



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

“Determinantes moleculares del efecto de la expresión de los canales Kv1.3 sobre la proliferación celular.”

Presentado por: Henar Albertos Arranz

Tutelado por: María Teresa Pérez García

Pilar Ciudad Velasco

Tipo de TFG: Investigación

En Valladolid, Mayo de 2015

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO..... | 7 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| 3.1. Instrumentos y aparatos | 8 |
| 3.1.1. Cabina de flujo laminar | 8 |
| 3.1.2. Incubador de CO ₂ | 8 |
| 3.1.3. Microscopio confocal..... | 8 |
| 3.2. Métodos..... | 9 |
| 3.2.1. Cultivos celulares | 9 |
| 3.2.2. Transfección mediada por lípidos catiónicos: lipofectamina | 9 |
| 3.2.3. Inmunocitoquímica en cubres con poli-L-lisina sin permeabilización | 10 |
| 3.2.4. Métodos de análisis | 11 |
| 3.2.4.1. Análisis de imagen: Image J (FIJI)..... | 11 |
| 3.2.4.2. Análisis estadístico | 12 |
| 4. RESULTADOS | 13 |
| 5. DISCUSIÓN | 17 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 19 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 20 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| CMLV: | Células de Músculo Liso Vascular. |
| MF: | Cambio fenotípico o modulación fenotípica. |
| FC: | Fenotipo Contráctil. |
| FP: | Fenotipo Proliferativo. |
| PAP-1: | 5-(4-phenoxybutoxy)psoralen. |
| MgTx: | Margatoxina. |
| mRNA: | Ácido Ribonucleico Mensajero (Messenger Ribonucleic Acid). |
| DNA: | Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid). |
| HEK: | Células Embrionarias de Riñón Humano (Human Embryonic Kidney Cells). |
| GFP: | Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein). |
| PBS: | Tampón Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline). |
| MEM: | Medio Esencial Mínimo (Minimum Essential Media). |
| DMEM: | Dulbecco's Modified Eagle Medium. |
| FBS: | Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum). |
| SEM: | Error Estándar de la Media. |

1. INTRODUCCIÓN

La pared de todos los vasos sanguíneos, excepto los capilares, está formada por diferentes capas: una capa de endotelio interna que se recubre de una capa elástica y de células de músculo liso y la adventicia externa. El presente estudio analiza la capa de células de músculo liso de los vasos.

Las células de músculo liso vascular (CMLV) maduras muestran un fenotipo contráctil (FC) constituido por diferentes proteínas específicas para mantener el tono muscular. Las alteraciones vasculares originan cambios en el fenotipo contráctil dando lugar a células con un fenotipo proliferativo (FP). Esta transformación implica modificaciones en la expresión de proteínas, de forma que en el FP disminuye la expresión de proteínas contráctiles y aumenta la de proteínas involucradas en proliferación, migración y secreción de matriz extracelular.

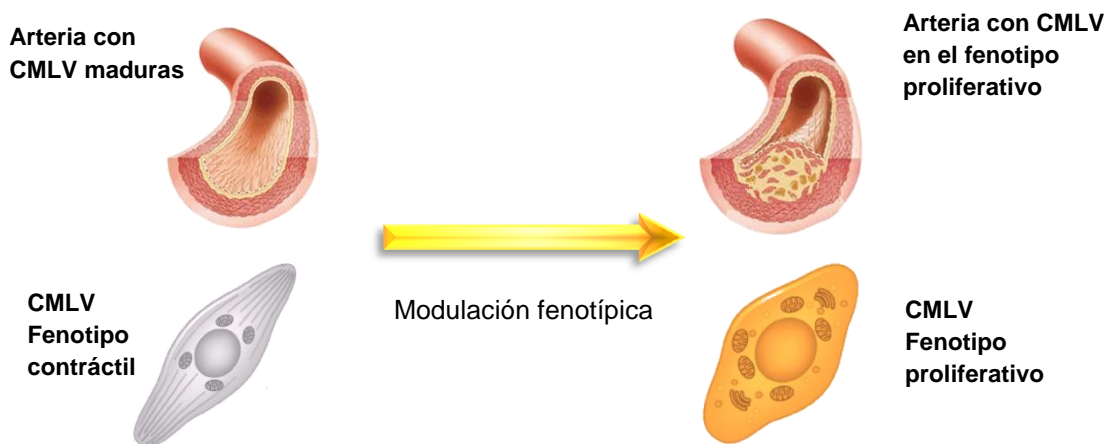


Figura 1. El cambio del fenotipo contráctil al proliferativo se conoce como modulación fenotípica.

Este cambio en la función celular implica que los procesos bioquímicos se redirijan hacia nuevas funciones metabólicas, acompañándose de cambios en la expresión de transportadores de membrana y canales iónicos. El trabajo previo del grupo analizó la expresión de hasta 95 genes de canales iónicos en células con FC y en dos modelos de proliferación: un modelo *in vivo* (mediante lesión endoluminal, que genera una hiperplasia de la íntima) y un modelo *in vitro* (mediante la obtención de cultivos celulares a partir de CMLV). El análisis de la expresión génica de canales iónicos mostró un aumento de la expresión de dos genes en ambos modelos: el gen que codifica el Kv1.3, canal de potasio dependiente de voltaje, y el gen que codifica para la subunidad accesoria Kv β 2, que actúa como chaperona facilitando la expresión en membrana ¹.

Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) constituyen una familia de proteínas de membrana ubicuas presentes en células excitables y no excitables. En las no excitables regulan el potencial de membrana en funciones como la migración y proliferación. Esto se ha observado en varios canales Kv de diferentes sistemas celulares (entre los que se incluye el Kv1.3). El Kv1.3 se ha relacionado con la proliferación en varios tipos celulares (linfocitos T o macrófagos entre otros) pero no se conocen los mecanismos involucrados.

Los estudios previos también concluyen que el Kv1.3 forma parte del FP en modelos *in vivo* e *in vitro*, luego la continuación de los estudios se pudo realizar con este último modelo. Además, dentro de la familia de los Kv1, se observa que el resto de los miembros disminuye su expresión en el FP, siendo el caso más llamativo el del Kv1.5, que pasa de ser el canal dominante en FC a casi desaparecer en FP. La figura 2 muestra los cambios en la expresión de mRNA de los Kv1.

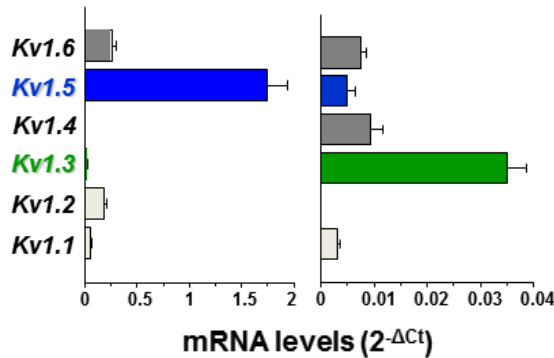


Figura 2. Niveles de mRNA de los canales de K⁺ voltaje-dependientes de la familia Kv en respuesta a la MF de las CML de arterias femorales de ratón. (tomado de Ciudad et al. 2010¹)

Estos datos demuestran que en la modulación fenotípica (MF) existe un cambio en la expresión del Kv1.5 (contráctil) al Kv1.3 (proliferativo). Además, los estudios electrofisiológicos realizados con la técnica patch-clamp en los modelos *in vivo* e *in vitro* confirman este cambio, ya que las corrientes a través del Kv1.3 en el FC son menores que las corrientes del FP en ambos modelos. Esto permite establecer la relación entre la expresión de la proteína de los canales y la funcionalidad de los mismos.

Por otra parte, se demuestra que la expresión de estos canales tiene relación con la proliferación celular ya que al bloquear el Kv1.3 con bloqueantes selectivos como 5-(4-phenoxybutoxy)psoralen (PAP-1) o margatoxina (MgTx), dicha proliferación disminuye tanto en modelos *in vivo*¹ como *in vitro*². En los modelos *in vitro* se cumple en diferentes lechos vasculares, incluyendo células humanas (arterias uterinas, coronarias, renales y venas safenas)².

De hecho, se comprobó el mismo efecto (un aumento de la proliferación) con la sobreexpresión del canal Kv1.3 clonado en un sistema heterólogo: las células embrionarias de riñón humano (HEK)³. De igual manera, se vio que la sobreexpresión del Kv1.5 tenía un efecto anti-proliferativo. Estas observaciones son interesantes, ya que en este sistema se pueden manipular los niveles de expresión del canal, generar canales mutados o quimeras para estudiar los mecanismos que asocian la expresión del Kv1.3 con la proliferación celular.

En principio, se postuló que el mecanismo podría estar mediado por los efectos del Kv1.3 modulando el potencial de membrana. Para comprobar esta hipótesis, se generaron canales Kv1.3 mutantes, con cambios en los aminoácidos que afectaban bien a su permeabilidad a potasio (mutantes del poro) o bien a la sensibilidad a voltaje que determina el mecanismo de apertura y cierre del canal (mutantes del "gating"):

- Los canales Kv1.3WF (WF) y Kv1.3 AYA (AYA) son mutantes del poro, que no permiten flujo de iones y no ayudan a controlar el potencial de membrana.

- El canal Kv1.3-WF3X (WF3X) es un mutante del poro y del gating, ni es permeable a potasio ni percibe el voltaje y cambia su conformación.

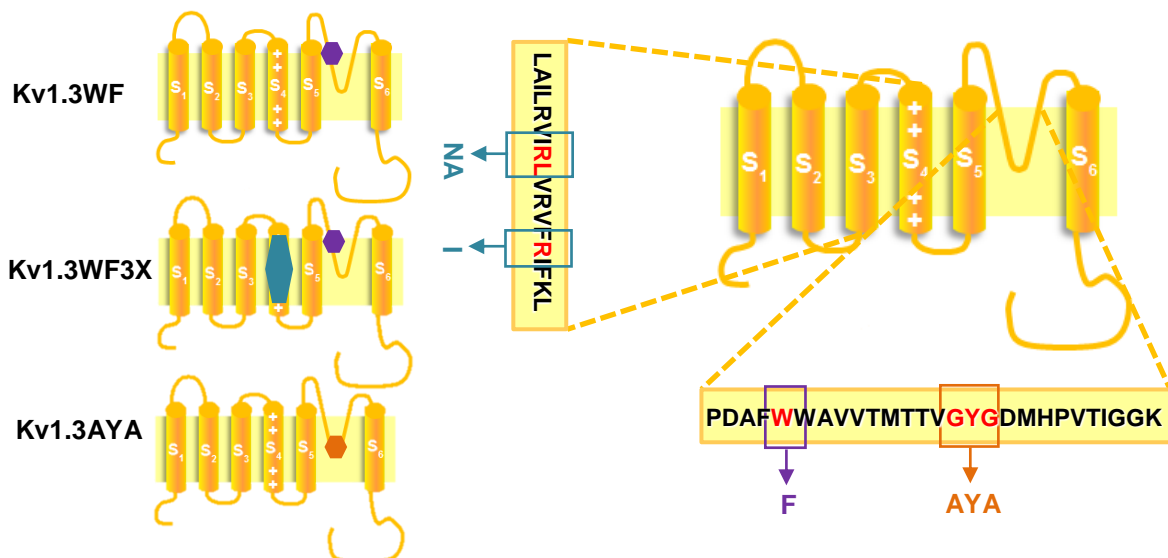


Figura 3. Esquema con los mutantes del poro (WF y AYA) y los mutantes del poro y gating (WF3X). Los resultados mostraron que el AYA no se expresa en membrana y que el WF tenía un efecto sobre la proliferación similar al Kv1.3, y sensible a MgTx.

Expresando estos canales mutados en células HEK y analizando el efecto sobre la proliferación se observó que sólo el mutante del poro (Kv1.3WF) modulaba la proliferación como el Kv1.3. Se concluye que para la modulación de la proliferación del Kv1.3 es necesario percibir el cambio en el potencial de membrana (apertura y cierre) pero no se requiere del flujo de iones.

El Kv1.3 y el Kv1.5 son canales de K⁺ dependientes de voltaje que modulan el potencial de membrana de las células. Sin embargo, el Kv1.3 parece desencadenar vías de señalización que activan proliferación mientras que el Kv1.5 inhibe esta proliferación.

Para conocer la porción de la proteína Kv1.3 que interviene en la proliferación se crearon quimeras añadiendo al Kv1.5 el extremo carboxilo (K5C3) y el extremo amino (K5N3) del Kv1.3. El K5C3 mostró un incremento en la proliferación, con niveles similares a los del Kv1.3. La proliferación del K5N3 fue inferior a la del Kv1.5. La proliferación celular, por lo tanto, parece ligada al extremo carboxilo del Kv1.3.

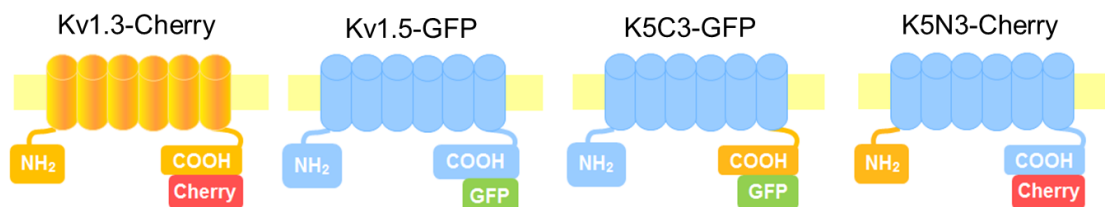


Figura 4. Esquema con los canales Kv1.3, Kv1.5 y las quimeras, K5C3 y K5N3, resultado de la combinación de los mismos. Están unidas a diferentes proteínas fluorescentes (Cherry y Green Fluorescent Protein (GFP)).

La evaluación más detallada del extremo carboxilo del Kv1.3 se continuó con la modificación de 8 posibles sitios de fosforilación de la cadena de

aminoácidos; son residuos de treonina, tirosina y serina rodeados de un medio más ácido que los convierte en residuos fosforilables.

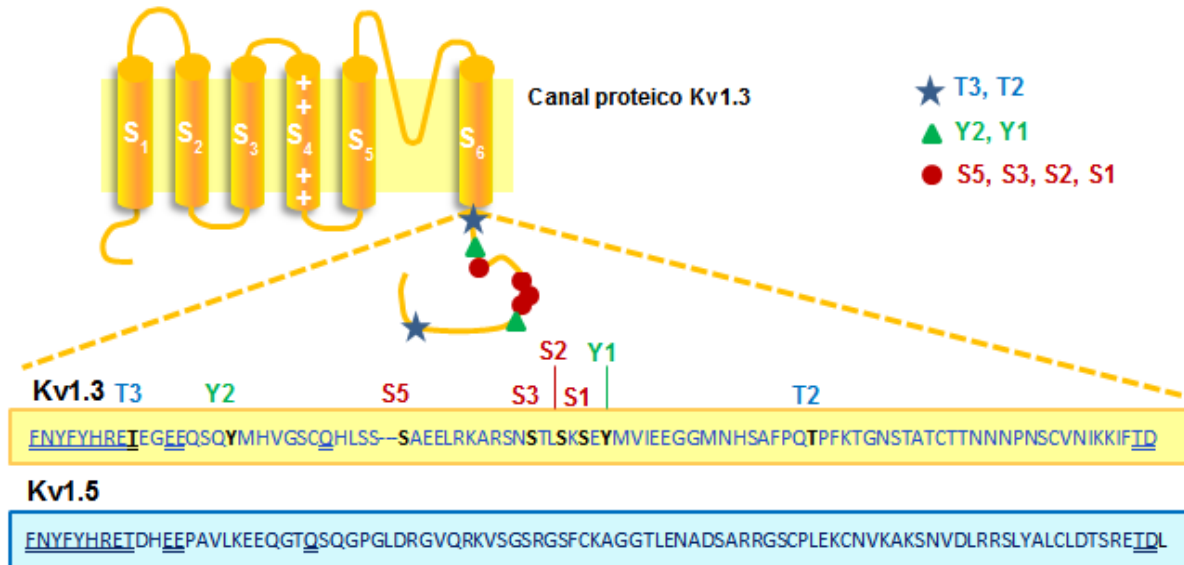


Figura 5. Porción de aminoácidos correspondientes con el extremo carboxilo del canal Kv1.3 y Kv1.5. Hay zonas coincidentes en ambos canales (subrayado). T3, Y2, S5, S3, S2, S1, Y1 y T2 son las localizaciones que se modifican para crear los mutantes.

El análisis determina que una parte del extremo carboxilo, comprendida entre Y2 y S5, puede tener mayor relación con la proliferación, por lo que, considerando esta porción se diseñan nuevas quimeras:

- Kv1.3 únicamente con el fragmento elegido (K3YS).
- Kv1.5 adicionando la porción al final de la cadena (K5-613YS).
- Kv1.5 adicionando el fragmento en una posición similar a la de Kv1.3 (K5-532YS).

La quimera K3YS no afecta a la proliferación de forma diferente respecto al Kv1.3. En las quimeras del Kv1.5, se observa que mientras el K5-613YS no tiene efecto sobre la proliferación, el K5-532YS tiene un efecto similar al del Kv1.3. Estos resultados indican que la importancia de ese fragmento YS para el efecto sobre la proliferación está relacionada con su posición dentro del canal.

Sin embargo, puesto que estos canales mutados pueden tener defectos en su tráfico a la membrana, tenemos que descartar que los cambios observados en la proliferación no se deban a cambios en su expresión. Para ello podemos analizar su expresión funcional (con registros electrofisiológicos) o su expresión en membrana (mediante técnicas inmunocitoquímicas), esto último facilitado por el diseño de los canales como proteínas de fusión con marcadores fluorescentes (Cherry o GFP), que permiten localizar su expresión.

El objetivo del estudio es establecer si existe una relación entre el efecto sobre la proliferación celular y la expresión de todos los mutantes en la membrana de las células HEK.

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Como se ha comentado, los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.3 y Kv1.5 muestran efectos opuestos sobre la proliferación celular, los primeros estimulan la proliferación celular mientras que los segundos la inhiben. Los estudios previos del grupo indican que este efecto podría ser debido a que los canales activan diferentes vías de señalización por lo que se ha estudiado el efecto sobre la proliferación celular y la funcionalidad del canal de las diferentes quimeras y mutantes de estos canales para tratar de esclarecer el mecanismo molecular y más en concreto la región responsable del efecto proliferativo del canal Kv1.3.

La **hipótesis planteada** en este trabajo es que *las diferencias en la expresión en membrana de los distintos constructos, están relacionadas con la función estudiada mediante técnicas electrofisiológicas pero son independientes de las diferencias observadas en la proliferación celular* debida a la sobreexpresión de cada uno de los canales. Para estudiar esta hipótesis se plantean **tres objetivos específicos**:

1. Estudiar la **expresión en membrana de los canales mediante inmunocitoquímica** con anticuerpos extracelulares anti-Kv1.3 y anti-Kv1.5.
2. Comparar la **expresión en membrana** de los diferentes canales **y su función**, medida con técnicas de electrofisiología.
3. Determinar si existe relación entre los **niveles de expresión** de los canales y la **proliferación celular**.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTOS Y APARATOS

3.1.1. Cabina de flujo laminar

Para trabajar con cultivos celulares (realizar los cambios de medio, las transfecciones, etc.) se emplea una cabina de flujo laminar de Telstar Biostar, con un filtro HEPA que permite mantener la esterilidad con una eficacia de hasta el 99,99% en partículas superiores a 0,2 μg .

3.1.2. Incubador de CO₂

Para mantener y favorecer el crecimiento de los cultivos celulares se utiliza un incubador de CO₂ que mantiene las células a 37° C con una atmósfera al 5% de CO₂ (Hera Cell 150).

3.1.3. Microscopio confocal

Se utiliza un microscopio confocal modelo Leica TCS SP5 para la obtención de imágenes de fluorescencia en las que se determinó la expresión en membrana.

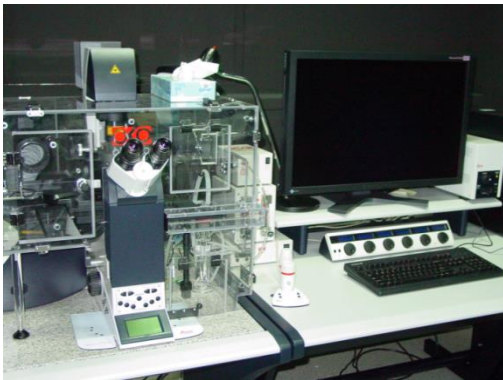


Figura 6. Microscopio Confocal LEICA TCS SP5

El microscopio confocal es un instrumento que permite obtener imágenes de alta resolución mediante la proyección de secciones ópticas sobre muestras celulares de diferente grosor. La combinación de los cortes ópticos en el plano vertical proporciona imágenes tridimensionales.

La fuente de luz envía un haz laser con una longitud de onda determinada que focaliza en un plano concreto de la muestra. La luz reflejada alcanza un detector tras atravesar un pinhole. Este

diafragma limita el trayecto de los rayos analizando los que focalizan en un plano concreto de la muestra y atenuando los planos anteriores y posteriores a él mejorando la resolución y el contraste de la imagen. Esto permite recrear imágenes punto a punto.

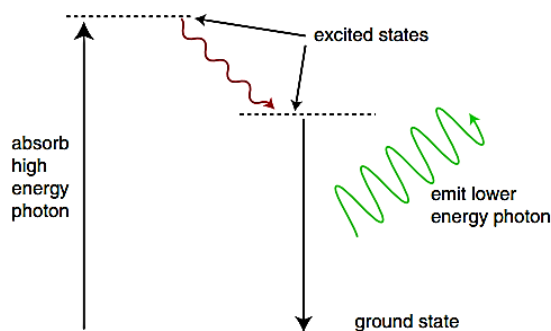


Figura 7. La absorción de un fotón de luz con una longitud de onda concreta incrementa la energía molecular (estado excitado) y los fluoróforos emiten luz en otras longitudes de onda. La emisión de luz provoca la pérdida de energía. ⁴

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivos celulares

Los experimentos que se realizan en el trabajo consisten en expresar los canales iónicos de interés en un sistema heterólogo como son las células HEK. Las células HEK 293 constituyen una línea celular inmortalizada formada por células renales embrionarias humanas transformadas con el genoma del adenovirus tipo 5⁵.

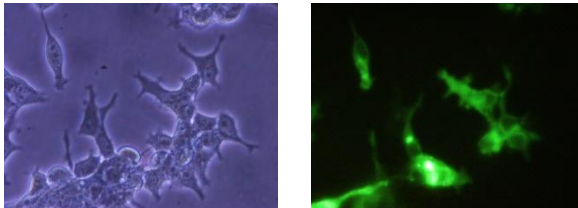


Figura 8. Células embrionarias de riñón humano (HEK 293) transfectadas con GFP. Se muestra la imagen en campo claro y la eficiencia de transfección en la imagen de fluorescencia.

Son ampliamente utilizadas por su facilidad y su eficacia en la transfección. Aunque no es adecuada para estudiar el comportamiento celular sí es válida para analizar las proteínas de membrana expresadas tras la transfección de un gen.

Las HEK se mantienen en un medio DMEM con FBS al 5%, penicilina-estreptomicina (100 U/ml), 5 µg/ml fungizona, y 2 mM L-glutamina a 37° C en un ambiente al 5% de CO₂.

3.2.2. Transfección mediada por lípidos catiónicos: Transfección con lipofectamina

La transfección comprende la introducción de una molécula de DNA dentro de una célula eucariota a través de métodos químicos o físicos. Las células HEK se sembraron en placas de 35 mm de diámetro, y al llegar a una confluencia de 80-90% se transfectaron usando lipofectamina 2000. Este método de transfección está basado en la formación de complejos de lípidos catiónicos y DNA. Se realiza según el protocolo propuesto por el fabricante:

1. Se añade sobre un eppendorf (A) 500 µl de Opti-MEM (Invitrogen) y 1 µg del plásmido conteniendo el constructo de interés.
2. Sobre un segundo eppendorf (B) se adicionan 500 µl de Opti-MEM (Invitrogen) y 2 µl de lipofectamina 2000.

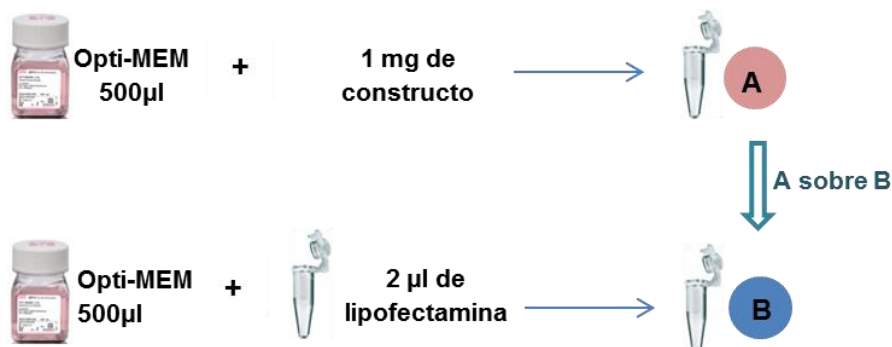


Figura 9. Primera fase del protocolo de transfección

3. Se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos y después, se mezcla el contenido del eppendorf A sobre el eppendorf B (20 minutos de incubación a temperatura ambiente).
4. Tras retirar el medio de cultivo de las placas donde están sembradas las células se añade la mezcla de transfección, y las células se conservan en el incubador de CO₂ hasta el día siguiente. Tras ello, las células se levantan y se siembran 70.000 células en cristales de 12 mm de diámetro, previamente tratados con poli-L-lisina. Se dejan en medio de cultivo durante unas horas. La eficiencia de transfección se determinó cualitativamente observando la fluorescencia de las proteínas de fusión de las células transfectadas (figura 8).

3.2.3. Inmunocitoquímica en cubres con poli-L-lisina sin permeabilización

La inmunocitoquímica es una técnica que permite la localización de determinadas proteínas en muestras celulares mediante el empleo de anticuerpos, capaces de detectar antígenos específicos. Gracias a la gran especificidad y afinidad de los anticuerpos para reconocer las proteínas, la inmunocitoquímica se ha convertido en una técnica muy precisa y sencilla de realizar.

En este proyecto, se han realizado inmunocitoquímicas sin permeabilización de las células transfectadas con los diferentes mutantes de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Las células de cada cristal se fijan con formaldehído para preservar la morfología celular. Tras retirar el medio, se añaden 250 µl por pocillo de formaldehído 4% diluido de una concentración de 40%. Después de 15 minutos de incubación, se realizan 3 lavados con el Tampón Fosfato Salino (PBS) al 1%.
2. Se prepara la solución de bloqueo con PBS al 1% y Goat Serum al 2% (suero obtenido de animales adultos sanos) en la que se diluirán los anticuerpos primarios y secundarios (esta solución favorece la unión específica de los antígenos con la proteína de interés). El protocolo se desarrolla sin permeabilización porque la unión del anticuerpo primario se quiere observar sólo en la membrana celular. El protocolo permeabilizado se realizaría con tritón 0,1% ya que éste permite la entrada del anticuerpo primario al interior celular. Se añaden 250 µl de solución bloqueo por pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Después, se disponen los cristales sobre parafilm desde donde se continuará el proceso. Se añaden 50 µl de anticuerpo primario (anti-Kv1.5 o anti-Kv1.3 extracelular (ext)) por cristal diluido en la solución de bloqueo 1:50. Se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos.
4. Se hacen 3 lavados con PBS al 1% y se adicionan 100 µl de anticuerpo secundario (anti-rabbit (Rb) Alexa488 y anti-Rb 532) diluido 1:100 en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios están unidos a diferentes fluorocromos que se excitan a determinadas longitudes de onda y emiten luz, permitiendo visualizar diferentes estructuras celulares. Esto implica la incubación de los cristales en oscuridad para evitar la pérdida de

fluorescencia. Se incuban durante 1 hora. Para mantener las células en un ambiente húmedo se disponen tiras de papel humedecidas.

| Constructos | Proteína fluorescente | Anticuerpo 1º - Anticuerpo 2º |
|--|-----------------------|-----------------------------------|
| Kv1.3; S1-S2-S3-S5; T2 - T3; Y1 - Y2; K3YS | Cherry | Anti-Kv1.3 Ext - Anti Rb Alexa488 |
| K5N3; K5N3-β | Cherry | Anti-Kv1.5 Ext - Anti Rb Alexa488 |
| Kv1.5; K5C3; K5-532YS; K5-613YS | GFP | Anti-Kv1.5 Ext - Anti Rb Alexa532 |

Figura 10. Esquema de los mutantes con las proteínas de fusión y los anticuerpos utilizados para su detección.

- Se realizan 3 lavados con PBS al 1% y se añaden 100 µl de Hoechts 0,5:1000 en PBS en cada cristal. El Hoechts es un colorante fluorescente que se une al DNA de las células y tiñe los núcleos de azul al excitarlos. Se incuban 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se hacen 2 lavados con PBS 1% y uno con H₂O desionizada para lavar posibles restos. Finalmente, los cristales se disponen en portaobjetos con 1,5 µl de vectashield y se conservan en oscuridad a 4° C hasta tomar las imágenes. El vectashield es un medio de montaje que evita que se quemara la fluorescencia de las moléculas siendo compatible con diferentes fluorocromos.

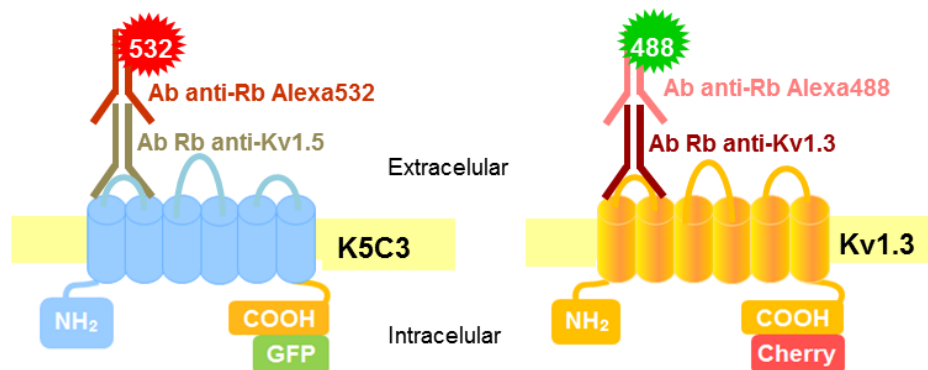


Figura 11. Unión del anticuerpo (Ab) primario con el canal del K5C3-GFP y del Kv1.3-Cherry y del Ab secundario enlazado a un fluoróforo (532 y 488 respectivamente). Se emplean Ab secundarios anti-rabbit porque los primarios proceden del suero de rabbit.

3.2.4. Métodos de análisis

3.2.4.1. Análisis de imagen: Image J (FIJI)

Para analizar la expresión en membrana de los diferentes canales, se obtienen imágenes de las células HEK transfectadas con los diferentes constructos con el microscopio confocal. Se analizan a través del programa Image J (FIJI). La cuantificación relativa de la expresión en membrana se realiza mediante la binarización de las imágenes.

Las imágenes digitales adquiridas son representaciones de una imagen a partir de una matriz numérica. Presentan una resolución de 16X, 8 bits y se tomaron con una apertura numérica de 1 Airy.

El pixel constituye la mínima unidad que forma parte de la imagen digital. No tiene tamaño ni forma pero sí **se puede asociar una dimensión real a un número de píxeles**. Por lo tanto, al binarizar las imágenes mediante un “threshold” automático del software del ImageJ se obtiene el número de píxeles de máxima intensidad de forma que se pueda estimar la expresión del canal en la membrana celular según éstos.

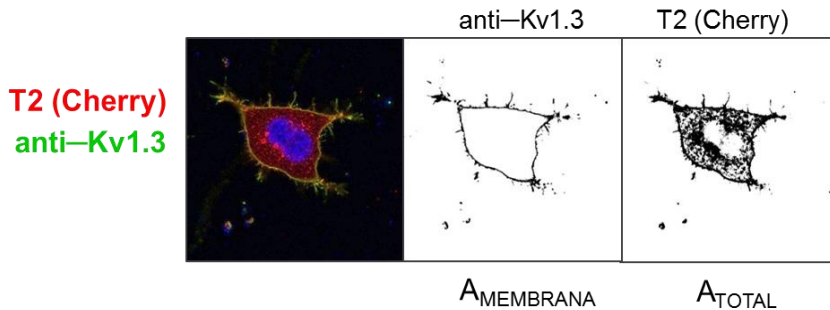


Figura 12.

Binarización de imágenes para el cálculo del ratio en uno de los mutantes.

Las imágenes con las proteínas fluorescentes Cherry o GFP estiman el área total (A_T), las imágenes con los anticuerpos anti-Kv1.3 o anti-Kv1.5 extracelulares definen el área de la membrana (A_m) y ambos valores se emplean para conocer el porcentaje de expresión en membrana mediante el ratio:

$$Ratio = \frac{A_M \cdot 100}{A_T}$$

El análisis se realizó para una n de entre 10 y 40 células aisladas en cada condición, obtenidas de al menos tres experimentos diferentes.

3.2.4.2. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se realiza una ANOVA simple a través del programa Statgraphics. La ANOVA simple es un modelo estadístico que determina si existen o no diferencias significativas entre las medias y/o varianzas de una variable dependiente sobre diferentes factores. Permite establecer una comparación intergrupos e intragrupos.

Los datos se representaron con:

- Gráficas y tablas de ANOVA. Determina si las medias de los factores, difieren o no significativamente unas de otras.
- Resúmenes estadísticos. Determina diferentes estadísticas comunes como la media o la desviación estándar.
- Pruebas de múltiples rangos. Comparación intergrupos para definir diferencias significativas

Se realizaron dos ANOVA; una comparando el Kv1.3 y sus mutantes y otra distinguiendo el Kv1.5 y sus constructos.

La existencia de una correlación entre la expresión en membrana y la expresión funcional o la proliferación se estudió mediante un análisis de regresión utilizando el paquete estadístico del programa Microsoft Excel. El gráfico de dispersión está definido por una ecuación, un coeficiente de correlación y el p-valor.

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA EN LOS DIFERENTES CONSTRUCTOS

Las células HEK se transfectaron con los diferentes mutantes y quimeras utilizando lipofectamina y se realizaron inmunocitoquímicas para observar las células al microscopio confocal.

La figura 13 muestra algunas de las imágenes de los constructos del Kv1.3 obtenidas con el microscopio confocal analizadas con la correspondiente proteína de fusión (Cherry) y el anticuerpo anti-Kv1.3 marcado con Alexa 488. Se presentan dos mutantes (Y2 y S5) y una quimera (K3YS).

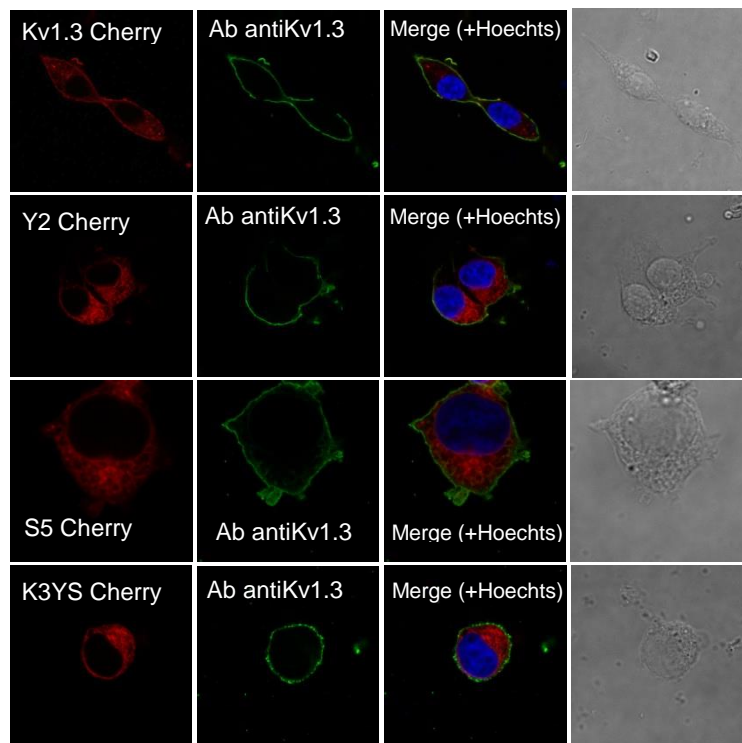


Figura 13. La primera y segunda columna muestra el marcaje de la proteína de fusión (Cherry, en rojo) y del secundario (Alexa 488, verde) unido al anti-Kv1.3, respectivamente.

El Merge (+Hoechts) combina los diferentes canales junto con el marcaje de los núcleos en azul, indicando co-localización en la membrana.

Las imágenes correspondientes con las quimeras del Kv1.5 se marcan con diferentes anticuerpos según la proteína de fusión empleada: Cherry y GFP en este caso.

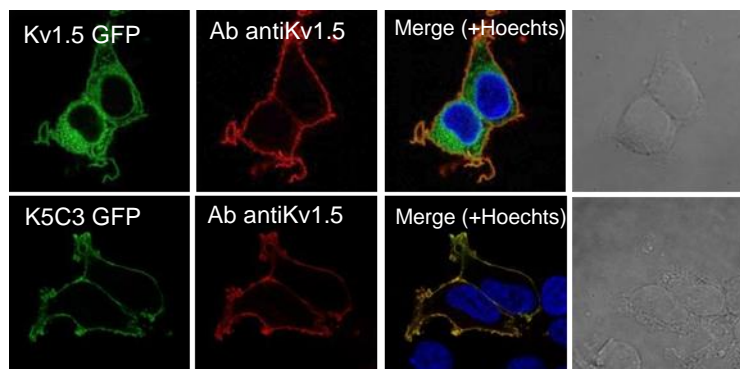


Figura 14.A. Imágenes del microscopio confocal. Se observa cómo el marcaje del K5C3 está prácticamente en su totalidad en membrana, lo que incrementa el valor del ratio.

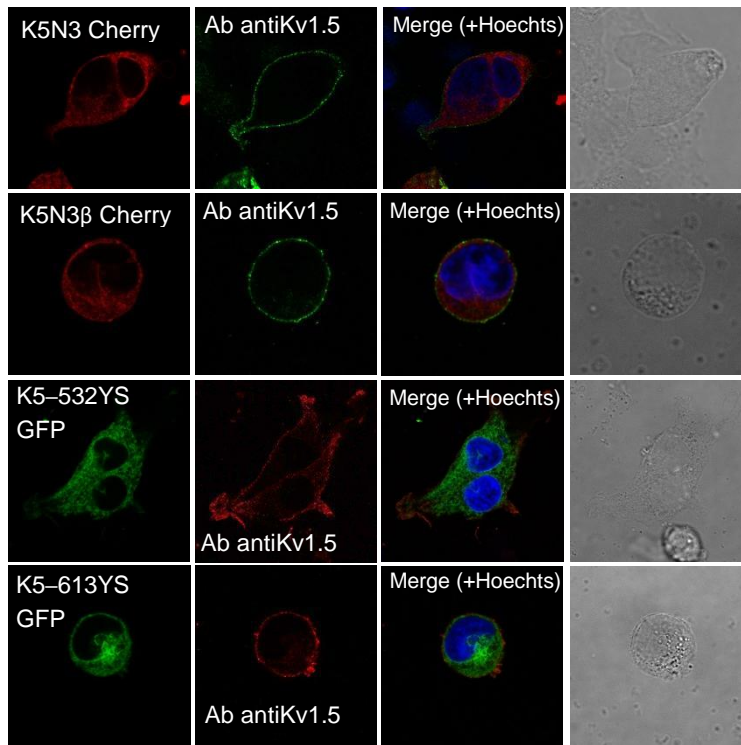


Figura 14.B. Imágenes del microscopio confocal mostrando la localización de las diversas proteínas de fusión derivadas del Kv1.5 y el marcaje con el anticuerpo anti-Kv1.5 en células sin permeabilizar, utilizando un anticuerpo secundario en rojo o verde como se indica.

Para analizar el ratio de la expresión en membrana se binarizaron las imágenes mediante un “threshold” automático con el programa Image J (FIJI). Se obtuvo la media \pm SEM para cada constructo y se compararon los valores obtenidos para cada uno de los dos canales “wild-type” con sus correspondientes mutantes. El análisis de la expresión del canal Kv1.3 y sus mutantes (figura 15) muestra pequeñas diferencias entre ellos.

| | Kv1.3 | S1 | S2 | S3 | S5 | T2 | T3 | Y1 | Y2 | K3YS |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Promedio Ratio (%) | 41,14 | 42,95 | 46,51 | 47,39 | 42,11 | 39,97 | 43,31 | 34,14 | 36,80 | 35,18 |
| Error estándar de la media | 1,95 | 4,30 | 3,25 | 3,24 | 4,79 | 1,76 | 2,36 | 2,55 | 4,77 | 4,60 |

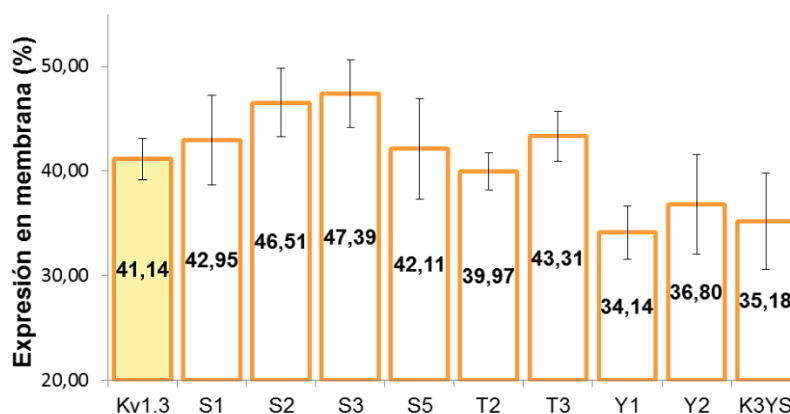


Figura 15. Gráfica de la expresión en membrana de los diferentes mutantes del canal Kv1.3 según los valores de la tabla. Cada barra es media \pm SEM de 11-25 células de 3 experimentos individuales.

El análisis estadístico realizado mediante una ANOVA simple con el Statgraphics *no mostró diferencias significativas entre grupos en la media de la expresión en membrana* ($p > 0,05$) en los mutantes del Kv1.3. Este no fue el caso cuando se compara el valor medio del ratio de la expresión en membrana

del canal Kv1.5 y sus quimeras, ya que presenta diferencias muy significativas entre grupos ($p < 0,001$) (Figura 16).

| | Kv1.5 | K5-532YS | K5-613YS | K5N3 | K5N3- β | K5C3 |
|-----------------------------------|-------|----------|----------|-------|---------------|-------|
| Promedio del Ratio (%) | 39,59 | 46,75 | 40,58 | 21,03 | 25,74 | 96,11 |
| Error estándar de la media | 3,03 | 5,70 | 4,45 | 1,66 | 2,47 | 4,01 |

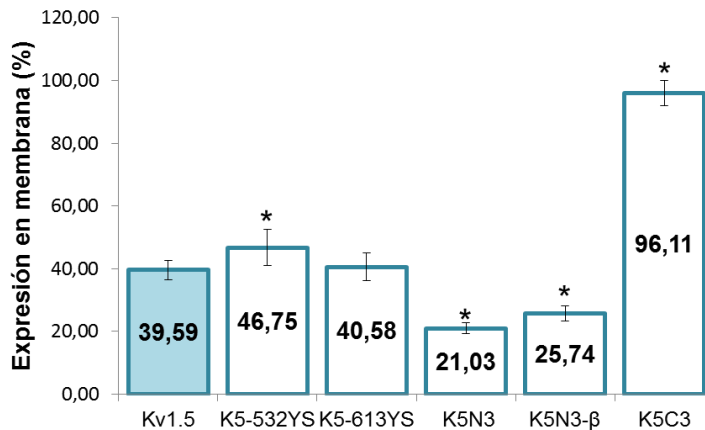


Figura 16. Gráfica de la expresión en membrana de los diferentes mutantes del canal Kv1.5 según los valores de la tabla. Cada barra es la media \pm SEM de 9-15 células de 3 experimentos individuales.

(*) Muestran diferencias significativas respecto Kv1.5.

En relación a la gráfica anterior, la prueba de múltiples rangos determinó que sólo la quimera K5-613YS no mostraba diferencias significativas respecto del Kv1.5. El resto de las quimeras eran diferentes del Kv1.5. Estas diferencias pueden estar asociadas a un peor tráfico del canal en todos los casos excepto K5C3.

4.2. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE LOS DIFERENTES CANALES Y SU FUNCIÓN

Para validar el método de análisis de expresión de membrana propuesto, exploramos su correlación con la expresión funcional de los diferentes constructos, obtenidos previamente en el grupo mediante técnicas electrofisiológicas.

Para comparar ambos grupos de datos, se representaron unos frente a otros y se estudió la correlación mediante una regresión lineal. Se observa que existe una correlación entre ambos métodos para determinar la actividad de los canales ya que un incremento en la expresión de membrana se asocia con una mayor corriente celular (figura 17). La correlación fue estadísticamente significativa en ambos casos, con un intervalo de confianza del 99% en el caso de los mutantes del Kv1.3 ($p < 0,01$) y de un 95% para las quimeras del Kv1.5, ($p < 0,05$).

A su vez, se observa como la dispersión de los datos es mayor en el caso de las quimeras del Kv.15 que en los mutantes dependientes del Kv1.3, lo cual correlaciona con lo observado en las medidas de expresión (Figuras 15,16).

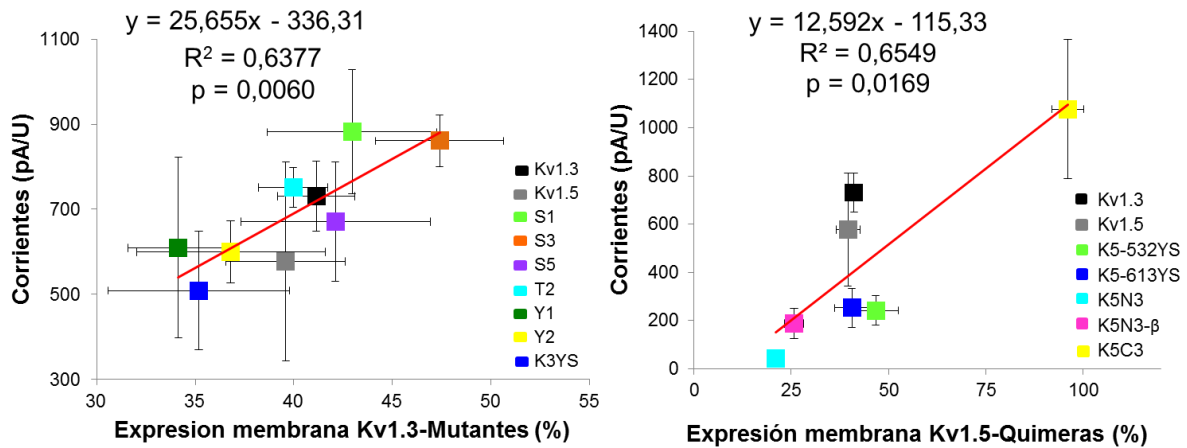


Figura 17. Gráficas con la media \pm SEM de la expresión en membrana y la expresión funcional de los diferentes constructos.

4.3. DETERMINAR SI EXISTE RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS CANALES Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Una vez validado el método de análisis de expresión en membrana, se trata de determinar si existe relación entre los niveles de expresión con la proliferación celular. Para ello, se utilizan los datos de proliferación de los estudios llevados a cabo previamente por el grupo de investigación y se establece una regresión lineal entre éstos y la expresión en membrana.

Se observa que no existe correlación entre la expresión en membrana y los niveles de proliferación celular en canales sobreexpresados (figura 18); es decir, ambos parámetros son independientes.

La correlación tanto del Kv1.3 como de las quimeras del Kv1.5 no presenta diferencias significativas en ninguno de los dos casos ($p > 0,05$).

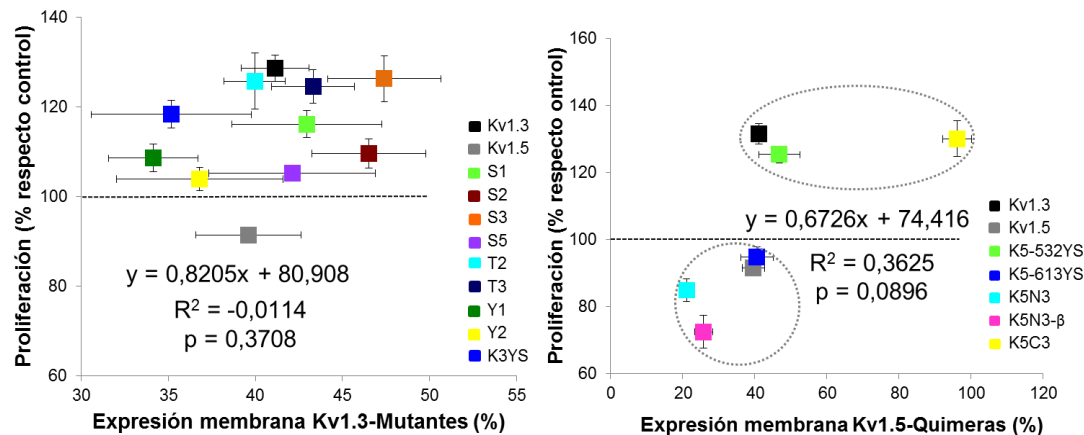


Figura 18. Gráficas con la media \pm SEM de la expresión en membrana y los niveles de proliferación que demuestran que no existe correlación entre ambos parámetros.

Los valores de proliferación celular se expresan en porcentajes respecto al control. El control lo forman células HEK sin transfectar que dan como resultado una proliferación total del 100%. De esta forma, valores superiores al control indican un incremento de la proliferación y valores inferiores, una disminución en la misma.

De nuevo, se advierte una mayor dispersión de los datos en las quimeras del Kv1.5 en comparación con los constructos del Kv1.3

5. DISCUSIÓN

En función de los resultados previos, se observa que no existen diferencias significativas en la expresión de membrana en los mutantes del Kv1.3 pero sí en la expresión de las quimeras del Kv1.5. Las regiones implicadas en el tráfico a la membrana se localizan en el extremo NH (para el Kv1.3)⁶ y en el extremo COOH (para el Kv1.5)⁷. Esto explica el peor tráfico de la quimera K5N-, que carece de las señales de direccionamiento a membrana, y la elevada expresión de la quimera K5C3 (con todas las señales de ambos canales). En el caso de las quimeras YS, la inserción al inicio del COOH (K5-532YS) produce una alteración del tráfico que no se observa cuando se inserta al final (K5-613YS).

Además, una mayor dispersión de los datos de expresión de membrana en el caso de las quimeras del Kv1.5 puede estar asociada al grado de modificación de la estructura del canal original. Es decir, las quimeras creadas presentan grandes diferencias moleculares en su estructura respecto de la proteína original, lo que implica esa fuerte dispersión de los datos. Sin embargo, las mutaciones puntuales realizadas en el extremo carboxilo del Kv1.3, ofrecen resultados de expresión en membrana similares en todos ellos puesto que la modificación estructural, en esta situación, es mínima.

La hipótesis planteada inicialmente, donde se buscaba comparar la expresión en membrana de los diferentes canales con su función, puede corroborarse gracias a los resultados de los estudios electrofisiológicos realizados por el grupo de investigación. Existe una correlación significativa tanto en los constructos del Kv1.3 ($R^2 = 0,6377$) como en las quimeras del Kv1.5 ($R^2 = 0,6549$) (gráfica 17).

Esto permite validar el método de análisis de la expresión en membrana como medida indirecta de la actividad de los canales. Esta correlación no es perfecta, por lo cual se considera que los estudios electrofisiológicos siguen siendo la manera más precisa de obtener esta información porque determinan la expresión funcional y por tanto la contribución a la actividad celular.

Las limitaciones del estudio provienen del hecho de que no es una medida directa de la función del canal, y son fundamentalmente limitaciones técnicas, ya que es necesaria una cuidadosa selección de las condiciones en las que se obtienen las imágenes para no introducir sesgos en el análisis. Observamos que el análisis de las imágenes con el Imagen J (FIJI) daba lugar a errores en aquellos casos en los que el programa no binarizaba toda la célula, a pesar de que podía observarse de manera completa en los tres canales (rojo, verde y azul).

Otra limitación del estudio presente durante el análisis fue la imposibilidad de evaluar todas las células de manera aislada. En algunos casos, las células se mostraban en grupo, modificando las condiciones del análisis.

Finalmente, no es posible discernir con este estudio la viabilidad de las células observadas, lo cual puede conducir a desviaciones al cuantificar la expresión de los canales.

En general, si bien existe una correlación significativa entre ambos métodos (análisis de imagen y electrofisiología) la correlación fue menor de lo esperada en el caso de las quimeras del Kv1.5.

Al establecer una comparación entre los resultados de los estudios de proliferación con los valores de expresión en membrana se comprueba que dichos cambios observados en la proliferación no se deben a cambios en su expresión (gráfica 18). Esto permite corroborar que la proliferación de los diferentes canales es independiente de su expresión en membrana.

Un ejemplo claro se muestra en la expresión en membrana de los canales Kv1.3 y Kv1.5, que no presentan diferencias significativas entre ambos pero el valor de proliferación es mayor en el Kv1.3 que en el Kv1.5.

Se concluye que el estudio permite definir una relación entre la expresión en membrana y la expresión funcional siendo éstas independientes de los valores de proliferación obtenidos con la sobreexpresión de los canales.

6. CONCLUSIONES

Atendiendo a los diferentes resultados del estudio se puede concluir que:

- No se observan diferencias significativas en la expresión de los constructos del Kv1.3 pero sí son notables en el caso de las quimeras del Kv1.5.
- Las diferencias y la dispersión de los datos en las quimeras del Kv1.5 se asocian a los grandes cambios estructurales de la proteína.
- El método de análisis de expresión de membrana es un método válido para evaluar la actividad celular al presentar correlación con la expresión funcional de los canales.
- No existe una relación entre la proliferación celular y la expresión de todos los mutantes en la membrana de las células HEK.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ciudad P, Moreno-Dominguez A, Novensa L, Roque M, Barquin L, Heras M, Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR. *Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1203-1211.
2. Ciudad P, Miguel-Velado E, Ruiz-McDavitt C, Alonso E, Jimenez-Perez L, Asuaje A, Carmona Y, Garcia-Arribas D, Lopez J, Marroquin Y, Fernandez M, Roque M, Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR. *Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. Pflugers Arch.* 2014.
3. Ciudad P, Jimenez-Perez L, Garcia-Arribas D, Miguel-Velado E, Tajada S, Ruiz-McDavitt C, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT. *Kv1.3 channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1299-1307.
4. D Semwogerere, E.R.Weeks. *Confocal Microscopy.* In: Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Taylor and Francis, ed. 2005. Taylor and Francis.
5. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol.* 1977;36:59-74.
6. Martinez-Marmol R, Perez-Verdaguer M, Roig SR, Vallejo-Gracia A, Gotsi P, Serrano-Albarras A, Bahamonde MI, Ferrer-Montiel A, Fernandez-Ballester G, Comes N, Felipe A. *A non-canonical di-acidic signal at the C-terminus of Kv1.3 determines anterograde trafficking and surface expression. J Cell Sci.* 2013;126:5681-5691.
7. Misonou H, Trimmer JS. *Determinants of voltage-gated potassium channel surface expression and localization in Mammalian neurons. Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2004;39:125-145.