

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Área de Bioquímica y Biología Molecular

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y
FUNCIONALIDAD DE LOS MUTANTES W369C Y
V413I DEL CANAL IÓNICO K_v2.1**

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2023/2024

Autor Iván Carrasco Victoria

Tutor académico Dr. Antonio Vicente Ferrer Montiel

Tutora profesional Dra. Eva María Villalba Riquelme

Resumen

El presente trabajo se centra en la caracterización de mutaciones en el canal de potasio dependiente de voltaje $K_v2.1$, identificadas en dos niños con fenotipo epiléptico que no respondieron a tratamientos convencionales. La epilepsia, definida por la OMS como un trastorno crónico del cerebro caracterizado por crisis recurrentes, afecta a aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo, generando impactos significativos en la calidad de vida y repercusiones socioeconómicas. Las mutaciones específicas encontradas (W369C y V413I) en los pacientes plantean la necesidad de entender mejor su influencia en la función de $K_v2.1$. Este trabajo investiga estas mutaciones a través de la expresión y análisis funcional de las proteínas mutantes en células HEK293 transfectadas, comparando sus propiedades electrofisiológicas con las de la variante WT mediante la técnica electrofisiológica *patch clamp* y ensayos de inmunocitoquímica. Los resultados obtenidos indican una reducción significativa en las corrientes generadas, así como una expresión significativamente menor de los canales mutantes. Este avance proporciona una base para el desarrollo de terapias dirigidas que podrían mejorar la calidad de vida de pacientes de encefalopatías epilépticas.

Palabras clave: epilepsia, $K_v2.1$, mutaciones, canal iónico

Abstract

This study focuses on the characterization of mutations in the voltage-gated potassium channel $K_v2.1$, identified in two children with an epileptic phenotype who did not respond to conventional treatments. Epilepsy, defined by the WHO as a chronic brain disorder characterized by recurrent seizures, affects around 50 million people worldwide, significantly impacting quality of life and creating socioeconomic burdens. The specific mutations discovered (W369C and V413I) in these patients underscore the need to better understand their effect on $K_v2.1$ function. This research examines these mutations by expressing and analyzing the mutant proteins in transfected HEK293 cells, comparing their electrophysiological properties to those of the wild-type variant using the patch-clamp technique and immunocytochemistry assays. The findings reveal a significant reduction in the generated currents and a notably lower expression of the mutant channels. This progress lays the groundwork for the development of targeted therapies that could enhance the quality of life for patients with epileptic encephalopathies.

Keywords: epilepsy, $K_v2.1$, mutations, ion channel

Agradecimientos

Gracias, papá y mamá, por haberme apoyado siempre.

Gracias abuelos, por el ejemplo que fuisteis y sois.

Gracias Alejandro, no tendré más suerte en la vida que la que he tenido contigo como hermano.

Gracias, Eloy y Keko, por ser mi segunda familia y estar en las buenas y las malas.

Gracias Silvia, por la fuerza y el amor incondicional que siempre me has dado, estoy orgulloso de estar a tu lado.

Gracias, sin vosotros no hubiera sido posible.



Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ANOVA: Análisis de varianza

CMV: Citomegalovirus

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco

D-PBS: Solución tampón fosfatada

DsRed: Proteína fluorescente roja de *Discosoma*

EGTA: Ácido egtazico

FBS: Suero fetal bovino

GFP: Proteína fluorescente verde

HEK293: Células embrionarias de riñón humano 293

IK: Corriente rectificadora tardía

Kan/NeoR: Resistencia a kanamicina y neomicina

K_v: Canal de potasio dependiente de voltaje

Na_v: Canal de sodio dependiente de voltaje

NGS: Suero normal de cabra

MCS: Sitio de clonación múltiple

SEM: Error estándar de la media

smGFP: Proteína fluorescente verde con solubilidad modificada

SV-40 poly-A: Poliadenilato de virus 40 de simio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución tampón fosfatada

WT: Variante silvestre

Índice

1. Introducción.....	5
1.1. Introducción del problema	5
1.2. Epilepsia.....	5
1.3. Fisiopatología de la epilepsia	6
1.4. Potencial de acción.....	8
1.5. Canales iónicos	10
1.6. Canales de potasio dependientes de voltaje	10
1.7. K _v 2.1.....	11
2. Antecedentes y objetivos	13
3. Materiales y Métodos.....	15
3.1. Cultivo celular.....	15
3.2. Construcción de los plásmidos para la transfección de W369C y V413I.....	15
3.3. Transfección	17
3.4. Electrofisiología	17
3.5. Inmunocitoquímica.....	19
3.6. Análisis de datos	20
4. Resultados	21
4.1. Ajuste de densidad de siembra	21
4.2 Análisis de la expresión proteica	22
4.3 Estudio de la Funcionalidad de los canales	27
5. Discusión	32
6. Conclusiones y proyección futura	35
7. Referencias	36

1. Introducción

1.1. Introducción del problema

En el hospital Niño Jesús se intentó tratar a dos niños con fenotipo epiléptico que, lamentablemente, no respondieron a tratamientos convencionales. Debido a esto, se realizó un estudio genético y se encontró que tenían una mutación en un canal de potasio dependiente de voltaje, más concretamente en $K_v2.1$.

Las mutaciones que fueron halladas eran de sustitución, una de ellas de triptófano a cisteína en el aminoácido 369 (W369C) y la otra de valina a isoleucina en el aminoácido 413 (V413I).

Este descubrimiento, junto con la falta de respuesta de los pacientes a tratamientos convencionales, presentó la necesidad de estudiar ambas mutaciones con el fin de desarrollar un tratamiento efectivo para estos dos niños además de para posibles futuros pacientes.

Por ello, en este trabajo se tratará de caracterizar algunos aspectos de estas mutaciones, dando así el primer paso en la tarea de desarrollar nuevos tratamientos para pacientes con fenotipo epiléptico.

1.2. Epilepsia

Primero cabe explicar en qué consiste esta patología. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2024) define esta enfermedad como un trastorno crónico del cerebro caracterizado por crisis recurrentes. Estas crisis, también llamadas ataques epilépticos, son una serie de movimientos involuntarios de una parte del cuerpo (parciales) o de todo el cuerpo (generalizadas), que pueden venir acompañadas de alteraciones sensoriales, pérdida del control de los esfínteres y/o pérdidas de conciencia (Fisher et al., 2014; Fisher et al., 2005).

En la actualidad, alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo sufren epilepsia, siendo esta una de las enfermedades neurológicas más comunes (Fisher et al., 2014; OMS, 2024).

Cabe añadir que esta enfermedad conlleva ciertas consecuencias más allá de los síntomas y es que en muchas ocasiones las personas con epilepsia se enfrentan a prejuicios tales como que

su enfermedad es incurable e incluso contagiosa. Esta situación fomenta que muchos pacientes se vean abocados a la marginalidad y el ostracismo (OMS, 2024).

Además del evidente deterioro en la calidad de vida de los pacientes, este trastorno tiene graves repercusiones a nivel social y económico debido principalmente a la necesidad de asistencia sanitaria que requiere, a las muertes prematuras que genera y a la pérdida de productividad laboral (Fisher et al., 2014; Fisher et al., 2005; OMS, 2024).

Todo lo anteriormente mencionado subraya la importancia de continuar investigando los mecanismos subyacentes a esta enfermedad.

1.3. Fisiopatología de la epilepsia

Las crisis epilépticas se originan debido a una descarga eléctrica brusca, excesiva e hipersincrónica de un grupo de neuronas, y de su propagación a través de redes neuronales. Por tanto, sus efectos vendrán determinados por las partes del cerebro que afecten (Staley & Dudek, 2006).

De las distintas partes anatómicas que forman el cerebro los ataques se originan y afectan a uno o varios de los cuatro lóbulos del cerebro: frontal, parietal, occipital y temporal. Estos lóbulos se encargan de controlar las actividades cognitivas, la percepción sensorial y las contracciones de los músculos esqueléticos (Boore, 2016).

Para funcionar adecuadamente, estas partes requieren de una comunicación correctamente medida y coordinada entre las neuronas que los forman. Esta comunicación entre neuronas se basa en señales electroquímicas que son reguladas por las distintas regiones de la neurona: dendritas, soma y axón (Bear et al., 2007; Hille, 2001).

En el caso del axón, es relevante mencionar que consta de dos regiones diferenciadas. Una región que se encuentra recubierta parcialmente por vainas de mielina y otra parte donde el axón termina y que se conoce como axón terminal el cual se encuentra muy próximo en el espacio a las dendritas de otras neuronas (Bear et al., 2007; Hille, 2001).

Como se ha mencionado, estos mensajes son electroquímicos y se pueden separar en dos partes, una eléctrica y otra química. La parte eléctrica de esta comunicación se produce a través de una descarga eléctrica conocida como potencial de acción que se caracteriza por una

despolarización “todo o nada”, propagándose desde las dendritas hasta el terminal del axón (Faber & Pereda, 2018; Hahn et al., 2019; Hille, 2001).

Por otra parte, como se puede observar en la Figura 1, el mecanismo químico de la comunicación neuronal sucede mediante la transmisión sináptica, que permite la propagación de la señal entre neuronas mediante impulsos químicos que se convierten en impulsos eléctricos en la dendrita de la neurona postsináptica (Faber & Pereda, 2018; Hahn et al., 2019; Hille, 2001).

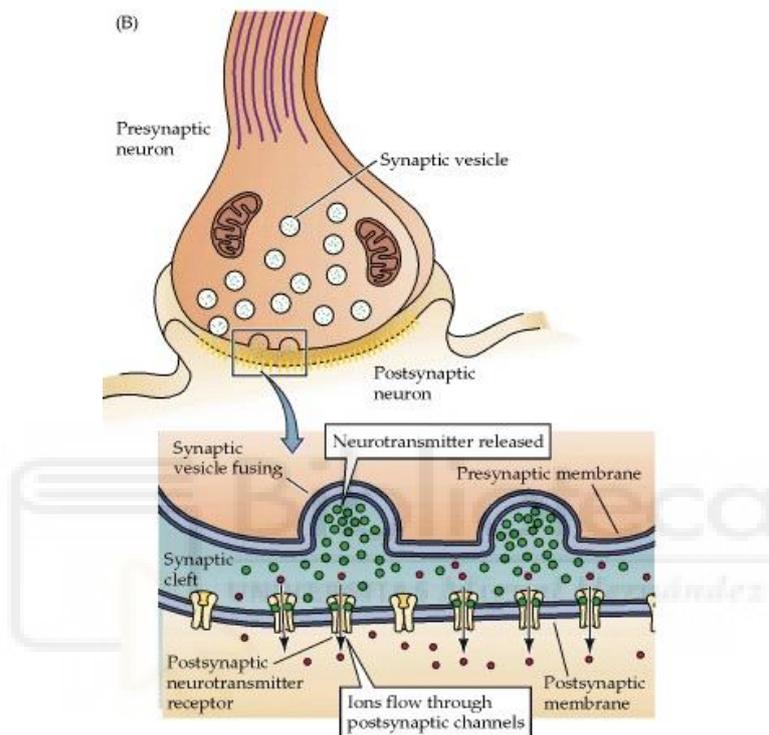


Figura 1. Esquema de la sinapsis. En esta imagen se puede observar una ilustración detallando el proceso de sinapsis entre dos neuronas. En verde encontramos neurotransmisores siendo liberados en el espacio sináptico desde el axón terminal mediante vesículas sinápticas. Estos neurotransmisores actúan sobre los receptores de la dendrita de la célula postsináptica abriendo los canales de sodio (representado en rojo) y permitiendo su entrada a través de los canales. Extraída de (Purves D, 2001).

Es decir, una neurona recibe una señal química en las dendritas en forma de neurotransmisores y estos generan, o no, una respuesta eléctrica. Esta señal eléctrica vendrá regulada por el equilibrio entre neurotransmisores excitatorios e inhibitorios que favorecerán o no que se despolarice la neurona y se disparen los potenciales de acción respectivamente (Bear et al., 2007; Faber & Pereda, 2018; Hahn et al., 2019; Hille, 2001).

Estos potenciales viajarán a través de la neurona, llegarán al axón terminal y provocarán la liberación de una serie de neurotransmisores que alcanzarán a otra neurona. Este proceso se da entre varias neuronas simultáneamente y se repetirá mientras que los estímulos excitatorios

superen a los inhibitorios, de lo contrario cesará (Bear et al., 2007; Faber & Pereda, 2018; Hahn et al., 2019; Hille, 2001).

Una neurona puede recibir mensajeros químicos de varias neuronas a la vez y el equilibrio entre excitadores e inhibidores recibidos es lo que permite detectar a la neurona con qué intensidad se está recibiendo un estímulo. De esta forma, un estímulo que no es lo suficiente intenso no llega a producir un potencial de acción, que es la descarga eléctrica que producen las células al excitarse. Esto también permite que un potencial de acción que viaja por una región del cerebro no pase a regiones indeseadas que podrían comprometer el correcto funcionamiento de este (Bear et al., 2007; Faber & Pereda, 2018; Hahn et al., 2019; Hille, 2001).

En el caso de la epilepsia, existen neuronas conocidas como epileptógenas que se encuentran en un estado de hiperexcitabilidad, es decir, tienden a generar más potenciales de acción de lo debido. Este estado puede ser consecuencia del aumento de la neurotransmisión excitadora, de la disminución de la neurotransmisión inhibitoria, de una alteración de los canales iónicos controlados por voltaje, o de una alteración de las concentraciones iónicas intracelulares o extracelulares que favorecen la despolarización de la membrana celular (Faber & Pereda, 2018; Lagarde et al., 2022; Staley & Dudek, 2006).

Como se puede notar, el problema radica en la incapacidad de regular la generación de potenciales de acción adecuadamente. Por este motivo, por lo que cabe hablar más en detalle de estos.

1.4. Potencial de acción

Un potencial de acción ocurre como consecuencia de un cambio en el voltaje de la membrana. Este potencial se genera debido a la diferencia de cargas positivas y negativas que existe entre el interior de esta membrana y su exterior (Bear et al., 2007). En la Figura 2 se puede observar un esquema que ilustra este proceso.

En su estado basal, la membrana se encuentra entre -70 y -60 mV y el proceso comienza cuando un estímulo provoca un cambio en el voltaje de la membrana que incrementa hasta alcanzar el potencial umbral (Bear et al., 2007).

Como se representa en la Figura 2, tras alcanzar este potencial umbral llega la fase de **despolarización** donde los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) se abrirán permitiendo que el sodio, que se encuentra a mayor concentración fuera de la membrana que

dentro, entre a la célula y el potencial de acción se disparará y aumentando rápidamente el voltaje de la membrana hasta su pico límite, entre +30 y +40 mV (Bear et al., 2007; Hahn et al., 2019; Hille, 2001).

En este punto comienza la fase de **repolarización** donde los Na_v se cerrarán, y se abrirán los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v). Estos canales K_v aumentarán drásticamente la permeabilidad del potasio el cual, al encontrarse en mayor concentración dentro de la membrana que fuera, saldrá provocando un rápido descenso en el voltaje de la membrana hasta valores más negativos que el basal, fase conocida como **hiperpolarización**, antes de que los canales K_v se cierren completamente (Bear et al., 2007; Hahn et al., 2019; Hille, 2001).

Finalmente, las bombas de Na^+/K^+ y otros mecanismos celulares recuperarán los valores basales de concentración de iones y por tanto el voltaje basal de la membrana.

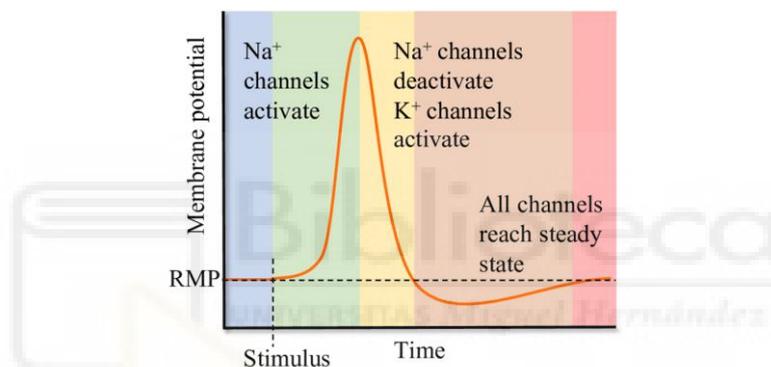


Figura 2. Esquema de un potencial de acción marcando las diferentes fases de este. Se puede observar las distintas fases en colores diferentes. En azul encontramos el estado de la célula con su potencial de reposo. En verde se muestra la despolarización, donde la célula recibe un estímulo que alcanza el umbral y abre los canales de sodio disparando el potencial de acción. En amarillo se muestra la repolarización, donde ocurre la inactivación de los canales de sodio y la apertura de los canales de potasio volviendo a llevar el potencial de la membrana a valores negativos. En la fase naranja encontramos la hiperpolarización, donde todos los canales vuelven a sus estados basales y se recupera el potencial basal. Finalmente, en rojo la membrana vuelve a su voltaje basal. Extraída de (Verma et al., 2020).

Como se puede observar, el correcto funcionamiento de los canales iónicos es imprescindible para una correcta excitabilidad neuronal. Es por esto por lo que diversos estudios encontraron relación entre la epilepsia y mutaciones en canales iónicos (Bloms-Funke et al., 2022; Lerche et al., 2001; Oyler et al., 2018; Schmidt & Schachter, 2014).

1.5. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que permiten el flujo selectivo de iones a través de la membrana celular. Este proceso resulta fundamental para la generación y propagación de señales eléctricas en las neuronas. De esta forma, se puede entender el rol que juegan en la generación y propagación de estas señales eléctricas (Catterall, 2010).

Mientras la intensidad del estímulo permita alcanzar el potencial umbral, se disparará un potencial de acción que mantendrá siempre las mismas características. En cuanto a cómo varía la señal eléctrica para diferenciar entre estímulos más o menos intensos, esto se logra mediante el número de potenciales de acción continuos. Es decir, a mayor número de potenciales de acción disparados de forma continua mayor es la intensidad del estímulo recibido (Bear et al., 2007; Catterall, 2010).

Un correcto funcionamiento de los canales iónicos responsables de la repolarización es importante ya que, de repolarizarse de manera anómala, un estímulo podría dar lugar a más o menos potenciales de acción de los debidos, interpretándose el mismo con una intensidad errónea.

Estos canales se clasifican según el ion que transportan y el mecanismo que regula su apertura y cierre. La principal familia encargado de la repolarización es la de los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v).

1.6. Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) constituyen una subfamilia específica de canales iónicos que se activan en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Se componen típicamente de cuatro subunidades α , que forman el poro del canal. Cada subunidad α se compone a su vez de seis segmentos transmembrana (S1-S6). El segmento S4 es particularmente importante porque contiene residuos de arginina o lisina, que son sensibles a los cambios en el potencial de membrana. Estos cambios inducen movimientos conformacionales en S4 que abren o cierran los canales en respuesta a cambios de voltaje (Catterall, 2010).

Esta subfamilia está a su vez clasificada en 12 tipos diferentes según la homología de secuencia de sus subunidades α , así como de sus propiedades funcionales en: KCNA (K_v1), KCNB (K_v2),

KCNC (K_v3), KCND (K_v4), KCNF (K_v5), KCNG (K_v6), KCNQ (K_v7), KCVN (K_v8), KCNS (K_v9) y KCNH (K_v10, K_v11, y K_v12) (Gutman et al., 2005).

Como se ha mencionado al comienzo de la *Introducción*, la mutación encontrada en los pacientes del hospital Niño Jesús se encuentra en K_v2.1. Por ello, este trabajo se centrará en este canal.

1.7. K_v2.1

El canal iónico K_v2.1, codificado por el gen KCNB1, es uno de los canales de potasio dependientes de voltaje más abundantes en el sistema nervioso central. Este canal es expresado predominantemente por neuronas y dentro de estas se localiza tanto en el soma, como en las dendritas proximales y en los segmentos iniciales del axón (Hille, 2001; Trimmer, 2015).

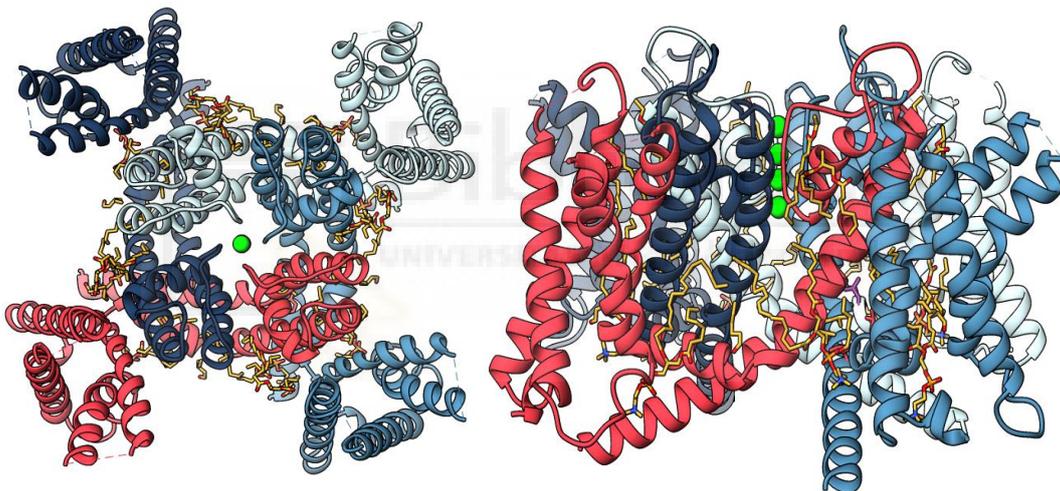


Figura 3. Visión lateral y desde arriba del canal iónico K_v2.1 tomadas mediante criomicroscopía electrónica. Las distintas subunidades se encuentran ilustradas en diferentes colores. Las esferas en verde representan el poro por el que pasan los iones de K⁺.

Extraída de (Fernández-Mariño et al., 2023)

Como se ha explicado anteriormente, K_v2.1 detecta con su subunidad S4 los cambios de voltaje y cuando este es suficientemente alto, el canal se abre permitiendo el paso de los iones de potasio (K⁺) y generando una corriente eléctrica de salida (Catterall, 2010; Hille, 2001).

Una característica de K_v2.1 es que se activa a voltajes un poco más altos que otros miembros de su familia como los K_v4, que participan de la parte inicial de la repolarización. Esto se debe principalmente a que la corriente de la que participa K_v2.1 junto con otros miembros de la familia

como los K_v1 es la corriente rectificadora tardía (IK). Esta corriente es la encargada de la rectificación sostenida en el tiempo del potencial de membrana (Hille, 2001).

Una falta o exceso de intensidad en estas corrientes podrían llevar a ciertas patologías. De hecho, algunas alteraciones en la función del canal $K_v2.1$ se han asociado con diversas condiciones patológicas, incluyendo epilepsia y trastornos neuropsiquiátricos (Allen et al., 2016; Torkamani et al., 2014; Trimmer, 2015).



2. Antecedentes y objetivos

En 2014, Torkamani et al. (2014) fueron los primeros en relacionar ciertas mutaciones del gen KCNB1 (concretamente S347R, G379R y T374I) con encefalopatías de fenotipo epiléptico.

Desde entonces, estudios como el realizado por Xiong et al. (2021) han buscado y caracterizado, en pacientes con encefalopatías epilépticas, distintas mutaciones de la proteína Kv2.1. Este estudio, por ejemplo, halló y caracterizó, en diez pacientes con fenotipo epiléptico, ocho mutaciones desconocidas y una ya identificada en otro estudio (Miao et al., 2017). Cuando analizaron la funcionalidad mediante electrofisiología de estas nuevas mutaciones descubrieron que tres de ellas eran de pérdida parcial de función, cinco de ellas de pérdida total de función.

Cabe añadir que, como avance significativo en el estudio de Kv2.1, recientemente se ha publicado en un estudio la estructura de Kv2.1 (Fernández-Mariño et al., 2023). La estructura, que fue reconstituida en nanodiscos lípicos y obtenida mediante microscopía electrónica, permitió modelar y estudiar los mecanismos de apertura e inactivación y cierre tanto del WT como de distintos mutantes, así como compararlos con los de otros canales iónicos ya estudiados. De esta forma, sentaron un precedente en la búsqueda de nuevos tratamientos, por un lado, permitiendo conocer en mayor profundidad los mecanismos subyacentes al funcionamiento Kv2.1 y por otro con la caracterización de mutantes.

Actualmente, algunos de los pacientes que padecen epilepsia debido a mutaciones en el gen KCNB1 responden a fármacos convencionales (Xiong et al., 2021). Sin embargo, siguen existiendo muchos otros casos en los que no, son estos casos los que subrayan la necesidad de buscar nuevos potenciales fármacos (Xiong et al., 2021).

En esta búsqueda se encuentran estudios como el de Fernández-Mariño et al. (2023). En este estudio trataron con ditiotreitol al doble mutante T199C/Q293C de pérdida de función y observaron como recuperó significativamente la conductancia. Recientemente se publicó también el informe clínico de un paciente de 12 años que tras no responder a tratamientos convencionales fue tratado con canabidiol altamente purificado (Ferrera et al., 2024). Según el reporte, en el momento de escritura de este el paciente estuvo sin sufrir ningún ataque epiléptico durante dieciocho meses.

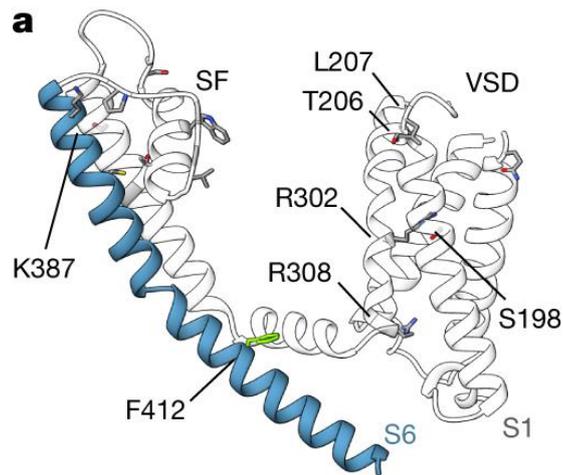


Figura 4. Estructura modelada de un monómero de KV2.1. Se encuentra marcada con mutaciones que causan encefalopatías epilépticas en distintas regiones del monómero. Extraída de Fernández-Mariño et al., 2023.

En el presente trabajo se pretendió colaborar en el estudio y caracterización de los mutantes de $K_v2.1$ y es por eso por lo que se plantearon los siguientes objetivos específicos con respecto a los mutantes W369C y V413I:

1. Establecimiento de un protocolo de siembra y transfección de la línea celular HEK293 para la realización de *patch clamp* y ensayos de inmunocitoquímica.
2. Análisis de las diferencias entre la expresión de la proteína $K_v2.1$ WT y sus variantes mutantes mediante ensayos de inmunocitoquímica.
3. Análisis de las diferencias a nivel funcional entre $K_v2.1$ WT y sus variantes mutantes mediante experimentos de *patch clamp*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivo celular

Para la realización de los distintos experimentos que se registran en esta memoria se utilizó la línea celular HEK293. Las células HEK293 fueron cultivadas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco™) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) y 1% de penicilina-estreptomina (Invitrogen).

Las células fueron sembradas y mantenidas en frascos de cultivo de 25 cm² con cuello inclinado (Corning®) a los que se les agregaba 5 ml del medio anteriormente descrito cada 2 días para mantener unas condiciones de crecimiento óptimas. Los frascos sembrados se mantuvieron en un incubador a 37 °C con un ambiente de 5 % de CO₂ para mantener las condiciones óptimas de crecimiento y viabilidad de las células.

Cuando las células alcanzaban una confluencia del 70-80 %, se llevó a cabo la tripsinización. Para ello se les retiraba el medio, se les añadía 1 ml de tripsina y se incubaba durante 3 minutos a 37°C. Tras la incubación se le añadía medio de cultivo en exceso para detener la acción de la tripsina. Por último, eran cuantificadas usando un hemocitómetro para su posterior siembra.

3.2. Construcción de los plásmidos para la transfección de W369C y V413I

Para la transfección de las variantes W369C y V413I de Kv2.1, se usaron vectores de expresión pIRES2-EGFP-(Addgene). Este vector estructural expresa un gen y Red Fluorescent Protein (DsRed) en un mismo transcrito. En este caso se usó una versión modificada de este vector para expresar Green Fluorescent Protein (GFP) en lugar de DsRed. Esta modificación se realizó con la finalidad de usar la fluorescencia verde de GFP como marcador de las células transfectadas al ser observadas al microscopio. Además de esto, el vector contiene el promotor CMV (promotor de citomegalovirus), como secuencia de terminación cuenta con SV-40 poly-A (poliadenilato de virus 40 de simio) y como marcador de selección la resistencia a neomicina (Kan/NeoR).

Cada secuencia de ADN complementario (ADNc) de interés se insertó en el sitio de clonación múltiple (MCS)-sobre vectores distintos de la siguiente forma: un vector con la secuencia del canal *Wild Type* (WT) de Kv2.1 humano, otro con la secuencia de ADNc que contiene la mutación

que produce el cambio del aminoácido triptófano 369 a cisteína (W369C), y otro con la mutación que produce el cambio de valina 413 a isoleucina (V413I). Los plásmidos fueron comprados a AddGene y el vector completo, con el gen KCNB1 y smGFP, tenía 7982 bp.

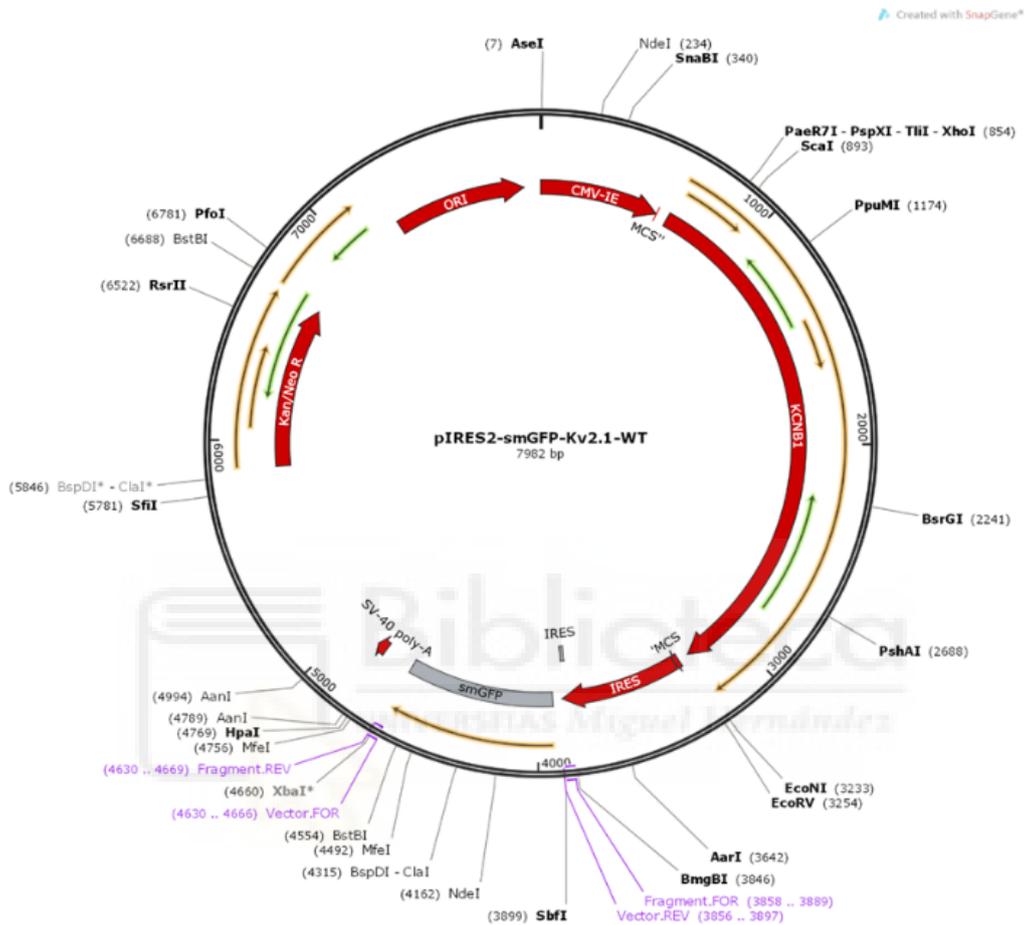


Figura 5. Mapa genético de la construcción del vector pIRES2-smGFP-Kv2.1-WT. En la imagen se muestra la construcción para el vector usado en la transfección de $K_v2.1$ WT obtenido de Addgene. El constructo contiene tanto el ADNc para smGFP como para KCNB1. La construcción para los mutantes es idéntica a $K_v2.1$ WT, a excepción de los cambios en los nucleótidos de la cadena de ADNc de KCNB1 que codifican las mutaciones W369C y V413I.

3.3. Transfección

Para la expresión de la proteína Kv2.1 WT y sus mutantes, las células HEK293 fueron transfectadas utilizando el agente de transfección Lipotransfectina (Optimum i+D). Brevemente, las construcciones de ADN plasmídico que contenían las secuencias codificantes de dichos canales fueron diluidas en medio DMEM y se incubaron junto al agente Lipotransfectina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron añadidos a cada pocillo de células HEK293 100 μ L de la mezcla de ADN-lipotransfectina (833,3 ng de ADN por mL de medio y 1,7 μ L de lipotransfectina por mL de medio) y se incubó durante 6 horas. Estas proporciones fueron las indicadas por la casa comercial para maximizar la expresión y minimizar la toxicidad.

Pasado el periodo de incubación, el medio con el reactivo de transfección fue retirado y reemplazado el volumen de cada pocillo por 500 μ L de medio de cultivo fresco. La expresión de estos canales se analizó entre 48 y 96 horas después de la transfección.

3.4. Electrofisiología

Para la caracterización funcional de los canales Kv2.1 WT, Kv2.1 W369C, y Kv2.1 V413I se realizaron experimentos de *patch clamp*. Para estos experimentos, se sembraron células HEK293 a una densidad de 10000 células por pocillo en placas de 24 pocillos con cristales pretratados con poli-L-lisina (Gibco™) durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido el período de incubación, se lavaron dos veces con *Phosphate Buffered Saline* (PBS) antes de sembrar las células. Tras un periodo de 24 a 48 horas después de sembrar las células, se realizó la transfección con el protocolo anteriormente mencionado. Los experimentos se llevaron a cabo entre 48 y 96 horas después de haber realizado la transfección.

Las pipetas utilizadas para estos registros se obtuvieron a partir de tubos de borosilicato de 1.5 mm de diámetro externo y 1.17 mm de diámetro interno (Harvard apparatus) que fueron estirados y pulidos con llama con un estirador P-97 (Sutter Instruments). Las pipetas utilizadas contaban con una resistencia de entre 2 y 5 M Ω . La resistencia a la hora de realizar los sellos fue de entre 0,2 y 1 G Ω . Las células transfectadas fueron identificadas visualmente mediante la expresión de la GFP con un microscopio invertido ZEISS Axio Observer A.1 con filtro de fluorescencia verde (510 nm de longitud de onda) y acoplado a una lámpara de fluorescencia.

Para la solución extracelular, usamos una disolución compuesta por NaCl 140 mM, KCl 4 mM, HEPES 10 mM, CaCl 1.8 mM, y glucosa 10 mM ajustado a pH 7,4 con NaOH. Para la solución interna: KCl 144 mM, MgCl₂ mM, 10 HEPES mM, 5 EGTA mM, ajustado a pH 7,2 con KOH.

Se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje para comparar las corrientes del Kv2.1 silvestre y las de los distintos mutantes. El protocolo consistió en una serie de pulsos de voltaje que comienzan con 100 ms a -80 mV, seguidos de 300 ms, que comienzan aplicando un potencial de membrana de -80 mV y variando en incrementos de 10 mV por cada pulso hasta alcanzar los 80 mV y finalizados por 100 ms donde el voltaje vuelve a -80 mV. Los datos fueron adquiridos con una frecuencia de 20 kHz y analizados utilizando el software Patchmaster v2x53. Los registros se adquirieron en configuración *whole-cell* utilizando un amplificador EPC10 Pulse® software (HEKA Elektronik).

Para obtener las curvas de Conductancia-Voltaje (G-V), los valores de conductancia se extrajeron de los valores de corriente obtenidos para cada voltaje mediante la siguiente fórmula derivada de la ley de Ohm:

$$G = \frac{I}{V - V_{eq}} \quad (1)$$

Donde G es la conductancia, una medida de la facilidad con la que una corriente eléctrica puede fluir a través de un circuito, I es la intensidad de corriente medida a un determinado voltaje, V es el voltaje, y V_{eq} es el potencial de equilibrio para un determinado ion el cual viene determinado por la ecuación de Nernst:

$$V_{eq} = \frac{RT}{z_{ion}F} \cdot \ln \left(\frac{[ion]_{out}}{[ion]_{in}} \right) \quad (2)$$

En esta ecuación, R es la constante de gases, T la temperatura en grados Kelvin, F la constante de Faraday, z_{ion} la carga para un determinado ion y $[ion]_{out}$ y $[ion]_{in}$ las concentraciones para un determinado ion fuera y dentro de la célula, respectivamente. La concentración externa de potasio fue 4 mM, la interna de 144 mM y al realizarse los experimentos a 25 °C la T fue 298,15. El resultado de V_{eq} fue igual a -92 mV.

Por último, se normalizaron los datos de conductancia (G) con los datos de conductancia máxima ($G_{m\acute{a}x}$) y se ajustaron a la ecuación de Boltzmann:

$$\frac{G}{G_{m\acute{a}x}} = G_{m\acute{i}n} + \frac{(G_{m\acute{a}x} - G_{m\acute{i}n})}{\left(1 + e^{\frac{V_{0,5} - V}{m}}\right)} \quad (3)$$

Donde, $G/G_{\text{máx}}$ fue la conductancia normalizada por la conductancia máxima, $G_{\text{mín}}$ la conductancia mínima, $V_{0.5}$ el potencial al que la conductancia es la mitad de la máxima, V el potencial al que se encuentra la conductancia normalizada y m la pendiente de la curva que equivale a RT/zF . Esto se debe a que bajo ciertas condiciones experimentales la pendiente es equivalente a la valencia de los iones que pasan por el canal siendo la k la constante de Boltzmann, $T=25^{\circ}\text{C}$ en grados Kelvin, F la constante de Faraday y z , la valencia, siendo equivalente a $-26/m$.

3.5. Inmunocitoquímica

Para estos experimentos, se sembraron 20000 células por cristal y se siguió el mismo protocolo de transfección realizado para los cristales usados en la técnica de *patch clamp*. Una vez transcurridas 48 horas de la transfección se realizó el siguiente protocolo:

Primero, se retiró el medio a los cristales y se lavaron 2 veces con *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (D-PBS) enriquecido con calcio y magnesio (SIGMA) para eliminar cualquier resto de medio. Tras los lavados, se les añadió paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos para su fijación. Tras ser fijadas, fueron sometidas a 3 lavados con D-PBS y posteriormente fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% (SIGMA) durante 5 minutos en agitación. Tras la permeabilización, se realizaron tres lavados de 5 minutos con D-PBS en agitación. Inmediatamente tras el último lavado, las células fueron incubadas con una solución de bloqueo que contenía un 5% de suero de cabra (Normal Goat Serum, NGS) diluido en D-PBS durante 60 minutos en agitación. Por último, se incubaron las células con un anticuerpo primario de ratón específico contra Kv2.1 (NeuroMab) durante toda la noche diluido en la solución de bloqueo a una concentración de 1:500 a 4°C .

Una vez realizada la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con D-PBS en agitación. Una vez lavados los cristales, se incubaron a temperatura ambiente con anticuerpo secundario durante 60 minutos en agitación. Este anticuerpo es de cabra, anti-ratón y cuenta con el fluoróforo Alexa 568. Transcurridos los 60 minutos, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con D-PBS en agitación. Posteriormente, añadimos un tinte fluorescente que se une a las regiones ricas en adenina y timina del ADN, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), durante 10 minutos en agitación. Por último, se realizó un lavado con D-PBS y se montaron los cristales usando 4 μL Mowiol® (Calbiochem) en un portaobjetos. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de fluorescencia alimentado con fuente de luz Colibri 7 ZEISS o un

microscopio confocal alimentado con fuente de luz Colibri 5 siendo ambos microscopios inversos modelo Axio Observer A.1. Las imágenes fueron obtenidas mediante el software ZEN v3.2.

3.6. Análisis de datos

Para el análisis de las imágenes obtenidas en los experimentos de inmunofluorescencia se hizo uso del software ImageJ 1.54f (Fiji). Usando las herramientas de ImageJ, se midieron los niveles de intensidad lumínica de las células fluorescentes en unidades aleatorias (UAs). Para minimizar errores en las medidas de la intensidad lumínica causada por reflejos y demás dispersiones de la luz, se midió la intensidad de la célula y a esas medidas se le restaron las medidas en su entorno más próximo, de esa forma eliminamos la intensidad lumínica que tengamos de fondo de nuestras medidas. Para los cálculos de porcentaje de células fluorescentes e intensidad de fluorescencia se utilizó el software Microsoft Excel® para Microsoft 365 MSO versión 2405. En cuanto a la representación de estos datos, se hizo uso del software GraphPad Prism 8.0.1.

En cuanto a los datos de *patch clamp*, se exportaron los datos de intensidad de corriente (nA) con el software Patchmaster v2x53 al formato .asc para ser analizados con Excel® Microsoft 365 MSO versión 2405. Con el software Excel® se ordenaron con respecto al tiempo y al voltaje. Haciendo uso del mismo software se calculó la media de intensidad de corriente para cada voltaje entre los 0,35 y 0,37 segundos de registro, donde se consideró que las corrientes ya se encontraban estabilizadas. Tras esto, se realizaron los cálculos de conductancia para cada voltaje según la ecuación de Ohm (1). Estos datos se representaron, normalizaron (en el caso de conductancia con respecto a su conductancia máxima) y se ajustaron a la ecuación de Boltzmann (3) utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1.

Tanto los valores de los ensayos de inmunocitoquímica como los de *patch clamp* se encuentran expresados en media \pm error estándar de la media (SEM). En cuanto a los análisis estadísticos, se realizaron análisis de varianza ANOVA y se llevaron a cabo comparaciones múltiples entre los mutantes y los controles utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1.

4. Resultados

Con la finalidad de obtener unos resultados acordes a los objetivos planteados en este Trabajo de Fin de Grado, se han realizado los procedimientos descritos en el apartado *Materiales y métodos*. A continuación, se exponen los resultados obtenidos en distintos apartados de acuerdo con los datos que se pretendían conseguir de ajuste de densidad de siembra, expresión de Kv2.1 y funcionalidad de los canales.

En la Figura 6, podemos observar un diagrama de los distintos procesos que se llevaron a cabo para llegar a realizar tanto *patch clamp* como ensayos de inmunocitoquímica partiendo del momento de siembra (0 h) en los cristales tratados con poli-L-lisina.

En el diagrama se puede observar cómo las células eran transfectadas 24 horas más tarde de haber sido sembradas. También es posible apreciar como *patch clamp* y los ensayos de inmunocitoquímica fueron comenzados 48 horas más tarde de haber sido transfectadas las células (72 horas tras haber sido sembradas).

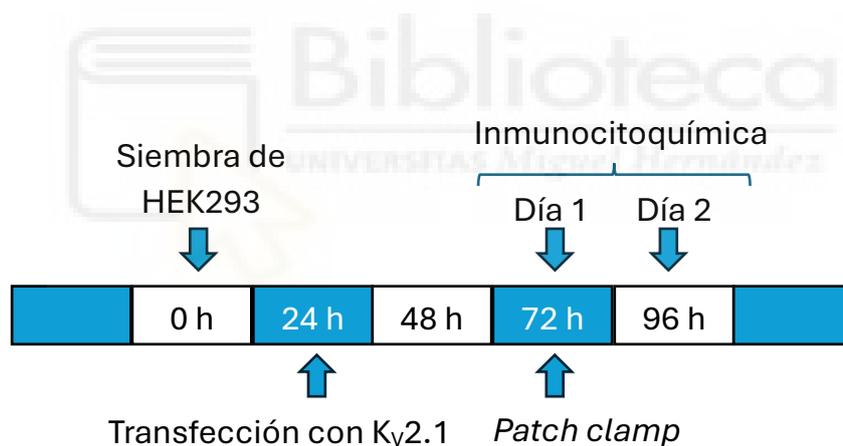


Figura 6. Diagrama de trabajo semanal. En este diagrama se muestra el protocolo semanal seguido para la realización de los distintos experimentos. A las 0 horas se sembraron las células HEK293, a las 24 horas se transfectaron y a las 72 horas se comenzaron tanto los experimentos de *patch clamp* como de inmunofluorescencia.

4.1. Ajuste de densidad de siembra

Para poder realizar todos los experimentos propuestos, se requerían cristales con una densidad de $\approx 50\%$ para *patch clamp* y $\approx 70\%$ para los ensayos de inmunocitoquímica. Se llegó a la conclusión de que estos porcentajes eran idóneos tras tener en cuenta algunas consideraciones.

En el caso de *patch clamp*, se decidió teniendo en cuenta que se necesitaban una cantidad de células elevada pero que se encontraran relativamente aisladas de otras.

En cambio, para los ensayos de inmunofluorescencia, se necesitaba un número de células que permitiera que se agruparan en grandes grupos, pero dejando espacio para diferenciar unas de otras en las imágenes.

Para ello, se sembraron varios cristales con distinta cantidad de células, se realizó la transfección a las 24 horas, y se cuantificó la confluencia celular a las 24, 48 y 72 horas tras haber sido sembradas. Los resultados se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Pruebas sobre la densidad celular. En la tabla se muestran los datos de la evolución de la confluencia celular en % (área con células/área total) según la cantidad de células sembradas en cristales, $n=6$. La transfección celular se realizó a las 24h de la siembra y la confluencia se midió a las 24h, 48h y 72h tras la siembra.

N.º células sembradas por pocillo	Confluencia celular (%)		
	24 h	48 h	72 h
10000	10	20	40
15000	15	25	55
20000	25	35	65
50000	45	70	100
60000	70	100	100
100000	80	100	100
200000	100	100	100

En base a los datos de porcentaje de confluencia celular obtenidos a las 72h, se decidió utilizar cristales sembrados con 10000 células para poder llevar a cabo los experimentos de *patch clamp* y con 20000 células/pocillo en los ensayos de inmunofluorescencia. La cantidad de células escogidas se determinaron en base a los experimentos que se iban a realizar, dado que en el primer caso necesitaba mayor número de células aisladas, mientras que en el segundo se requería una mayor cantidad.

4.2 Análisis de la expresión proteica

Para evaluar la expresión de Kv2.1, se realizaron varios ensayos de inmunofluorescencia siguiendo el protocolo detallado en *Materiales y métodos*. Una vez finalizados los ensayos, se

procedió a tomar imágenes de campo claro y microscopia de fluorescencia usando filtros para DAPI y Alexa568 que fueron posteriormente cuantificadas.

En primer lugar, se examinó la especificidad del marcaje con los anticuerpos empleando HEK293 sin transfectar tratadas tanto con anticuerpo primario como secundario (Figura 7 Imágenes A), HEK293 transfectadas con Kv2.1 WT tratadas únicamente con el anticuerpo primario (Figura 7 Imágenes B) y HEK293 transfectadas con Kv2.1 WT tratadas únicamente con el anticuerpo secundario (Figura 7 Imágenes C). Como se puede apreciar en las imágenes presentadas, ninguno de los controles mostro la fluorescencia de Alexa568, que es el fluoróforo al que se encuentra unido el anticuerpo secundario, demostrando así la especificidad de ambos anticuerpos.

Acto seguido, tras haber comprobado la especificidad de los anticuerpos empleados, se procedió a realizar los ensayos que servirían para recabar datos. De estos ensayos se utilizaron las imágenes tomadas con filtro para DAPI y para Kv2.1 a la hora de medir los resultados. Para ello se cuantificó el total de las células que se encontraban en la imagen, excluyendo los márgenes, usando el filtro para DAPI. Se llevo a cabo de esta forma ya que este colorante azul tiñe los núcleos celulares de todas las células independientemente de si están transfectadas o no.

Por otro lado, para cuantificar la cantidad de células fluorescentes se utilizó la imagen con filtro para Alexa568. Para evitar falsos positivos se consideraron como células que expresaban Kv2.1 aquellas que presentaran una fluorescencia mínima de 1000000 de unidades arbitrarias (UAs) y, para evitar confundir esta fluorescencia con la luminosidad del fondo que podría haber, se restó a la medición de la fluorescencia de la célula la fluorescencia medida en el entorno más próximo a esta. Siguiendo este protocolo, se cuantificó el total de células fluorescentes y midió la intensidad de su fluorescencia.

Finalmente, se dividió el número de células fluorescentes entre el total determinado con DAPI y se expresó en porcentaje, como se puede observar en la gráfica D de la Figura 8.

En total, se cuantificaron seis imágenes de distintos cristales para cada condición (HEK293 transfectadas con Kv2.1 WT, W369C y V413I). Como se puede observar, en las imágenes representativas (Figura 8 Imágenes A, B y C) existen diferencias en el número de células fluorescentes entre Kv2.1 WT y sus variantes mutantes W369C y V413I.

Finalmente, se comprobó que, en el caso de los mutantes de Kv2.1, había un menor número de células que expresaban la proteína. Los resultados de estas mediciones indican que en Kv2.1 WT se contabilizó un $19\% \pm 1,7$ de células fluorescentes mientras que para los mutantes

W369C y V413I se cuantificó un $6\% \pm 1,4$ y $5\% \pm 0,8$, respectivamente, como se puede observar en la gráfica E de la

. Tras ser sometido a una prueba estadística ANOVA, se pudo comprobar que, efectivamente, existía una diferencia significativa en la proporción de células fluorescentes entre Kv2.1 WT, W369C y V413I.

Con respecto a la intensidad de fluorescencia, se cuantificó, se sometieron los resultados a una prueba de varianza ANOVA y se concluyó que no existía una diferencia significativa entre Kv2.1 WT, W369C y V413I (Gráfica D de la Figura 8).



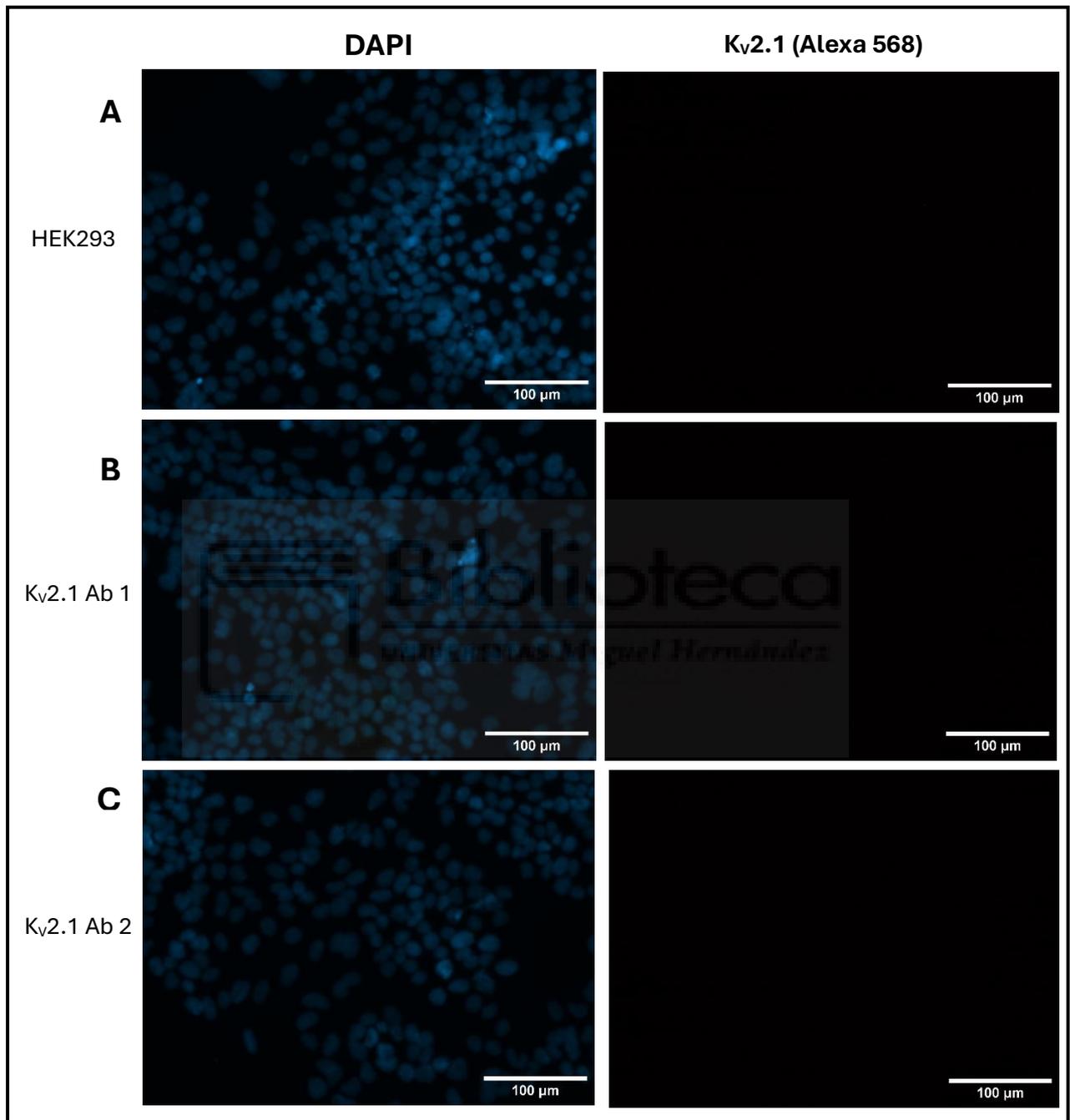


Figura 7. Imágenes de los controles en ensayos de inmunocitoquímica. En las imágenes A, B y C vemos imágenes representativas de las que fueron tomadas como control para asegurar la especificidad de los anticuerpos utilizados. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia a un aumento de 20x con filtros para DAPI y Alexa568. En A vemos células HEK293 sin transfectar tratadas tanto con anticuerpo primario como secundario. En B se trata de células HEK293 transfectadas con K_v2.1 WT y tratadas únicamente con el anticuerpo primario. En C vemos células transfectadas con K_v2.1 WT y tratadas únicamente con el anticuerpo secundario.

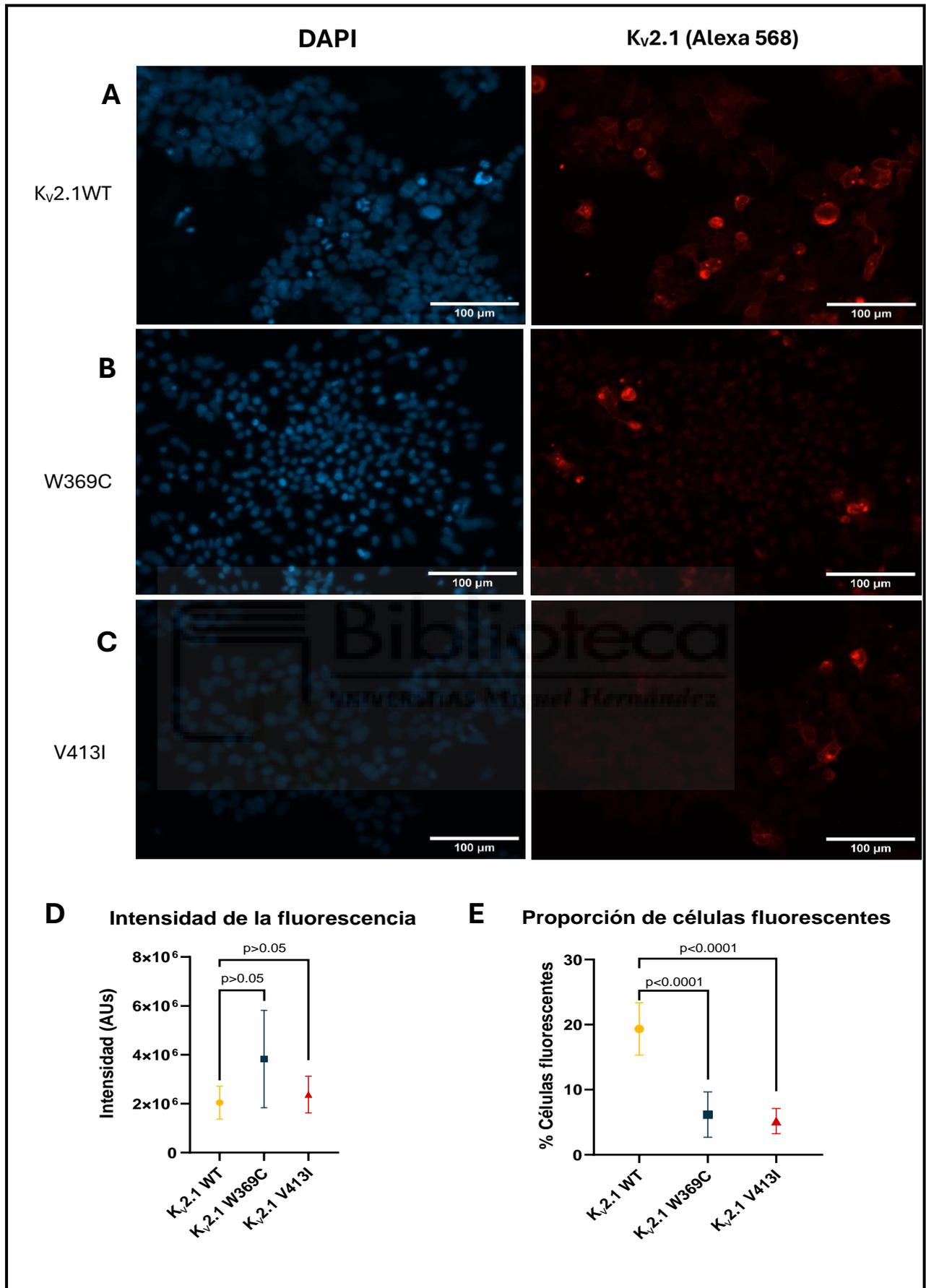


Figura 8. Expresión de $K_v2.1$ WT, $K_v2.1$ W369C y $K_v2.1$ V413I en células HEK293. Las imágenes A, B y C son representativas de las imágenes que fueron tomadas para recabar datos de células HEK293 transfectadas con $K_v2.1$ WT, $K_v2.1$ W369C y $K_v2.1$ V413I, respectivamente, fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia a un aumento de 20x con filtros para DAPI y Alexa568. En la imagen C se observa con menor intensidad la fluorescencia de DAPI debido a que se priorizó el enfoque óptimo para la fluorescencia de Alexa568 siempre y cuando no interfiriera en el análisis de las imágenes. (D) Gráfica que presenta la media de luminiscencia de todas las células contabilizadas, la cual esta medida en unidades arbitrarias (UAs) del software. Tras realizar un análisis de varianza ANOVA se concluyó que la diferencia en los valores de los mutantes con respecto al control WT no fueron significativas ($p>0,05$). (E) Gráfica que muestra la proporción de células fluorescentes contabilizadas con respecto a células totales en % (células fluorescentes/células totales). Tras realizar un análisis de varianza ANOVA se concluyó que la diferencia de valores entre los mutantes y WT fueron significativas ($p<0,0001$). Los datos mostrados en las gráficas D y E pertenecen al conteo de células en seis imágenes de un total de tres cristales, dos imágenes por cristal, para cada condición ($N=3$, $n=6$) y se encuentran expresados en media \pm SEM.

4.3 Estudio de la Funcionalidad de los canales

Tras confirmar mediante inmunofluorescencia la presencia de $K_v2.1$ se procedió a realizar un análisis de su funcionalidad mediante la técnica de electrofisiología conocida como *patch clamp*.

El objetivo de los procedimientos realizados fue medir las corrientes generadas por la entrada de iones de potasio con carga una positiva (K^+) en la célula como baremo de cuan efectivos eran los mutantes de $K_v2.1$. Ya que estos mutantes podrían presentar tanto ganancia como pérdida de función, siendo en ambos casos capaces de generar patologías, se utilizaron como control positivo y negativo $K_v2.1$ WT y HEK293 sin transfectar, respectivamente.

A continuación, en la Figura se muestran los resultados.

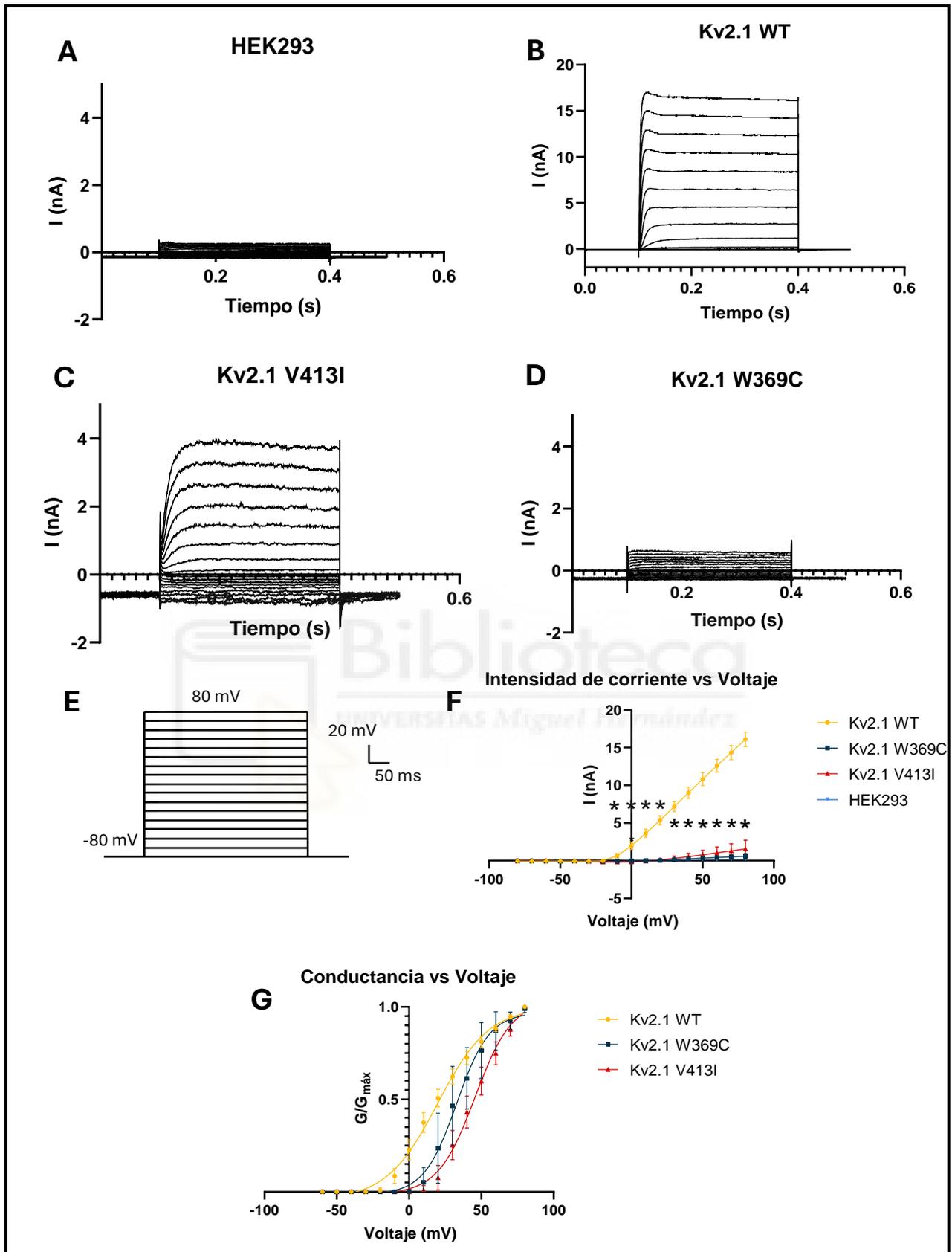


Figura 9. Registros representativos y parámetros electrofisiológicos de $K_v2.1$ WT, $K_v2.1$ W369C y $K_v2.1$ V413I en células HEK293. (A, B, C y D) Registros de patch clamp representativos de $K_v2.1$ WT, $K_v2.1$ W369C y $K_v2.1$ V413I y células HEK293 sin transfectar donde se observa la intensidad de corriente (nA) contra tiempo (s) para HEK293 sin transfectar y HEK293 transfectadas con $K_v2.1$ WT, $K_v2.1$ W369C y $K_v2.1$ V413I. (E) Diagrama que muestra el protocolo de pasos de voltaje aplicado durante los ensayos de patch clamp representando en el eje Y el voltaje (mV) y en el X el tiempo (ms). (F) Gráfica que representa intensidad de corriente (nA) contra voltaje (mV), tras un ANOVA ($p < 0,0001$) V413I y W369C demostraron ser representativamente distintos con respecto de WT, representado con un asterisco (*) sobre los potenciales en los que se encontraron las diferencias. El ANOVA también reveló que V413I y W369C no presentaban diferencias significativas con respecto a HEK293 ($p > 0,005$). (G) Gráfica que representa la conductancia contra voltaje (mV). Los datos de conductancia fueron normalizados con respecto a la conductancia máxima de cada registro y ajustados con respecto a la ecuación de Boltzmann. La obtención de estos datos se realizó para $K_v2.1$ WT y V413I con $n=6$, para W369C con $n=5$ y para HEK293 con $n=3$ y están expresados en media \pm SEM.

Como se puede observar en las imágenes A, B, C y D de la Figura, se tomaron registros de HEK293 sin transfectar y HEK293 transfectadas con $K_v2.1$ WT, W369C y V413I en los cuales fue medida, mientras se alteraba el voltaje de la membrana celular, la intensidad de las corrientes (nA) generadas por los canales de potasio.

En estos registros se aprecian varios detalles. El primero de estos es que la intensidad de las corrientes para las células HEK293 sin transfectar no varía a pesar de aumentar el voltaje, lo cual concuerda con lo esperado debido a que esta línea celular no posee actividad eléctrica propia. A su vez, se observan diferencias significativas entre las corrientes generadas por las células transfectadas con los mutantes de $K_v2.1$ y con $K_v2.1$ WT, siendo las de estas últimas de mayor intensidad.

Debido a esto, se representó el registro de $K_v2.1$ WT con un máximo en el eje Y de 20 nA en lugar de los 5 nA que se delimitaron en el resto de los registros para poder observar las diferencias con mayor precisión.

Tabla 2. Parámetros electrofisiológicos de K_v2.1 WT, W369C y V413I. Valores de intensidad de corriente a 60 mV expresados en nA ($I_{60\text{mV}}$), voltaje al que los canales comienzan a abrirse (V_{ap}) y voltaje al que K_v2.1 se encuentra al 50% de su capacidad total de apertura ($V_{0,5}$). Estos valores se muestran para K_v2.1 WT y V413I con n=6 y para W369C con n=5 y están expresados en media \pm SEM. Tras ser sometidos a una prueba estadística ANOVA, ambos mutantes mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto de WT ($p < 0,0001$) marcado en la tabla con asteriscos (*).

	K _v 2.1 WT	K _v 2.1 W369C	K _v 2.1 V413I
$I_{60\text{mV}}$ (nA)	12,7 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1 *	1,0 \pm 0,3 *
V_{ap} (mV)	-36,5 \pm 1,7	-14,9 \pm 2,9 *	-10,7 \pm 2,1 *
$V_{0,5}$ (mV)	19,9 \pm 2,0	33,2 \pm 3,7 *	45,9 \pm 2,4 *

Con los datos sobre la intensidad de las corrientes se pudo representar una gráfica donde se observa la curva de intensidad de corriente contra voltaje (IV) como se observa en la gráfica F de la Figura. Los datos de intensidad representados corresponden a los de las corrientes entre los 0,35 s y los 0,37 s del registro, donde se consideró que estas ya se encontraban estabilizadas.

Como se menciona con anterioridad, el objetivo de estos ensayos fue analizar la funcionalidad de K_v2.1 W369C y V413I y para ello debe medirse la capacidad de apertura, y por tanto la capacidad de entrada de iones y la facilidad de paso de corrientes, de estos mutantes.

Para ello se realizó un cálculo de la conductancia, medida inversa a la resistencia que nos informa de la facilidad de paso de corrientes eléctricas. La conductancia se calculó para cada voltaje a partir de los datos de intensidad de corriente siguiendo la ecuación de la ley de Ohm (1). A su vez, para esa ecuación se tuvo que calcular el voltaje de equilibrio (V_{eq}) para el potasio en nuestras células, teniendo en cuenta la concentración de potasio interna y externa de nuestras soluciones, siguiendo la ecuación de Nernst (2). El V_{eq} resultó ser igual a -92 mV.

A continuación, se procedió a normalizar las conductancias obtenidas con la máxima conductancia de su registro. Por último, se ajustaron los datos con respecto a la ecuación de Boltzmann (3) y se representaron en la gráfica G de la Figura.

Una vez normalizados y ajustados los datos, nos es posible apreciar las diferencias en cuanto a la conductancia de $K_v2.1$ y a la capacidad de apertura de los canales. En la Tabla 2, podemos observar las diferencias entre $K_v2.1$ WT, W369C y V413I en las corrientes tomadas durante el paso de voltaje a 60 mV Siendo significativamente menores las de los mutantes que las de WT. De la gráfica de la conductancia se extrae el valor $V_{0,5}$ que indica el voltaje al que el canal presenta la mitad de la conductancia máxima. Este valor nos permite comparar la sensibilidad de los canales a los cambios en el voltaje, estando los de $K_v2.1$ W369C y V413I desplazados hacia voltajes más altos que WT. También se pueden observar diferencias en el V_{ap} , que es el potencial de membrana al que los canales comienzan a abrirse. En este caso encontramos que $K_v2.1$ W369C y V413I tienen un voltaje de apertura más alto que WT.

Para finalizar, cabe añadir que los datos de intensidad de corriente y de conductancia fueron sometidos a una prueba de varianza ANOVA en los que se comparó a los mutantes con respecto a WT y HEK293 (en el caso de la intensidad de corriente) y mostraron ser significativamente relevantes ($p > 0,0001$) con respecto a WT, pero no con respecto a HEK293.



5. Discusión

Desde que Torkamani et al. (2014) estudiaron ciertas mutaciones del canal de potasio activado por voltaje $K_v2.1$ en pacientes con epilepsia, esta proteína se convirtió en eje de múltiples estudios que buscan comprender más las encefalopatías epilépticas. A partir de entonces, numerosos estudios han girado en torno a comprender los mecanismos subyacentes a su funcionamiento, así como a caracterizar distintos mutantes (Fernández-Mariño et al., 2023; Kang et al., 2019; Thiffault et al., 2015; Veale et al., 2022; Xiong et al., 2021).

En este trabajo, se ha querido continuar con esta labor a través de la caracterización de la expresión y funcionalidad de los mutantes de $K_v2.1$ W369C y V413I mediante estudios de inmunofluorescencia y electrofisiología. El primer paso realizado durante este Trabajo Fin de Grado fue el desarrollo de un protocolo de siembra y transfección adecuado para la línea celular de estudio, HEK293.

Una vez ajustado el protocolo de siembra y transfección, se realizaron los inmunoensayos para confirmar la presencia del canal y la efectividad y sensibilidad de los anticuerpos primario y secundario. De no haber sido suficientemente efectivos y sensibles se podría haber observado una fluorescencia roja en células que no expresaran $K_v2.1$ o que no hubieran sido incubadas con ambos anticuerpos. Otra posibilidad era que no se observara fluorescencia roja en células que expresaran el canal y hubieran sido tratadas con ambos anticuerpos. Sin embargo, no se observó ningún resultado que indicara falta de efectividad o sensibilidad por parte de los anticuerpos por lo que se continuó con el estudio.

Se prosiguió realizando ensayos que buscaban comparar la capacidad de expresión de $K_v2.1$ WT con los mutantes W369C y V413I. Tras la toma y el análisis de células, se encontraron dos posibles diferencias entre los resultados de los mutantes y WT, siendo estas la intensidad lumínica y la proporción de células fluorescentes con respecto al total de células.

En cuanto a la proporción de células fluorescentes respecto al total de las mismas, una prueba ANOVA demostró la presencia de diferencias significativas de $K_v2.1$ WT con respecto a W369C y V413I. Diferencias similares fueron observadas en un estudio que caracterizaba al mutante $K_v2.1$ V378A (Thiffault et al., 2015), en el que se llegó a la conclusión de que esto ocurría debido a que la mutación provoca en el canal una pérdida de selectividad para potasio y $K_v2.1$ V378A genera corrientes de entrada de cationes que activan los mecanismos de muerte celular. En el estudio, utilizaron esta toxina como inhibidor de $K_v2.1$ para corroborar si las corrientes de entrada que observaron se debían a $K_v2.1$. Finalmente, no solo observaron que, efectivamente, las corrientes

de entrada se debían a $K_v2.1$, si no que rescataron parcialmente los niveles de expresión de V378A.

Aunque en el caso de $K_v2.1$ W369C y V413I podría ocurrir por un efecto parecido en la pérdida de selectividad para potasio, en este trabajo no se hicieron experimentos inhibiendo el canal, por lo que no se puede saber si por eso se observa la diferencia de expresión.

Una vez confirmada la presencia de $K_v2.1$ en las células HEK293 transfectadas, se procedió a realizar *patch clamp* sobre las mismas. En este punto se esperaba observar que los mutantes W369C y V413I fueran de pérdida de función, ya que son numerosos los estudios que apuntan a que lo más probable es que una mutación en $K_v2.1$ acabe provocando una pérdida de función con respecto a $K_v2.1$ WT (Fernández-Mariño et al., 2023).

Tras recabar suficientes registros HEK293 sin transfectar y HEK293 transfectadas con $K_v2.1$ WT, W369C y V413I, se compararon y analizaron los datos con una prueba ANOVA y se concluyó que existían diferencias significativas entre ambos mutantes con respecto a $K_v2.1$ WT mientras que las diferencias no fueron representativas con respecto a HEK293 sin transfectar.

Como se esperaba, ambos mutantes presentaron pérdida de función con respecto a WT, al igual que ciertas mutaciones observadas en varios estudios (Kang et al., 2019; Xiong et al., 2021). Esta pérdida de función se puede observar en la diferencia de valores que existen en cuanto a intensidad de corriente y a $V_{0.5}$, siendo menos intensas las corrientes de los mutantes y, además, abriéndose a voltajes de membrana más altos que en el caso de WT.

En la literatura se han propuesto varios razonamientos que podrían explicar la pérdida de función observada en W369C y V413I como son la pérdida de especificidad al potasio de $K_v2.1$ (Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014), el impedimento en la formación de una estructura cuaternaria adecuada (Calhoun et al., 2017) o la pérdida de efectividad en el transporte a la membrana (Xiong et al., 2021). Mientras que en el estudio de Calhoun et al. (2017) no se observaron diferencias en cuanto a la expresión, los estudios que barajan las otras dos hipótesis sí. En este aspecto, falta información para aseverar una explicación plausible, por lo que deben llevarse a cabo más experimentos en el futuro.

Por ejemplo, en este trabajo, en los ensayos de inmunocitoquímica se utilizó un anticuerpo primario que se unía a una región de $K_v2.1$ que se encuentra dentro de la célula, por lo que se tuvo que permeabilizar las membranas. De esta forma, el anticuerpo primario se unió tanto a las $K_v2.1$ que se encontraran fuera como dentro de estas. Para obtener más información acerca de la expresión del canal en la membrana plasmática, se podría realizar un ensayo de

inmunofluorescencia con un anticuerpo primario que se una a la región de $K_v2.1$ que se encuentra en la cara externa de la membrana. Esto permitiría comparar la cantidad de $K_v2.1$ que se encuentra dentro de la célula o en la membrana y saber si el problema se encuentra en el transporte del canal hacia la membrana.

En cuanto a la hipótesis de selectividad para el potasio, se podrían realizar experimentos de *patch clamp* inhibiendo el canal con alguna toxina como la guangxitoxina, ya comentada, para comprobar si se rescatan los niveles de expresión y no se observan en los registros corrientes de entrada (Thiffault et al., 2015).

En este trabajo se han obtenido resultados similares a los obtenidos por Thiffault et al. (2015) tanto en ensayos de inmunofluorescencia como de electrofisiología. Ambas, la cantidad significativamente reducida de células fluorescentes como la menor intensidad de las corrientes concuerdan con la pérdida de $K_v2.1$ de selectividad para potasio, aunque para concluir con mayor seguridad se deberían realizar algunos de los experimentos explicados anteriormente.

En el estudio de Fernández-Mariño et al. (2023) también se recuperó la funcionalidad de un mutante usando un inactivador de canales de potasio dependientes de voltaje, el ditiotreitól. Estos hallazgos abren, por tanto, la posibilidad de comprobar la viabilidad como compuesto activo de distintas sustancias estudiando su capacidad de recuperación de la funcionalidad de los mutantes.

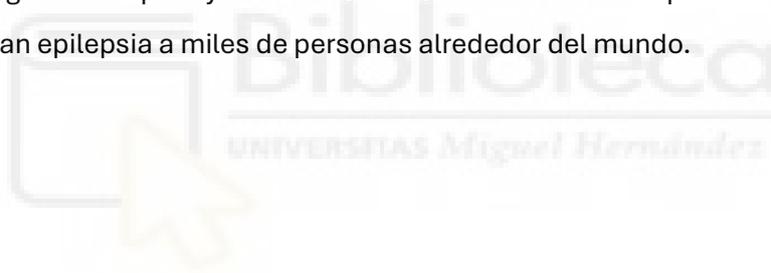
Los resultados conseguidos en este trabajo son de gran importancia ya que no solo consiguen explicar por sí mismos los efectos de las mutaciones W369C y V413I sobre $K_v2.1$ si no que, como se ha mencionado, concuerdan con los obtenidos por otros estudios que han estudiado otras mutaciones de este canal.

6. Conclusiones y proyección futura

En base a los objetivos propuestos y los resultados obtenidos, en el presente trabajo se puede concluir que:

- Se ha establecido un protocolo de siembra y transfección efectivo para la proteína K_v2.1 en la línea celular HEK293.
- En cuanto a la capacidad de expresión, se ha encontrado una reducción significativa en las variantes mutantes con respecto a K_v2.1 WT.
- Con respecto al análisis de la funcionalidad, se ha demostrado que ambos mutantes son de pérdida de función y requieren de voltajes más altos para activarse.

Este proyecto sienta las bases en la caracterización de K_v2.1 W369C y V413I, abriendo la puerta a futuros estudios que ahonden en los mecanismos por los que pierden función, así como su relación con la epilepsia superando las limitaciones de este trabajo y estudiando sus efectos *in vivo*. Finalmente, la información presentada en este trabajo subraya la importancia de seguir realizando investigaciones que ayuden a dilucidar los mecanismos por los que estas y otras mutaciones causan epilepsia a miles de personas alrededor del mundo.



7. Bibliografía

- Allen, N. M., Conroy, J., Shahwan, A., Lynch, B., Correa, R. G., Pena, S. D., McCreary, D., Magalhães, T. R., Ennis, S., Lynch, S. A., & King, M. D. (2016). Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*, 57(1), e12-17. <https://doi.org/10.1111/epi.13250>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience: Exploring the brain*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Bloms-Funke, P., Bankstahl, M., Bankstahl, J., Kneip, C., Schröder, W., & Löscher, W. (2022). The novel dual-mechanism Kv7 potassium channel/TSPO receptor activator GRT-X is more effective than the Kv7 channel opener retigabine in the 6-Hz refractory seizure mouse model. *Neuropharmacology*, 203, 108884. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108884>
- Boore, J., Cook, N. F., & Shepherd, A. (2016). *Essentials of Anatomy and Physiology for Nursing Practice*. <https://uk.sagepub.com/en-gb/eur/essentials-of-anatomy-and-physiology-for-nursing-practice/book243578>
- Calhoun, J. D., Vanoye, C. G., Kok, F., George, A. L., Jr., & Kearney, J. A. (2017). Characterization of a KCNB1 variant associated with autism, intellectual disability, and epilepsy. *Neurol Genet*, 3(6), e198. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000198>
- Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915-928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>
- Faber, D. S., & Pereda, A. E. (2018). Two Forms of Electrical Transmission Between Neurons. *Front Mol Neurosci*, 11, 427. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00427>
- Fernández-Mariño, A. I., Tan, X. F., Bae, C., Huffer, K., Jiang, J., & Swartz, K. J. (2023). Inactivation of the Kv2.1 channel through electromechanical coupling. *Nature*, 622(7982), 410-417. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06582-8>
- Ferrera, G., Ricci, E., Peron, A., Parrini, E., Vignoli, A., & Canevini, M. P. (2024). Continuous spike-wave of slow sleep in a patient with KCNB1-related epilepsy responsive to highly purified cannabidiol: a case report and comparison with literature. *Neurocase*, 30(2), 68-72. <https://doi.org/10.1080/13554794.2024.2354952>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>

- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J., Jr. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 473-508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>
- Hahn, G., Ponce-Alvarez, A., Deco, G., Aertsen, A., & Kumar, A. (2019). Portraits of communication in neuronal networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(2), 117-127. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0094-0>
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (Vol. 18).
- Kang, S. K., Vanoye, C. G., Misra, S. N., Echevarria, D. M., Calhoun, J. D., O'Connor, J. B., Fabre, K. L., McKnight, D., Demmer, L., Goldenberg, P., Grote, L. E., Thiffault, I., Saunders, C., Strauss, K. A., Torkamani, A., van der Smagt, J., van Gassen, K., Carson, R. P., Diaz, J., Leon, E., Jacher, J. E., Hannibal, M. C., Litwin, J., Friedman, N. R., Schreiber, A., Lynch, B., Poduri, A., Marsh, E. D., Goldberg, E. M., Millichap, J. J., George, A. L., Jr., & Kearney, J. A. (2019). Spectrum of K(V) 2.1 Dysfunction in KCNB1-Associated Neurodevelopmental Disorders. *Ann Neurol*, 86(6), 899-912. <https://doi.org/10.1002/ana.25607>
- Lagarde, S., Bénar, C. G., Wendling, F., & Bartolomei, F. (2022). Interictal Functional Connectivity in Focal Refractory Epilepsies Investigated by Intracranial EEG. *Brain Connect*, 12(10), 850-869. <https://doi.org/10.1089/brain.2021.0190>
- Lerche, H., Jurkat-Rott, K., & Lehmann-Horn, F. (2001). Ion channels and epilepsy. *Am J Med Genet*, 106(2), 146-159. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1582>
- Miao, P., Peng, J., Chen, C., Gai, N., & Yin, F. (2017). [A novel mutation in KCNB1 gene in a child with neuropsychiatric comorbidities with both intellectual disability and epilepsy and review of literature]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 55(2), 115-119. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.02.012>
- OMS. (2024). *Epilepsy*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Oyrer, J., Maljevic, S., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Petrou, S., & Reid, C. A. (2018). Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacol Rev*, 70(1), 142-173. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014456>
- Purves D, A. G., Fitzpatrick D, et al., editors. (2001). *Neuroscience*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11164/>

- Schmidt, D., & Schachter, S. C. (2014). Drug treatment of epilepsy in adults. *Bmj*, 348, g254.
<https://doi.org/10.1136/bmj.g254>
- Staley, K. J., & Dudek, F. E. (2006). Interictal spikes and epileptogenesis. *Epilepsy Curr*, 6(6), 199-202. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2006.00145.x>
- Thiffault, I., Speca, D. J., Austin, D. C., Cobb, M. M., Eum, K. S., Safina, N. P., Grote, L., Farrow, E. G., Miller, N., Soden, S., Kingsmore, S. F., Trimmer, J. S., Saunders, C. J., & Sack, J. T. (2015). A novel epileptic encephalopathy mutation in KCNB1 disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. *J Gen Physiol*, 146(5), 399-410.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201511444>
- Torkamani, A., Bersell, K., Jorge, B. S., Bjork, R. L., Jr., Friedman, J. R., Bloss, C. S., Cohen, J., Gupta, S., Naidu, S., Vanoye, C. G., George, A. L., Jr., & Kearney, J. A. (2014). De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*, 76(4), 529-540.
<https://doi.org/10.1002/ana.24263>
- Trimmer, J. S. (2015). Subcellular localization of K⁺ channels in mammalian brain neurons: remarkable precision in the midst of extraordinary complexity. *Neuron*, 85(2), 238-256.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.042>
- Veale, E. L., Golluscio, A., Grand, K., Graham, J. M., Jr., & Mathie, A. (2022). A KCNB1 gain of function variant causes developmental delay and speech apraxia but not seizures. *Front Pharmacol*, 13, 1093313. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1093313>
- Verma, P., Kiente, A., Flockerzi, D., & Ramkrishna, D. (2020). Using Bifurcation Theory for Exploring Pain. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(6), 2524-2535.
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b04495>
- Xiong, J., Liu, Z., Chen, S., Kessi, M., Chen, B., Duan, H., Deng, X., Yang, L., Peng, J., & Yin, F. (2021). Correlation Analyses of Clinical Manifestations and Variant Effects in KCNB1-Related Neurodevelopmental Disorder. *Front Pediatr*, 9, 755344.
<https://doi.org/10.3389/fped.2021.755344>