



Universidad Miguel Hernández de Elche

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biotecnología

Ingeniería y validación funcional del canal Kv2.1-HaloTag para el estudio del tráfico de variantes mutantes.

Trabajo de Fin de Grado

Autora: Enya Osuna Fresneda

Tutor: Dr. Antonio Vicente Ferrer Montiel

Cotutora: Dra. Magdalena Nikolaeva Koleva

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Grupo de Neuropatías Periféricas

2025-2026

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Encefalopatías epilépticas.	4
1.2. Canales iónicos	5
1.2.1. Familias de canales iónicos	6
1.2.2. Canales de potasio.....	7
1.3. Estructura del canal Kv2.1.	8
1.4. Gen <i>KCNB1</i> -Kv2.1: Mutaciones epilépticas	11
1.5. Localización y tráfico celular del canal.....	12
1.6. Sistema HaloTag para el monitoreo de variantes mutantes.....	14
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Ingeniería plasmídica	16
3.2. Cultivo celular.....	18
3.3. Lipotransfección	19
3.4. Cultivo bacteriano.....	20
3.5. Marcaje con HaloTag.....	21
3.6. Microscopía	22
3.7. Análisis de imagen (ImageJ)	22
3.8. Electrofisiología	22
3.9. Análisis de datos electrofisiológicos	24
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Caracterización electrofisiológica del canal Kv2.1-WT y Kv2.1-Halo	26
4.2. Evaluación de la expresión y tráfico intracelular del canal	29
5. DISCUSIÓN	34
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES FUTURAS	36
7. BIBLIOGRAFÍA	37

RESUMEN

Las encefalopatías epilépticas son trastornos neurológicos graves causados principalmente por mutaciones en canales iónicos. Destacan las variantes mutantes del gen *KCNB1* (canal de potasio Kv2.1) asociadas a epilepsias refractarias y cuya alta heterogeneidad y posibles defectos de proteostasis y tráfico intracelular complican su caracterización funcional. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollo de una tecnología de marcaje más adecuada para estudios en célula viva que la inmunocitoquímica. En este trabajo se diseñó y evaluó una construcción plasmídica del canal Kv2.1 con inserción de la etiqueta HaloTag en posición G221. Ensayos funcionales de *patch-clamp* demostraron que dicha inserción no altera la actividad ni las propiedades biofísicas del canal respecto al silvestre (Kv2.1-WT). Además, mediante microscopía confocal se validó la funcionalidad del sistema Kv2.1-Halo permitiendo monitorizar la expresión y localización temporal del canal, así como procesos activos de tráfico intracelular, por lo que el sistema ayudaría en la caracterización de variantes *KCNB1* patológicas.

Palabras clave: canal iónico, Kv2.1, HaloTag, encefalopatías epilépticas, tráfico intracelular, *patch-clamp*

ABSTRACT

Epileptic encephalopathies are severe neurological disorders primarily caused by ion channel mutations. Notably, *KCNB1* (Kv2.1 potassium channel) gene variants are linked to refractory epilepsies, whose high heterogeneity and potential proteostasis and intracellular trafficking defects complicate their functional characterization. Therefore, it is necessary to develop a precise labeling system more suitable for live-cell studies than immunocytochemistry. In this study, a chimeric plasmid construct of the Kv2.1 channel was designed and evaluated by inserting a HaloTag domain into position G221. *Patch-clamp* assays demonstrated that this insertion did not alter the functionality nor biophysical properties of the channel compared to the wild type (Kv2.1-WT). Furthermore, confocal microscopy assays validated the Kv2.1-Halo system, enabling the monitoring of channel expression, temporal dynamics and active intracellular trafficking processes thereby supporting the characterization of pathological *KCNB1* variants.

Keywords: ion channel, Kv2.1, HaloTag, epileptic encephalopathies, intracellular trafficking, *patch-clamp*

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ENCEFALOPATÍAS EPILÉPTICAS.

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico caracterizado por una predisposición a generar crisis epilépticas espontáneas, y que afecta actualmente a más de 70 millones de personas. Esta patología está asociada a su vez a una serie de comorbilidades que incluyen disfunción y problemas cognitivos, afectando a la calidad de vida y la educación de los pacientes, malformaciones en el desarrollo cortical, e incluso problemas cardíacos o neuropsiquiátricos correlacionados con ansiedad y depresión. Además, las personas con epilepsia presentan una mayor tasa de mortalidad, con riesgo a sufrir la muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP), estimada en un caso cada 1000 pacientes. Es relevante destacar también que un tercio de la población epiléptica sufre epilepsia resistente a fármacos (DRE), lo que agrava el pronóstico clínico (1).

En función de pruebas clínicas como electroencefalograma (EEG), la etiología y las comorbilidades, se pueden diferenciar 3 categorías de encefalopatías. El primer grupo corresponde a las encefalopatías del desarrollo (ED), desórdenes severos con inicio temprano caracterizados por un deterioro motor, mental y trastornos del comportamiento; en estas, el EEG revela principalmente una alteración de la actividad basal. El segundo grupo comprende las encefalopatías epilépticas (EE), un grupo heterogéneo de epilepsias graves asociadas a retraso en el desarrollo, donde el EEG muestra además descargas epileptiformes continuas. Por último, las encefalopatías epilépticas y del desarrollo (EED) combinan crisis de aparición temprana graves con anomalías en el EEG. En este tercer grupo, las descargas epileptiformes no solo son continuas, sino que pueden resultar tan abundantes que lleguen a ocupar más del 85% del sueño del paciente (2–4). En este escenario, el deterioro del sistema nervioso puede deberse tanto a los efectos adversos ocasionados por una actividad epiléptica no controlada, como a la propia causa molecular responsable de la patología.

La incidencia de la epilepsia es dependiente de la edad, con mayores casos en individuos menores de 5 años, especialmente en el primer año de vida. Dentro de este grupo, las EED se dividen en EED infantil temprana (EIDEE), con inicio exclusivo antes de los 3 meses de edad, y otros síndromes que se presentan generalmente después de dicho periodo. En cuanto a las encefalopatías tempranas, presentan un aspecto clínico muy heterogéneo, caracterizado por función cortical anormal persistente, malformaciones estructurales, o incluso errores de metabolismo (5).

Respecto a la causa, aunque una proporción de estos casos continúan sin diagnóstico molecular, otra gran parte es debida a mutaciones monogénicas en distintos genes que codifican para canales iónicos dependientes del voltaje como *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A*, *KCNQ2* y *KCNB1* (6). Por tanto, el estudio de dichos canales iónicos se posiciona como un hito para ahondar en la comprensión de las características fisiopatológicas epilépticas, así como en definir posibles estrategias de tratamiento.

1.2. CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas de membrana que crean poros nanométricos, permitiendo una permeabilidad pasiva y específica de iones a través de la membrana celular y cuya disfunción ocasiona canalopatías que pueden afectar a distintos sistemas: nervioso (p.ej. epilepsia, migraña), cardiovascular (p.ej. arritmias), respiratorio (p.ej. fibrosis quística), sistema endocrino (p.ej. hipoglucemia), sistema inmune (p.ej. *miastenia gravis*) o sistema urinario (p.ej. Síndrome de Bartter)(7).

Un aspecto destacado de ciertos canales iónicos es su propiedad multimodal, es decir, su capacidad de ser regulados simultáneamente por un amplio rango de estímulos. Entre estos agentes se incluyen estímulos eléctricos como voltaje, mecanismos físicos como la temperatura, fuerzas mecánicas, radiación UV o unión de ligandos (que pueden ser exógenos o endógenos como los neurotransmisores). Esta versatilidad amplía significativamente las vías de modulación necesarias para la excitabilidad celular y la plasticidad sináptica, y además, resulta crucial en la transducción de señales y el procesamiento de la información sensorial (como el pH, la osmolaridad o la presión). Todo ello permite explicar por qué un mismo tipo de canal puede actuar como diana terapéutica en distintas canalopatías (7,8).

Más allá de su papel en la señalización eléctrica, los canales iónicos participan en otros procesos celulares esenciales como por ejemplo, cooperan en el mantenimiento del equilibrio osmótico, median procesos de adhesión y repulsión celular (9), o permiten la liberación de insulina gracias a la entrada de calcio extracelular mediante canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) en células β pancreáticas (10).

En cuanto a su actividad eléctrica, los canales iónicos facilitan el flujo de iones a través de la membrana, generando las corrientes necesarias para la generación y propagación del potencial de acción. Para que este disparo ocurra, es necesario que se alcance el umbral de activación, lo que desencadena una entrada de iones sodio seguida de un flujo de salida de potasio, todo ello mediado por sus respectivos canales iónicos. Este mecanismo es fundamental en la regulación

de distintas actividades celulares como la secreción hormonal, contracción muscular y la motilidad celular. En el sistema nervioso, los canales iónicos controlan a través de los potenciales de acción la excitabilidad y comunicación neuronal, así como la transducción de señales físico-químicas en eléctricas (7). Alteraciones funcionales de estos canales pueden ocasionar hipo e hiperexcitabilidad neuronal, desencadenando en el último caso ataques epilépticos.

1.2.1. FAMILIAS DE CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos pueden clasificarse en función de los tipos de iones que permean, sus características estructurales o por factores de su cinética de apertura y cierre (*gating*)(7).

En términos generales, los canales iónicos pueden dividirse en dos grupos, aquellos cuyo *gating* está regulado por voltaje (Figura 1) (*voltage-gated* como canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y algunos de Cl^-) y otros que son relativamente insensibles al voltaje y son regulados por segundos mensajeros, intra o extracelulares (como los canales LGIC, ASIC o receptores de inositol trifosfato (IP3)). A continuación se detallarán algunas de las familias más relevantes dentro de cada grupo (11).

Entre los canales regulados por ligandos y estímulos físicos se encuentran los receptores de GABA, capaces de detectar el neurotransmisor inhibitorio GABA (*γ-aminobutyric acid*) el cual juega un papel esencial en el mantenimiento del equilibrio entre la excitación e inhibición neuronal (12,13).

Por otro lado, dentro de los canales dependientes de voltaje, los canales de sodio (Na_v 1.1-1.9) son los responsables de la excitabilidad neuronal al permitir una despolarización rápida y generación y propagación del potencial de acción en neuronas sensoriales periféricas (14).

Finalmente, los canales de potasio, y concretamente los de potasio dependientes de voltaje (K_v), constituyen el grupo más diverso y complejo, siendo fundamentales en la repolarización celular y el control de la excitabilidad neuronal (15).

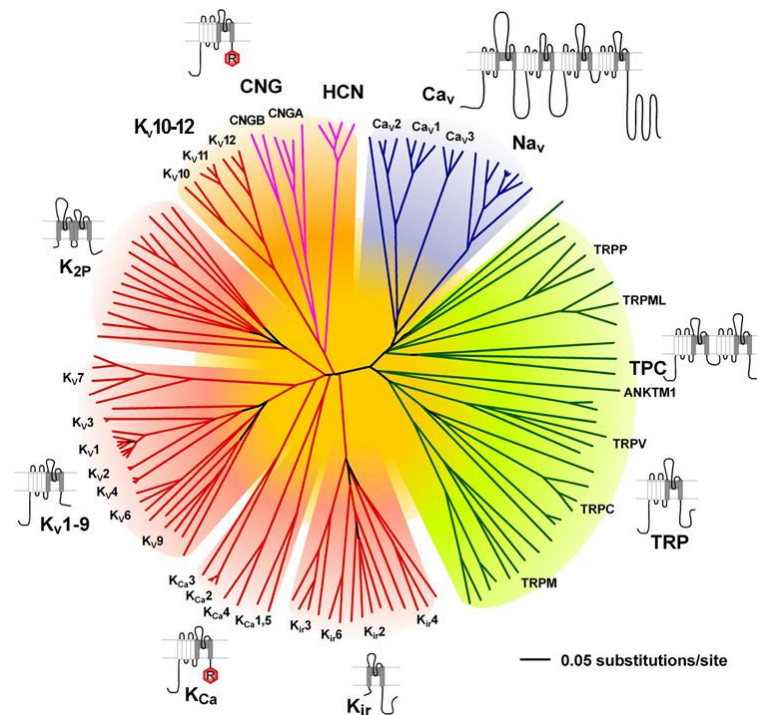


Figura 1: Clasificación de las familias de canales iónicos dependientes de voltaje. Representación de la relación evolutiva de los canales iónicos activados por voltaje, destacando las 7 familias principales y sus topologías transmembrana. Imagen tomada de Yu FH, et al. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):387-395.

1.2.2. CANALES DE POTASIO

Los canales iónicos de potasio constituyen uno de los grupos más amplios, estando presentes en arqueas, bacterias y células eucariotas. Su elevada diversidad radica en su mecanismo de apertura (*gating*) donde pueden clasificarse en canales dependientes de voltaje; cuyo movimiento del poro está acoplado a cambios eléctricos captados por el dominio sensor de voltaje, y canales regulados por ligandos; cuya apertura responde a la unión de iones o pequeñas moléculas. A pesar de su elevada heterogeneidad, su selectividad al ion K^+ se encuentra enormemente preservada gracias a la conservación de la secuencia del filtro de selectividad (secuencia consenso TVGYGD), compartida por todos los miembros de esta superfamilia (16,17).

Dentro de la familia de canales de potasio regulados por ligandos destacan los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}), que se abren en respuesta al incremento de Ca^{2+} intracelular y modulan la hiperpolarización del potencial de membrana (18).

Otros canales independientes del voltaje son los rectificadores de entrada (Kir o *inward rectifiers*) y los de dominios de dos poros (K2P). Estas dos familias muestran cinéticas de *gating* complejas

y reguladas por señales metabólicas, estímulos fisicoquímicos o incluso pueden tener actividad constitutiva. No obstante, ambas familias están involucradas en el mantenimiento continuo del potencial de reposo (E_{res})(19,20).

Finalmente, los canales Kv representan la familia más grande y extensa de este grupo de proteínas. Biofísicamente, se engloban dentro de los rectificadores de salida (*outward rectifiers*), subdividiéndose en rectificadores retardados (*delayed rectifiers*) y los canales tipo A (*A-Type*) (21). La subfamilia de los rectificadores retardados se caracteriza por una cinética de activación lenta, ya que no se activan inmediatamente después de la despolarización, sino tras un retraso. Esta propiedad le confiere su rol crítico en la repolarización, ya que su lenta inactivación permite restaurar de manera eficiente el potencial de reposo de membrana, suprimiendo el disparo de potenciales de acción espontáneos (22).

Debido a su expresión ubicua, los canales Kv (Kv1-12) participan en una amplia gama de funciones fisiológicas, jugando especialmente un papel crítico en el sistema nervioso y tejido cardíaco. Dentro de este grupo, la familia *KCNAX* codifica para los canales Kv1, asociados principalmente a problemas cardíacos como arritmias o neuronales como la ataxia episódica. Por otra parte, los genes *KCNQx* (Kv7.1-7.5) y *KCNHx* (Kv10-12) codifican para rectificadores retardados fundamentales en el proceso de recuperación de la actividad eléctrica cardíaca y control de los patrones de disparo neuronal. Finalmente, en esta misma línea se encuentran los genes *KCNBx* que codifican para los rectificadores retardados Kv2.1 (*KCNB1*) y Kv2.2 (*KCNB2*), esenciales en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo. No obstante, las mutaciones en esta última subfamilia, y fundamentalmente en el gen *KCNB1*, destacan por su fuerte vinculación con las encefalopatías epilépticas y del desarrollo (22).

1.3. ESTRUCTURA DEL CANAL KV2.1.

La diversidad funcional de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) surge de la combinación y organización entre sus subunidades alfa. Estas, que pueden pertenecer funcionalmente a distintas familias, pueden organizarse en homotetrámeros (cuatro subunidades idénticas) o heterotetrámeros (combinaciones de distintas subunidades) generando una gran heterogeneidad electrofisiológica. En este último caso, las subunidades de Kv2.1 pueden heterotetramerizar tanto con otros tipos de Kv activos (como pueden ser otros miembros de la familia Kv2) como con subunidades de la subfamilia de los Kv silentes (KvS). Los canales KvS no pueden formar canales funcionales en la membrana plasmática por sí solos, sino

que requieren de la coexpresión con otros miembros eléctricamente activos para poder ser funcionales (23).

Estructuralmente, cada subunidad alfa está compuesta por 6 hélices transmembrana (S1-S6) y unos extremos N-terminal y C-terminal intracelulares. Las hélices transmembrana pueden dividirse por funcionalidad en 2 módulos: Las hélices S1-S4 conforman el dominio sensible al voltaje (VSD) formado principalmente por residuos básicos, mientras que los segmentos S5 y S6 forman el dominio del poro (PD) (Figura 2).

En cuanto al dominio del poro, el bucle localizado entre los segmentos S5 y S6 conforma el filtro de selectividad en posición 377-382 y secuencia: TVGYGD (código Uniprot Q14721). Hacia el interior del poro se orientan las cadenas de carbonilos y oxígenos, que coordinan y regulan el mecanismo de permeabilidad iónica (24).

En cuanto a los extremos N y C terminal, estos son intracelulares y junto a la subunidad transmembrana del poro, forman las subunidades reguladoras citoplasmáticas. El N-terminal contiene el dominio T1 (dominio de tetramerización) que media interacciones entre subunidades de la misma subfamilia, permitiendo el ensamblaje de subunidades eléctricamente activas (25).

El extremo C-terminal contiene el dominio de activación (CTA), que puede a su vez interactuar con el dominio T1 del extremo N-terminal. Excepcionalmente, los canales Kv2 como Kv2.1 presentan un C-terminal más largo ya que estos son eléctricamente activos, y contiene diversas señales para el tráfico de proteínas, la interacción con el sistema de endomembranas y formación de agrupaciones (*clusters*) (25).

El funcionamiento del canal depende de la comunicación coordinada entre los dominios anteriormente descritos. Su arquitectura permite este hecho, posicionando las hélices formadoras del dominio sensible al voltaje adyacentes a las del poro.

Cuando se produce un cambio en el potencial de membrana, el dominio responsable de captarlo es el VSD (dominio sensible al voltaje), concretamente, la hélice S4. El segmento S4 contiene 5 residuos básicos de los cuales 3 están posicionados en la parte externa y su fácil accesibilidad permite la generación de las corrientes de compuerta. Ante una despolarización (cambio en el interior hacia un voltaje más positivo), los residuos básicos de la hélice S4 experimentan una fuerza electrostática que ocasiona un movimiento hacia fuera (*outward*). Este movimiento genera las corrientes de compuerta *ON gating*. En el caso contrario, cuando se produce la repolarización (caída hacia potenciales negativos) el movimiento se da en sentido contrario, hacia el interior, generando las corrientes *OFF gating* (24).

El acoplamiento entre el dominio sensible al voltaje (VSD) y el dominio del poro (PD) permite un funcionamiento normal del canal. Esta conexión está mediada por el *linker* S4-S5, donde el VSD rodea la base del poro transmitiendo el desplazamiento mecánico hacia el extremo de la hélice S6, mecanismo que produce la apertura del poro. De este modo, el VSD actúa como sensor, permitiendo físicamente la apertura o el cierre de la compuerta del poro, y regulando el flujo de iones (24).

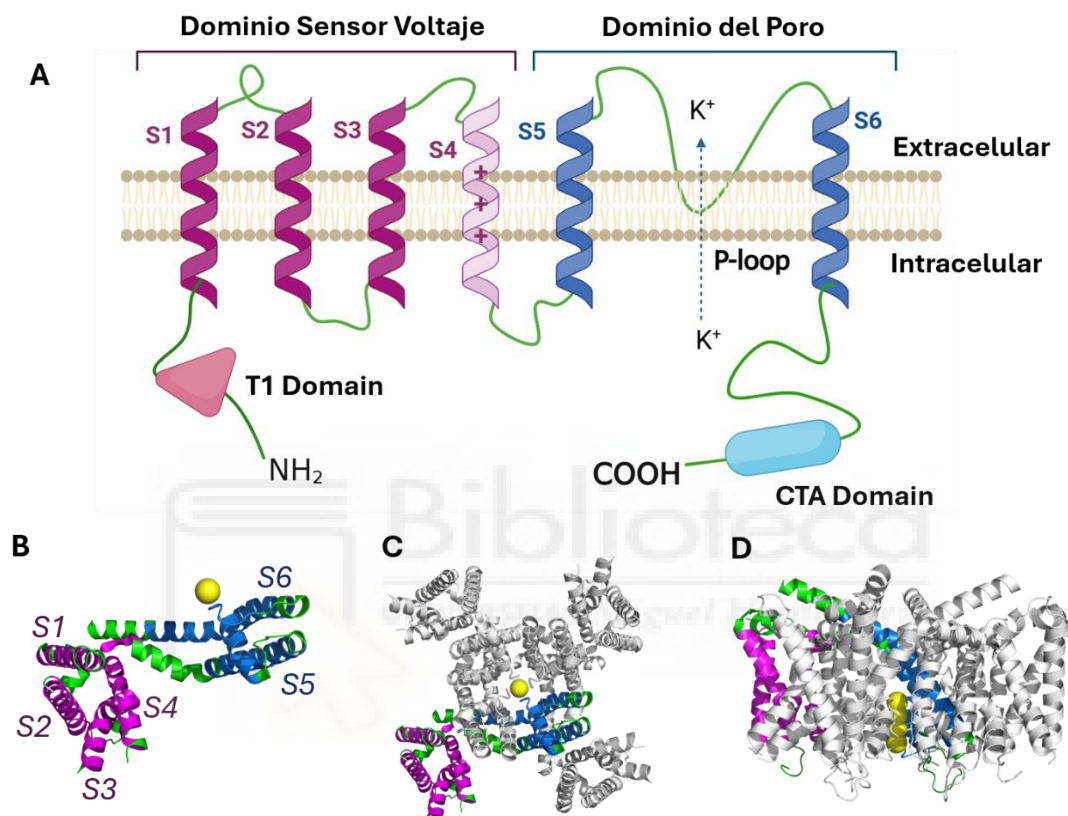


Figura 2: Estructura topológica y tridimensional del canal Kv2.1. **A)** Representación topológica transmembrana del canal Kv2.1 que muestra la organización de las seis hélices alfa (S1-S6) y los dominios citoplasmáticos. Se destacan los dos módulos principales: el dominio sensible al voltaje (VSD, hélices S1-S4 en rosa) y el dominio del poro (PD, hélices S5-S6 en azul). S4 muestra los residuos básicos (+) claves para la detección de cambios de voltaje. Además, están resaltados el dominio T1 (tetramerización) en el extremo N-terminal y el dominio CTA en el C-terminal, así como el bucle P (P-loop) que forma el filtro de selectividad. Los loops intra y extracelulares están marcados en verde. Imagen construida mediante BioRender. En el panel inferior se muestran las vistas estructurales en 3D de la proteína donde en **B)** se representa la vista superior de un único monómero, en **C)** la vista superior del tetrámero completo con una subunidad resaltada en color y en **D)** la vista transmembrana del tetrámero completo, colocado en la posición que ocuparía en la bicapa lipídica. Se ha empleado el mismo código de colores que en A) y las esferas amarillas representan iones potasio. Imágenes obtenidas mediante Pymol, código PDB 8SD3.

1.4. GEN *KCNB1*-KV2.1: MUTACIONES EPILÉPTICAS

El gen *KCNB1* (en posición 20q13.13) codifica para la subunidad alfa del canal de potasio dependiente de voltaje Kv2.1. Este canal es un rectificador retardado responsable de la corriente de salida de potasio (I_K) en las neuronas piramidales. Tras la despolarización celular, el canal se activa con un ligero retraso para permitir la salida de K^+ , permitiendo que la neurona vuelva a su estado de reposo durante la repolarización. Además de moldear la fase final del potencial de acción, permite el mantenimiento de la integridad del circuito neuronal al evitar disparos repetitivos, es por ello que deleciones en este gen provocan un estado de hiperexcitabilidad (26,27).

Clínicamente, mutaciones en este gen se asocian a encefalopatías epilépticas y del desarrollo de aparición temprana y refractaria a los tratamientos antiepilépticos actuales. A pesar de la severidad de la EED inducida por mutaciones en *KCNB1*, la escasa prevalencia en la población que la categoriza como una enfermedad rara hace de la misma una patología escasamente caracterizada. Actualmente se desconoce el impacto fenotípico de cada variante además del impacto que puedan tener otras proteínas moduladoras de la actividad del canal Kv2.1.

De acuerdo con los datos publicados por la Universidad de Northwestern recopilados de las plataformas ClinVar y Decipher, hoy en día se han identificado alrededor de 75 mutaciones patogénicas en este gen; sin embargo, apenas un tercio de ellas han sido caracterizadas funcionalmente (28–32). Esta falta de datos evidencia una necesidad crítica de caracterización funcional ya que la notable heterogeneidad de estas mutaciones compromete la funcionalidad del canal principalmente por dos motivos:

- Alteraciones específicas de la conductancia iónica que afectan la funcionalidad por procesos de *gating*, pérdida de selectividad iónica o pérdida de sensibilidad al voltaje. En este contexto, los mutantes comprometen la cinética del canal modificando los procesos de activación e inactivación pudiendo desplazarlos hacia voltajes no fisiológicos.
- Alteraciones inespecíficas de conductancia donde se detectan defectos de proteostasis y tráfico: la funcionalidad del canal se ve comprometida por su presencia reducida o nula en la superficie celular. La problemática de muchos mutantes reside en que la falta de expresión de Kv2.1 explica la pérdida de conductancia observada en ensayos electrofisiológicos (33). Esta disminución en la superficie de la membrana puede deberse a la naturaleza de dominancia negativa de las mutaciones, donde la alteración de un monómero puede comprometer el tráfico del tetrámero completo, o a que el canal quede retenido en el retículo

endoplasmático (RE), orgánulo en el que es sintetizado y donde es susceptible de sufrir la degradación asociada al retículo (ERAD)(34).

En cuanto al tráfico intracelular, *KCNB1* está implicado en el contacto entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática, determinando, por ejemplo, la cantidad de canales iónicos de potasio Kv2.1 y Kv4.1 que alcanzan la membrana o la señalización de calcio (35).

El canal Kv2.1 tiene la capacidad de formar uniones con las integrinas, generando IKCs (*Integrin K⁺ Channel Complex*), estructuras capaces de controlar la migración neuronal y neuritogénesis (36). La neuritogénesis es un proceso que permite el establecimiento y desarrollo del circuito neuronal, además de permitir la reparación neuronal tras heridas (37). Por otra parte, la migración neuronal también resulta imprescindible y permite determinar la capa exacta que van a ocupar las neuronas durante la formación del neocórtex (38).

En definitiva, el canal Kv2.1 está implicado tanto en la excitabilidad cerebral, al controlar el disparo y duración de los potenciales de acción, como en el desarrollo neuronal donde es participe en la formación de sinapsis, prolongación de las neuritas o control de la migración neuronal. Este segundo grupo de afecciones se alberga dentro de las funciones no iónicas del canal donde las IKC cobran especial relevancia (36,38). Por tanto, la relación entre las funciones iónicas y no iónicas es sinérgica e intrínsecamente ligada al gen *KCNB1*. Daños en el mismo no solo deterioran el circuito eléctrico sino que comprometen el desarrollo normal del cerebro al interrumpir o alterar procesos fundamentales del mismo (36,38).

1.5. LOCALIZACIÓN Y TRÁFICO CELULAR DEL CANAL

Para garantizar el correcto funcionamiento de las células excitables es necesario un control preciso de la densidad y localización de los canales iónicos en la superficie celular. En este contexto, el canal Kv2.1 sufre un complejo proceso de tráfico a través del sistema endomembrana, teniendo como sitio final de expresión principalmente la membrana celular. Presumiblemente, este proceso se realiza a través de una vía de tráfico anterógrado predeterminada, sin ninguna acumulación intracelular en canales silvestres (25,39).

Una característica distintiva del canal Kv2.1 es su organización espacial en la membrana. Este puede encontrarse como canales individuales que difunden libremente o autoensamblarse en agrupaciones (*clusters*) micrométricas esenciales para el mantenimiento de la proteostasis y la regulación de la arquitectura de la superficie celular (40).

Desde el punto de vista funcional, los *clusters* son microdominios que actúan como sistema multifuncional. Por una parte, interaccionan con proteínas del complejo SNARE, participando en procesos de secreción y exocitosis, pero además, actúan como plataformas de tráfico desde y hacia la superficie, facilitando tanto la inserción de canales en la membrana como su endocitosis. Singularmente, estas estructuras son no conductoras, aunque conservan la capacidad de detectar cambios de voltaje (35).

La dinámica de los *clusters* está regulada por el citoesqueleto de actina, formando una estructura llamada “valla perimetral” (*perimeter fence*). Esta barrera delimita el dominio y restringe la difusión libre de los canales, regulando el intercambio de canales entre el dominio del *cluster* y el resto de la membrana (40) (Figura 3).

En cuanto al recambio de Kv2.1 en la superficie, es un proceso fluctuante donde el canal muestra una preferencia a insertarse en regiones de agregaciones preexistentes. Tras su anclaje en la membrana, el canal puede ser endocitado y reciclado permitiendo un reajuste de los niveles de expresión en la superficie de acuerdo con las necesidades de la célula. Estos *clusters* funcionan no solo como sitios de inserción para Kv2.1 sino también para otros canales como el Kv1.4 (35).

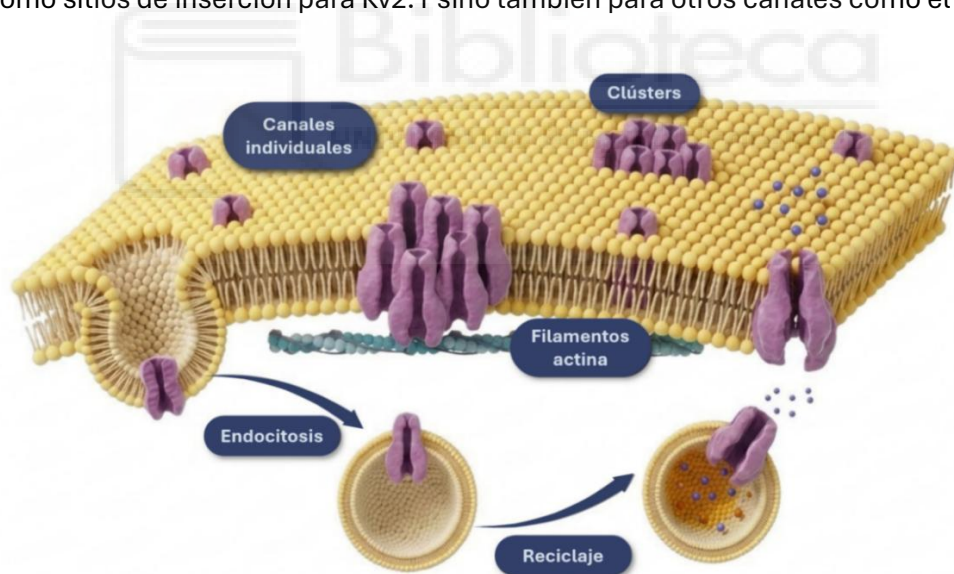


Figura 3: Dinámica de membrana, organización espacial y tráfico vesicular del canal Kv2.1. En la bicapa lipídica se reflejan los dos estados de organización del canal: agrupaciones macromoleculares (*clusters*) y canales individuales con capacidad de difusión libre. Los filamentos de actina interactúan con los clusters, actuando como una valla perimetral y restringiendo la movilidad lateral de las proteínas agrupadas. En la parte inferior se representa el ciclo de recambio del canal, detallando los procesos de endocitosis y la posterior vía de reciclaje para la reinserción de los canales en la superficie celular. Imagen creada por BioRender y editada por Gemini.

Finalmente, en cuanto a la localización neuronal, los *clusters* de Kv2.1 se localizan predominantemente en el soma, las dendritas proximales y los segmentos iniciales axónicos (AIS) de neuronas hipocámpales y corticales(41). También se ha documentado su localización en terminales postsinápticas, donde su organización resulta crítica para la modulación de la respuesta sináptica (42).

Para determinar la localización del canal, una aproximación es la inmunocitoquímica (ICC), que utiliza anticuerpos específicos. No obstante, dada la complejidad del tráfico intracelular anteriormente descrito, que incluye procesos de reciclaje, endocitosis y tráfico por distintos compartimentos, surge la necesidad de uso de una tecnología de marcaje más precisa e incluso compatible con ensayos en célula viva. Este enfoque permitiría el estudio y la mejora de la comprensión de la enfermedad llegando a dilucidar el comportamiento individualizado de cada variante mutante. La tecnología HaloTag surge como una posibilidad de ello, representando un avance hacia la medicina personalizada y permitiendo incluso determinar el compartimiento subcelular donde quedan retenidas las proteínas.

1.6. SISTEMA HALOTAG PARA EL MONITOREO DE VARIANTES MUTANTES.

El sistema HaloTag representa una tecnología novedosa para el marcaje específico de proteínas. Este sistema se basa en una proteína marcadora modificada (HaloTag), derivada originalmente de la enzima bacteriana haloalcano deshalogenasa (DhaA) de *Rhodococcus* (43). La innovación reside en que esta etiqueta de 33 kDa ha sido diseñada para reaccionar de forma rápida, específica e irreversible con ligandos sintéticos que contienen un cloroalcano (44).

En la enzima silvestre el cloroalcano es procesado para liberar alcohol, sin embargo, en el sistema HaloTag, se ha llevado a cabo una modificación (mutación de la base H272F) que impide la hidrólisis del intermediario covalente. Esto resulta en la formación de un enlace éster covalente estable entre la proteína y el ligando (43).

Una sola construcción genética de la proteína de interés fusionada a HaloTag puede utilizarse para múltiples aplicaciones, por ejemplo, permitiendo la purificación proteica o el marcaje tanto de proteínas intracelulares como superficiales en células vivas. Esta versatilidad se basa en el uso de ligandos tanto permeables como impermeables a la membrana, permitiendo el marcaje intracelular o extracelular. Además, los ligandos son pequeños y no tóxicos, compatibles con el uso en células vivas (Figura 4).

Por tanto, el sistema HaloTag resulta útil para investigar variantes mutantes relacionadas con la proteostasis, como es el caso del gen *KCNB1*. Esta tecnología permitiría realizar un seguimiento de la internalización, el reciclaje o la degradación de variantes mutantes que podrían estar retenidas en el retículo endoplasmático por defectos de plegamiento.

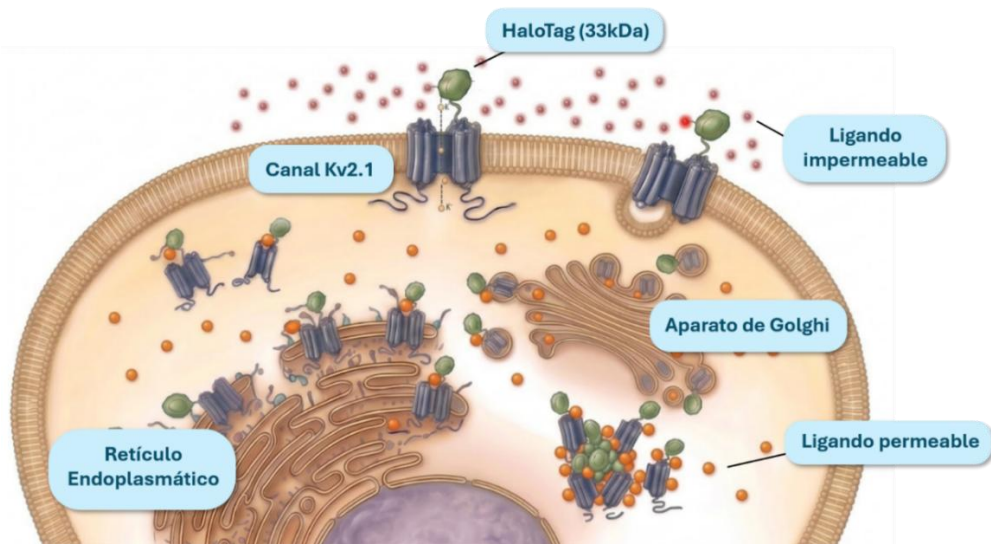


Figura 4: Representación de marcaje mediante la tecnología HaloTag. La etiqueta HaloTag (verde) permite realizar un marcaje selectivo de distintos compartimentos. El ligando impermeable (rojo) se une exclusivamente a los canales expuestos en la superficie celular, mientras que el ligando permeable (naranja) atraviesa la membrana marcando de forma específica las fracciones del citosol o aquellas retenidas en los orgánulos intracelulares. Imagen creada con Gemini.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Anteriormente, las alteraciones ocasionadas por mutantes de canales de potasio se orientaban principalmente a defectos funcionales, especialmente a alteraciones en el dominio del poro que comprometían su selectividad o *gating*. Sin embargo, en 2001 se describieron residuos críticos localizados en regiones conservadas del dominio del poro de Kv1 que afectaban al tráfico del canal, revelando una función no descrita anteriormente para el dominio del poro, su actuación como regulador del tráfico intracelular (45).

Estudios más recientes (Thiffault et al., 2015) apuntan a que ocurren defectos similares en el canal Kv2.1, donde los cambios en la estructura de los poros también comprometen su transporte (5). Este hallazgo sugiere un cambio en la fisiopatología, ya que las mutaciones en los poros de Kv2.1 no deben atribuirse exclusivamente a defectos biofísicos, sino que a la hora de evaluar la conductancia del canal se han de tener en cuenta los posibles efectos sobre la expresión y la localización del canal. Las estrategias terapéuticas dirigidas a las variantes Kv2.1

también deberán tener en cuenta su papel estructural, clave en la formación de uniones entre el retículo y la membrana o el reclutamiento de proteínas.

Adicionalmente, en 2008 se desarrolló el sistema HaloTag, que proporcionó una tecnología de etiquetado químico de alta afinidad y selectiva, ideal para analizar la dinámica de proteínas mediante microscopía confocal (43).

Posteriormente, en 2017 Misonou et al. desarrollaron un sistema Halo-Kv2.1 para el estudio de la localización del Kv2.1 en el segmento inicial del axón (AIS). Esta construcción fue generada mediante la inserción de la etiqueta HaloTag en el primer *loop* extracelular y se clonó en un vector de expresión inducible por tetraciclina (41). Sin embargo, no se indicó con exactitud el sitio de inserción ni se ha evaluado si dicha modificación altera la funcionalidad nativa del canal.

Las mutaciones del gen *KCNB1* están asociadas a encefalopatías graves que alteran no solo la funcionalidad del canal, sino también su localización y densidad en la superficie celular. En este escenario, la ingeniería HaloTag surge como una aplicación idónea para el estudio de las mutaciones patogénicas de *KCNB1* al permitir la monitorización del tráfico intracelular y análisis de la expresión del canal.

En definitiva, el objetivo principal de este trabajo busca desarrollar una herramienta experimental basada en la inserción de un HaloTag en la secuencia del canal iónico Kv2.1 y permitirá sentar las bases para aplicar la estrategia desarrollada al estudio sobre la dinámica subcelular y patogénesis asociada a variantes mutantes de Kv2.1.

Por ello, los objetivos específicos del presente trabajo son los siguientes:

1. Analizar la estructura tridimensional del canal Kv2.1 para identificar regiones tolerantes a la inserción del HaloTag sin comprometer su funcionalidad.
2. Generar las construcciones génicas correspondientes; canal silvestre (Kv2.1-WT) y canal fusionado con HaloTag (Kv2.1-Halo).
3. Evaluar la función de Kv2.1-Halo mediante ensayos electrofisiológicos, comparándola con la de Kv2.1-WT.
4. Monitorizar el tráfico de Kv2.1-Halo mediante microscopía confocal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. INGENIERÍA PLASMÍDICA

Para monitorizar la posición del canal Kv2.1 se diseñó la construcción Kv2.1 fusionada a la etiqueta proteica HaloTag (Kv2.1-Halo). A diferencia de casos anteriores, donde la inserción del HaloTag se realizó en los extremos citoplásmicos N o C-terminal porque son regiones variables y flexibles (23), en este trabajo se seleccionó un bucle extracelular. Esta decisión es crítica, ya que la localización intracelular de los extremos terminales impediría el uso de ligandos impermeables.

Se realizó un monitoreo de los bucles (*loops*) extracelulares en busca de aquellos que estuviesen alejados del poro, de modo que la inserción de la etiqueta tuviese el menor impacto y no dificultara la funcionalidad del canal, por ejemplo, al taponarlo. Se pretendía además minimizar tensiones en la estructura del canal que pudieran provocar cambios indeseables. Este canal presenta 3 *loops* extracelulares, el localizado entre las hélices S1-S2, entre las hélices S3-S4, y entre las hélices S5-S6. De todos ellos, el localizado entre los dominios S5-S6 quedó descartado dado que es donde se localiza el dominio del poro.

Se analizaron los otros 2 *loops* en busca de glicinas, un aminoácido caracterizado por ausencia de cadena lateral y elevada flexibilidad. La inserción en sitios próximos a este aminoácido facilitaría la movilidad de la etiqueta y minimizaría tensiones con el resto de la estructura del canal. Se identificó únicamente 1 glicina en dichos *loops*, la G221 situada en el primer *loop* (entre las hélices S1 y S2).

La construcción Kv2.1-Halo se generó mediante la inserción del HaloTag en el *loop* extracelular S1-S2 del canal silvestre, específicamente tras el residuo G221. En el plásmido resultante, dicha inserción se localiza en la posición 995. Además, tal como se puede observar en el mapa del plásmido (Figura 5), el HaloTag queda flanqueado por secuencias espaciadoras formadas por 3 repeticiones en tándem GGGGS que permiten mejorar la flexibilidad. Las glicinas aportan flexibilidad, y las serinas, un aminoácido polar sin carga, le confieren hidrofilia garantizando la solubilidad del espaciador y evitando interacciones inespecíficas. Este diseño permite maximizar la flexibilidad posibilitando una mayor libertad rotacional del HaloTag y facilitando su accesibilidad a los ligandos en el medio extracelular.

El vector fue sintetizado por la plataforma VectorBuilder y se utilizó como promotor CMV (citomegalovirus) y kanamicina como gen de resistencia a antibiótico. Se incluyó además un gen marcador *smGFP* acoplado a un IRES para identificar mediante microscopía las células transfectadas.

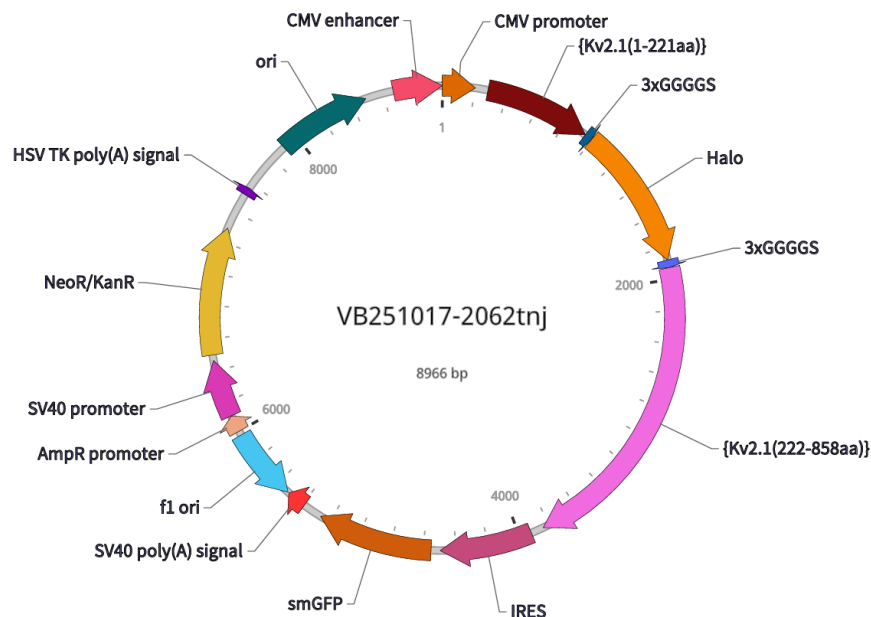


Figura 5: Mapa genético del vector de expresión Kv2.1-Halo. La expresión del plásmido está dirigida por el promotor CMV. La secuencia codificante del canal se encuentra dividida en dos fragmentos al ser interrumpida por el gen Halo (HaloTag), el cual a su vez está flanqueado por espaciadores peptídicos flexibles 3xGGGGS. Aguas abajo se localiza un sitio IRES que permite la co-expresión del canal con el gen smGFP como gen reporter fluorescente. El vector incorpora además un origen de replicación eucariota (f1 ori), bacteriano (ori) y los genes de resistencia a neomicina/kanamicina (NeoR/KanR) y ampicilina (AmpR). Plásmido generado por la plataforma VectorBuilder.

3.2. CULTIVO CELULAR

Se utilizan como cultivo células de riñón embrionario humano (HEK-293) LTV (Lentiviral-Transfection Variant), variante procedente de las células HEK 293 optimizadas para maximizar la transfección. Esta es una línea estable ampliamente utilizada por su alta capacidad de transfección y rápido crecimiento, así como por presentar una reducida expresión de canales de potasio que mejoran el estudio de canales de potasio transfectados de forma transitoria, como es el caso. Además, han sido optimizadas para la producción de vectores virales como lentivirus y de proteínas recombinantes (46).

El mantenimiento de esta línea se lleva a cabo con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) -Glutamax (61965-026, Gibco) suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) (10500-064, Gibco), 1% de los antibióticos Penicilina/estreptomicina (15140-122, Gibco) y 0,1% de aminoácidos no esenciales (11140-035, Gibco). Las células se mantienen en un incubador de cultivo celular a 37 °C y 5% CO₂, condiciones que permiten un crecimiento óptimo.

Las células además se siembran en *flask* T25 con 25 cm² de superficie, manteniéndose con 6 ml del medio basal anteriormente descrito cambiado cada 48-72 h. Al alcanzar una confluencia del 80-90% se les realiza un pase a un nuevo *flask*, permitiendo el mantenimiento del cultivo.

El pase se realiza de acuerdo con un protocolo de tripsinización, retirando previamente el medio, y añadiendo 1 ml de Tripsina-EDTA al 0.25%. La tripsina permite tanto levantar las células como disgregarlas. Tras 2 minutos, se adiciona 5 ml de medio basal para detener el proceso de tripsinización, ya que el suero bovino contiene inhibidores naturales de proteasas, principalmente la α -antitripsina y la α -a macroglobulina (se unen irreversiblemente a la tripsina deteniendo su acción). Con los 6 ml se homogeneiza la muestra para disgregar los grumos que puedan persistir y se lleva a cabo un recuento en cámara de Neubauer con 10 μ l. Estimada la concentración en células/ml se procede a la siembra. Para los cultivos de mantenimiento de 1 semana se siembran 20.000 células/ml.

Por otra parte, las células empleadas para *patch clamp* se siembran en cristales a una concentración de 20.000 células por cristal.

Los cristales, de 12mm de diámetro, se tratan con Poli-L-Lisina al 0.01% (P4707, Sigma) durante 30 minutos anteriormente a la siembra celular para evitar que las células se despeguen durante los ensayos de *patch clamp*. Tras los 30 minutos de incubación, se retira la Poli-L-Lisina y se realizan 2 lavados con tampón fosfato salino (PBS 1x) sin calcio ni magnesio. Finalmente, se dejan reposar 20 minutos en la cabina para que se sequen.

3.3. LIPOTRANSFECCIÓN

Respecto al procedimiento de lipotransfección, se utiliza el reactivo Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (L3000015, Invitrogen). El protocolo parte de un cultivo celular a 70-90% de confluencia. Además, es necesario el uso del medio Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (31985-070, Gibco) para la transfección de lípidos catiónicos.

Para la transfección, se utiliza ADN, Lipofectamina 3000 y P3000 en una proporción 1:1,5:3. En primer lugar, se diluye la cantidad de plásmido requerido y del reactivo P3000 en medio Opti-MEM. Y, paralelamente, se diluye Lipofectamina 3000 en medio Opti-MEM. Finalmente, se juntan ambas mezclas en una proporción 1:1.

Una vez mezclados todos los componentes, se retira el medio del cultivo y se añaden 1,5 ml de medio Opti-MEM junto a la mezcla lipídica generada. 4h tras la transfección, se añaden 4 ml de

medio basal DMEM-Glutamax y se incuba toda la noche. Al día siguiente, 24h post-transfección, se cambia todo el medio.

3.4. CULTIVO BACTERIANO

Para el crecimiento bacteriano se preparan medios LB (Luria-Bertani) líquido y sólido utilizando en ambos casos cápsulas de medio deshidratado (3002031, MP Biomedicals) a una concentración de 25 cápsulas/L y agua Mili-Q como solvente. Adicionalmente, el medio sólido se suplementa con Agar Bacteriológico Europeo de Conda al 2% (4g).

Ambos medios se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Tras atemperarse en un baño a 50 °C se adiciona el antibiótico de selección, en este caso la kanamicina, a una concentración final de 50 µg/ml. El medio sólido se vierte en placas Petri para su gelificación.

El stock bacteriano de Kv2.1-Halo se siembra por el método de estría en las placas LB sólidas e incuba toda la noche (*overnight*) a 37 °C. A partir de una colonia aislada se realiza un preinóculo en 5 ml del medio líquido anteriormente preparado, el cual se incuba durante 2-3h a 37 °C bajo agitación. Posteriormente, se transfiere ese volumen a un matraz de 500 ml y se incuba a 37 °C con agitación de 200 rpm *overnight*.

Para la purificación del plásmido a partir del cultivo de 500 ml se utiliza el kit comercial E.Z.N.A.® Plasmid DNA Maxi Kit (D6922-02, Omega Bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método de extracción se basa en procesos de lisis alcalina y purificación mediante columnas de sílice. Finalmente, el ADN extraído se eluye en agua destilada libre de nucleasas, y la cantidad de ADN se cuantifica utilizando espectrofotometría (NanoDrop de Thermo Scientific). Se obtuvo una concentración final de 158,8ng/µl y una calidad de ADN puro y libre de contaminantes. La calidad del ADN se mide a través de los parámetros A260/280 y A260/230. La relación A260/280 mide el ADN contaminado por proteínas o compuestos aromáticos, mientras que la relación A260/230 mide la contaminación del ADN por compuestos salinos y fenoles. En la Tabla 1 se recoge la calidad del ADN purificado en función de los parámetros anteriormente descritos:

Tabla 1: Parámetros para determinación de calidad de ADN (A260/280 y A260/230).

	A260/280	A260/230
ÓPTIMO	>1.8-2.1	>2-2.2
ACEPTABLE	>1.6-1.7	>1.8

ADN CONTAMINADO	<1.6 ADN contaminado por proteínas o compuestos aromáticos	<1.8 ADN contaminado con sales, fenoles
		<1.5 ADN altamente contaminado

En nuestro caso, los valores de A260/280 y A260/230 fueron de 1.83 y 2.07 respectivamente, encontrándose ambos en el rango óptimo.

3.5. MARCAJE CON HALOTAG

Para la visualización mediante microscopía del canal Kv2.1-Halo expresada en la superficie celular, se utiliza el ligando extracelular impermeable HaloTag Alexa Fluor 660 de Promega.

El marcaje se realiza sobre un cultivo de HEK 293 LTV anteriormente transfectadas y sembradas en cristales de 12mm de diámetro, tal como se ha descrito anteriormente.

Se prepara una solución de marcaje diluyendo el ligando HaloTag Alexa Fluor 660 en medio de cultivo anteriormente calentado, alcanzando una concentración final de 3,5 μ M. Tras retirar el medio de cultivo de los cristales, se adicionan 200 μ l de la solución preparada sobre cada cristal. Los cristales con el medio de marcaje se incuban durante 15 minutos en condiciones fisiológicas (37 °C y 5% CO₂), tiempo suficiente para permitir que se lleve a cabo la unión entre el ligando extracelular y el HaloTag insertado en el canal. Finalizado el periodo de incubación se retira el medio con el ligando de los cristales, y se realiza un lavado con tampón fosfato (PBS 1x). Posteriormente, se añade nuevo medio de cultivo.

Para el marcaje intracelular, se utiliza el ligando permeable HaloTag Janelia Fluor 549 de Promega. Se disuelve anteriormente en 37,8 μ l de DMSO para alcanzar una concentración final de 132ng/ μ l. El protocolo de incubación y lavado se ejecuta de forma exacta al descrito anteriormente para el marcaje extracelular.

Finalmente, para realizar el marcaje de la membrana se utiliza la sonda CellBrite Blue Cytoplasmic Membrane-Labeling Kit (30024, Biotium) donde se diluye el marcador en un loading buffer en proporción 1:1 y dicha mezcla en proporción 1:100 con PBS 1x. A continuación, se añaden 200 μ l de la solución preparada sobre cada cristal y se incuba durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, deben lavarse los cristales con PBS.

Para la toma de imágenes con el objetivo 20x y células vivas, antes de la obtención de imágenes mediante microscopía, cada cristal debe ser lavado de nuevo con PBS y montado en una cámara de microscopía, utilizándose PBS como solución extracelular para evitar interferencias con el

rojo fenol del medio de cultivo. En el caso de realización de imágenes con el objetivo de 64x y uso de aceite de inmersión, se fijan las células con paraformaldehído (PFA) 4% durante 30 minutos y a continuación se realizan 2 lavados con PBS 1x. Finalmente, para montar los cristales, se utiliza Fluoromount-G (00-4958-02, Invitrogen) y se dejan secar *overnight*.

3.6. MICROSCOPÍA

Para la obtención de las imágenes de fluorescencia, se utiliza el microscopio confocal de barrido láser LSM900 (Zeiss) equipado con un detector con Airyscan2. Para visualizar los ligandos se emplea un láser de 640 nm para la excitación del HaloTag Alexa Fluor 660 (impermeable), uno a 561 nm para el HaloTag Janelia Fluor 549 (permeable) y otro de 488 nm para la GFP. Se tomaron imágenes utilizando el objetivo de 20x y 64x con uso de aceite de inmersión.

3.7. ANÁLISIS DE IMAGEN (IMAGEJ)

El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el software Zen Blue (Zeiss), y las imágenes se procesaron con el software de ImageJ/Fiji. Con él se evaluó el % de área y densidad integrada. Para el cálculo del % de área se realizó una región de interés (ROI) correspondiente a la parte ocupada por la GFP y sobre ella se aplicó una máscara binaria para el cálculo del área. De esta forma, el análisis se acotó exclusivamente a las células transfectadas. En cuanto a la densidad integrada (*Integrated Density* o *IntDen*), calculada también como Mean Gray Value x Area, representa la suma total de las intensidades de los píxeles dentro de una región de interés (ROI). Este valor es directamente proporcional a la cantidad total del fluoróforo presente en el área seleccionada y permite comparar la señal registrada entre muestras de distintos tamaños y formas. Para medir este parámetro, se acotó la región de interés a la región ocupada exclusivamente por cada ligando, no de la célula completa.

Adicionalmente, para los análisis estadísticos de ANOVA, se utilizó el software GraphPad Prism. *N* corresponde a las réplicas biológicas y *n* el número de imágenes evaluadas en cada condición.

3.8. ELECTROFISIOLOGÍA

Para el estudio de la funcionalidad y caracterización del canal Kv2.1, se utiliza la técnica *patch clamp* en configuración *whole-cell*. Esta técnica permite registrar las corrientes y cambios de voltaje en toda la célula al realizar un sello de elevada resistencia (gigasello), utilizando para ello una punta o micropipeta de vidrio.

Las corrientes Kv2.1 se registran utilizando un protocolo de *voltage-clamp* y haciendo uso de un amplificador EPC-10 Pulse y el programa PatchMaster (HEKA Elektronik). Dichas medidas se llevan a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

Para mimetizar las condiciones fisiológicas, es necesario el uso de soluciones extracelulares e intracelulares que permitan generar los gradientes iónicos necesarios.

La solución extracelular se encuentra bañando al cristal donde se localizan las células, y está compuesta por NaCl 140 mM, CaCl₂ 1.8 mM, KCl 4 mM, HEPES 10 mM y Glucosa 10 mM y ajustada a un pH de 7.4 con NaOH. En cuanto a la interna, esta presenta KCl 144 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM y EGTA 5 mM, y ajustada a un pH de 7.2 con KOH.

Para la realización del sello, se utilizan capilares de vidrio de borosilicato, rellenos con la solución intracelular. La punta debe ser aproximada a la célula hasta tocar la membrana para la formación del sello y, como se ha mencionado anteriormente, la configuración utilizada para las medidas electrofisiológicas es *whole-cell*, por lo tanto, es necesario que además de formar el sello este sea abierto. Al abrirlo, el interior de la célula queda en contacto con la solución interna de la pipeta y pueden registrarse las corrientes de toda la célula (Figura 6).

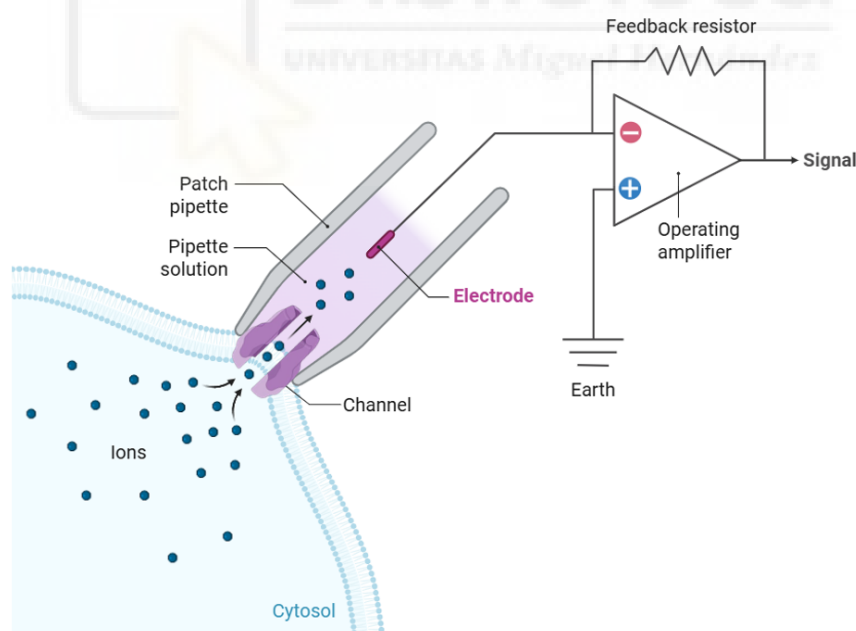


Figura 6: Representación del sistema de registro de patch-clamp. Ilustración de la formación del sello entre la micropipeta y la membrana plasmática en configuración *whole-cell*. En el interior de la pipeta, inmerso en la solución interna, se ubica el electrodo de registro. Este, junto con el electrodo conectado a la tierra permiten generar un circuito eléctrico. Esta configuración permite la aplicación de pulsos de voltaje controlados junto al registro de la corriente generada por la célula. Imagen generada mediante Biorender.

Las puntas con las que se realizan los registros se fabricaron utilizando capilares de diámetro externo e interno de 1.5mm y 1.17mm respectivamente y el estirador de micropipetas (*puller*) Modelo P-97. Este instrumento permite la transformación de un capilar de vidrio en dos puntas mediante la realización de una serie de ciclos de calor en el centro del capilar y estiramiento de este. En cuanto a la resistencia de las puntas, cuando son rellenadas con la solución interna presentan resistencia entre 2-5M Ω .

Los registros de corriente se obtienen aplicando un protocolo en *steps* de 9,5s de duración total, compuesto por 17 pulsos de voltaje de 500 ms cada uno. Estos *steps* recorren un rango de potenciales desde -80 mV hasta +80 mV, en incrementos de 10 mV. La señal pasa por un amplificador y digitalizador EPC-10 antes de alcanzar el ordenador y se analiza mediante el programa Patchmaster.

Para obtener la curva de activación (G/G_{max}) se utiliza un protocolo que permite obtener las corrientes de cola (*tail*). Este protocolo consiste también en la aplicación de una serie de *steps* desde -80 mV a +80 mV seguido de la aplicación durante 250 ms de un pulso constante de -30 mV.

Y, como protocolo de inactivación, se aplica también un protocolo de *steps* formado por pulsos de larga duración (3 s) desde -100 mV hasta +40 mV, seguidos de un pulso de 250 ms de +60 mV. La corriente registrada en cada pulso se normaliza frente a la corriente máxima obtenida en el I_o, permitiendo evaluar la fracción de canales disponibles para abrirse.

Finalmente, para la selección de las células, se utiliza el microscopio Zeiss Axio Observer, que presenta un filtro de luz verde de 510 nm de longitud de onda y está acoplado a una lámpara de fluorescencia de xenón XBO 75, Zeiss. Esto permite seleccionar las células transfectadas, dado que aquellas que expresan el gen de interés también expresan la GFP.

En cuanto al flujo de trabajo general, se transfecta 48h antes de sembrar y 72h antes de realizar los experimentos de *patch-clamp* y microscopía.

3.9. ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Una vez obtenidos los registros, se procede al análisis de las señales con el fin de caracterizar las propiedades del canal Kv2.1 y determinar si la presencia del HaloTag altera su funcionalidad.

Para asegurar un análisis homogéneo, se midió la intensidad de corriente a los 100 ms. Con dichos valores, se obtuvieron las gráficas I-V (Intensidad de corriente- Voltaje).

Dado que la intensidad de corriente puede variar según el tamaño de la célula o el número de canales por célula, los datos se normalizan calculando la densidad de corriente (J). Para ello, se divide la intensidad de corriente (I) entre la capacitancia de la membrana (C_{slow}), proporcional al tamaño de la célula.

$$J = \frac{I}{C_{slow}}$$

La densidad de corriente (J) integra factores biológicos y físicos, tales como el número total de canales en la membrana, su probabilidad de apertura y la fuerza impulsora.

Con el fin de comprobar que el canal silvestre presenta las mismas características que el modificado con la etiqueta HaloTag y que esta no altera las propiedades, se calculan las curvas Conductancia-Voltaje. La conductancia (G) se determinó mediante la Ley de Ohm:

$$G = \frac{I}{V - V_{eq}}$$

Donde G es la conductancia en siemens (S), I es la intensidad en amperios, V es el voltaje en voltios y V_{eq} es el potencial eléctrico para un ion. Para el cálculo de V_{eq} se utiliza la ecuación de Nernst, teniendo en cuenta las concentraciones de las soluciones empleadas en los registros:

$$V_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}}$$

La concentración de potasio extra e intracelular vienen determinadas por las soluciones preparadas, por lo tanto $[K^+]_{ext}$: 4mM y $[K^+]_{int}$: 144mM. La R corresponde a la constante de los gases ideales (8.314J/mol*K) y T es la temperatura en Kelvin a la que se realizaron los experimentos. Como se llevó a cabo en condiciones de temperatura ambiente (25 °C) son 298.15°K. z es la carga del ion (en el caso del potasio +1) y F es la constante de Faraday, 96485.33 C/mol.

Finalmente, los valores se normalizan frente a la conductancia máxima obtenida para cada célula (G_{max}). Obtenida la relación G/G_{max} , se representa gráficamente G/G_{max} -V. Las curvas resultantes se ajustan a la función de Boltzmann, permitiendo obtener el potencial medio de activación ($V_{1/2}$), el factor de la pendiente (k) y los intervalos de confianza. De esta forma, se puede realizar una comparación estadística entre el canal silvestre y la construcción con HaloTag.

Además, se obtienen las gráficas de inactivación I/I_0 que permiten medir la fracción de canales disponibles tras cada pulso. Para ello, se normaliza la corriente registrada en cada pulso frente

a la I_0 . Dichos resultados también se ajustan a la ecuación de Boltzmann obteniendo los parámetros estadísticos. Adicionalmente, para el análisis t-test se utilizó el software GraphPad Prism. n corresponde al número de registros evaluados en cada condición.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL CANAL Kv2.1-WT Y Kv2.1-HALO

Para comprobar que la inserción del dominio HaloTag en el bucle S1-S2 no altera las propiedades biofísicas del canal, se llevó a cabo la caracterización electrofisiológica de dicho canal. Para ello, se registró la corriente iónica del canal mediante la técnica de *patch clamp* en configuración *whole-cell*.

Primero se comparó la actividad eléctrica de células que expresaban el canal Kv2.1 silvestre respecto a células HEK 293 LTV sin transfección (células “Mock”), con el objetivo de caracterizar la corriente basal endógena del cultivo celular utilizado. Tal como se observa en la Figura 7, estas células muestran una pequeña corriente de potasio debida a los canales de potasio nativos de las células HEK. Sin embargo, la intensidad de corriente mostrada por las células es despreciable frente a la magnitud registrada en las células transfectadas con el canal silvestre.

Posteriormente, se analizaron las propiedades del canal modificado Kv2.1-Halo, utilizando el mismo protocolo. Tal y como se observa en la Figura 7 las corrientes registradas en células que expresan Kv2.1-WT y Kv2.1-Halo presentan un aspecto, amplitud y cinética similares.

Para el análisis cuantitativo, se utilizaron los datos de las intensidades registradas a los 100 ms de cada pulso de voltaje. Con dichos datos se construyó la representación I-V (intensidad de corriente vs voltaje). Con el fin de corregir la variabilidad derivada del tamaño celular y los niveles de expresión, los datos se normalizaron utilizando la capacitancia de membrana (C_{slow}), obteniendo así la densidad de corriente (J , pA/pF). La densidad de corriente (J) se calcula como la corriente que atraviesa una membrana dividida entre la capacitancia de la membrana, un valor que viene determinado por el tamaño de la célula. Esta estandarización permite comparar de forma más óptima células con distinto tamaño.

A partir de estos datos, se construyeron las curvas J-V (densidad de corriente frente voltaje) (Figura 7). Los resultados muestran que tanto Kv2.1-WT como Kv2.1-Halo presentan corrientes significativamente superiores a las células sin transfectar y a la vez, muy similares entre sí, lo que indica que la inserción del HaloTag no altera la corriente conducida por el canal.

Concretamente, presentan una densidad de corriente máxima de $221.1 \text{ pA/pF} \pm 19.6$ las células Kv2.1-WT y $277.9 \text{ pA/pF} \pm 25.5$ las células Kv2.1-Halo.

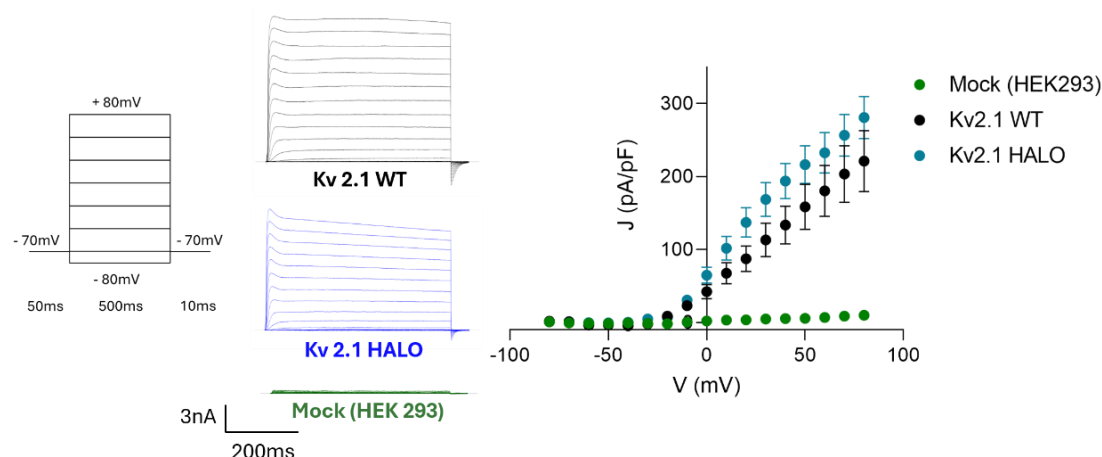


Figura 7: Análisis corrientes Kv2.1-WT frente Kv2.1.Halo. Izquierda: registros representativos de cada una de las construcciones analizadas: “Mock” células HEK 293 LTV sin transfectar $n=5$, Kv2.1-WT $n=13$ y Kv2.1-Halo $n=10$. Derecha: relación J (densidad de corriente pA/pF) frente al voltaje (mV) para Mock, Kv2.1-WT y Kv2.1-Halo.

Además del protocolo J-V se aplicaron otros protocolos específicos de activación e inactivación. Para el análisis de la activación, se utilizó un protocolo basado en pulsos despolarizantes de 500 ms seguidos de un pulso de -30 mV durante 250 ms, lo que genera las denominadas corrientes de cola (*tail currents*) (Figura 8). Estas corrientes se producen tras un cambio rápido de voltaje hacia potenciales de repolarización y revelan la cinética de cierre del canal. Dado que la amplitud depende exclusivamente del número de canales que se encontraban abiertos en ese instante, su medición permite cuantificar el grado de activación. A partir de esas corrientes, se extrajeron los datos necesarios para la construcción de la curva $G/G_{\max}$ tal y como se explicó en la sección de Materiales y Métodos.

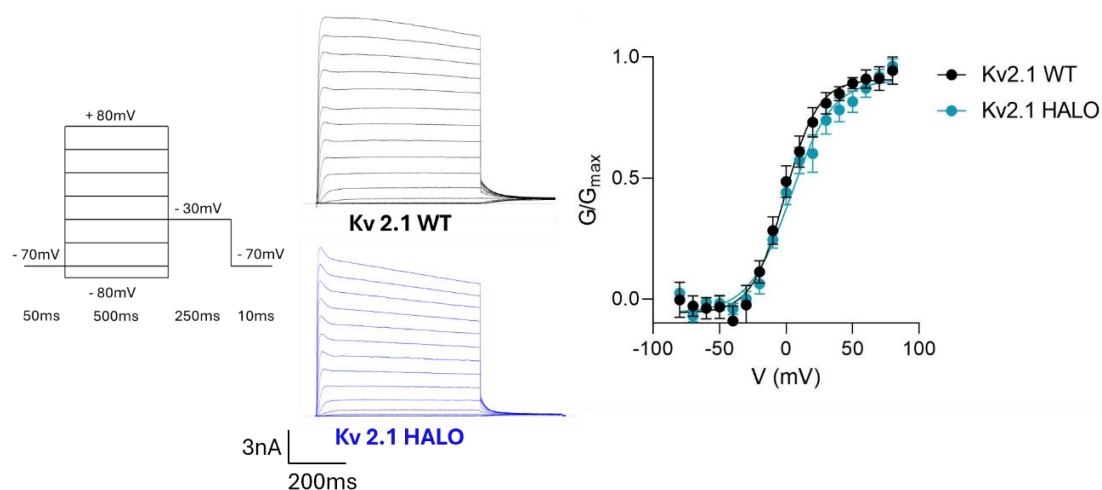


Figura 8: Curva de activación de Kv2.1-WT y Kv2.1-Halo. Izquierda: Imágenes representativas de registros de activación para cada una de las construcciones analizadas. Kv2.1 silvestre $n=10$ y Kv2.1 modificado con la inserción de la etiqueta HaloTag $n=10$. Derecha: curva G/G_{max} para Kv2.1-WT y Kv2.1-Halo.

Los registros no revelaron un cambio en las propiedades de activación del canal obteniéndose unos voltajes de activación media de $V_{0.5}$ Kv2.1-WT= -0.96 ± 0.08 y $V_{0.5}$ Kv2.1-Halo= 3.55 ± 0.09 . Tampoco se experimentó un cambio significativo en la pendiente: k Kv2.1-WT=12.48 y k Kv2.1-Halo= 15.86.

El canal modificado con el HaloTag no alteró significativamente la dependencia con el voltaje en la curva de activación respecto al WT. Se registró un leve cambio en el G/G_{max} hacia potenciales más despolarizantes con una diferencia de aproximada de 4 mV.

En cuanto al protocolo de inactivación, se aplicaron pulsos de voltaje desde -100 mV hasta +40 mV seguidos de un pulso de test de 250 ms a +80 mV (Figura 9). Este pulso final altamente despolarizante activa todos los canales disponibles, de forma que la corriente registrada se corresponde con la fracción de canales no inactivados.

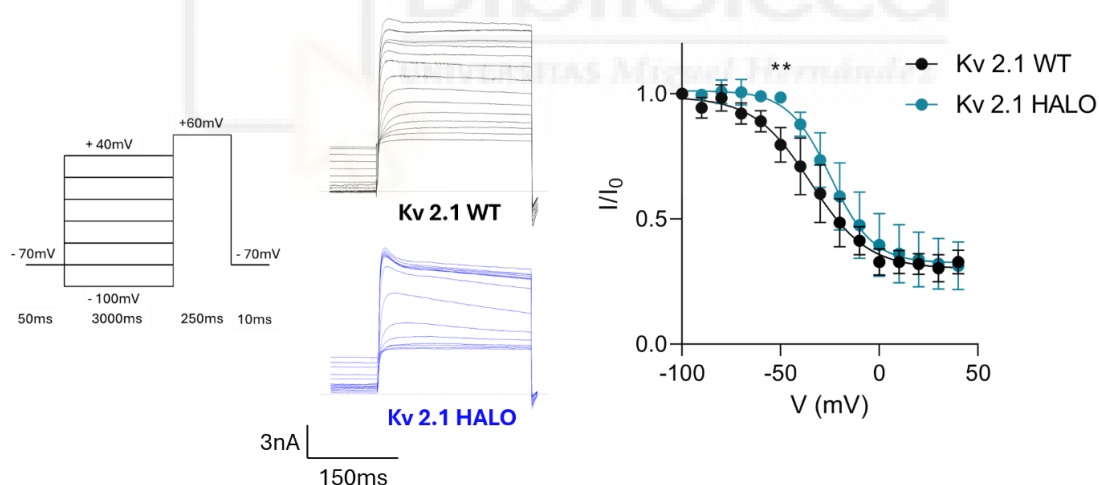


Figura 9: Curva de inactivación del canal Kv2.1-WT y Kv2.1-Halo. Izquierda: Imágenes representativas de registros de inactivación para cada una de las construcciones analizadas. Kv2.1 silvestre $n=6$ y Kv2.1 modificado con la inserción de la etiqueta HaloTag $n=6$. Representación adicional del protocolo utilizado. Izquierda: Curva de inactivación I/I_0 para Kv2.1-WT y Kv2.1-Halo con análisis estadístico unpaired t-test y significancia en el step 6 (**) $p < 0.01$.

Los datos de intensidad de corriente se obtuvieron de la parte final del registro, la fracción correspondiente al pulso test final de +80 mV. A su vez, la curva I/I_0 se obtuvo normalizando la

corriente registrada en cada uno de los pulsos respecto a la corriente máxima obtenida en el pulso inicial (Figura 9).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: $V_{0.5}$ Kv2.1-WT = $-34.8 \text{ mV} \pm 0.09$, k Kv2.1-WT = -14.4 y $V_{0.5}$ Kv2.1-Halo = $-28.9 \text{ mV} \pm 0.07$, k Kv2.1-Halo = -10.8 .

Los datos de inactivación muestran un leve desplazamiento hacia la derecha en la curva de inactivación del Kv2.1-Halo respecto al canal WT. La diferencia de los voltajes de activación $V_{0.5}$ obtenidos de la curva de inactivación es de 5 mV, dicha diferencia puede deberse a errores experimentales dado que únicamente se ha obtenido 1 punto como estadísticamente significativo, el del step -50 mV con significancia $p < 0.01$.

En conjunto, los resultados indican que la inserción del dominio HaloTag en el bucle S1-S2 del canal Kv2.1 no altera significativamente sus propiedades electrofisiológicas principales, incluyendo la amplitud de corriente, la activación dependiente de voltaje y la inactivación, validando así su uso para estudios posteriores.

4.2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y TRÁFICO INTRACELULAR DEL CANAL

Tras la validación de la funcionalidad electrofisiológica del canal, se evaluó la idoneidad del tag para monitorizar el nivel de expresión proteico y distribución subcelular del canal Kv2.1. Para ello, se utilizó la tecnología HaloTag combinando el uso de 2 ligandos: un ligando impermeable (Alexa Fluor 660) que permite cuantificar exclusivamente la fracción del canal en la superficie externa de la membrana, y un ligando permeable (Janelia Fluor 549), que atraviesa la membrana celular permitiendo el marcaje del canal localizado en el compartimento intracelular. Previamente a la adquisición de las imágenes mediante microscopía confocal se incubaron las células con una sonda de membrana con el fin de delimitar la membrana celular y facilitar el análisis de la colocalización.

Con el objetivo de estudiar la dinámica temporal de la expresión y evaluar posibles cambios en el tráfico del canal (externalización/internalización), los ligandos se evaluaron en 3 condiciones experimentales de marcaje: un marcaje y medida 24 h post-siembra, otra 48 h post-siembra y una condición “seguimiento durante 24h”. Esta última consistió en realizar la incubación a 24 h post-siembra igual que en la primera condición, pero examinando las imágenes 24 h más tarde. El objetivo fue monitorizar y evaluar la distribución a lo largo de un día de la fracción de canales expresados y etiquetados en un primer momento (Figura 10). Como imagen representativa del control negativo Kv2.1-WT, se muestra una imagen a 24 h post incubación. Esta condición

coincide con el pico máximo de expresión del canal y es la única incluida dado que no observó marcaje inespecífico en ninguna de las condiciones estudiadas.

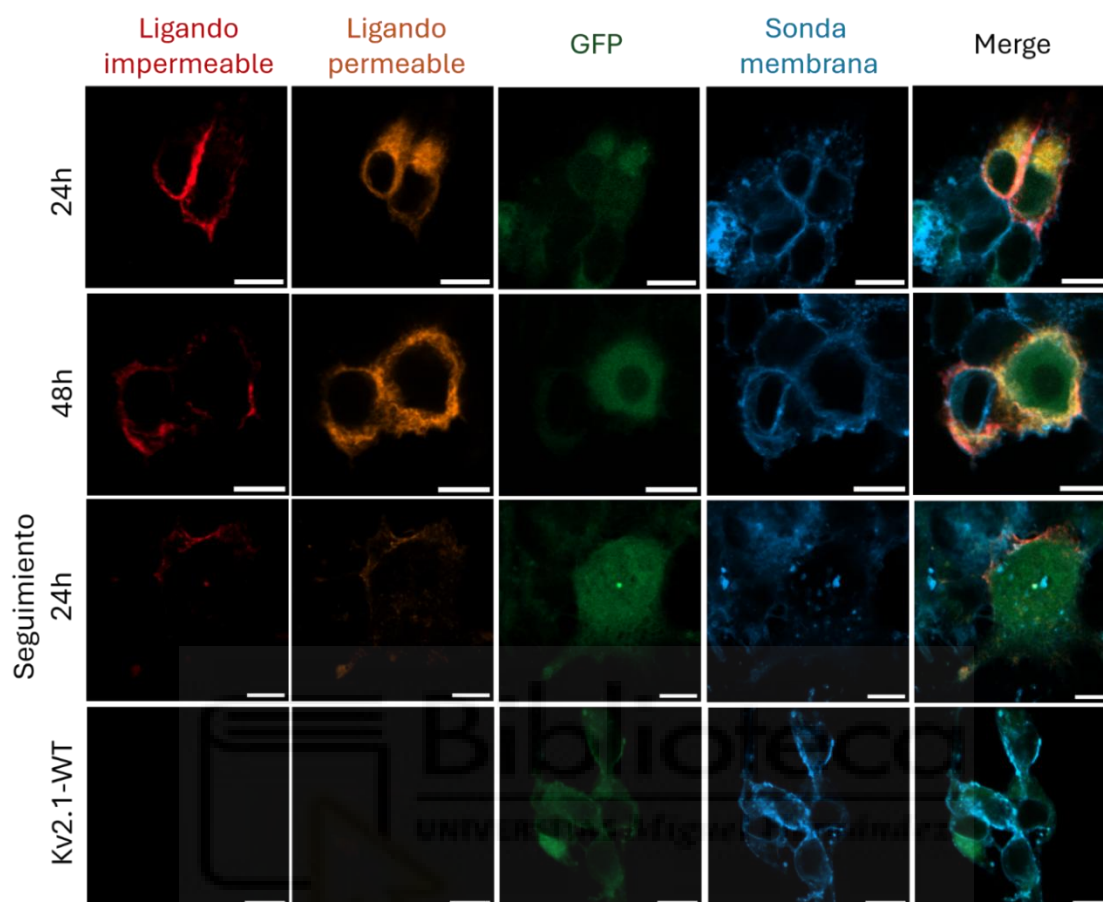


Figura 10: Visualización representativa de la expresión y distribución subcelular del canal mediante microscopía confocal. El panel muestra imágenes de células transfectadas en tres condiciones temporales: 24 h post-siembra, 48 h post-siembra, marcaje a 24h con seguimiento de los ligandos y control negativo Kv2.1-WT 24 h post-siembra. En las columnas se indican los distintos canales: el ligando impermeable rojo revela la fracción del canal insertada en la membrana plasmática; el ligando permeable naranja muestra la expresión del canal en el compartimento intracelular; GFP (verde) confirma la transfección; y la sonda de membrana (azul) marca la membrana celular. Finalmente, la columna Merge representa la superposición de los canales anteriormente descritos. Imagen obtenida a aumento 64x, barras de escala = 10 μ m.

Para el análisis de las imágenes se generó una máscara a partir de la señal del canal de la GFP con el propósito de restringir el análisis y cuantificación de la señal exclusivamente a las células transfectadas. Sobre esta máscara se evaluó en primer lugar el % del área ocupada por cada uno de los ligandos (Figura 11).

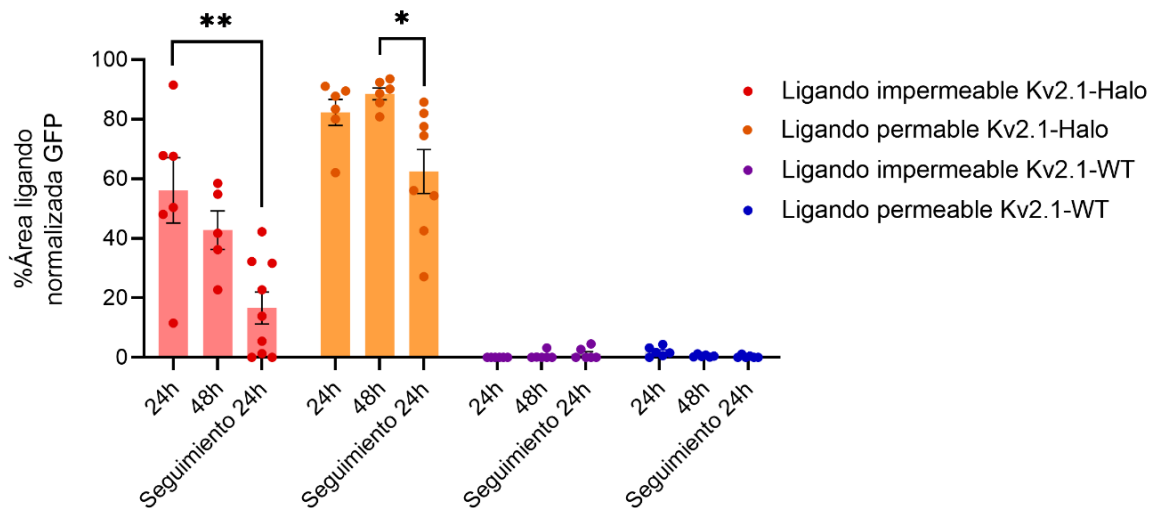


Figura 11: Dinámica temporal del área de expresión del canal. Se representa la cuantificación del porcentaje de área ocupada por los ligandos de la etiqueta HaloTag respecto al área total de las células transfectadas. Las barras rojas representan el área del canal marcada con el ligando impermeable Alexa Fluor 660 (correspondiente a la fracción extracelular), las naranjas indican la correspondiente al ligando permeable Janelia Fluor 549 (relativo a la fracción intracelular), y las lilas y azules al marcaje del canal Kv2.1-WT utilizado como control negativo con el ligando impermeable y permeable respectivamente. Por cada ligando ensayado se evalúan tres condiciones de medida: a 24h, 48h, y marcaje a 24 h con seguimiento. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar media (SEM). $N=3$ y $n=6$ para todos excepto Seguimiento 24 h ligando impermeable Kv2.1-Halo ($n=9$), Seguimiento 24 h con ligando permeable Kv2.1-Halo ($n=8$). Se realizó un análisis one-way ANOVA para comparar individualmente cómo afecta la condición de medida temporal en cada ligando. Se obtuvieron diferencias significativas dentro del grupo ligando impermeable Kv2.1-Halo entre 24 h y Seguimiento 24 h ($p<0.01$ (**)) y en el grupo ligando permeable Kv2.1-Halo entre 48 h y Seguimiento 24 h ($p<0.05$ (*)). Además, se realizó un análisis two-way ANOVA donde se evaluó la influencia de los parámetros tiempo de medida y ligando utilizado sobre el canal Kv2.1- Halo. Se obtuvieron unos valores de p valor <0.001 (***) para el tiempo y p valor <0.0001 (****) para el ligando.

Comparando el área ocupada por ambos ligandos, la del ligando impermeable fue significativamente inferior a la del permeable en todas las condiciones, resultado esperado dado que la localización del primero está acotada a la superficie celular. Este hecho queda corroborado en las imágenes, donde además se aprecia que el ligando permeable no ocupa exclusivamente la región intracelular, sino que también posee la capacidad de unirse a la fracción del canal extracelular que no ha sido ocupada previamente por el ligando impermeable (Figura 12).

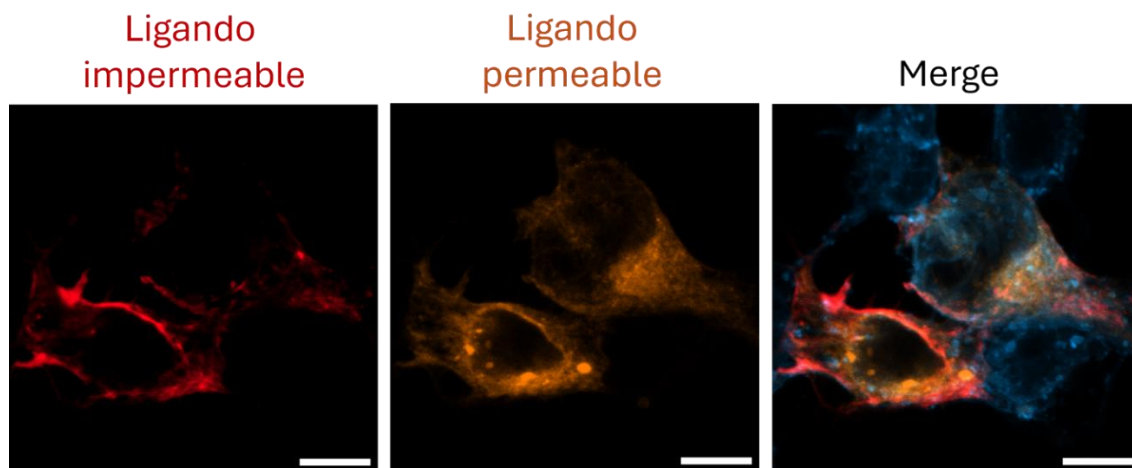


Figura 12: Visualización mediante microscopía confocal del marcaje de Kv2.1-Halo a 24 h post-siembra. La distribución del ligando impermeable Alexa Fluor (rojo) queda restringida a la membrana plasmática externa, mientras que el ligando permeable Janelia Fluor (naranja) es capaz de marcar el canal tanto en el compartimento citoplásmico como en la superficie celular. Finalmente, se muestra la superposición de ambos fluoróforos y una sonda específica de membrana (azul). Las células seleccionadas expresaban el gen reportero GFP a pesar de que no se muestre dicho canal. Imagen tomada a 24h y obtenida a aumento 64x, barras de escala = 10 μ m.

Comenzando por el análisis del ligando impermeable, el máximo porcentaje de área ocupada se registró en la condición a 24h post-siembra, con un valor de 56,10%. Este descendió a un 42,77% a las 48 h post-siembra posiblemente como resultado del decaimiento propio de la expresión por transfección transitoria. Sin embargo, se produjo una caída aún más pronunciada a las 24 h con seguimiento, alcanzando unos valores de 16,59% (disminución de 39,51% respecto al primer día). En el último caso, la disminución del área ocupada se puede deber posiblemente a degradación o internalización del canal.

En cuanto al ligando permeable o intracelular, el área de marcaje obtenida fue mucho más amplia, con unos valores de 82,26% a 24 h post-siembra, 88,50% a las 48 h post-siembra y 62,44% en la condición de marcaje a 24 h con seguimiento.

El ligero incremento registrado de 24 h a 48 h post-siembra (exactamente de un 6,24%) puede atribuirse a un margen de error experimental inherente al tamaño de la muestra ($n=6$) y a la variabilidad de los niveles de expresión del plásmido. No obstante, la tendencia general se mantiene, en la condición de marcaje a 24 h con seguimiento vuelve a producirse una caída significativa del % de área hasta un 62,44%. Este hecho confirma que el canal localizado en el interior celular también experimenta cambios en su expresión, tales como procesos de

degradación o ciclos de externalización a membrana e internalización. En cualquier caso, estos resultados reflejan un tráfico constante del canal.

Además, la comparación de ambos ligandos con los controles Kv2.1-WT en todas las condiciones demuestra que el marcaje del sistema HaloTag es completamente específico. En conclusión, la señal fue significativa tanto para los diferentes ligandos como para los distintos tiempos de incubación.

Para completar los datos de evaluación del canal se midió la intensidad de la señal mediante el parámetro *Integrated Density*. Este valor es directamente proporcional a la cantidad total del fluoróforo y por ende, la población de canales iónicos presente en el área seleccionada (Figura 13). Dado que las áreas registradas con el control Kv2.1-WT eran nulas o prácticamente inexistentes (Figura 11), se excluyeron del análisis de la densidad integrada. En la mayoría de los casos, al analizar las imágenes de Kv2.1-WT se obtenía “NaN” (*Not a number*) debido a la ausencia de señal.

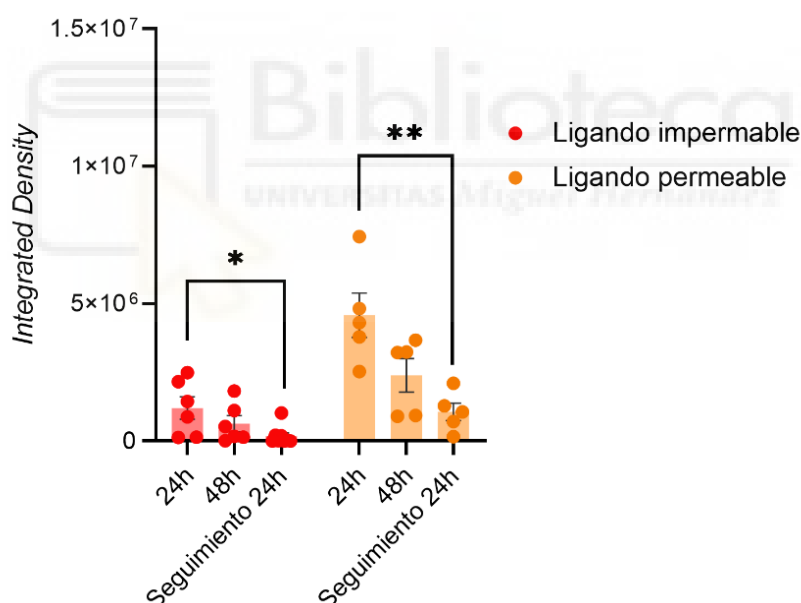


Figura 13: Dinámica temporal de la densidad de expresión del canal. Esta figura refleja la cuantificación de la densidad integrada (*Integrated Density*) normalizada por el área ocupada de cada ligando. Las barras rojas indican los niveles de expresión de la fracción del canal marcada con el ligando impermeable Alexa Fluor 660 (correspondiente a la fracción extracelular), mientras que las barras naranjas corresponden a la parte marcada con el ligando permeable Janelia Fluor 549 (relativo a la fracción intracelular). Se evalúan tres condiciones de medida: a las 24h, 48h, y marcaje a 24 h con seguimiento. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar media (SEM). $N=3$ y $n=6$ para todas las muestras ensayadas con ligando impermeable excepto seguimiento 24 h $n=8$ y para el ligando permeable todos $n=5$. Se realizó un análisis one-way ANOVA para comparar individualmente cómo afecta la condición de medida temporal en cada

ligando. Se obtuvo una diferencia significativa dentro del grupo Ligando impermeable entre 24 h y Seguimiento 24h (p valor <0.05 ()) y en el grupo ligando permeable entre Kv2.1-Halo a 24 h y Seguimiento 24h ($p < 0.01$ (**)). Además, se realizó un análisis two-way ANOVA donde se evaluó la influencia de los parámetros tiempo de medida y ligando utilizado sobre el canal Kv2.1- Halo. Se obtuvieron unos valores de p valor <0.001 (***) para el tiempo y p valor < 0.001 (***) para el ligando utilizado.*

Al comparar la señal obtenida por ambos ligandos, la intensidad de la señal registrada del impermeable es de nuevo menor que la del permeable. En este caso, esa diferencia obtenida está directamente correlacionada con la concentración de canales iónicos, que es inferior en el compartimento extracelular.

En cuanto a la evolución temporal, ambos ligandos presentaron un comportamiento y tendencia idéntica: la intensidad de la señal decae progresivamente con el tiempo, siendo significativa en el paso de 24 h a Seguimiento con 24 h para ambos ligandos. De nuevo, los ensayos de la Densidad Integrada revelaron significancia no solo para las distintas condiciones temporales evaluadas, sino también entre los distintos ligandos utilizados.

Los valores máximos se obtuvieron a las 24 h ($1,2 \times 10^6$ para el ligando impermeable y $6,1 \times 10^6$ para el permeable), a 48 h se observó una caída en la intensidad explicada por la pérdida paulatina del nivel de expresión característica de los modelos de expresión transitoria ($0,6 \times 10^6$ y $3,3 \times 10^6$ respectivamente). Y por último, las intensidades más bajas se registraron en la condición de marcaje a 24 h con seguimiento ($0,2 \times 10^6$ para el ligando impermeable y $1,8 \times 10^6$ para el ligando permeable). Esta pérdida drástica apunta a que una gran proporción del canal que fue sintetizado y etiquetado a las 24 horas fue degradado o eliminado de la célula durante las 24 horas posteriores.

5. DISCUSIÓN

Las encefalopatías epilépticas y del desarrollo (EED) son trastornos neurológicos graves que pueden estar asociadas a mutaciones en el gen *KCNB1*. Este gen codifica para un canal de potasio sensible al voltaje, el canal Kv2.1, y cuyas mutaciones constituyen un espectro clínico severo caracterizado por discapacidad intelectual, dificultad y retraso en el aprendizaje y crisis epilépticas refractarias de inicio temprano (1,2,3). A pesar de su gravedad, el carácter “raro” de estas variantes genéticas ha hecho que su investigación quede en un segundo plano, limitando así la comprensión de los mecanismos patogénicos responsables.

Asimismo, dado que la heterogeneidad de estas mutaciones no solo altera la conductancia iónica, sino que puede comprometer la proteostasis al provocar, por ejemplo, la retención del

canal en orgánulos como el retículo endoplasmático (47), resulta crucial el desarrollo de una herramienta molecular que permita su estudio. Concretamente, surge la necesidad de establecer una estrategia que permita monitorizar el tráfico intracelular en tiempo real y que permita comparar la dinámica del canal silvestre (WT) con el comportamiento insólito de variantes mutantes.

Este Trabajo de Fin de Grado ha abordado con éxito esta problemática al diseñar y validar un vector de expresión plasmídica del canal Kv2.1 modificado para acoplar la inserción de la etiqueta HaloTag. Dicha etiqueta se insertó en la posición G221 y se evaluó la posibilidad de que el HaloTag alterara las propiedades biofísicas del canal.

La caracterización electrofisiológica mediante el uso de la técnica *patch clamp* en configuración *whole-cell* reveló que el canal conservaba su funcionalidad, manteniendo la densidad de corriente conducida y presentando un comportamiento cinético muy similar al del canal WT sin modificar. Para ello se obtuvieron curvas de activación e inactivación, donde los valores se acercan a los descritos para el canal nativo (22,24). No obstante, cabe destacar la existencia de un único punto significativo en la curva de inactivación I/I_0 , cuya desviación puede deberse a errores experimentales del ensayo, debería comprobarse aumentando el tamaño muestral.

Una vez demostrada la equivalencia biofísica, se procedió a evaluar la distribución subcelular y tráfico del canal aprovechando la unión irreversible producida entre el HaloTag y sus ligandos fluoróforos. Dichos ensayos de microscopía confocal revelan que el área ocupada por el canal en posición extracelular (detectada por el ligando impermeable Alexa Fluor 660) es inferior a la señal obtenida en el compartimento intracelular (medida por el ligando permeable Janelia Fluor 549). Estos resultados concuerdan con la compartimentalización celular, donde la superficie de la membrana es notoriamente más reducida que el volumen ocupado por el citoplasma y orgánulos.

En cuanto al análisis de la dinámica temporal, los cambios en la intensidad de la señal fluorescente revelaron una disminución progresiva de los niveles de expresión del canal a las 48 h post-siembra en comparación con los de 24h. Este fenómeno es predecible dado que se ha llevado a cabo una transfección transitoria donde los niveles del plásmido decaen gradualmente tras alcanzar un pico a 48 h post-transfección, que coincide justo con el momento de la siembra (48).

No obstante, los principales resultados sobre la estabilidad y flujo del canal son los obtenidos en la condición de marcaje con seguimiento durante 24h. En este escenario, tanto la señal como el

área ocupada por el ligando impermeable y permeable experimentó un descenso abrupto. Adicionalmente, se pudo observar microscópicamente que se producía una reorganización local de la señal intracelular concentrándose en las proximidades de la membrana plasmática. Fisiológicamente, este comportamiento concuerda con las elevadas tasas de recambio entre el canal Kv2.1 y el interior celular. Como se comentó anteriormente en la introducción, el canal está expuesto a ciclos continuos de endocitosis, tráfico vesicular y reciclaje hacia la membrana, todo ello con el objetivo de mantener el estado de equilibrio de la célula. El posible aumento en la periferia de la membrana sugiere que los canales intracelulares restantes (los que no experimentaron una degradación lisosomal) sufrieron un redireccionamiento y fueron movilizados hacia la membrana plasmática donde quedaron almacenados en vesículas listos para su exocitosis.

En conclusión, los resultados experimentales demuestran que la inserción del HaloTag en la posición G221 es estructural y funcionalmente tolerada por el canal Kv2.1. Dicha modificación no altera la arquitectura molecular del poro, ni el dominio sensor de voltaje, más tampoco impide la accesibilidad de la enzima HaloTag a sus ligandos. Por lo tanto, esta construcción se consolida como un modelo robusto, preciso y apto para ser utilizado en futuros experimentos destinados a dilucidar tanto los defectos de tráfico como la fisiopatología de las mutaciones asociadas al gen *KCNB1*, aproximándonos a la medicina personalizada.

6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES FUTURAS

En este trabajo se ha diseñado y validado de forma óptima un vector plasmídico del canal Kv2.1 modificado para la incorporación de la etiqueta HaloTag en la posición G221. La caracterización biofísica mediante ensayos *patch-clamp* demostró que esta modificación no altera las propiedades electrofisiológicas propias del canal, ya que el canal modificado mantuvo la densidad de corriente y propiedades de activación e inactivación muy similares a las del canal silvestre (WT). Asimismo, la realización de ensayos de microscopía confocal revelaron la funcionalidad y accesibilidad de la etiqueta HaloTag, denotando su especificidad frente al control Kv2.1-WT.

El uso conjunto de ligandos permeables e impermeables permitió caracterizar con cierta resolución espacial y temporal la fracción del canal posicionada en la superficie celular frente a la restante en el compartimento intracelular. Dichos ensayos microscópicos permitieron no solo evaluar la eliminación progresiva del canal a lo largo de incubaciones, sino la identificación de procesos de recambio e internalización.

En definitiva, este constructo se consolida como una herramienta válida para el análisis del tráfico intracelular y homeostasis del canal Kv2.1, con la posibilidad de extrapolar su ensayo a otros canales iónicos donde también existan dificultades de tráfico.

A su vez, la validación de este modelo permite dar paso a nuevas líneas de investigación destinadas a ahondar en la fisiopatología de las canalopatías asociadas a *KCNB1*. Dado que la tecnología HaloTag es compatible con la viabilidad celular y también es muy estable, el próximo paso consistirá en la realización de ensayos de *time-lapse* y videomicroscopía en células vivas, lo que permitirá monitorizar la cinética de internalización, endocitosis y tráfico en tiempo real con una resolución temporal muy superior. Además, el siguiente paso crucial en la caracterización de estas encefalopatías consistirá en replicar la estrategia y ensayos para los mutantes *KCNB1*. Este método resultará especialmente interesante para los mutantes que muestran ausencia de corriente en los ensayos *patch-clamp* ya que permitirá demostrar si los defectos radican en la pérdida de conductancia por motivos de fallos estructurales o porque quedan retenidos en compartimentos intracelulares.

Dando un paso más allá, el canal Kv2.1 no está únicamente involucrado en procesos eléctricos al permitir la conductancia en membrana, también está implicado en actividades fisiológicas no iónicas como la interacción con el citoesqueleto de actina o la plasticidad sináptica. En este contexto, será necesario evaluar posibles efectos estéricos de la etiqueta HaloTag en dichas actividades celulares, comprobando la actividad del constructo en cultivos más complejos como neuronas corticales o piramidales. Estos ensayos permitirán evaluar si la etiqueta HaloTag interfiere con las funciones no conductoras del canal.

Asimismo, considerando que el canal Kv2.1 no se encuentra de forma aislada en la célula, sino que en el citoplasma puede colocalizar e interactuar con otras proteínas auxiliares como AMIGO y KvS (49), otro planteamiento de interés consistiría en el estudio del tráfico del canal en condiciones de co-expresión. Este enfoque permitiría analizar no solo el tránsito de Kv2.1 junto a sus proteínas auxiliares, sino también monitorizar la capacidad de las chaperonas moleculares de rescatar los mutantes atrapados en el interior celular y restaurar su tráfico a membrana.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kahrom A, Soo C, Arifin N, McGonigal A. Approach to epilepsy: overview and update of diagnosis and management. Internal Medicine Journal. marzo de 2026;56(3):354-63. doi:10.1111/imj.70326
2. Guerrini R, Conti V. Epileptic encephalopathies and progressive neurodegeneration. Revue Neurologique. mayo de 2024;180(5):363-7. doi:10.1016/j.neurol.2024.03.004

3. Posar A, Visconti P. Continuous Spike–Waves during Slow Sleep Today: An Update. *Children*. 28 de enero de 2024;11(2):169. doi:10.3390/children11020169
4. Castro-Villablanca F. Actualización en la clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos. *Revista Médica Clínica Las Condes*. enero de 2026;37(1):8-16. doi:10.1016/j.rmcl.2026.02.001
5. Thiffault I, Specá DJ, Austin DC, Cobb MM, Eum KS, Safina NP, et al. A novel epileptic encephalopathy mutation in *KCNB1* disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. *Journal of General Physiology*. 1 de noviembre de 2015;146(5):399-410. doi:10.1085/jgp.201511444
6. Hu C, Liu D, Luo T, Wang Y, Liu Z. Phenotypic spectrum and long-term outcome of children with genetic early-infantile-onset developmental and epileptic encephalopathy. *Epileptic Disorders*. abril de 2022;24(2):343-52. doi:10.1684/epd.2021.1394
7. Kim JB. Channelopathies. *Korean J Pediatr*. 2014;57(1):1. doi:10.3345/kjp.2014.57.1.1
8. Dai G. Signaling by Ion Channels: Pathways, Dynamics and Channelopathies.
9. Kaczmarek LK. Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci*. 1 de octubre de 2006;7(10):761-71. doi:10.1038/nrn1988
10. Vignali S, Leiss V, Karl R, Hofmann F, Welling A. Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *The Journal of Physiology*. mayo de 2006;572(3):691-706. doi:10.1113/jphysiol.2005.102368
11. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA, Veale EL, Striessnig J, Kelly E, et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: Ion channels. *British J Pharmacology*. octubre de 2021;178(S1). doi:10.1111/bph.15539
12. Chebib M, Johnston GAR. GABA-Activated Ligand Gated Ion Channels: Medicinal Chemistry and Molecular Biology. *J Med Chem*. 1 de abril de 2000;43(8):1427-47. doi:10.1021/jm9904349
13. Barki M, Xue H. GABRB2, a key player in neuropsychiatric disorders and beyond. *Gene*. enero de 2022;809:146021. doi:10.1016/j.gene.2021.146021
14. Chahine M, Ziane R, Vijayaragavan K, Okamura Y. Regulation of Nav channels in sensory neurons. *Trends in Pharmacological Sciences*. octubre de 2005;26(10):496-502. doi:10.1016/j.tips.2005.08.002
15. Xie C, Kessi M, Yin F, Peng J. Roles of KCNA2 in Neurological Diseases: from Physiology to Pathology. *Mol Neurobiol*. noviembre de 2024;61(11):8491-517. doi:10.1007/s12035-024-04120-9
16. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Letters*. 27 de noviembre de 2003;555(1):62-5. doi:10.1016/S0014-5793(03)01104-9
17. Sansom MSP, Shrivastava IH, Bright JN, Tate J, Capener CE, Biggin PC. Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. octubre de 2002;1565(2):294-307. doi:10.1016/S0005-2736(02)00576-X
18. Kshatri AS, Gonzalez-Hernandez A, Giraldez T. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca²⁺ Activated Potassium Channels in the Nervous System. *Front Mol Neurosci*. 30 de julio de 2018;11:258. doi:10.3389/fnmol.2018.00258
19. Enyedi P, Cziráj G. Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiological Reviews*. abril de 2010;90(2):559-605. doi:10.1152/physrev.00029.2009
20. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*. enero de 2010;90(1):291-366. doi:10.1152/physrev.00021.2009

21. Smith DO, Rosenheimer JL, Kalil RE. Delayed Rectifier and A-Type Potassium Channels Associated with Kv 2.1 and Kv 4.3 Expression in Embryonic Rat Neural Progenitor Cells. McCabe B, editor. PLoS ONE. 13 de febrero de 2008;3(2):e1604. doi:10.1371/journal.pone.0001604
22. Singh V, Auerbach DS. Neurocardiac pathologies associated with potassium channelopathies. Epilepsia. septiembre de 2024;65(9):2537-52. doi:10.1111/epi.18066
23. Lacroix G, Bhat S, Shafia Z, Blunck R. KCNG4 Genetic Variant Linked to Migraine Prevents Expression of KCNB1. IJMS. 17 de agosto de 2024;25(16):8960. doi:10.3390/ijms25168960
24. Fernández-Mariño AI, Tan XF, Bae C, Huffer K, Jiang J, Swartz KJ. Inactivation of the Kv2.1 channel through electromechanical coupling. Nature. 12 de octubre de 2023;622(7982):410-7. doi:10.1038/s41586-023-06582-8
25. Jędrychowska J, Korzh V. Kv2.1 voltage-gated potassium channels in developmental perspective. Developmental Dynamics. diciembre de 2019;248(12):1180-94. doi:10.1002/dvdy.114
26. Saitsu H, Akita T, Tohyama J, Goldberg-Stern H, Kobayashi Y, Cohen R, et al. De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. Sci Rep. 19 de octubre de 2015;5(1):15199. doi:10.1038/srep15199
27. Gao K, Lin Z, Wen S, Jiang Y. Potassium channels and epilepsy. Acta Neuro Scandinavica. diciembre de 2022;146(6):699-707. doi:10.1111/ane.13695
28. Torkamani A, Bersell K, Jorge BS, Bjork RL, Friedman JR, Bloss CS, et al. De novo *KCNB1* mutations in epileptic encephalopathy. Annals of Neurology. octubre de 2014;76(4):529-40. doi:10.1002/ana.24263
29. Kang SK, Vanoye CG, Misra SN, Echevarria DM, Calhoun JD, O'Connor JB, et al. Spectrum of Kv 2.1 Dysfunction in *KCNB1* -Associated Neurodevelopmental Disorders. Annals of Neurology. diciembre de 2019;86(6):899-912. doi:10.1002/ana.25607
30. Manville RW, Block SD, Illeck CL, Kottmeier J, Sidlow R, Abbott GW. A novel autism-associated KCNB1 mutation dramatically slows Kv2.1 potassium channel activation, deactivation and inactivation. Front Cell Neurosci. 29 de julio de 2024;18:1438101. doi:10.3389/fncel.2024.1438101
31. Thiffault I, Specá DJ, Austin DC, Cobb MM, Eum KS, Safina NP, et al. A novel epileptic encephalopathy mutation in *KCNB1* disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. Journal of General Physiology. 1 de noviembre de 2015;146(5):399-410. doi:10.1085/jgp.201511444
32. Fernández-Mariño AI, Tan XF, Bae C, Huffer K, Jiang J, Swartz KJ. Inactivation of the Kv2.1 channel through electromechanical coupling. Nature. 12 de octubre de 2023;622(7982):410-7. doi:10.1038/s41586-023-06582-8
33. Kang SK, Vanoye CG, Misra SN, Echevarria DM, Calhoun JD, O'Connor JB, et al. Spectrum of Kv 2.1 Dysfunction in *KCNB1* -Associated Neurodevelopmental Disorders. Annals of Neurology. diciembre de 2019;86(6):899-912. doi:10.1002/ana.25607
34. Nguyen NH, Brodsky JL. The cellular pathways that maintain the quality control and transport of diverse potassium channels. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. marzo de 2023;1866(1):194908. doi:10.1016/j.bbagrm.2023.194908
35. Deutsch E, Weigel AV, Akin EJ, Fox P, Hansen G, Haberkorn CJ, et al. Kv2.1 cell surface clusters are insertion platforms for ion channel delivery to the plasma membrane. Martin TFJ, editor. MBoC. agosto de 2012;23(15):2917-29. doi:10.1091/mbc.e12-01-0047
36. Bortolami A, Yu W, Forzisi E, Ercan K, Kadakia R, Murugan M, et al. Integrin-KCNB1 potassium channel complexes regulate neocortical neuronal development and are implicated in epilepsy. Cell Death Differ. marzo de 2023;30(3):687-701. doi:10.1038/s41418-022-01072-2

37. Leung Y, Huang C, Chao C, Lu D, Kuo C, Cheng T, et al. Voltage-gated K⁺ channels play a role in cAMP-stimulated neuritogenesis in mouse neuroblastoma N2A cells. *Journal Cellular Physiology*. abril de 2011;226(4):1090-8. doi:10.1002/jcp.22430
38. Bortolami A, Sesti F. Ion channels in neurodevelopment: lessons from the Integrin-KCNB1 channel complex. *Neural Regeneration Research*. noviembre de 2023;18(11):2365-9. doi:10.4103/1673-5374.371347
39. Misonou H, Mohapatra DP, Trimmer JS. Kv2.1: A Voltage-Gated K⁺ Channel Critical to Dynamic Control of Neuronal Excitability. *NeuroToxicology*. octubre de 2005;26(5):743-52. doi:10.1016/j.neuro.2005.02.003
40. O'Connell KMS, Rolig AS, Whitesell JD, Tamkun MM. Kv2.1 Potassium Channels Are Retained within Dynamic Cell Surface Microdomains That Are Defined by a Perimeter Fence. *J Neurosci*. 20 de septiembre de 2006;26(38):9609-18. doi:10.1523/JNEUROSCI.1825-06.2006
41. Jensen CS, Watanabe S, Stas JI, Klaphaak J, Yamane A, Schmitt N, et al. Trafficking of Kv2.1 Channels to the Axon Initial Segment by a Novel Nonconventional Secretory Pathway. *J Neurosci*. 29 de noviembre de 2017;37(48):11523-36. doi:10.1523/JNEUROSCI.3510-16.2017
42. Muennich EAL, Fyffe REW. Focal aggregation of voltage-gated, Kv2.1 subunit-containing, potassium channels at synaptic sites in rat spinal motoneurons. *The Journal of Physiology*. febrero de 2004;554(3):673-85. doi:10.1113/jphysiol.2003.056192
43. Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, et al. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem Biol*. 1 de junio de 2008;3(6):373-82. doi:10.1021/cb800025k
44. England CG, Luo H, Cai W. HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications. *Bioconjugate Chem*. 17 de junio de 2015;26(6):975-86. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00191
45. Manganas LN, Wang Q, Scannevin RH, Antonucci DE, Rhodes KJ, Trimmer JS. Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 de noviembre de 2001;98(24):14055-9. doi:10.1073/pnas.241403898
46. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front Bioeng Biotechnol*. 13 de diciembre de 2021;9:796991. doi:10.3389/fbioe.2021.796991
47. Ficker E, Dennis AT, Obejero-Paz CA, Castaldo P, Taglialatela M, Brown AM. Retention in the Endoplasmic Reticulum as a Mechanism of Dominant-negative Current Suppression in Human Long QT Syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. diciembre de 2000;32(12):2327-37. doi:10.1006/jmcc.2000.1263
48. Lynch J, Chung J, Huang Z, Pierce V, Saunders NS, Niu L. Enhancing transient protein expression in HEK-293 cells by briefly exposing the culture to DMSO. *Journal of Neuroscience Methods*. febrero de 2021;350:109058. doi:10.1016/j.jneumeth.2020.109058
49. Peltola MA, Kuja-Panula J, Lauri SE, Taira T, Rauvala H. AMIGO is an auxiliary subunit of the Kv2.1 potassium channel. *EMBO Rep*. 1 de diciembre de 2011;12(12):1293-9. doi:10.1038/embor.2011.204
50. JLE - Epileptic Disorders - Epilepsy and ionic channels.