laura y a Jose, por echarme una mano siempre que lo he necesitado, por todas las conversaciones y las risas en el zulo!!! 😊

A Maite, por haberme ayudado tanto tantas veces, en mi lucha con las PCRs, con el microscopio de fluorescencia y por avisarme de que el pollo de los lunes de la cafetería es el mismo que el de los viernes!!! Brilla estrellita!!! 😊

A Vero, por tu apoyo constante, por las innumerables horas extras que me has dedicado, por todo lo que me haces reír y porque hay millones de bacterias para las que significas el mundo!!! Y recuerda que pase lo que pase, sigues siendo genial!!! 😊

Pero, sobre todo, al genio de la electrofisiología, al mago del patch, a un científico brillante, a un profesor ejemplar... es un súper tutor y se llama: Rooooberto!!! :D (Quédense con este nombre, hay que ficharlo!!! 😊) Muchíiiiisimas gracias por... por todo!!!

Por otro lado, agradecer a mis compañeras de viaje, “las chochis”, y a “los jovenzuelos”, porque sois unos grandes amigos.

Y especialmente a mi familia, porque he tenido la mejor suerte del mundo sin jugar a la lotería 😊. A mi hermana, mis padres, mi tía, mis abuelos, mis tíos... porque sois extraordinarios!!! Porque nada de esto habría sido posible sin vosotros. Porque jamás podré agradeceros todo lo que habéis hecho y hacéis por mí.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
EL DOLOR	1
IMPACTO DEL DOLOR CRÓNICO EN LA SOCIEDAD	1
FISIOPATOLOGÍA DEL DOLOR	2
CANALES IÓNICOS DE K ⁺	4
OTRAS APLICACIONES	6
GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR QUE EXPRESA ESTABLEMENTE LOS CANALES IÓNICOS Kv7.2 Y Kv7.3	6
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
RESULTADOS.....	16
CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS HEK293 NO TRANSFECTADAS	16
LD ₅₀ DE GENETICINA	17
TRANSFECCIÓN	19
<i>Cotransfección 1:1</i>	21
<i>Cotransfección 5:1</i>	23
<i>Transfección de mEYFP-Kv7.3 sobre células que expresan Kv7.2</i>	26
CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA LÍNEA Kv 7.2/MEYFP-Kv7.3 DESARROLLADA	31
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	36
BIBLIOGRAFÍA	37

Introducción

El dolor

El dolor se define como una señal molesta o desagradable que nos alerta ante la exposición a estímulos nocivos tan diversos como: las temperaturas y presiones extremas, la presencia de moléculas tóxicas o de mediadores inflamatorios [1].

Por su importancia, la función biológica del dolor y sus disfunciones han sido ampliamente estudiadas. Alteraciones en la vía de señalización del dolor conducen a ciertas situaciones patológicas. En un extremo, las personas que no pueden sentir dolor son propensas a desarrollar infecciones persistentes, autolesionarse y suelen tener una esperanza de vida reducida. En contraposición, si esta sensación de dolor persiste de forma prolongada, incluso en ausencia de estímulos nocivos, este mecanismo de alerta dejará de tener una función protectora, convirtiéndose en un serio problema de salud, el dolor crónico [1-3].

Impacto del dolor crónico en la sociedad

El dolor crónico es una de las enfermedades con mayor impacto en la población. Se estima que, aproximadamente, el 20% de la población europea padece dolor crónico y se considera la principal causa de incapacidad en Estados Unidos [4, 5].

Se trata de una patología que reduce significativamente la calidad de vida de las personas afectadas [4, 5]. En estudios previos realizados en Europa e Israel, se mostró que 2 de cada 3 personas con dolor crónico tenían más dificultades para dormir. La mitad de los encuestados veían disminuida su capacidad de caminar y de desempeñar tareas cotidianas con normalidad debido a esta patología. Además, 1 de cada 5 pacientes habría sido diagnosticado de depresión como consecuencia de esta enfermedad [6].

Dentro del ámbito económico, esta enfermedad conlleva una notable reducción de la productividad y efectividad de los trabajadores. Este hecho unido al coste sanitario de su tratamiento, resultan en elevadas pérdidas económicas para la sociedad. Sólo en Estados Unidos se calcula que en 2010, el coste total asociado al dolor estaba comprendido entre 560 y 650 mil millones de dólares. De esta forma, el coste anual del dolor sería mayor que el asociado a otras enfermedades como cáncer, patologías cardíacas o diabetes [7].

En consecuencia, el dolor crónico presenta una gran implicación tanto social como económica, reduciendo notablemente la calidad de vida de un sector muy amplio de la población y resultando en elevados costes para la sociedad.

Actualmente, debido a su gran incidencia en la población, la búsqueda de nuevos fármacos más eficaces para el tratamiento y prevención del dolor crónico continúa siendo un gran reto en investigación biomédica. El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen al dolor crónico podría ser la clave para mejorar la calidad de vida de millones de personas.

Fisiopatología del dolor

Desde la detección de un estímulo hasta su percepción como dolor se pueden distinguir 4 etapas distintas: transducción, transmisión, modulación y percepción.

La transducción es el proceso por el cual un estímulo nocivo se convierte en una señal eléctrica. Los estímulos nocivos se detectan en unas neuronas primarias aferentes especializadas (fibras A-delta y fibras C) denominadas nociceptores, que están distribuidas por la mayor parte del cuerpo [1]. Si el estímulo supera un determinado umbral, estas neuronas se despolarizarán y dispararán un pulso eléctrico conocido como potencial de acción.

En la transmisión, los impulsos eléctricos generados se dirigirán al asta dorsal de la médula espinal, a través de estas neuronas primarias aferentes. Desde este punto, se enviarán al tálamo desde donde se mandarán al córtex cerebral [8, 9].

Además, la señal del dolor está sometida a modulación. Es decir, puede ser amplificada o inhibida a distintos niveles por mecanismos endógenos o exógenos.

Finalmente, la percepción del dolor consiste en el procesamiento de estos impulsos eléctricos que llegan al cerebro para traducirlos en una sensación dolorosa. La percepción varía enormemente entre distintos individuos. De hecho, el entorno, los factores psicológicos y los factores físicos de cada persona pueden influir en la intensidad con que se percibe la sensación dolorosa.

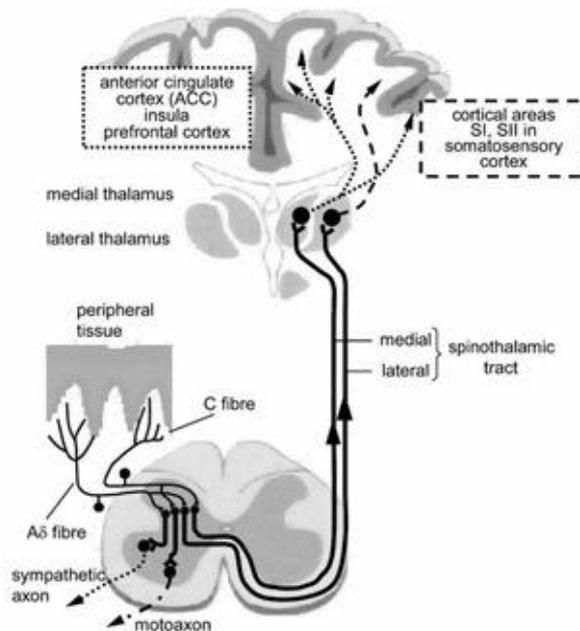


Figura 1. Esquema de las vías de transmisión del dolor periférico [10].

El dolor crónico se percibe por un aumento de la excitabilidad neuronal (hiperexcitabilidad) debido a una desregulación en estas vías de transmisión. Esta alteración puede deberse a distintas causas y, en función de ellas, se pueden distinguir tres tipos de dolor: nociceptivo, neuropático o inflamatorio.

- **Dolor nociceptivo:** la exposición intensa o de larga duración a un estímulo nocivo puede desencadenar una sensibilización de los nociceptores. De esta forma, el umbral de señal necesario para disparar un potencial de acción se reduce. Como consecuencia, las personas con dolor nociceptivo presentarán una respuesta exagerada frente a estímulos nocivos (hiperalgesia) o detectarán como dolorosos, estímulos que no lo son (alodinia) [11].
- **Dolor neuropático:** la activación de los nervios periféricos se produce en respuesta a una lesión neuronal. Esto hace que se generen potenciales de acción que se traducen en señales dolorosas en ausencia de un estímulo nocivo [11].
- **Dolor inflamatorio:** se produce como consecuencia de la liberación de mediadores que activan la vía de señalización del dolor tras una inflamación [12].

Puesto que la transmisión de los potenciales de acción es común en estos tres tipos de dolor, a pesar de las diferencias en los factores causantes, la regulación de este proceso podría servir para tratar estas categorías de forma conjunta.

En la transmisión de los estímulos eléctricos participan canales iónicos dependientes de voltaje. Más específicamente, canales de sodio (Na^+) y canales de potasio (K^+). Los canales de Na^+ se abren en

respuesta a un estímulo que supera el voltaje umbral de activación de estos canales. Esto produce el disparo del potencial de acción. Los canales de K^+ se encargan de compensar esta despolarización devolviendo el potencial de membrana a su nivel basal [9].

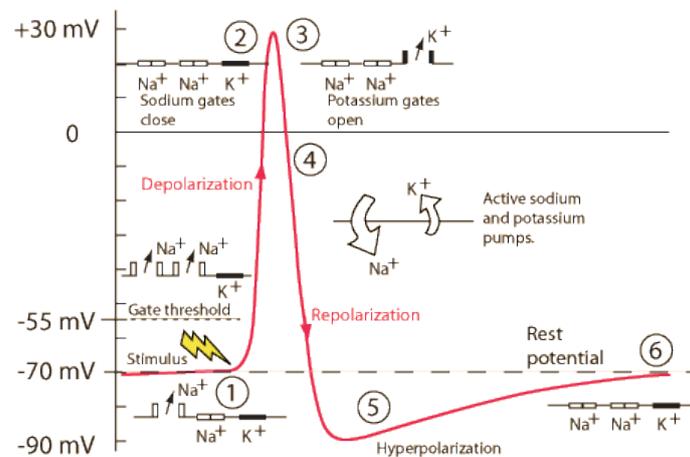


Figura 2. Estructura de un potencial de acción [13].

De esta manera, en situaciones de hiperexcitabilidad neuronal, como en el dolor crónico, en las que se propagan más potenciales de acción que en condiciones normales, tanto el bloqueo de estos canales de Na^+ , como la activación de dichos canales de K^+ servirá para reducir la propagación del impulso nervioso.

Aunque ambas son importantes estrategias para desarrollar compuestos que traten el dolor (analgésicos), ante la imposibilidad de abordar ambas estrategias conjuntamente, en este trabajo nos centraremos solamente en los canales de K^+ .

Canales iónicos de K^+

Actualmente se conoce una gran variedad de canales iónicos de K^+ . Los canales de K^+ son proteínas transmembrana que conducen iones de K^+ a favor de gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática. En muchos tipos celulares son los principales determinantes de su potencial de reposo. Al ser un grupo muy amplio de canales, están implicados en funciones tan diversas como el control de la duración y frecuencia de los potenciales de acción, el transporte de electrolitos, el control de la secreción hormonal o la proliferación celular [14].

De acuerdo con sus características fisiológicas y estructurales, estos canales se pueden dividir en cuatro grupos distintos: canales de potasio activados por voltaje (K_v), canales de potasio de dos poros (K_2P), canales de potasio activados por calcio (BK_{Ca}) y canales de potasio rectificadores de entrada (K_{ir}) [14].

De estos cuatro grupos, los canales iónicos Kv constituyen el grupo más amplio. De hecho, en humanos se han encontrado 40 genes que codifican para estos canales. Estos canales se caracterizan porque se activan debido a una despolarización de la membrana plasmática [15].

Este grupo se puede subdividir a su vez en distintas subfamilias, entre las que se encuentran los canales Kv7. La subfamilia Kv7 está formada por cinco canales (Kv7.1-7.5), cuatro de los cuales (Kv7.2-7.5), están presentes en el sistema nervioso [16].

En nuestro caso, por su implicación en la transmisión de las señales dolorosas, adquieren especial interés los canales iónicos Kv7.2 y Kv7.3. Ambos canales se asocian formando un heterotetrámero que en muchas neuronas es el principal responsable de generar una corriente de iones de K^+ no inactivante, denominada corriente M [17].

Estos canales se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico [15, 16, 18]. En el sistema nervioso periférico regulan la excitabilidad neuronal de las fibras A y C (Figura 3).

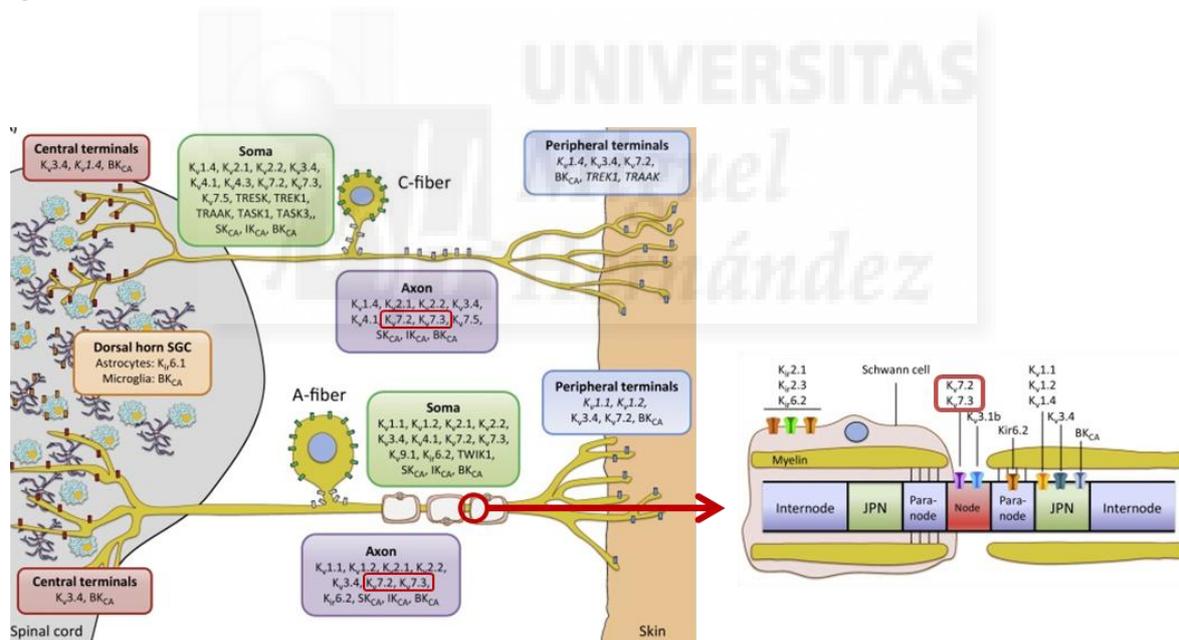


Figura 3. Localización de los canales Kv7.2 y Kv7.3 en las vías de transmisión del dolor. Los canales Kv7.2 y Kv7.3 se encuentran en el nodo de los axones de las fibras A y C que comunican las terminaciones periféricas con el asta dorsal. [14]

Estos canales presentan unas características muy específicas que hacen que jueguen un papel crítico en la estabilización del potencial de membrana neuronal [19].

En primer lugar, estos canales se activan a potenciales inferiores al umbral de disparo (alrededor de -60 mV) generando una corriente de salida que se opone a la presencia de una ligera despolarización de la membrana. De esta forma, se consigue estabilizar el potencial de membrana, recuperando el nivel basal de excitabilidad neuronal.

En segundo lugar, la corriente de salida generada mayoritariamente por los canales Kv7.2/7.3 es una corriente no inactivante de K^+ . Al tratarse de una corriente no inactivante, mientras dure un estímulo excitatorio, esta corriente estará activa compensando la despolarización producida por el estímulo. Esto hace que esta corriente sea esencial para el control de la generación de potenciales de acción repetitivos.

Por todo ésto, el heterotetrámero formado por los canales Kv7.2 y Kv7.3 se considera una potencial diana terapéutica para el tratamiento del dolor crónico. En estas situaciones patológicas de hiperexcitabilidad, una potenciación de la corriente M mediante la activación de estos canales, conseguirá restablecer la excitabilidad neuronal a niveles normales.

Otras aplicaciones

Si bien nos hemos centrado en el tratamiento del dolor crónico, la modulación del heterotetrámero Kv7.2/7.3 ha sido descrita adicionalmente como una oportunidad prometedora para el tratamiento de otras enfermedades ocasionadas por una descarga neuronal excesiva, como la epilepsia [17].

Otro hecho que indica su importancia en esta enfermedad es que las mutaciones de pérdida de función de estos canales causan una forma de epilepsia denominada convulsiones neonatales familiares benignas (BFNC) [19].

Generación de una línea celular que expresa establemente los canales iónicos Kv7.2 y Kv7.3

En condiciones normales, Kv7.2 y Kv7.3 se encuentran en neuronas que expresan adicionalmente una enorme variedad de canales iónicos distintos que podrían interferir en el estudio de éstos. Por este motivo, para poder estudiar e identificar activadores específicos de estos canales iónicos es necesario un vehículo de expresión que permita su estudio de forma aislada. Una estrategia para resolver este problema es el desarrollo de una línea celular que establemente exprese de forma heteróloga las subunidades Kv7.2 y Kv7.3.

Las líneas celulares estables proporcionan una población de células genéticamente homogénea que expresa de forma estable una molécula de interés. Actualmente, constituyen una herramienta de laboratorio esencial para un gran número de aplicaciones como la sobreexpresión de proteínas de interés, el estudio de la función de genes, la producción de proteínas terapéuticas o experimentales o el cribado de potenciales fármacos [20].

En este trabajo, con el objetivo de poder estudiar específicamente los canales iónicos Kv7.2 y Kv7.3 y con el de identificar posteriormente activadores potenciales de los mismos, se ha generado una línea celular que expresa de forma estable estas dianas terapéuticas.



Antecedentes y Objetivos

Anteriormente, el estudio de los canales iónicos Kv7.2/7.3, como posible diana terapéutica frente al dolor y a la epilepsia, ya ha sido abordado en numerosos estudios [14, 17, 18, 21]. Sin embargo, hasta el momento, solamente se han aprobado dos compuestos activadores de estos canales: la retigabina (RTG) y la flupirtina. La retigabina está dirigida al tratamiento de crisis epilépticas de comienzo parcial y la flupirtina se utiliza como analgésico para el tratamiento del dolor muscoesquelético [22, 23].

No obstante, el tratamiento en humanos con estos compuestos se ha asociado a la aparición de notables efectos secundarios adversos. Por ejemplo, para la retigabina, cabe destacar problemas en la micción, prolongación del intervalo QT, que conlleva a desórdenes cardiovasculares, y cambio en la pigmentación del ojo. Además, podría afectar a la transmisión neuronal mediada por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) [18]. Por otro lado, la flupirtina se relaciona con problemas de hepatotoxicidad y en la función reproductora así como, efectos psicológicos negativos [24, 25].

Por este motivo, actualmente se siguen buscando nuevos moduladores de estos canales que tengan unas propiedades más apropiadas para su uso en pacientes.

Para abordar este problema, este trabajo se ha enfocado al desarrollo de un sistema celular que permita el cribado de alto rendimiento de quimiotecas para identificar activadores de estos canales iónicos que puedan servir para tratar el dolor crónico o la epilepsia. Este sistema será una línea celular humana que exprese establemente de forma heteróloga los canales iónicos Kv7.2/7.3.

Los objetivos principales son la generación de una línea celular que exprese establemente los canales iónicos Kv7.2/7.3; y, su validación molecular y electrofisiológica.

Materiales y Métodos

Cultivo celular de la línea HEK293

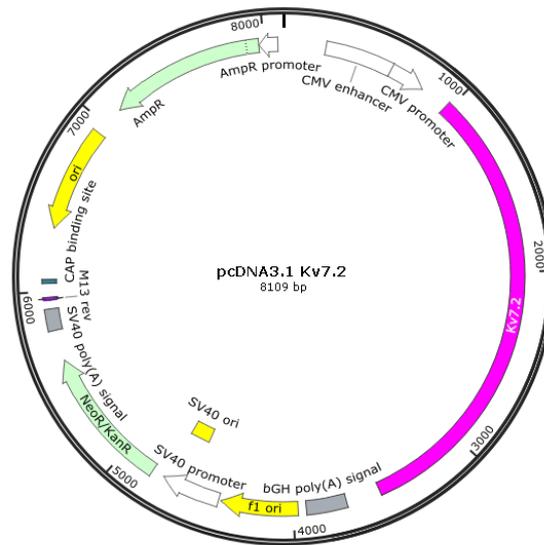
Las células HEK293 se cultivaron en medio mínimo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina (medio completo). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

Construcciones de Kv7.2 y mEYFP-Kv7.3

Las construcciones de Kv7.2 y Kv7.3, cedidas por la Unidad de Biofísica del País Vasco, se habían desarrollado empleando vectores de expresión **pcDNA 3.1**. Estos vectores constan de los siguientes componentes: **NeoR**: secuencia codificante que confiere resistencia a diversos antibióticos entre los que se encuentra la geneticina G-418. Está situado “aguas abajo” del promotor **SV40**. La geneticina G-418 se ha utilizado como marcador de selección de las células transfectadas. **MCS**: sitio de clonación múltiple, donde se encuentran gran parte de las dianas de las enzimas de restricción. **ori**: origen de replicación. **CMV**: promotor inmediato-temprano del citomegalovirus humano. **AmpR**: ADNc que confiere resistencia a ampicilina, para su amplificación en bacterias.

Las secuencias de los ADN complementarios (ADNc) de los canales de interés, Kv7.2 y Kv7.3 humanos, estaban insertadas en vectores distintos, en el sitio de clonación múltiple (MCS) bajo el control del promotor CMV, para permitir una expresión de alto nivel del ADNc de interés. La secuencia de Kv7.3 se insertó fusionada al extremo C-terminal del ADNc de la YFP potenciada con la mutación A206K (**mEYFP**).

A



B

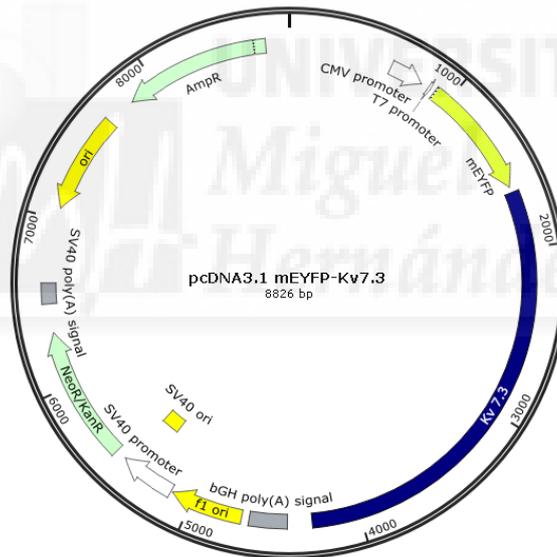


Figura 4. Mapa genético de los plásmidos pcDNA 3.1 obtenido desde SnapGene. A) pcDNA 3.1 con la secuencia del ADNc de Kv7.2. B) pcDNA 3.1 con la secuencia incorporada del ADNc de mEYFP fusionado a la del ADNc de Kv7.3.

LD₅₀ de geneticina

Se sembraron células HEK293 en una placa de 24 pocillos a una concentración de 20000 células por pocillo. Después de 24 horas, se incubaron las células con distintas concentraciones de 0 a 2000 µg/mL del antibiótico geneticina o G-418 (Gibco), siendo 0 µg/mL el control negativo.

El efecto de la geneticina sobre estas células se determinó en base a la viabilidad celular después de 2, 3 y 6 días de tratamiento con el antibiótico. Como medida de viabilidad celular se estimó la densidad celular expresada en porcentaje de confluencia mediante observación de las células en el microscopio óptico.

Transfección

Las células HEK293 se sembraron en placas Petri de 60 x 15 mm de tamaño, 72 horas antes de la transfección. Una vez alcanzado aproximadamente el 90% de confluencia, se procedió a transfectar las células.

Para la transfección simultánea de las secuencias de los ADNc de Kv7.2 y Kv7.3 (cotransfección), los plásmidos anteriores se incubaron con el reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen) durante 20 minutos en medio mínimo DMEM sin suero. La concentración final de lipofectamina y de ADN fue de 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. La mezcla de ADN-lípidos se añadió a las células sembradas y se dejó incubar durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró esta mezcla y se añadió medio completo DMEM.

En total se realizaron tres transfecciones:

- Cotransfección 1:1, en la que se incubó la misma cantidad de plásmido con la secuencia del ADNc de Kv7.2 que con el de Kv7.3.
- Cotransfección 5:1, la concentración de plásmido con Kv7.2 fue 5 veces mayor a la de Kv7.3.
- Transfección de Kv7.3, se incubó únicamente el plásmido que contenía esta secuencia.

Selección

Con el objetivo de obtener una línea celular homogénea, se seleccionaron grupos de células procedentes de una única célula (clones). Transcurridas 48 horas desde la transfección, se añadieron 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina para aislar las células que se hubieran transfectado. Dos semanas después, se seleccionaron diferentes clones utilizando anillos de clonación (*Cloning cylinders*, Sigma-Aldrich).

Los clones seleccionados se amplificaron manteniendo la presión selectiva hasta obtener más de un millón de células de cada uno a fin de poderlos analizar. Para el mantenimiento de los clones, se redujo a la mitad la concentración de G-418 utilizada (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En la transfección de Kv7.3 sobre el clon 18 (ver Resultados), la selección de las células de los clones 19 y 20 se realizó una semana después de resembrar el clon 18.3.

Microscopía de fluorescencia

Para detectar la fluorescencia celular, se utilizó un microscopio invertido Nikon eclipse TE2000-U, equipado con una cámara digital CCD DS-1QM. La expresión de la proteína amarilla fluorescente (YFP) se observó con un filtro de excitación de 460-500 nm y un filtro de emisión de 510-560 nm. Las imágenes se adquirieron con el programa NIS-Elements AR 3.22.15. Las células se observaron en contraste de fases y posteriormente con el filtro de fluorescencia citado.

Las células se sembraron 24 horas antes en una placa de 24 pocillos con cristales tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich).

PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que permite la amplificación selectiva de determinados segmentos de ADN desde una mezcla compleja. Se trata de un ensayo enzimático basado en la capacidad de las ADN polimerasas de replicar ADN [26].

Para que esto ocurra, se necesitan cebadores, secuencias cortas de ADN complementarias a fragmentos de la secuencia de interés y que hibridan con ésta de forma específica. La ADN polimerasa extenderá estos cebadores hasta amplificar toda la región de interés.

La extracción de ADN genómico se realizó con el kit de extracción de ADN de E.Z.N.A. Blood DNA Mini Kit Protocols (Omega). La concentración y pureza de las muestras de ADN obtenidas con este procedimiento se determinaron con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). A fin de cuantificar la pureza se midieron las absorbancias a distintas longitudes de onda (260, 280 y 230 nm) y con éstas, se calcularon los siguientes ratios:

- 260/280: valores inferiores a 1.8 señalan la contaminación del ADN extraído con proteínas o distintos reactivos como fenol residual.
- 260/230: un valor menor a 1.8 indica la presencia de distintos contaminantes en la muestra como fenol residual o carbohidratos.

Las PCRs se llevaron a cabo con el objetivo de advertir la incorporación de los ADNc de interés en el ADN genómico de las células transfectadas. Para ello, se utilizó la enzima GoTaq (Promega). La cantidad de ADN utilizado para todas las reacciones fue de 50 ng. Las secuencias de los cebadores diseñados y la longitud del segmento amplificado para cada gen se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar las secuencias de los ADNc de Kv7.2 y Kv7.3. En esta tabla, se indica el nombre asignado a cada cebador, su secuencia y la longitud del segmento que amplificaría de cada ADNc cada pareja de cebadores. F= *Forward*. R= *Reverse*.

ADNc	Cebadores	Secuencia de los cebadores	Longitud del segmento amplificado
Kv 7.2	Kv7.2F01	F: 5' –CTACCACGCCTACGTGTTCC- 3'	147 pb
	Kv7.2R02	R: 5' –CACGAAGTACTCCACGCCAA- 3'	
Kv 7.3	Kv7.3F05	F: 5' -AGGTCACGGAGTATTACCCAAC' - 3'	394 pb
	Kv7.3R06	R: 5' -CGCGTGATGCTACGTCTCT- 3'	
	Kv7.3F09	F: 5' –CTGGGTCTCTTGGATCGGGT- 3'	570 pb
	Kv7.3R10	R: 5' –GATTCTGATGTGGATGGTCTGG – 3'	

Las condiciones de reacción establecidas para la PCR fueron: una etapa inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de: 20 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (hibridación) y 1 minuto a 73°C (extensión). Después de estos ciclos, se incluyó una etapa de extensión final de 3 minutos a 73°C, seguida de una fase de refrigeración a 4°C.

Los productos de la PCR se corrieron mediante electroforesis en un gel al 2% de agarosa teñido con gel red (Biotium). Para tener una medida del peso molecular de las bandas del gel se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Patch clamp

Desde hace más de 30 años, la técnica de *patch clamp* ha abierto las puertas al estudio de la actividad eléctrica celular. Este método se fundamenta en el aislamiento de un pequeño parche de membrana celular dentro de la punta de una pipeta. En el interior de esta pipeta se podrá medir el paso de corriente a su través [27].

Las pipetas, con las que se realizaron los registros de *patch clamp*, se prepararon desde capilares de paredes finas de borosilicato de 1.5 mm de diámetro externo y 1.17 de diámetro interno (Harvard apparatus capillaries 30-0062 GC100T-10). Se pulieron con llama, utilizando un estirador P-97 (Sutter Instruments). La resistencia final en las pipetas oscilaba entre 2 – 5 MΩ.

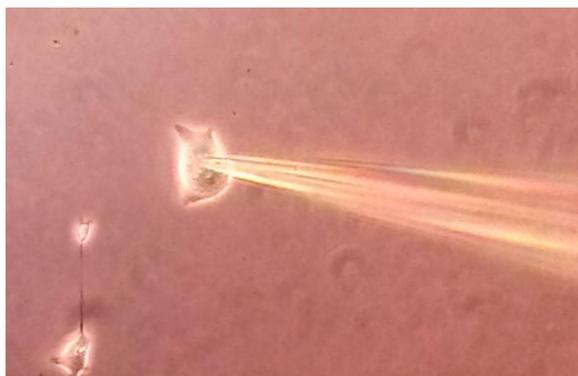


Figura 5. Fotografía de una pipeta de *patch clamp* unida a la membrana de una célula HEK. Esta imagen se obtuvo con un microscopio invertido utilizando un objetivo 20x.

La composición de los tampones utilizados se indica a continuación. La solución interna contenía (en mM): 144 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA, ajustado a pH 7.2 con KOH. La solución externa se preparó con (en mM): 140 NaCl, 2 MgCl₂, 4 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 5 Glucose, 20 Manitol, pH 7.40 ajustado con NaOH.

Las células HEK utilizadas en estos experimentos se sembraron en placas de 24 pocillos (a distintas concentraciones de células) en cristales con poli-L-lisina.

Los registros se llevaron a cabo en configuración de *whole-cell* a una temperatura de 25°C. Para realizar las curvas I-V y G/G_{máx} se diseñó un protocolo de pulsos de 10 mV de -100 a +70 mV con duración de 300 ms.

Para obtener las curvas G-V, los valores de corriente obtenidos con el protocolo de pulsos se convirtieron en valores de conductancia utilizando la siguiente fórmula:

$$G = I/(V - V_{eq}) \quad Ec. (1)$$

donde G es la conductancia, I es el valor de la corriente medida para cada pulso de voltaje V y V_{eq} es el potencial de equilibrio del K⁺ dado por la ecuación de Nernst:

$$V_{eq} = -\frac{RT}{z_x F} \cdot \ln \frac{c_x^i}{c_x^e} \quad Ec. (2)$$

en esta ecuación, z_x es la carga del ión K⁺, c_x^i es la concentración intracelular de K⁺, c_x^e es la concentración extracelular de K⁺ (en la solución externa). El valor de RT/F a 25°C es 25.6 mV.

Las curvas $G/G_{m\acute{a}x}$ normalizadas se ajustaron a la ecuaci3n de Boltzmann:

$$\frac{G}{G_{m\acute{a}x}} = \frac{G_{m\acute{i}n}}{G_{m\acute{a}x}} + \frac{(1 - \frac{G_{m\acute{i}n}}{G_{m\acute{a}x}})}{(1 + e^{\frac{z_g \cdot (V - V_{0.5})}{KT}})} \quad Ec. (3)$$

donde $G_{m\acute{a}x}$ es la conductancia m\acute{a}xima obtenida a 70 mV, $G_{m\acute{i}n}$ es la conductancia m\acute{i}nima obtenida a -100 mV, $V_{0.5}$ es el voltaje requerido para activar la mitad de la conductancia m\acute{a}xima, z_g es la carga de apertura, T es la temperatura absoluta y K es la constante de Boltzmann.

El programa utilizado para los registros electrofisiol3gicos es PatchMaster. El amplificador usado es EPC10 con *Pulse*[®] software (HEKA Electronic, Alemania). Las corrientes se adquirieron a 20 kHz, la resistencia del sello oscilaba entre 300 MΩ y 1.5 GΩ, la capacitancia entre 10 y 30 pF y la resistencia en serie se compens3 entre un 50-80%.

Estudio farmacol3gico

El compuesto retigabina (Sigma-Aldrich), se liofiliz3 y se disolvi3 en dimetilsulf3xido (DMSO) para originar un stock a 10 mM. Esta soluci3n stock se diluy3 con la soluci3n externa para obtener los distintos valores de concentraciones testados. La concentraci3n final de DMSO fue $\leq 0.2\%$ del volumen total.

El efecto de la retigabina sobre Kv7.2/7.3 transfectados se cuantific3 midiendo el incremento de corriente producido tras aplicar concentraciones crecientes de este compuesto (de 0.1 a 20 μM). Los valores obtenidos se normalizaron dividiéndolos entre la corriente registrada a 20 μM ($I_{20\mu M}$).

An\lisis de datos

El an\lisis de los resultados se realiz3 utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los resultados se expresan en media \pm sem o en media \pm SE. El valor de n representa el n\umero de medidas o c3lulas, y N , el n\umero de experimentos independientes.

Para construir las curvas dosis-respuesta a geneticina y a retigabina, los datos se ajustaron a la ecuaci3n de Hill modificada:

$$Y = E_{m\acute{i}n} + \frac{(E_{m\acute{a}x} - E_{m\acute{i}n})}{1 + 10^{(LogEC_{50} - X)}} \quad Ec. (4)$$

donde $E_{m\acute{i}n}$ y $E_{m\acute{a}x}$ son el m\acute{i}nimo y el m\acute{a}ximo valor de efecto obtenido, respectivamente; y EC_{50} es la concentraci3n que produce la mitad del efecto m\acute{a}ximo.

Resultados

Caracterización de células HEK293 no transfectadas

En estudios previos se ha descrito la presencia de canales iónicos de K^+ en la línea celular HEK293 que hemos escogido como sistema de expresión de nuestros canales iónicos de interés. Para saber si estos canales endógenos podrían interferir con los canales iónicos Kv7.2/7.3, se caracterizó electrofisiológicamente esta línea celular antes de su transfección.

Utilizando la técnica de *patch clamp*, se cuantificaron las corrientes generadas por los canales endógenos tras su activación por pulsos despolarizantes de voltaje (Figura 6A). Con esta información, se representó la intensidad de las corrientes en función del voltaje (curva I-V). A partir de la curva I-V obtenida (Figura 6B), las medidas de corriente se transformaron en conductancia, lo que permitió graficar la relación $G/G_{\text{máx}}$ respecto al voltaje (Figura 6C).

Con estos experimentos, se pudo detectar la activación por voltaje de corrientes de salida en las células HEK293. Estas corrientes se compararon con las descritas anteriormente para el heterotetrámero Kv7.2/7.3 en base a los parámetros biofísicos $I_{70\text{mV}}$ y $V_{0.5}$. La corriente media registrada a 70 mV para estas células fue de 280 ± 20 pA y el voltaje que produjo la apertura de la mitad de los canales iónicos ($V_{0.5}$) de 3.7 ± 0.5 mV (Tabla 7).

Como resultado, el valor de corriente producida por la apertura de los canales iónicos endógenos de la línea celular HEK293 a cada voltaje es significativamente distinto a los datos anteriormente citados para el heterotetrámero Kv7.2/7.3 [16]. Además, el voltaje de apertura para los canales endógenos (-30 mV) es mayor que para los canales de interés (\sim -50 mV).

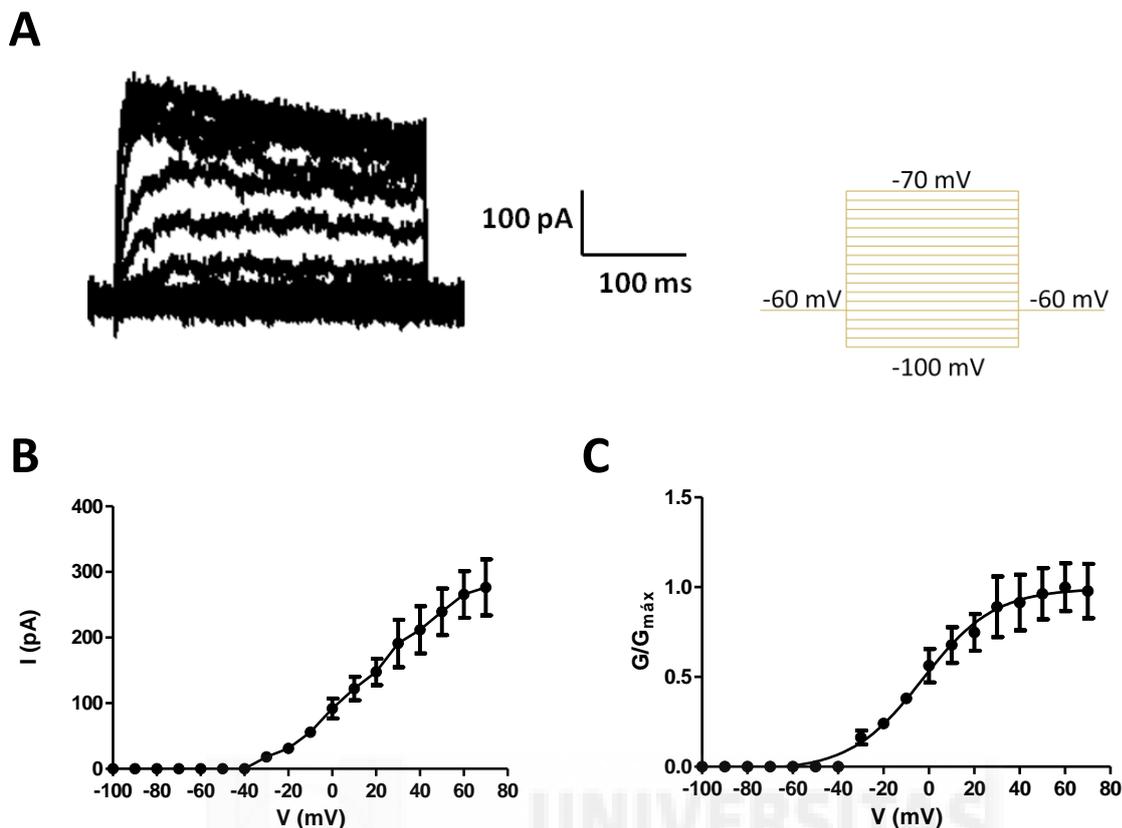


Figura 6. Caracterización electrofisiológica de las células HEK293. A) Familia de corrientes activadas por voltaje para las células HEK293. Corrientes registradas en configuración de *whole-cell* utilizando un protocolo de pulsos de 300 ms en incrementos de 10 mV desde -100 mV a 70 mV ($V_h = -60$ mV). B) Curva I-V de las células HEK293. C) $G/G_{máx}$ obtenida con los valores de la curva I-V para las células HEK293 ($V_{eq} = -96$ mV). Valores expresados en media \pm SEM; N= 2; n=4.

Con estos datos se concluyó que la corriente producida por los canales iónicos endógenos no interferirá con las medidas de las corrientes debidas a Kv7.2/7.3. De esta forma, en la búsqueda de activadores se podrá diferenciar las corrientes producidas por la activación de estos canales respecto a las corrientes endógenas.

LD₅₀ de Geneticina

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de antibiótico para el proceso de selección, se testaron distintas concentraciones de geneticina en células HEK no transfectadas.

Para poder cuantificar el efecto del antibiótico, se determinó la confluencia celular tras 2, 3 y 6 días del inicio del tratamiento. La confluencia es una medida de densidad celular expresada en porcentaje. De esta forma, 0% de confluencia corresponderá con un 100% de muerte celular.

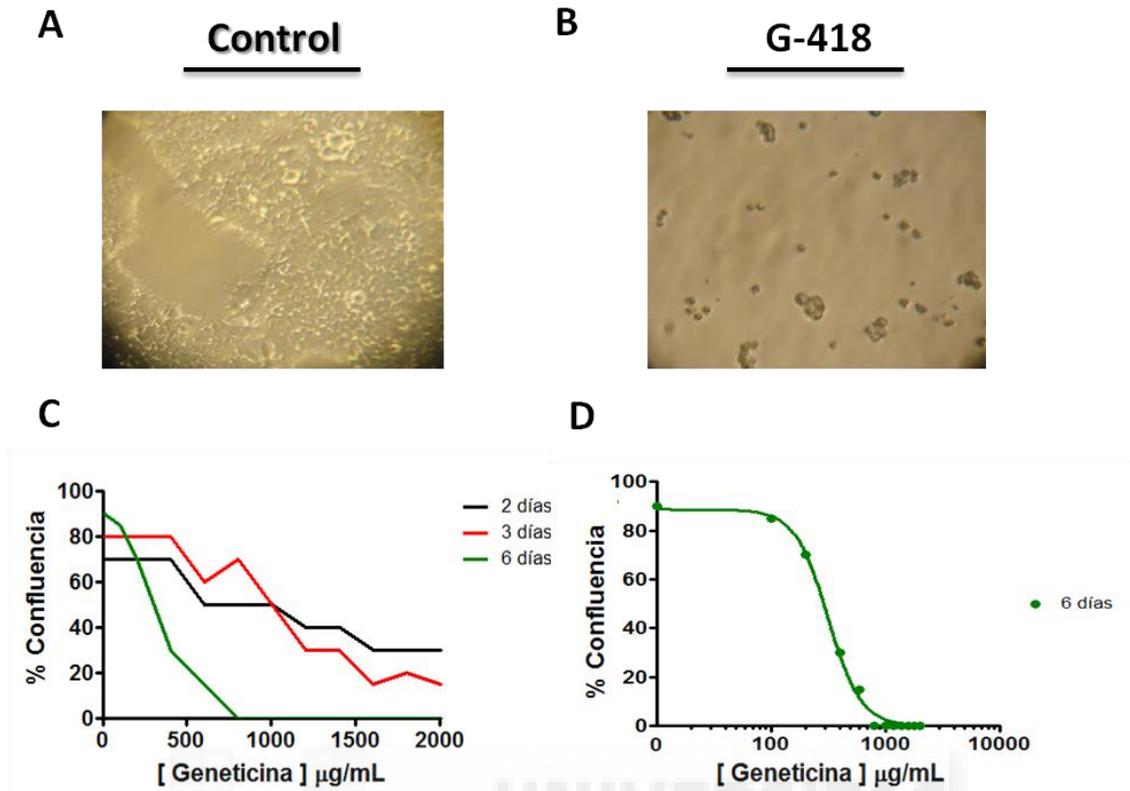


Figura 7. Efecto de la geneticina sobre células HEK293 sin transfectar. A. Células en ausencia de geneticina (0 µg/mL) utilizadas como control negativo. B. Células en presencia de 800 µg/mL de geneticina, 6 días después de iniciar el tratamiento. C. Porcentaje de confluencia 2, 3 y 6 días desde el inicio del tratamiento con geneticina. Las concentraciones usadas fueron 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 µg/mL. D. Dosis-respuesta a geneticina en células HEK293 6 días después del inicio del tratamiento con geneticina. La curva dosis-respuesta se ajustó a la ecuación de Hill, siendo los parámetros $E_{máx} = 100\%$ de confluencia y $E_{mín} = 0\%$ de confluencia.

Como resultado, un aumento en la concentración de geneticina resultó en una reducción en el porcentaje de confluencia celular y por ello, un aumento de la muerte celular (Figura 7). Esto implica que las células HEK293 sin transfectar son sensibles a este antibiótico. Por este motivo, la geneticina servirá para llevar a cabo el proceso de selección de las células que expresen el transgén. Además, la concentración mínima testada de antibiótico que produjo la muerte de todas las células del pocillo fue de 800 µg/mL. La concentración que produjo la muerte del 50% de las células (LD_{50}) fue de 317 ± 2 µg/mL.

Atendiendo a estos resultados, para garantizar la selección de las células transfectadas se escogió una concentración ligeramente superior a la mínima eficaz, 1000 µg/mL de geneticina.

Transfección

Una vez determinada la concentración óptima de agente selectivo, se procedió a realizar la transfección. La transfección consiste en la liberación de ADN o ARN exógeno en el interior de una célula. Sin embargo, se trata de un proceso con muy baja eficiencia. Esto se debe a la elevada resistencia que opone la membrana plasmática celular al paso de moléculas cargadas a su través. Como los ácidos nucleicos que forman el material genético están cargados negativamente, es necesario recurrir a métodos que faciliten la entrada del ADN de interés en las células. Existe una gran diversidad de métodos de transfección, pero en este caso, el procedimiento escogido fue la lipofección.

La lipofección se basa en el uso de lípidos cargados positivamente. Al incubar el ADN de interés con estos lípidos se forman complejos que presentan una elevada afinidad por la membrana plasmática. Estos complejos se fusionarán con la membrana plasmática y liberarán el contenido de material genético al citoplasma celular.

En este trabajo, para conseguir generar la línea celular Kv7.2/mEYFP-Kv7.3 se realizaron diversas transfecciones: cotransfección 1:1, cotransfección 5:1, y transfección de Kv7.3 sobre el clon que expresaba Kv7.2.

En el siguiente diagrama de flujo, se muestra la estrategia seguida para la generación de la línea celular que expresa establemente las subunidades Kv7.2/7.3.

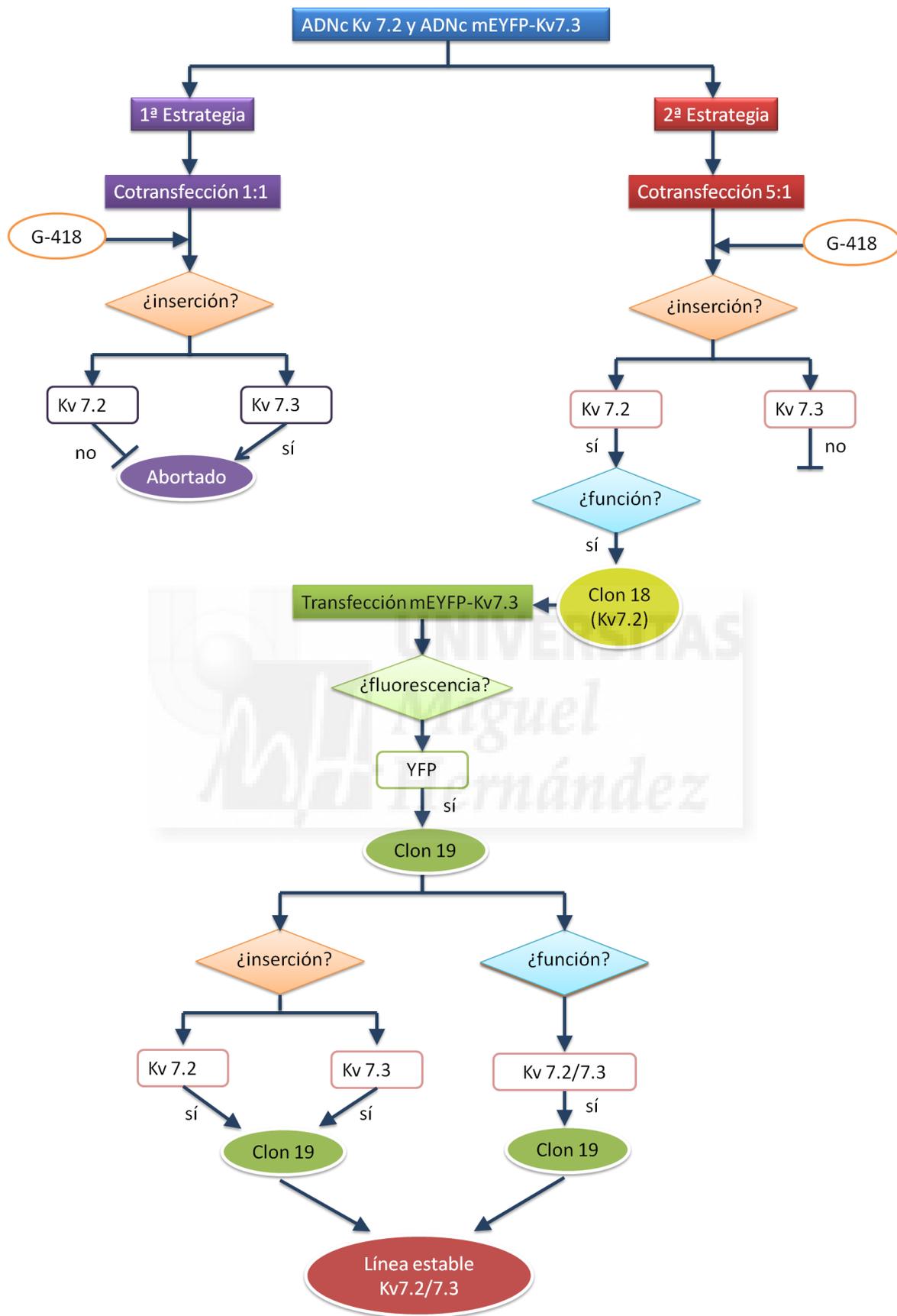


Figura 8. Estrategia seguida para la generación de la línea celular Kv7.2/mEYFP-Kv7.3. Se realizaron tres transfecciones distintas: cotransfección 1:1, cotransfección 5:1 y transfección de Kv7.3 sobre el clon 18.

Cotransfección 1:1

En primer lugar, se cotransfectaron el plásmido con la secuencia de Kv7.2 y el que contenía la secuencia de Kv7.3 en la misma proporción (relación 1:1 de Kv7.2/Kv7.3). En esta transfección, se seleccionaron 6 clones de los cuales se pudieron amplificar 4.

Se aisló el ADN de los clones procedentes de la primera transfección y las concentraciones de ADN y la pureza de las muestras se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Extracción de ADN de los clones 1, 2, 3 y 4.

	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4
[ADN] (ng/μl)	124.3	364.2	332.2	207.0
260/280	2.1	1.9	2.0	2.0
260/230	2.6	2.3	2.2	2.1

El ADN extraído se amplificó utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores Kv7.2F01 y Kv7.2R02, para el ADNc de Kv7.2 humano y, Kv7.3F05 y Kv7.3R06 para Kv7.3 humano (ver Materiales y Métodos). El producto de esta reacción se cargó en un gel de agarosa al 2%. Los fragmentos se separaron en base a su tamaño por electroforesis. El gel obtenido se muestra en la figura 9.

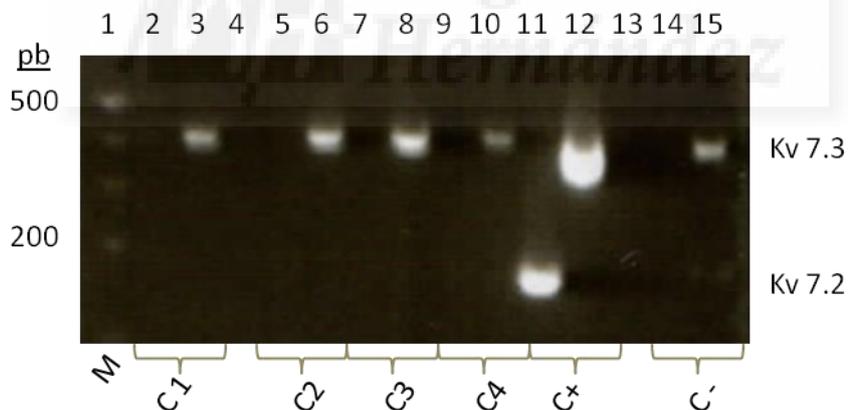


Figura 9. Detección de las secuencias de Kv7.2 y Kv7.3 en el ADN genómico de los clones seleccionados. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con gel red. La posición de cada muestra cargada se indica a continuación: Calle 1. Marcador de peso molecular. El tamaño de banda del peso molecular está indicado en pares de bases (pb). Calles 2 y 3. (C1) Clon 1 para el ADNc de Kv7.2 y de Kv7.3, respectivamente. Calle 4. No se cargó ninguna muestra. Calles 5 y 6. (C1) Clon 2 para Kv7.2 y Kv7.3. Calles 7 y 8. (C3) Clon 3 para Kv7.2 y Kv7.3, respectivamente. Calles 9 y 10. (C4) Clon 4 para Kv7.2 y Kv7.3, respectivamente. Calles 11 y 12. (C+) Control positivo desde el plásmido pcDNA 3.1 que contenía la secuencia de Kv7.2 y Kv7.3, respectivamente. Calle 13. No se cargó ninguna muestra. Calles 14 y 15. (C-) Control negativo desde células HEK293 sin transfectar para Kv7.2 y Kv7.3, respectivamente.

De los cuatro clones examinados, ninguno mostró señal tras la amplificación con los cebadores Kv7.2F01 y Kv7.2R02. En el control positivo, sí se pudo detectar una banda del tamaño esperado (147 pb) para este ADNc. Estos resultados indicaban que, la ausencia de banda en todos los clones para el ADNc de Kv7.2, no se debió a un error experimental y, los cebadores, amplificaban correctamente la secuencia de interés.

En cuanto a Kv7.3, no se pudo obtener información con este gel. La detección de una banda cercana a 400 pb en el control negativo (realizado con ADN de células HEK293 no transfectadas) denotaba que los cebadores estaban hibridando con una secuencia presente en el genoma de las células HEK utilizadas para la transfección. De esta forma, no se podía distinguir entre la incorporación de Kv7.3 transfectado de las células que no lo habían incorporado.

Esto se debió a que las células HEK293, a pesar de no expresar Kv7.3, presentan la secuencia del gen que lo codifica en su ADN genómico. Una diferencia fundamental entre el ADN genómico (ADNg) y el ADNc (utilizado en los plásmidos) es la presencia en el ADNg de intrones entre distintos exones. En consecuencia, para poder distinguir la secuencia de ADNc de Kv7.3 transfectado, que sí puede expresarse, de la de ADNg endógena, se requiere diseñar los cebadores con una secuencia que hibride en la unión de distintos exones. Como los cebadores Kv7.3F05 y Kv7.3R06 no cumplían con esta característica, estaban amplificando Kv7.3 desde el ADNg, lo que impide la distinción de las células transfectadas con Kv7.3 de las que no lo habían sido.

De esta forma, los cebadores se rediseñaron abarcando la unión de distintos exones. El procedimiento explicado anteriormente se repitió exclusivamente para la secuencia de Kv7.3 con los nuevos cebadores Kv7.3F09 y Kv7.3R10 (ver Materiales y Métodos) (Figura 10).

Esta vez se logró amplificar Kv7.3 en el ADN genómico en los clones 2, 3 y 4 (Figura 10). Estos tres clones mostraron una banda ligeramente superior a las 500 pb. El tamaño del segmento franqueado por estos cebadores era de 570 pb. Esto indica que los clones 2, 3 y 4 habrán incorporado el ADNc de Kv7.3 procedente del plásmido transfectado en su genoma. El clon 1 no mostró ninguna banda para el ADNc de Kv7.3.

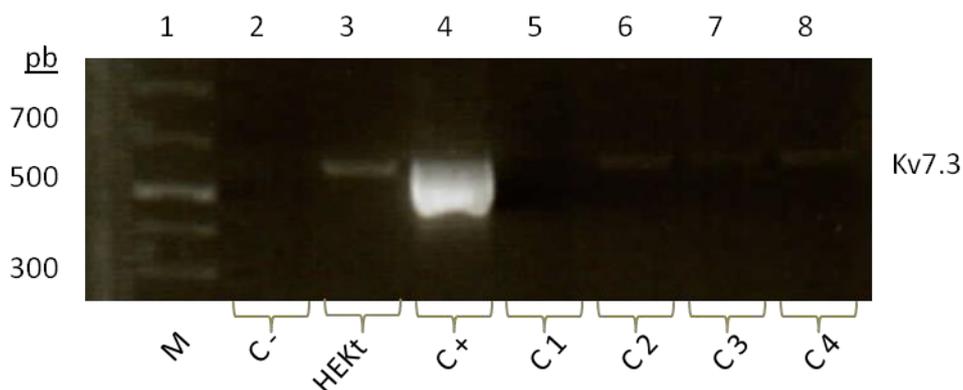


Figura 10. Detección del ADNc de Kv7.3 en el ADN genómico de los clones seleccionados. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con gel red, donde se cargaron las siguientes muestras: Calle 1. Marcador de peso molecular. El tamaño de banda del peso molecular está indicado en pares de bases (pb). Calle 2. (C-) Control negativo desde células HEK293 sin transfectar. Calle 3. (HEKt) Células HEK293 transfectadas sin aislar en clones. Calle 4. (C+) Control positivo con el plásmido pcDNA 3.1 que contenía la secuencia del ADNc de Kv7.3. Calle 5. (C1) Clon 1. Calle 6. (C2) Clon 2. Calle 7. (C3) Clon 3. Calle 8. (C4) Clon 4.

Como resultado, ninguno de los clones aislados parecía haber insertado ni expresado ambos ADNc simultáneamente. Además, el hecho de que Kv7.2 no se hubiera incorporado en el ADN genómico de los clones analizados indicaba una baja eficiencia de transfección de Kv7.2 (comparado con Kv7.3). Por este motivo, se decidió volver a cotransfectar las células con ambos plásmidos pero utilizando 5 veces más Kv7.2 que Kv7.3.

Cotransfección 5:1

En esta transfección se lograron aislar 3 clones (Clon 16, 17 y 18). De estos clones se amplificaron dos (clones 17 y 18). El procedimiento llevado a cabo para el análisis molecular de los clones extraídos en la transfección 5:1 (relación 5:1 de Kv7.2/Kv7.3) fue idéntico al de la transfección 1:1. Los datos de la extracción de ADN de estos clones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Extracción de ADN de los clones 17 y 18.

	Clon 17	Clon 18
[ADN] (ng/μl)	361.0	322.5
260/280	1.9	2.0
260/230	2.3	2.1

En el gel realizado, para los clones 17 y 18 amplificados con los cebadores para el ADNc de Kv7.2, se pudieron observar dos bandas de tamaño ligeramente inferior a 200 pb (Figura 11). El tamaño de la secuencia de ADNc de Kv7.2 franqueada por los cebadores Kv7.2F01 y Kv7.2R02 es de 147 pb. De esta forma, las bandas observadas corresponderían al segmento de Kv7.2 amplificado.

Como resultado, los clones 17 y 18 habían insertado la secuencia codificante de Kv7.2 en su genoma. Sin embargo, ninguno incorporó el ADNc de Kv7.3. En conclusión, utilizando más proporción de Kv7.2 respecto a Kv7.3 tampoco se logró obtener células que incorporaran y expresaran simultáneamente ambos canales iónicos.

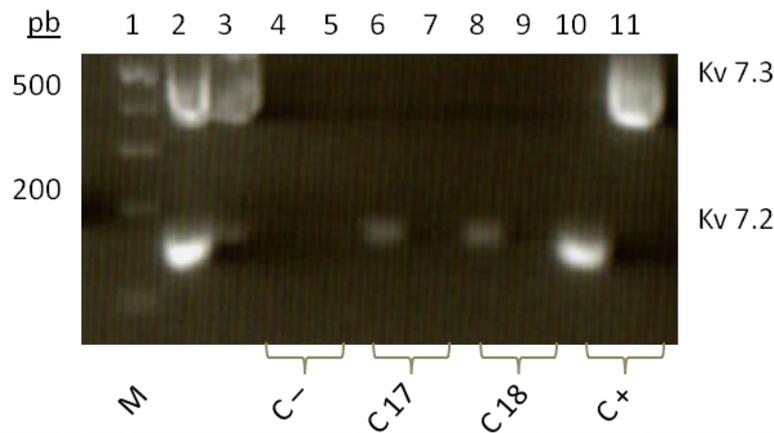


Figura 11. Detección del ADNc de Kv7.2 en el ADN genómico de los clones seleccionados. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con gel red, donde se cargaron las siguientes muestras: Calle 1. Marcador de peso molecular. El tamaño de banda del peso molecular está indicado en pares de bases (pb). Calles 4 y 5. (C-) Control negativo desde células HEK293 sin transfectar para Kv7.2 y Kv7.3, respectivamente. Calle 6. (C17) Clon 17 para Kv7.2. Calle 7. (C17) Clon 17 para Kv7.3. Calle 8. (C18) Clon 18 para Kv 7.2. Calle 9. (C18) Clon 18 para Kv 7.3. Calle 10. (C+) Control positivo con el ADN del plásmido pcDNA 3.1 que contenía la secuencia de Kv7.2. Calle 11. (C+) Control positivo con ADN plasmídico pcDNA 3.1 que contenía la secuencia de Kv7.3.

Para analizar la expresión de los canales Kv7.2 y Kv7.3 en los clones, se procedió a estudiarlos utilizando la técnica *patch clamp*.

Las corrientes producidas por la activación con voltaje se estudiaron para los clones 17 y 18 (Figura 12). En el clon 17, no se pudo detectar la expresión de Kv7.2. Las corrientes producidas por estas células ($I_{70mV} = 330 \pm 90$ pA, $V_{0.5} = 0 \pm 5$, $V_{apertura} = 30$ mV) eran idénticas a las corrientes de K^+ endógenas de las células HEK293 ($I_{70mV} = 280 \pm 20$ pA, $V_{0.5} = -3 \pm 4$, $V_{apertura} = 30$ mV). De esta forma, a pesar de haberse observado mediante PCR la incorporación del ADNc de Kv7.2 en este clon (Figura 11), las células no eran capaces de expresar este canal iónico (Figura 12A).

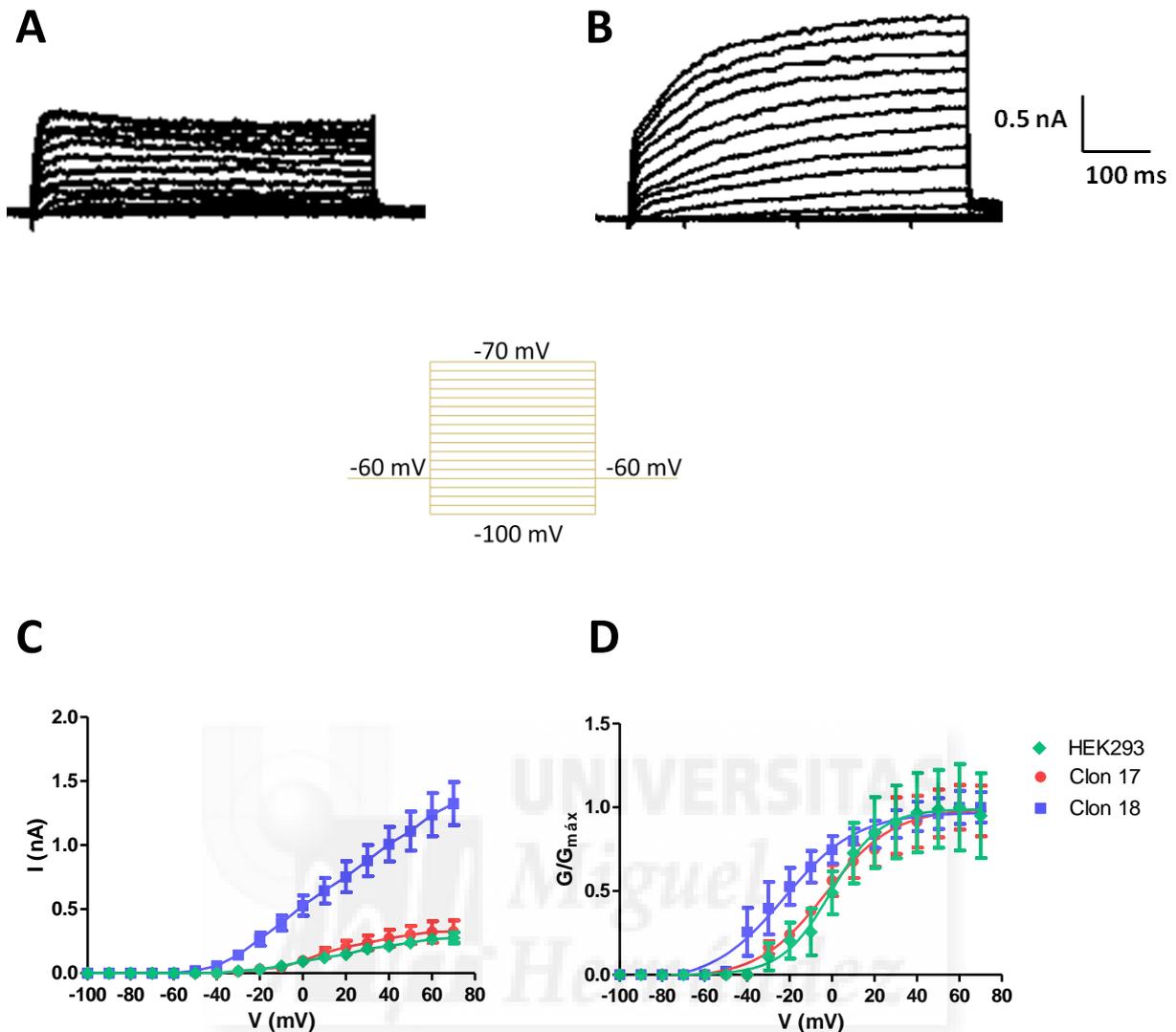


Figura 12. Caracterización electrofisiológica del clon 18. A, B) Familia de corrientes iónicas activadas por voltaje para el clon 17 (A) y el clon 18 (B). Corrientes registradas en configuración de *whole-cell* utilizando un protocolo de pulsos de 300 ms en incrementos de 10 mV desde -100 mV a 70 mV ($V_h = -60$ mV). C) Curva I-V de las células HEK293 (línea verde), del clon 17 (línea roja) y del clon 18 (línea azul). D) $G/G_{m\acute{a}x}$ obtenida con los valores de la curva I-V para las células HEK293 (línea verde), del clon 17 (línea roja) y del clon 18 (línea azul). $V_{eq} = -96$ mV. Valores expresados en media \pm SEM; $N \geq 2$; $n=4$.

En el clon 18, se pudo observar una corriente característica de canales iónicos Kv7.2 (Figura 12B). Se trataba de una corriente rectificadora de salida de apertura lenta activada con pulsos de voltaje. El voltaje de apertura se situó entre -50 y -40 mV. El valor en el que la mitad de los canales iónicos están abiertos se extrajo de la gráfica $G/G_{m\acute{a}x}$ resultando en $V_{0.5} = -23 \text{ mV} \pm 4 \text{ mV}$ (Figura 12D). A 70 mV, se obtuvo una corriente de $1300 \pm 200 \text{ pA}$. Estos datos, junto a los de la PCR, indicaban que el clon 18 estaba expresando el canal iónico Kv7.2.

Como resultado, en la cotransfección 5:1 tampoco se lograron aislar células que expresaran ambos canales iónicos. Como se había logrado aislar un clon que expresaba Kv7.2, el siguiente enfoque llevado a cabo consistió en la transfección de las células del clon 18 con el plásmido que contenía la secuencia de mEYFP-Kv7.3.

Transfección de mEYFP-Kv7.3 sobre células que expresan Kv7.2

Como se ha explicado anteriormente, la siguiente estrategia que se siguió para la generación de la línea Kv7.2/mEYFP-Kv7.3 consistió en transfectar nuevamente mEYFP-Kv7.3 sobre el clon 18 que ya expresaba el canal iónico Kv7.2.

En este caso, la geneticina no se podía utilizar como marcador de las células transfectadas, puesto que ya tenían incorporado el ADNc de NeoR que confería resistencia a este antibiótico. No obstante, debido a que se había incorporado la secuencia de mEYFP fusionada al ADNc de Kv7.3 en el mismo plásmido, las células que emitan fluorescencia como resultado de la expresión de YFP estarán expresando a su vez Kv7.3 (Ver Materiales y Métodos). Además, como la detección de fluorescencia es un método más rápido y sencillo que su caracterización mediante PCR o electrofisiología, se procedió a analizar los nuevos clones seleccionados mediante microscopía de fluorescencia.

Para seleccionar las células que expresaban mEYFP-Kv7.3, se intentaron aislar grupos homogéneos de células fluorescentes, como se muestra en la figura 13. Si este grupo fluorescente procede de una única célula, probablemente se habrá incorporado el plásmido en su genoma, pues se estará transmitiendo a todas las células descendientes.

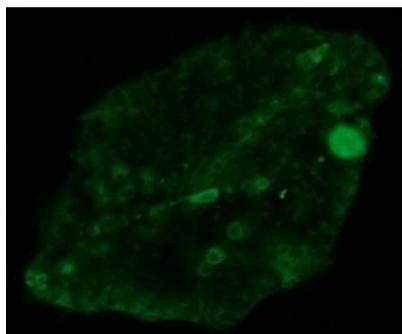


Figura 13. Fotografía obtenida en el microscopio de fluorescencia con un objetivo 20x de un clon de células fluorescentes seleccionado.

Con este procedimiento, se intentaron seleccionar 5 clones (clones 18.1 a 18.5) utilizando anillos de selección. Todos los clones se amplificaron y, un mes después, se volvió a chequear la presencia

de fluorescencia en los mismos. Al ser grupos aislados, se esperaba obtener un resultado homogéneo. En la tabla 4 se muestra la cantidad de células fluorescentes respecto al total de células, expresado en porcentaje.

Tabla 4. Porcentaje de células fluorescentes en los clones seleccionados un mes después de la transfección.

Clon	18.1	18.2	18.3	18.4	18.5
% Células fluorescentes	< 1	< 1	50	< 1	50

Como se puede observar, no se pudo seleccionar ningún clon completamente fluorescente. Además, en los tres grupos de células aislados (18.1, 18.2 y 18.4), la cantidad de células fluorescentes respecto al total era inferior al 1%. Únicamente en dos de los cinco clones (18.3 y 18.5) la mitad de las células expresaban YFP.

Debido a esto, se decidió resembrar uno de los clones que tenía más células fluorescentes, el clon 18.3, para volver a realizar el proceso de selección. De esta forma, si hay un mayor porcentaje de células fluorescentes será más fácil aislar clones completamente fluorescentes.

Siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior (Figura 13), se obtuvieron y amplificaron 2 clones: clon 19 y 20. El porcentaje de células fluorescentes de cada clon se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Cantidad de células fluorescentes respecto al total en cada clon expresado en porcentaje (%).

Clon	19	20
% Células fluorescentes	100	30

De los dos clones seleccionados, en el clon 19 se pudo detectar fluorescencia en todas las células (% células fluorescentes = 100%). El clon 20, sin embargo, sólo tenían el 30% del total de las células de la muestra fluorescentes (Tabla 5).

Nuevamente la selección del clon 20 no fue la esperada, pues una mayoría de células no emitía fluorescencia. No obstante, esta vez se consiguió aislar un clon completamente fluorescente (clon 19). Estos datos apuntaban al clon 19 como un posible candidato para albergar los canales iónicos Kv7.2 y Kv7.3.

En la figura 14 se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas para tres clones: clon 18, formado por células que sólo expresaban Kv 7.2 (A); clon 18.3, con algunas células fluorescentes (B); y clon 19 (C), en el que todas las células expresaban YFP. El clon 18 se utilizó como control negativo.

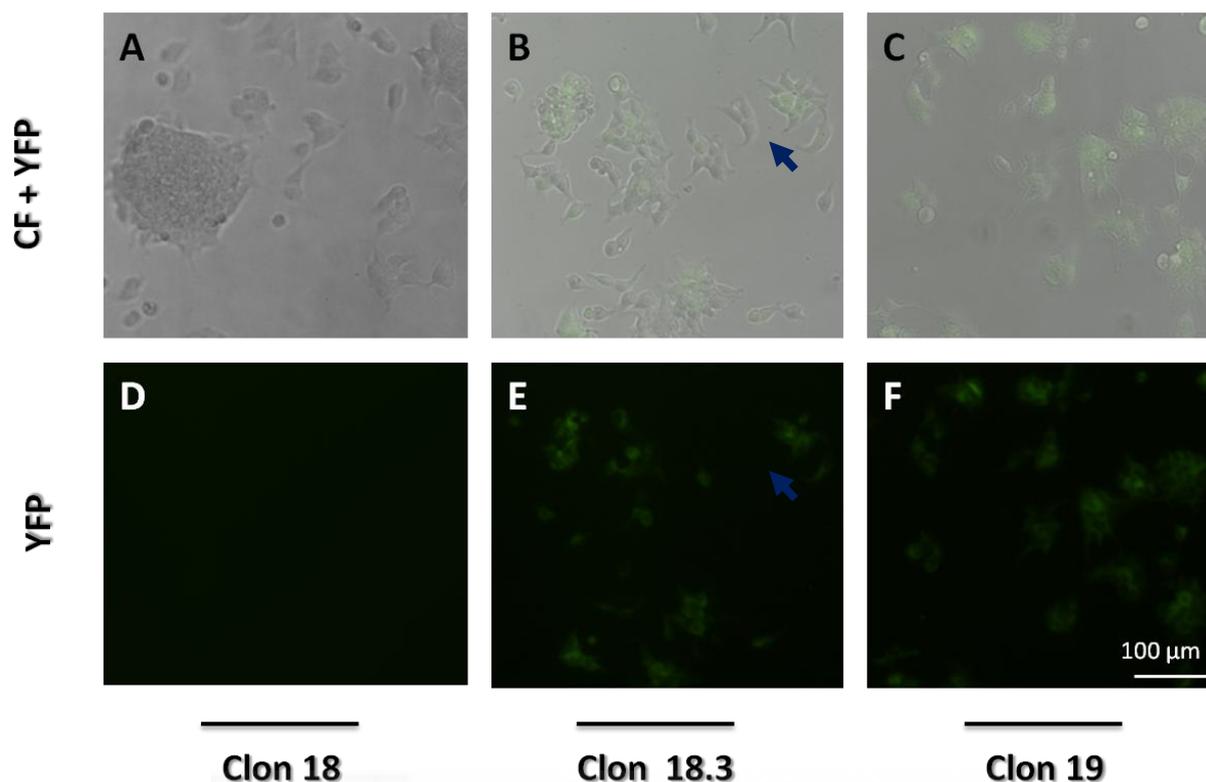


Figura 14. Expresión diferencial de YFP en células HEK procedentes de los clones 18 (A, D), 18.3 (B, E) y 19 (C, F). Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células HEK293 transfectadas con Kv7.2 y Kv7.3 unido a mEYFP. CF: Contraste de Fases. YFP: Fluorescencia debida a la expresión de Proteína Fluorescente Amarilla (YFP).

Para verificar estos resultados, se realizaron estudios moleculares y funcionales mediante las técnicas de PCR y electrofisiología. Siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente, se extrajo el ADN de cuatro clones: el clon que se había resembrado para volver a seleccionar células fluorescentes (clon 18.3), y los clones obtenidos desde éste (clones 19 y 20).

Tabla 6. Concentraciones de ADN y purezas obtenidas tras el proceso de extracción de ADN de los clones 18.3, 19 y 20. Las muestras se habían diluido en 150 μ L de agua bidestilada.

	Clon 18.3	Clon 19	Clon 20
[ADN] (ng/ μ l)	93.6	74.0	46.6
260/280	2.1	1.9	1.9
260/230	2.0	1.9	1.9

Los niveles de pureza y concentración de ADN de cada muestra fueron significativamente inferiores que en extracciones anteriores (Tabla 6). Este resultado fue debido a la elevada cantidad de células empleadas para este proceso. Esto condujo a una saturación de la columna de retención de ADN lo que dificultó la consecución de una adecuada extracción del material genético de las

células. A pesar de esto, tanto las concentraciones de ADN como los niveles de pureza eran adecuados para llevar a cabo el estudio mediante PCR.

Siguiendo el mismo procedimiento que anteriormente, se realizó una PCR y los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis.

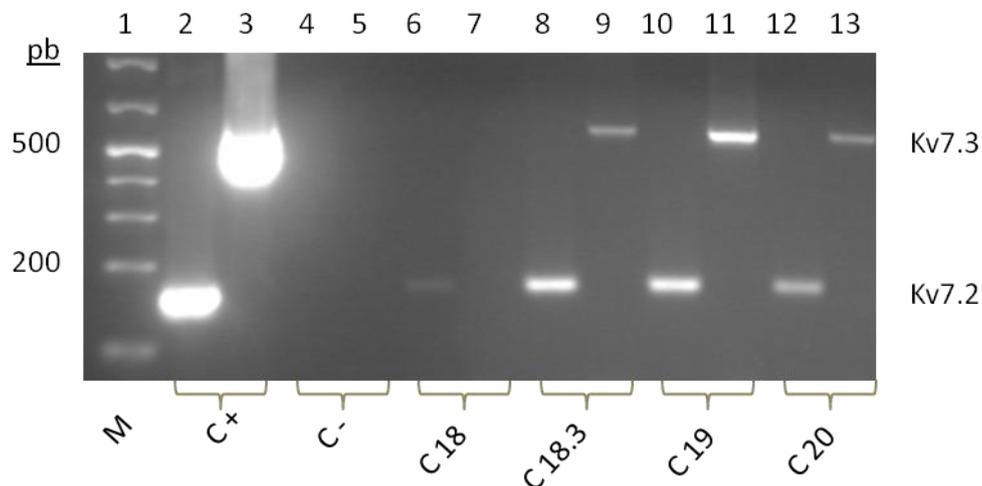


Figura 15. Detección de los ADNc de Kv7.2 y de Kv7.3 en el ADN genómico de los clones seleccionados en la transfección de Kv7.3 sobre el clon 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con gel red, donde se cargaron las siguientes muestras: Calle 1. Marcador de peso molecular. El tamaño de banda del peso molecular está indicado en pares de bases (pb). Calles 2 y 3. (C⁺) Control positivo desde los vectores que contenían las secuencias de Kv7.2 y Kv7.3 respectivamente. Calles 4 y 5. (C⁻) Control negativo desde agua bidestilada para Kv7.2 y Kv7.3, respectivamente. Calle 6. Clon 18 para Kv7.2. Calle 7. Clon 18 para Kv7.3. Calles 8 y 9. Clon 18.3 para Kv7.2 y Kv7.3, respectivamente. Calles 10 y 11. Clon 19 para Kv7.2 y para Kv7.3, respectivamente. Calle 12. Clon 20 para Kv7.2. Calle 13. Clon 20 para Kv7.3.

En el análisis genético, se detectaron bandas correspondientes a Kv7.2 y Kv7.3 en los clones 18.3, 19 y 20 (bandas 8 a 13 del gel, Figura 15).

En todos los clones que contenían células fluorescentes se pudo detectar la presencia de Kv7.3 en su genoma. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante microscopía de fluorescencia.

Con el objetivo de confirmar la expresión del heterotetrámero Kv7.2/7.3 en el clon 19, se realizó un estudio funcional mediante la técnica de *patch clamp*. Para ello, se siguió el mismo protocolo que para el análisis del clon 18.

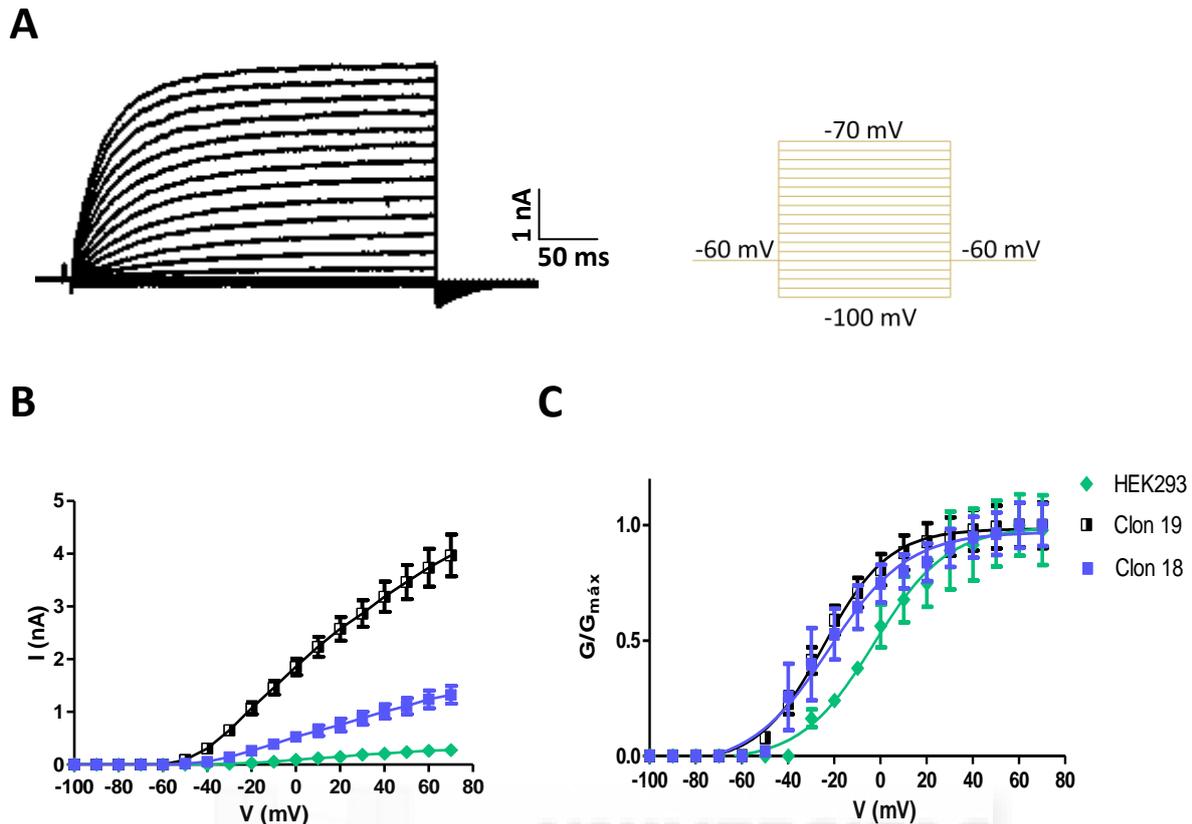


Figura 16. Caracterización electrofisiológica del clon 19. A. Corrientes registradas en configuración de *whole-cell* utilizando un protocolo de pulsos de 300 ms en incrementos de 10 mV desde -100 mV a 70 mV ($V_h = -60$ mV). B. Curva I-V de la actividad de Kv7.2 y Kv7.3 en las células HEK293 (línea verde), el clon 18 (línea azul) y el clon 19 (línea negra). C. $G/G_{máx}$ obtenida con los valores de la curva I-V ($V_{eq} = -96$ mV) para las células HEK293 (línea verde), el clon 18 (línea azul) y el clon 19 (línea negra). Valores expresados en media \pm SEM; N= 2; n= 6.

En la figura 16 se puede observar la activación con pulsos despolarizantes de voltaje de corrientes de entrada no inactivantes de K^+ (Figura 16A). La corriente media obtenida a 70 mV fue de 4000 ± 400 pA. En la curva conductancia-voltaje, las corrientes se normalizaron respecto al valor de corriente (I_{70mV}) obtenido a 70 mV. De esta gráfica, se determinó el valor de $V_{0.5} = -25 \pm 2$ mV. La apertura de estos canales iónicos se situaba entre -50 y -60 mV.

Estas células procedían del clon 18, así que, para analizar el efecto de la expresión de Kv7.3 sobre las corrientes generadas sólo por Kv7.2, se compararon los parámetros biofísicos entre estos dos clones. La intensidad de corriente a 70 mV previa a la transfección de Kv7.3 era de 1300 ± 200 pA (Tabla 7). Después de la transfección de mEYFP-Kv7.3, la intensidad de corriente registrada a 70 mV en estas células fue de 4000 ± 400 pA (Tabla 7), aproximadamente tres veces superior a la obtenida con Kv 7.2. Estos datos concuerdan con los descritos previamente [16].

Tabla 7. Comparación de los parámetros I_{70mV} y $V_{0.5}$ de las corrientes medidas en células HEK293 no transfectadas, en el clon 17, en el clon 18 y en el clon 19. Media \pm SE

Células	Canal iónico expresado	I_{70mV} (pA)	$V_{0.5}$ (mV)	n	$V_{apertura}$ (mV)
HEK 293	Endógenos	280 ± 20	-3 ± 4	4	-30
Clon 17	Endógenos	330 ± 90	0 ± 5	4	-30
Clon 18	Kv 7.2	1300 ± 200	-23 ± 4	4	-50 a -40
Clon 19	Kv 7.2 y Kv 7.3	4000 ± 400	-25 ± 2	6	-60 a -50

Con respecto al clon 18, la apertura del canal se desplazó ligeramente a potenciales más negativos. Además, el valor de corriente a 70 mV se incrementó aproximadamente tres veces (Tabla 7). Debido a la potenciación de Kv7.2 producida por la expresión de Kv7.3, estos datos indicaban la expresión del heterotetrámero Kv7.2/7.3.

Caracterización farmacológica de la línea Kv 7.2/mEYFP-Kv7.3 desarrollada

La retigabina (RTG) se ha descrito en numerosos estudios como un compuesto activador de estos canales [28-30]. Si las corrientes registradas en el clon 19 son debidas a los canales iónicos Kv7.2/7.3, serán sensibles a la aplicación de la retigabina. Por este motivo, se decidió estudiar el efecto de la retigabina sobre estos canales y de esta forma, caracterizar farmacológicamente la línea Kv7.2/7.3.

Para ello, se desarrollaron varios protocolos. En primer lugar, se diseñó un protocolo continuo a un voltaje fijo negativo cercano al potencial de activación del canal (-55 mV). Con éste, se analizó el efecto de concentraciones crecientes de retigabina (de 0.1 a 20 μ M) sobre la actividad de Kv7.2/7.3. Entre cada concentración aplicada, se lavó con tampón de solución externa hasta recobrar el nivel de corriente que tenía antes de la aplicación del compuesto (Figura 17A).

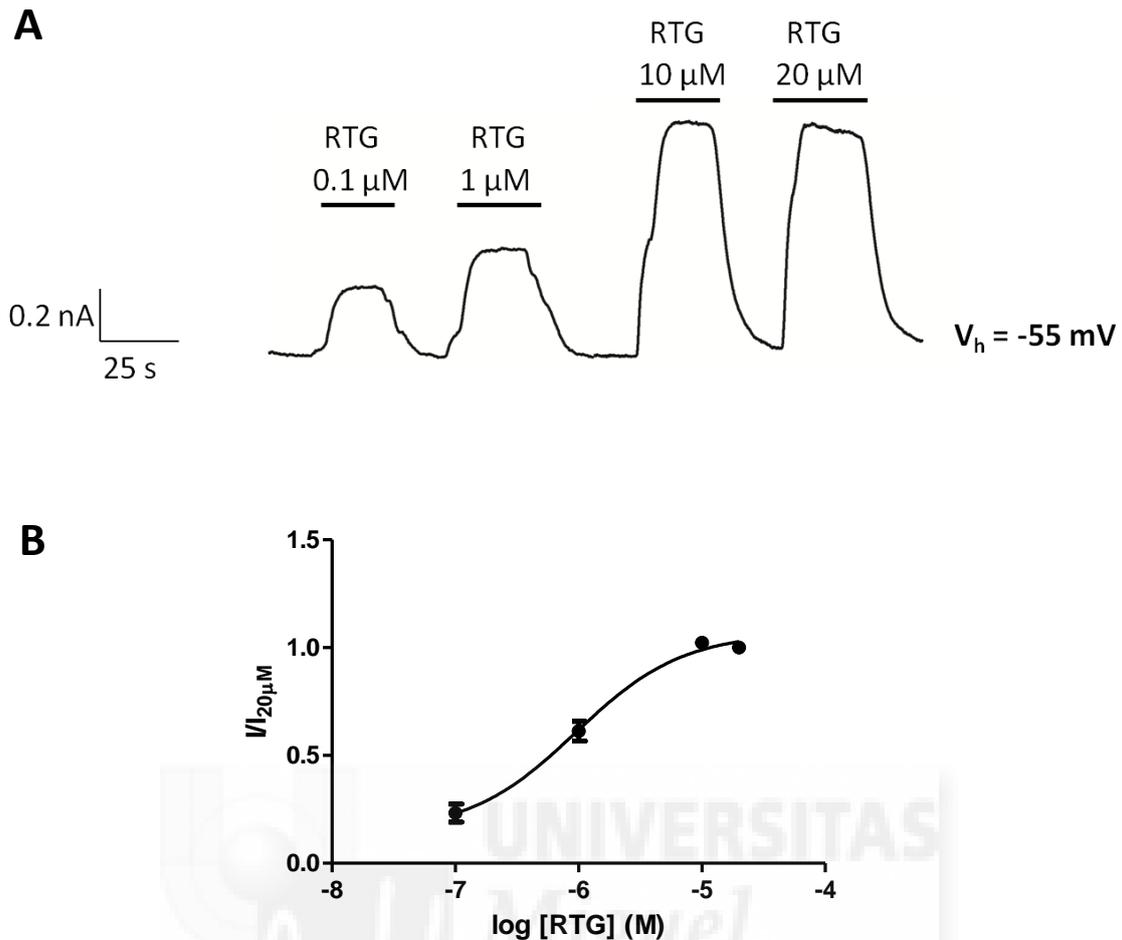


Figura 17. Respuesta de la línea Kv7.2/mEYFP-Kv7.3 frente a retigabina. A. Corrientes iónicas activadas tras la exposición a concentraciones crecientes de retigabina (0.1, 1, 10 y 20 μ M). Debido a que estos canales iónicos presentan activación por voltaje, el experimento se realizó al voltaje continuo de -55 mV. Entre cada estímulo se lavó con tampón solución externa hasta que se restableció el nivel basal de corriente en ausencia de estímulo. B. Relación dosis-respuesta para la activación por retigabina. Las corrientes se normalizaron en base al valor de corriente obtenido a 20 μ M para reducir la variabilidad entre células. Estos valores se representaron como función de la concentración de retigabina y se ajustaron a la ecuación de Hill, siendo $E_{min}=0.233$ y $E_{max}=1.023$. Datos expresados en media \pm SEM; N=1; n=4.

En el tratamiento con retigabina a -55 mV, la administración de este compuesto produjo un aumento de la corriente observada (Figura 17). Además, este incremento fue dependiente de la dosis administrada. La concentración en la que se detectó el máximo valor de corriente (700 ± 80 pA) es de 10 μ M. A partir de este valor, el valor de corriente fue constante. La concentración de retigabina que produjo la activación del 50% de los canales iónicos (EC_{50}) se situó en 0.95 ± 0.02 μ M. El valor basal de corriente se recuperó tras un lavado con solución externa.

En conclusión, los experimentos realizados confirman la expresión del heterotetrámero funcional Kv7.2/7.3 en el clon 19. De esta forma, se ha conseguido generar una línea celular que expresa establemente ambos canales iónicos.

Discusión

Para percibir un estímulo nocivo como una sensación dolorosa se requiere de un proceso muy complejo en el que están implicadas una gran cantidad de moléculas. Algunas de ellas y que actualmente han surgido como dianas terapéuticas para el tratamiento del dolor crónico son quinasas lipídicas [31], transportadores de glutamato [32] o canales iónicos [33].

En este último grupo, el de los canales iónicos, encontramos el heterotetrámero Kv7.2/7.3 que participa directamente en la transmisión de las señales dolorosas y en el cual se ha focalizado este trabajo.

El estudio de los canales iónicos Kv7.2 y Kv7.3 ya se ha abordado con éxito en múltiples estudios gracias al desarrollo de una línea celular que expresa establemente estas proteínas [29, 30].

En nuestro trabajo, para facilitar la búsqueda de analgésicos, se ha seguido con esta estrategia y se ha construido una línea celular humana Kv7.2/mEYFP-Kv7.3.

Respecto a los resultados obtenidos, a pesar de la presencia de canales iónicos endógenos en la línea celular HEK293, concluimos que las corrientes producidas por los mismos no interfieren con las generadas por los canales Kv7.2/7.3. Esto se debe a que este heterotetrámero conduce corrientes con una intensidad mucho mayor ($I_{70\text{mV}} = 4000 \pm 400 \text{ pA}$) a las corrientes endógenas ($I_{70\text{mV}} = 280 \pm 20 \text{ pA}$) y se activan a voltajes más positivos (-30 mV) que los canales Kv 7.2/7.3 (-60 mV). Consecuentemente, si se fija el voltaje de los experimentos en el rango comprendido entre -60 y -30 mV, los canales endógenos no estarán abiertos, de forma que se anularán las corrientes endógenas, evitando cualquier posible interferencia (Tabla 7).

Un inconveniente al que nos enfrentamos fue la inserción de las secuencias de los ADNc de los dos canales iónicos en plásmidos con el mismo gen de resistencia a antibiótico. Este hecho dificultó la selección de clones que expresaran ambos canales tras el proceso de cotransfección. Sin embargo, esto se pudo resolver gracias a la presencia de una secuencia testigo como es mEYFP, cuya expresión produce una proteína que emite fluorescencia. Como el ADNc de Kv7.3 se había incorporado fusionada a mEYFP, la expresión de esta proteína se correlacionaba con la de este canal. Mediante un microscopio de fluorescencia, detectamos de forma sencilla las células que expresaban mEYFP-Kv7.3, lo que permitió su aislamiento.

En cuanto al procedimiento seguido para generar la línea Kv7.2/mEYFP-Kv7.3, se realizaron diferentes protocolos de transfección. En primer lugar, se cotransfectaron los ADNc de Kv7.2 y Kv7.3

en idénticas proporciones. Sin embargo, sólo se consiguieron aislar clones que insertaron en su genoma la secuencia de Kv7.3 lo que señalaba una baja eficiencia de transfección de Kv7.2. Por este motivo, se decidió abordar un nuevo enfoque que consistía en la cotransfección de ambas secuencias pero utilizando una cantidad mucho mayor de Kv7.2. De esta transfección, se obtuvo un clon que expresaba Kv7.2. No obstante, no se detectó la transfección de Kv7.3 en estas células.

Ante la dificultad de obtener clones que incorporaran ambos canales simultáneamente, se decidió hacer de manera secuencial. Se volvió a transfectar el clon que expresaba Kv7.2 sólo con Kv7.3. Para detectar los clones que hubieran incorporado Kv7.3 y lo expresaran, se observó la expresión de YFP. Las medidas de fluorescencia concordaron con los resultados obtenidos con las otras técnicas utilizadas. Esta vez se logró aislar un clon que expresaba el heterotetrámero Kv7.2/7.3. Los datos obtenidos del análisis funcional de este clon coincidían con los descritos anteriormente para estos canales iónicos. Esto parecía indicar que se había conseguido construir con éxito la línea Kv7.2/7.3.

Para caracterizar con mayor profundidad la línea celular Kv7.2/7.3, se llevó a cabo un estudio farmacológico de la misma con el conocido modulador de estos canales iónicos, retigabina [28-30]. De acuerdo a lo descrito anteriormente, se pudo registrar la activación de corrientes tras la aplicación con retigabina. Esto confirmó que las corrientes registradas en el clon 19 procedían de los canales Kv7.2/7.3 transfectados. Además, la sensibilidad frente a la activación por retigabina, indicaba que la línea celular generada servirá para encontrar nuevos compuestos activadores de estos canales.

En algunos casos, la detección inicial de Kv7.2 y Kv7.3 por PCR no se correlacionó con los datos de los registros electrofisiológicos realizados mediante *patch clamp*. Esto podría deberse a que para insertar estas secuencias en el ADN genómico, las células necesitan linealizar el plásmido mediante enzimas de restricción. Este corte podría haber ocurrido en alguna región del plásmido necesaria para la transcripción de estos ADNc, como por ejemplo, dentro de las secuencias de Kv7.2 y Kv7.3; esto impediría la generación de una proteína funcional.

La carencia de un tratamiento satisfactorio para pacientes con dolor crónico, hace que la aplicación de esta línea Kv7.2/mEYFP-Kv7.3 en métodos de cribado de alto rendimiento, sea una gran oportunidad para facilitar la búsqueda de compuestos con mejor índice terapéutico que actúen frente a esta patología.

Como se ha dicho anteriormente, el heterotetrámero Kv7.2/7.3, está implicado en la regulación de la actividad de células excitables. Esto implica que el tratamiento de otras patologías causadas por

descarga neuronal excesiva, como la epilepsia, se pueda abordar a través de la modulación de estos canales iónicos.

Consecuentemente, la línea Kv7.2/mEYFP-Kv7.3 generada podrá servir para encontrar simultáneamente nuevos compuestos analgésicos y anticonvulsivos, para el tratamiento del dolor crónico y de la epilepsia, respectivamente.



Conclusiones y proyección futura

Considerando los objetivos iniciales y contrastándolos con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, se han extraído las siguientes conclusiones:

1. En este trabajo se ha desarrollado una línea celular que expresa establemente los canales iónicos Kv7.2 y Kv7.3 de forma heteróloga.
2. Las características funcionales y farmacológicas de los canales expresados en esta línea se ajustan a las propiedades del heterómero Kv7.2 y Kv7.3 descritas en anteriores estudios [16]. Esto sugiere que se trata de un buen sistema para el estudio y el cribado farmacológico de estos canales iónicos.

La línea celular Kv7.2/mEYFP-Kv7.3 desarrollada abrirá las puertas a su uso en plataformas de alto rendimiento como IonFlux™ o mediante la utilización de sondas fluorescentes. Esto facilitará y acelerará la búsqueda de nuevos activadores de estos canales que puedan servir como potenciales analgésicos o antiepilépticos.



Bibliografía

1. Dubin, A.E. and A. Patapoutian, *Nociceptors: the sensors of the pain pathway*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3760-72.
2. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell, 2009. **139**(2): p. 267-84.
3. Millan, M.J., *The induction of pain: an integrative review*. Prog Neurobiol, 1999. **57**(1): p. 1-164.
4. Chapman, C.R., *New directions in the understanding and management of pain*. Soc Sci Med, 1984. **19**(12): p. 1261-77.
5. Grichnik, K.P. and F.M. Ferrante, *The difference between acute and chronic pain*. Mt Sinai J Med, 1991. **58**(3): p. 217-20.
6. Breivik, H., et al., *Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment*. Eur J Pain, 2006. **10**(4): p. 287-333.
7. Gaskin, D.J. and P. Richard, *The economic costs of pain in the United States*. J Pain, 2012. **13**(8): p. 715-24.
8. Cross, S.A., *Pathophysiology of pain*. Mayo Clin Proc, 1994. **69**(4): p. 375-83.
9. Purves, D., et al., eds. *Neuroscience*, 2nd edition, ed. S. Associates. 2001.
10. Schaible, H.G. and F. Richter, *Pathophysiology of pain*. Langenbecks Arch Surg, 2004. **389**(4): p. 237-43.
11. Markenson, J.A., *Mechanisms of chronic pain*. Am J Med, 1996. **101**(1a): p. 6s-18s.
12. Health, U.o.W.S.o.M.a.P. *Pain Management*. 2010.
13. Rod Nave, K.X.C., *Potenciales de Acción 2008*
14. Tsantoulas, C. and S.B. McMahon, *Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain*. Trends Neurosci, 2014. **37**(3): p. 146-58.
15. Yoshihisa Kurachi, L.Y.J., Michel Lazdunsky *Potassium Ion Channels: Molecular Structure, Function, and Diseases*. Vol. 46 1999
16. Brown, D.A. and G.M. Passmore, *Neural KCNQ (Kv7) channels*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(8): p. 1185-95.
17. Fritch, P.C., et al., *Novel KCNQ2/Q3 agonists as potential therapeutics for epilepsy and neuropathic pain*. J Med Chem, 2010. **53**(2): p. 887-96.
18. Humphries, E.S. and C. Dart, *Neuronal and Cardiovascular Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets: Promise and Pitfalls*. J Biomol Screen, 2015. **20**(9): p. 1055-73.
19. Cooper, E.C. and L.Y. Jan, *M-channels: neurological diseases, neuromodulation, and drug development*. Arch Neurol, 2003. **60**(4): p. 496-500.
20. SPEED BioSystems, L. *Stable Cell Line Development Service*. 2016
21. Gribkoff, V.K., *The therapeutic potential of neuronal KCNQ channel modulators*. Expert Opin Ther Targets, 2003. **7**(6): p. 737-48.
22. Deeks, E.D., *Retigabine (ezogabine): in partial-onset seizures in adults with epilepsy*. CNS Drugs, 2011. **25**(10): p. 887-900.
23. Devulder, J., *Flupirtine in pain management: pharmacological properties and clinical use*. CNS Drugs, 2010. **24**(10): p. 867-81.
24. Harish, S., et al., *Flupirtine: Clinical pharmacology*. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2012. **28**(2): p. 172-7.
25. Michel, M.C., et al., *Unexpected frequent hepatotoxicity of a prescription drug, flupirtine, marketed for about 30 years*. Br J Clin Pharmacol, 2012. **73**(5): p. 821-5.
26. Brunstein, J., *PCR: the basics of the polymerase chain reaction*. MLO Med Lab Obs, 2013. **45**(4): p. 32, 34-5.
27. Odgen, D. and P. Stanfield, *Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording*, in *Microelectrode Techniques, 2nd edition*. 1994.

28. Main, M.J., et al., *Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(2): p. 253-62.
29. Rundfeldt, C. and R. Netzer, *The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits*. Neurosci Lett, 2000. **282**(1-2): p. 73-6.
30. Tatulian, L., et al., *Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine*. J Neurosci, 2001. **21**(15): p. 5535-45.
31. Loo, L., B.D. Wright, and M.J. Zylka, *Lipid kinases as therapeutic targets for chronic pain*. Pain, 2015. **156 Suppl 1**: p. S2-10.
32. Gegelashvili, G. and O.J. Bjerrum, *High-affinity glutamate transporters in chronic pain: an emerging therapeutic target*. J Neurochem, 2014. **131**(6): p. 712-30.
33. Mathie, A., *Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain*. J Pharm Pharmacol, 2010. **62**(9): p. 1089-95.

