



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**Partición membranal del canal de potasio Kv.10.1 (Eag1) y su
correlación funcional en neuronas.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias Biomédicas

P R E S E N T A

Lic. en Med. Aura Matilde Jiménez Garduño

Directora de tesis:

Dra. Alicia Ortega Aguilar
Facultad de Medicina

Comité Tutor:

Dr. David Erasmo García Díaz
Facultad de Medicina

Dr. Luis Vaca Domínguez
Instituto de Fisiología Celular

México, D.F. Junio de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mi madre, la fortaleza en mi pasado
y a mi hija, la esperanza en mi futuro*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
PREFACIO.....	6
RESUMEN GRÁFICO	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LÍSTA DE FIGURAS.....	11
CAPITULOS:	
1.- INTRODUCCIÓN	
I. Canales iónicos, generalidades e importancia.....	13
II. La familia de canales de potasio dependientes de voltaje (K_V).....	16
a. Descripción y generalidades electromecánicas.....	16
b. Localización y función.....	19
III. El canal K_V 10.1 ó éter-á-go-go1 (Eag1).....	22
a. Características estructurales y funcionales.....	22
b. Localización tisular y celular.....	25
c. Función y regulación.....	27
IV. La Membrana Plasmática.....	29
a. Estructura, composición y evolución.....	29
b. Modelos	30
V. Las Membranas Resistentes a Detergentes.....	33
a. El origen del concepto de “balsas lipídicas”.....	33
b. Características principales.....	35

c. Función de los dominios discretos en la membrana plasmática en los diferentes tejidos.....	36
VI. Canales iónicos y Membranas Resistentes a Detergentes.....	38
2.- OBJETIVO.....	42
3.- HIPÓTESIS.....	43
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
5.- RESULTADOS.....	49
I. Cerebro.....	49
II. Células de riñón embrionario humano (HEK).....	60
III. Células de cáncer.....	67
6.- DISCUSIÓN.....	71
7.- CONCLUSIÓN.....	79
8.- REFERENCIAS.....	80
9.- ANEXOS.....	86
I. Estadística del artículo.....	86
II. Imágenes originales sin y con contraste completas de la Fig. 5.5....	87
III. Imágenes con controles de la figura 5.11.....	88
IV. Artículo publicado.....	89

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM por ser mi casa para realizar esta tesis en el laboratorio de la Dra. Alicia Ortega, a mi Comité Tutor: Dr. Luis Vaca y Dr. David García. A mi comité sinodal: Dr. Zentella Dehesa, Dra. Ortega Aguilar, Dr. Gonzáez Halphen, Dr. Sohlenkamp y Dr. Stühmer. Gracias al Dr. Stühmer y Pardo por la colaboración interinstitucional para la realización del proyecto.

Gracias a las instituciones que me han apoyado a lo largo de mi vida: el Colegio Aleman Alexander von Humboldt, la UNAM (Facultad de Medicina y PDCB: Dra. Yolanda Vidal, Evangelina Vargas y Zenaida Martínez) por ser mi alma matter, especiales gracias en esta etapa del doctorado a CONACyT (#267035) y PAPIIT (UNAM-DGAPA-IN219812) en México y a DAAD en Alemania por el financiamiento de mi proyecto y mis estancias.

Tengo que continuar agradeciendo a Dios por haberme dado la vida.

En siguiente lugar le agradezco a María del Consuelo Garduño Villa, mejor conocida como “mi madre” por haberme amado, educado y dado las herramientas necesarias para vivir y aprender a disfrutar cada momento.

A la Dra. Alicia Ortega Aguilar, a quien conocí en el primer año de la carrera de medicina y que me ha acompañado a lo largo de toda mi formación académica brindándome su apoyo incondicional y guía. Sin ella esto no sería posible. Amiga, Maestra y Gurú, Gracias!

Mi siguiente agradecimiento va para el hombre que conocí hace ya 8 años y que ahora es mi esposo y padre de mi hija. Víctor, gracias por ser mi compañero de vida incondicionalmente y por tu confianza en mí, lo logré!

Obviamente le agradezco a mi padre Aurelio Jiménez Villa y a cada uno de los miembros de mi familia, que ha estado conmigo siempre apoyándome y confiando siempre en mí: los Garduño Hernández, Garduño Ortega, TODOS los Garduño Vázquez y descendencia, Garduño Méndez, Garduño Roque. Con especial cariños a mis tíos del alma Ernesto y Francisco Garduño y a mis “hermanas” Martha, Maira y Paola.

Le agradezco en especial a Rocío Álvarez por su enseñanza, apoyo y paciencia.

En siguiente lugar a mis compañeros del Lab1 Bqm, Ricardo, Joel, Paco, Pável, Chucho, Ibrahim, Lalo y Vero.

Muchas gracias también a mis grandes amigas y amigos Jean, Tina, Gina, Sandy, Cris, Ada, Marianela, Juan Carlos, Jon. Und auch sehr speziell für die Familie Wüstefeld, Danke meine liebe Laura!!!

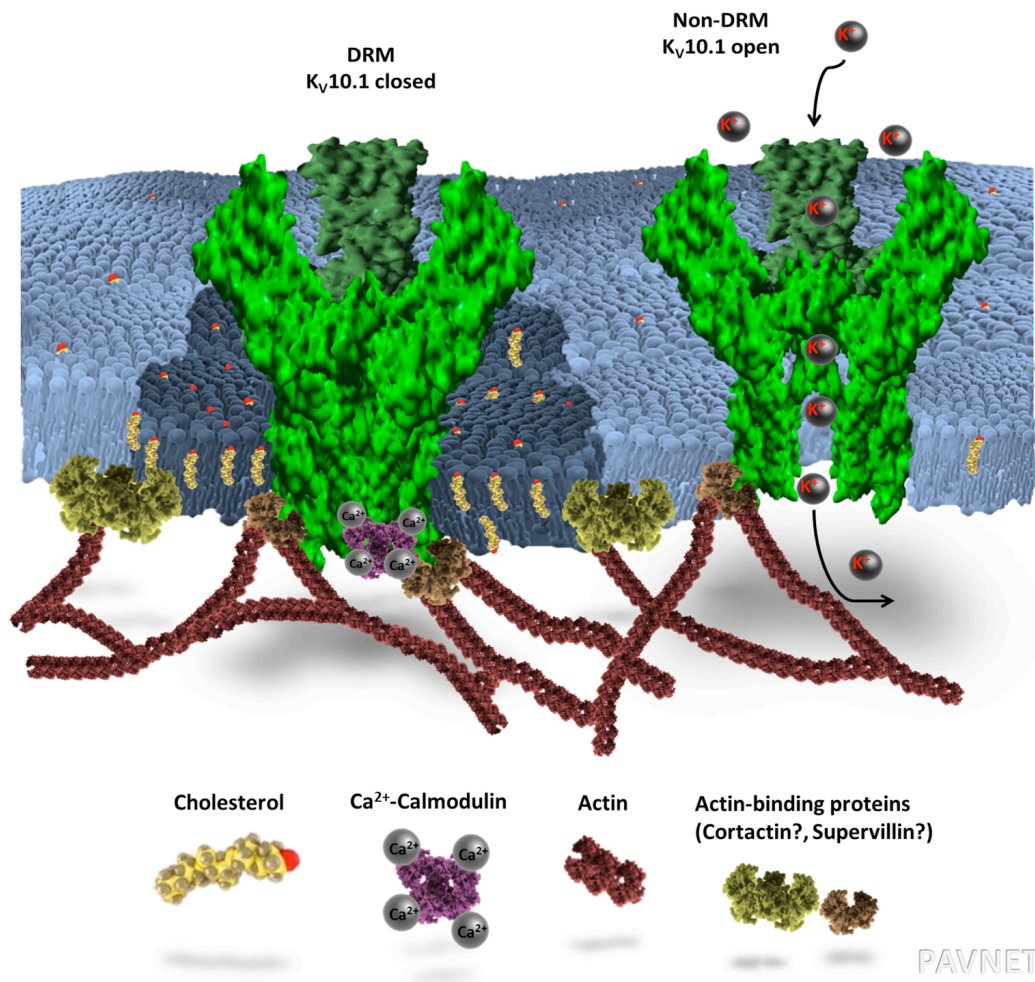
Para tooooooodo el departamento MBNS en el Max Planck Institut für Experimentelle Medizin en Göttingen Alemania, les mando toda mi gratitud hasta el otro lado del mundo, fui muy feliz en compañía de todos uds. Especialmente a Walter, gracias por ser un excelente guía y amigo!; también a Luis, Ara, Víctor, Roser y a todo el barrio latino!

Y gracias a la hermosa personita que recientemente entró a mi vida cambiando mi mundo y haciéndome la mujer más feliz del mundo, te amo y espero que la vida nos tenga preparadas hermosas sorpresas.

PREFACIO

Esta tesis es el resultado de una colaboración entre dos grupos de trabajo, el de la Dra. Alicia Ortega en la Facultad de Medicina de la UNAM en México y el del Dr. Walter Stühmer en el Max-Planck Institut für Experimentelle Medizin en Alemania. Las áreas de investigación de ambos colaboradores se fusionaron para poder realizar el estudio de las membranas y sus diferentes dominios (Dra. Ortega) con respecto a la proteína $K_v10.1$ (Dr. Stühmer). Ambos temas son actualmente de gran importancia en la investigación biomédica actual en laboratorios de todo el mundo y aportan avances importantes tanto a nivel básico como a nivel clínico. Ya que la proteína $K_v10.1$ es actualmente un blanco para herramientas diagnósticas y terapéuticas en el estudio del cáncer, esperamos que los resultados de esta tesis, ayuden en la ardua tarea para entender mejor la fisiopatología de los crecimientos tumorales asociados a la expresión de $K_v10.1$. La tesis muestra los resultados realizados en tres modelos, tejido cerebral, células con sobre-expresión y células tumorales. Las dos primeros sirvieron como control y el último como la condición patológica. Aunque la tesis no pudo ahondar más en el modelo de cáncer, por no ser el tema principal, los resultados obtenidos abren las puertas a una nueva línea de investigación donde la distribución membranal parece tener un papel importante en la regulación de la función de $K_v10.1$ y probablemente en su comportamiento diferente en células tumorales.

RESUMEN GRAFICO



RESUMEN

Los canales de potasio Kv10.1 son miembro de la familia EAG, se sobre-expresa en el tejido cerebral y están implicados casi exclusivamente en los procesos de la excitabilidad celular y de memoria, en la proliferación celular y en la progresión del tejido tumoral. Su expresión está más del 70 % de los tumores humanos, lo que hace a estos canales un blanco atractivo para el diagnóstico y la terapéutica. Aunque el papel fisiológico de este canal en el sistema nervioso central aún no se entiende completamente, el entendimiento acerca de su localización precisa en la célula pretende contribuir al entendimiento de su función e interacciones. La distribución del Kv10.1 en la membrana plasmática (PM) aislada de cerebro de ratón está asociada con las fracciones membranales ricas en esfingolípidos y colesterol. En este trabajo, se demuestra la presencia de por lo menos dos poblaciones de la proteína Kv10, con una relación de distribución en fracciones de membranas solubles en detergentes y una fracción asociada a membranales resistentes a los detergentes (MRD) en una relación 3:2. Esta distribución del Kv10.1 es dependiente de las concentraciones de colesterol, la integridad del citoesqueleto de actina - y la interacción del Kv10.1 con la Ca^{2+} -calmodulina (Ca-CAM). Una alteración en cualquiera de estos factores probados en modelos experimentales cambia la relación de partición del Kv10.1 en la membrana de 3:2 a 1:4. Por otro lado, la disminución de las concentraciones de colesterol en células, resulta en modificaciones de las propiedades electrofisiológicas del Kv10.1. La densidad de corriente se duplicó en las células depletadas de colesterol sin que otro parámetro haya sido afectado. Estos resultados demuestran que la distribución membranal preferente del Kv10.1 en los dominios resistentes a detergentes regula su función conductora.

ABSTRACT

K_v10.1 potassium channels are member of the EAG family, expressed almost exclusively in brain tissue and involved in cell excitability and memory processes, are also implicated in cell proliferation and tumor progression. Their expression in over 70% of human tumors makes them an attractive diagnostic and therapeutic target. Although their physiological role in the central nervous system is not yet fully understood, advances in their precise cell localization will contribute to the understanding of their interactions and function. We have determined the plasma membrane (PM) distribution of K_v10.1 in highly purified mouse brain PM fractions and its association with cholesterol- and sphingolipid-rich domains. We demonstrate that K_v10.1 shows two different populations in a 3:2 ratio, one associated to and another excluded from Detergent Resistant Membranes (DRM). This distribution of K_v10.1 is cholesterol-, actin cytoskeleton- and Ca²⁺-Calmodulin (Ca-CaM)-dependent since alteration of those factors in different experimental models changes the relationship to 1:4. We also analyzed the effect of cholesterol depletion in the electrophysiological properties of K_v10.1. Mean current density was duplicated in the cholesterol-depleted cells, without any noticeable effects on other parameters. These results demonstrate that recruitment of K_v10.1 to DRM involves its functional regulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

PM, membrana plasmática;
MRD, membranas resistentes a detergentes;
EAG, familia de canales éter a-go-go
Ca-CaM, calcio calmodulina;
CaMKII, cinasa de calcio calmodulina II;
HIF, factor inducido por hipoxia;
SNARE, Proteína NSF de unión soluble;
HERG, Gen relacionado al EAG humano,
HEK, riñón embrionario humano;
GalCer, galactosilceramida;
GM1, monosialotetrahexosilgangliosido1;
TCA, ácido tricloroacético;
Cav-1, caveolina-1;
Flot-2, flotilina-2;
TfR, receptor de transferrina;
GM130, marcador de Golgi 130;
TRAP α , proteína asociada al translocon alfa;
MBP, proteína básica de la mielina;
PLP, proteína proteolipídica;
Lat-A, latrunculina A;
BTX, bungarotoxina;
RSA, Actividad específica relativa;
Gfap, proteína glial fibrilar ácida;
Alf1, factor inflamatorio de injerto1;
Olig2, factor de transcripción del oligodendrocito2;
Mtap1, Proteína asociada a microtúbulos 1;
Syn, sinaptofisina;
LPR-1, receptor de lipoproteína 1

LISTA DE FIGURAS

Resumen Gráfico p.7

Figura 1.1 Estructura de canales de potasio, p.15

Figura 1.2 Filogenia de canales de potasio, p.18

Figura 1.3 Familia de canales EAG, p.24

Figura 1.4 Modelo de unidad alfa de $K_v10.1$, p.25

Figura 1.5 Expresión de $K_v10.1$ en tejidos, p.26

Figura 1.6 Modelos de membrana plasmática, p.33

Figura 1.7 Fases de la membrana plasmática, p. 34

Figura 1.8 Canales de potasio y MRD, p.40

Figura 5.1 Modelo de protocolo para MP, p.49

Figura 5.2 Caracterización de MP, p.51

Figura 5.3 Expresión de $K_v10.1$ en glía, p.52

Figura 5.4 Caracterización de MRD, p.54

Figura 5.5 Co-inmunoprecipitación cav y $K_v10.1$, p.55

Figura 5.6 MRD con M β CD y Na_2CO_3 , p.58

Figura 5.7 $K_v10.1$ en MRD con M β CD y Na_2CO_3 , p.59

Figura 5.8 Caracterización de MRD en HEK, p.61

Figura 5.9 $K_v10.1$ en MRD de HEK, p.62

Figura 5.10 Caracterización de las corrientes de $K_v10.1$, p.64

Figura 5.11 Efecto de EDTA y mutante C7 en MRD y $K_v10.1$, p.66

Figura 5.12 Expresión de $K_v10.1$ en DU-145, p.68

Figura 5.13 Distribución de $K_v10.1$ en MRD de DU-145, p.70

Figura 5.14 Distribución de $K_v10.1$ en HeLa y SH-SY5Y, p.70

CAPITULOS

1. INTRODUCCIÓN

I. Canales iónicos, generalidades e importancia

Los canales iónicos son proteínas que forman poros hidrofílicos a través de las membranas. Generalmente la mayoría de estas proteínas tienen poros muy angostos y selectivos en las membranas de animales y plantas, y regulan su apertura y cierre de una manera muy fina. Su eficiencia en el transporte de iones es muy alta y pueden transportar hasta 100 millones de iones en un segundo. Puesto que no utilizan alguna fuente de energía, el transporte que ellos facilitan es siempre pasivo (“cuesta abajo”). De esta forma su función se puede resumir como el permitir la difusión rápida de iones inorgánicos específicos, principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , y Cl^- , bajo el efecto de su gradiente electro-químico a través de bicapas lipídicas. La capacidad de regular el flujo de iones por medio de estos canales es esencial para muchas funciones celulares tanto en la membrana plasmática como en membranas internas. Dos características principales que los distinguen de otro tipo de poros en la membrana (como las porinas ó uniones tipo gap) es su filtro de selectividad y su regulación de compuerta. [1]

El filtro de selectividad es la porción más estrecha del canal que permite el paso de los iones casi siempre en fila única sin sus moléculas de agua asociadas. Este filtro también funciona como el factor limitante en la capacidad de transporte de cada canal. La regulación de compuerta hace que el canal no esté continuamente abierto y regula los cambios de conformación de la proteína entre los estados abierto, cerrado e inactivo. Dependiendo del factor que determine la regulación de compuerta los canales iónicos se pueden dividir en dos grandes familias: Canales iónicos dependientes de voltaje y canales iónicos dependientes de ligando. La primer familia cuenta con nueve miembros según la **International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR)** y comprende a los Cav (canales de calcio dependientes de voltaje), Nav (canales de sodio dependientes de voltaje) y los Kv (canales de potasio dependientes de voltaje, Figura 1.1), entre otros. En la segunda familia existen siete miembros donde se encuentran, por ejemplo, los canales iónicos acoplados a receptores de neurotransmisores. En total, más de cien tipos de canales iónicos han sido descritos y la lista sigue creciendo. Estas proteínas son las responsables de la excitabilidad de las células musculares y son las mediadoras de las señales eléctricas

en el sistema nervioso, así como de mantener el potencial de membrana en reposo de todas las células. [1]

El potencial de membrana representa la diferencia de cargas eléctricas a los lados de la membrana generado por un exceso de cargas negativas en el interior de la célula en comparación con la matriz extracelular. Debido a la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en la membrana plasmática, las concentraciones de sodio intracelulares se mantienen bajas, por lo que otros cationes tienen que abundar para equilibrar a las moléculas aniónicas intracelulares que están confinadas dentro de la célula. El principal catión intracelular es el potasio y juega un papel fundamental en la generación del potencial de membrana debido a sus canales de fuga (K^+ -leak) que permiten el paso libre del ion. Debido a las cargas negativas internas (gradiente eléctrico) el potasio tiende a entrar a la célula, pero una vez que la concentración intracelular supera la extracelular, el gradiente químico lo induce a salir de ésta. A cierta concentración (140 mM intracelular y 5 mM extracelular) el potasio se mantiene en equilibrio electroquímico (potencial de equilibrio del potasio) donde no hay movimiento neto del ion y la carga intracelular se mantiene negativa con respecto al exterior. Este equilibrio se refleja en el potencial de membrana en reposo de la célula y oscila entre los -50 y -100 mV si tomamos como cero al medio extracelular y añadimos la pequeña influencia de otros iones como el sodio y el cloro. Sin embargo, entre tejidos y organismos los rangos pueden variar, así como también la influencia de los otros iones. Debido a que el potencial de membrana en reposo tiene un valor fijo para cada célula, las variaciones en esta diferencia de cargas fueron tomadas por la naturaleza como un medio para regular distintos procesos celulares. Los principales sensores de los cambios de potencial en la membrana pertenecen a la familia de Canales Iónicos Dependientes de Voltaje y son fundamentales sobre todo en tejidos excitables como el muscular y el nervioso. En estos tejidos los canales iónicos participan en la propagación de los mensajes intercelulares a través de corrientes microscópicas autoreguladas denominadas “potencial de acción”. [2]

El potencial de acción es una despolarización súbita de la membrana ocasionada por la apertura de canales de sodio y su entrada masiva y rápida a la célula. Los cambios de potencial ocasionados promueven la inactivación de esos mismos canales y la apertura de canales de potasio para que el proceso se autolimita y el potencial regrese a su estado basal. Las corrientes generadas por el flujo de iones se propagan a través de las largas membranas neuronales y musculares y culminan en la generación de

efectos intracelulares más complejos como la señalización intracelular mediada por neurotransmisores o la contracción muscular. Otros procesos en tejidos no excitables como la división y fusión celular, la fecundación, la exocitosis y el movimiento celular también requieren de la participación de canales iónicos no solo en la membrana plasmática sino en membranas internas. La variabilidad de expresión de canales iónicos en los diferentes tejidos para procesos específicos juega un papel fundamental en la homeostasis de los organismos, fallas de un solo aminoácido pueden llevar a la muerte del mismo y la lista completa de todos los canales, así como su papel en las diferentes células falta aún por completarse. [2]

(b) Tetrameric channel

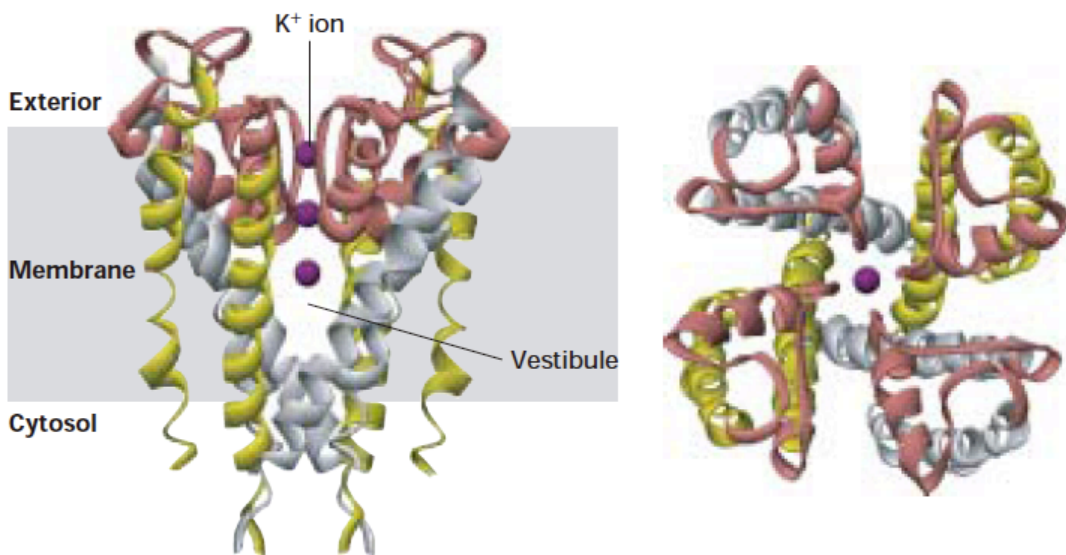


Figura 1.1. Estructura de los canales de potasio dependientes de voltaje [1].

II. La familia de canales de potasio dependientes de voltaje (K_V)

a. Descripción y generalidades electromecánicas

La familia de las subunidades principales (alfa) de los canales de potasio son por mucho la mayor y más diversa de todos los canales iónicos. Esta diversidad se origina en parte por el gran número de genes que codifican para las subunidades alfa, pero también por otros procesos como el empalme alternativo, el ensamble heteromérico y las modificaciones postraduccionales, que aumentan la versatilidad de las funciones. Los primeros componentes moleculares de los canales de potasio se identificaron hace poco más de dos décadas con métodos de clonación molecular y el número de moléculas clonadas y caracterizadas ha crecido a pasos agigantados desde entonces.

Los canales K_V (potasio dependientes de voltaje) pertenecen a la familia de canales de cationes voltaje dependientes, que también incluye a los Ca_V y a los Na_V . Todos los miembros de esta familia contienen seis segmentos hidrofóbicos por subunidad (S1-S6) y cinco regiones de enlace; en el caso de los K_V el canal se forma generalmente de homotetrámeros, mientras que en las otras subfamilias los 4 segmentos están unidos en una misma proteína. El canal consta de un poro central conductor de iones formado por los segmentos transmembranales S5-S6 y el asa P entre ambos. El acceso al poro conductor se controla por una compuerta formada por la región C-terminal del segmento S6 que obstruye el poro cuando el canal está cerrado. El asa P forma la parte extracelular del embudo hacia el poro, de menor tamaño, que forma el filtro y está altamente conservado en todos los K_V [3]. La habilidad del filtro de seleccionar iones de potasio y no dejar pasar cationes menores como el sodio, reside en los oxígenos de grupos carbonilo de los residuos de glicina localizados en una secuencia Gly-Tyr-Gly que se encuentra en la misma posición en el poro en todos los K_V conocidos. Los aminoácidos del poro forman una cavidad con carga y diámetro óptimo para el tamaño del ion potasio deshidratado y la energía de activación es mínima cuando el ion atraviesa, favoreciendo así el paso de potasio mil veces más que el del sodio. En el caso del calcio, el ion es demasiado grande para atravesar el poro [1].

Los segmentos S1-S4 forman el sensor del voltaje y el cuerpo del canal y presentan mayor variabilidad no solo entre especies sino entre los diferentes tipos de canales de potasio. La manera en la que el canal detecta los cambios de voltaje de la

membrana para cambiar su conformación ha sido tema de interés para muchos investigadores y hasta la fecha no hay una teoría definitiva que explique cómo ocurren la apertura, el cierre y la inactivación. Cada sensor de voltaje se compone de cuatro a seis residuos básicos separados por dos hidrofóbicos. Esto crea una superficie cargada positivamente a lo largo del S4 responsable de la sensibilidad al potencial de membrana. El S4 está en contacto parcial con el ambiente lipídico, pero la superficie cargada está en dirección a las otras hélices del sensor S1-S3. El sensor de voltaje y el dominio del poro están unidos por el asa S4-S5. Una característica de la apertura y cierre de los canales es que el S4 atraviesa diferentes estados cerrados antes de entrar al estado activado. Una vez que los cuatro sensores se activan, el poro se abre por cooperatividad. El movimiento del sensor puede ser detectado eléctricamente como las corrientes de apertura causadas por el re-arreglo de sus cargas electrostáticas con respecto al campo eléctrico. Actualmente el modelo de apertura de los canales postula que las cargas positivas de S4 se estabilizan por interacciones pareadas con cargas aniónicas de S1-S3 alineadas frente a él. Durante la activación, las cargas positivas “brincan” de una carga negativa a otra llevando al cambio conformacional. El S4 se inclina en la membrana, rota sobre el eje de su hélice y realiza una translación vertical y radial. Esto genera cambios conformacionales en S5 y S6 que abren el poro y permiten el paso de iones. Sin embargo, muchos aspectos de este mecanismo faltan aún por aclararse [1].

La familia completa de los K_V se enlista en la Figura 1.2. Basado en la clasificación del IUPHAR [4]. Además de la identificación genética de los canales, existen una gran cantidad de moléculas activadoras e inhibidoras que permiten una caracterización muy específica de las corrientes por medios electrofisiológicos. Inhibidores inespecíficos como la 4-aminopiridina (4-AP), el tetraetilamonio (TEA), la kaliotoxina, KN-93 y el clorhidrato de AM92016 permiten englobar una corriente recién detectada dentro de la familia de los K_V , mientras que compuestos como el astemizol ($K_V11.1$ y $K_V10.1$), la dofetilida ($K_V11.1$), DPO-1 ($K_V1.5$), la margatoxina ($K_V1.3$) y el clordihidrato de linopiridna (K_V7) permiten asignar una subfamilia de K_V a la corriente en estudio. La confirmación por métodos de biología molecular más dirigida permitirá clasificar las corrientes de manera precisa. La expresión de los K_V en muchos sistemas aún desconocidos y su caracterización molecular y biofísica, así como su función en la excitabilidad o en señalización intracelular, es un área muy vasta que sigue siendo explorada.

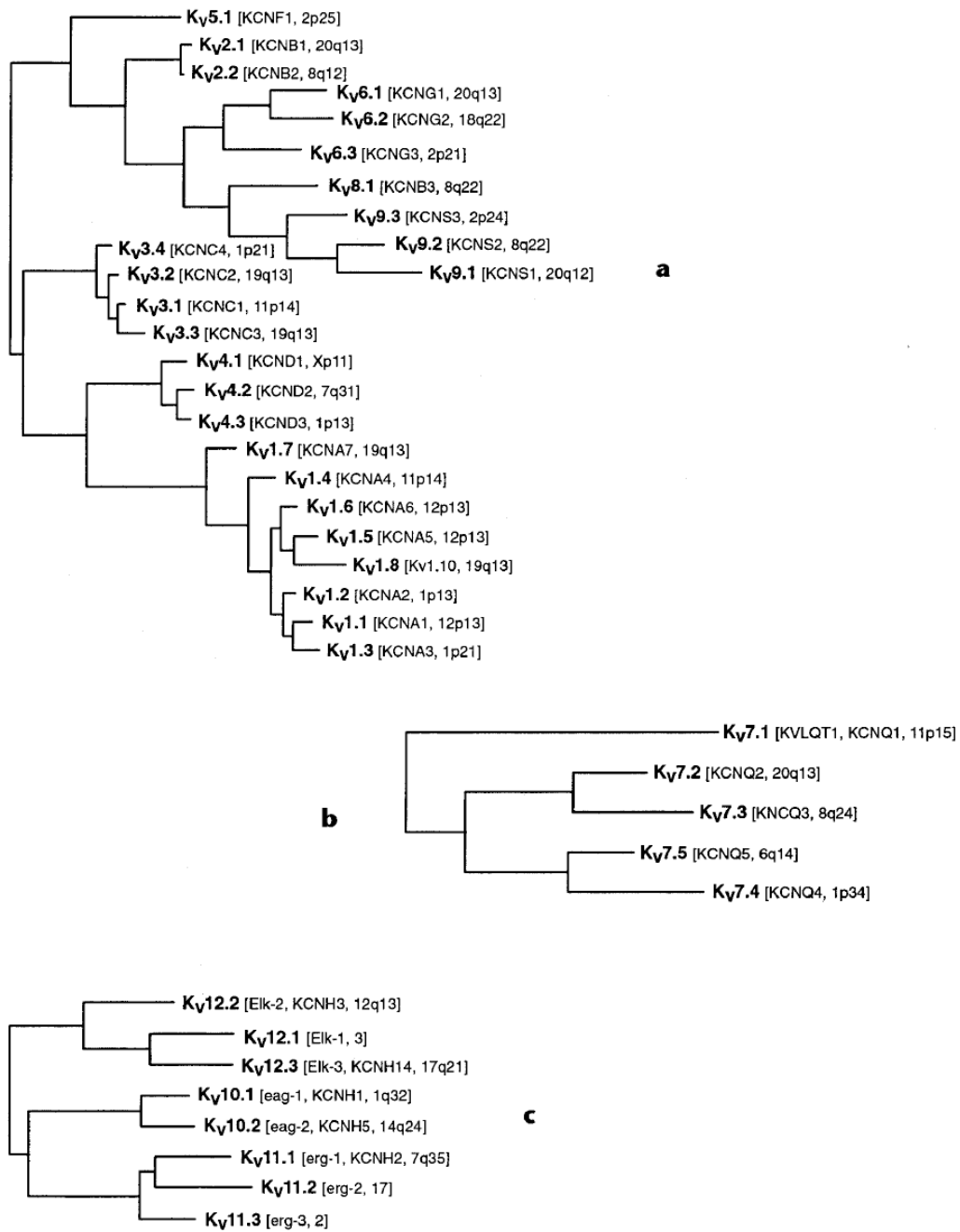


Figura 1.2. Árboles filogenéticos de los canales de potasio dependientes de voltaje. a, familias K_V1-K_V6 y K_V8-K_V9; b, familia K_V7; c, familias K_V10-K_V12. [4]

b. Localización y función

Los K_V se localizan principalmente en los tejidos excitables, es decir nervioso y muscular, sin embargo en las últimas dos décadas se ha observado que también juegan un papel importante en el tejido epitelial y en algunas células del tejido conectivo. Además de su participación en el potencial de acción, regulan funciones de división celular, apoptosis, y señalización intracelular. A continuación revisaremos su función en los diferentes tejidos del cuerpo.

Nervioso: En las neuronas los canales de potasio representa la familia más grande de canales iónicos y en conjunto participan en una gran cantidad de procesos celulares. La contribución de los canales de potasio al patrón de conducción de una neurona depende de los tipos de corrientes de potasio que contiene, las propiedades funcionales de dichas corrientes y la cantidad de corrientes que se emiten. Tratar de entender la contribución de estos canales en la excitabilidad neuronal se torna complicado si tomamos en cuenta que hay más de 100 tipos de subunidades alfa con el potencial de combinarse entre sí y además diferentes combinaciones con las subunidades beta. Sin embargo, en los últimos años se han logrado avances considerables en el área y la combinación de métodos de biología molecular en conjunto con la electrofisiología han permitido asignar una identidad estructural-funcional a cada uno de los K_V en las diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC). Los K_V muestran una expresión diferencial en las regiones del cerebro así como dentro de una misma neurona, además generan corrientes esenciales para la repolarización del potencial de acción, para determinar la forma del potencial de acción y para la integración sináptica. Dependiendo del tipo de corrientes los K_V se pueden clasificar en los tipo A y en los rectificadores tardíos. Los canales tipo A se activan a voltajes por debajo del umbral del potencial de acción y se inactivan rápidamente ante una despolarización. De esta manera regulan el ritmo de la generación de espigas eléctricas únicas y en tren. Las subfamilias que emiten este tipo de corrientes en condiciones de homotetrámeros son: $K_V1.4$, $K_V3.4$ y los K_V4 . Además, otros miembros de la familia K_V1 que son rectificadores tardíos, puede sufrir inactivación rápida en la presencia de subunidades $\beta 1$. En interneuronas estriatales colinérgicas, espinosas del striatum medio y neuronas pálidas y basales frontales se han hechos estudios que han podido evidenciar la expresión de miembros de la subfamilia K_V4 que generan corrientes tipo A y además el número de mRNA de los

canales correlaciona linealmente con la cantidad de las corrientes. Estudios en el hipocampo han mostrado que las corrientes A de esa región se deben a los subtipos $K_V4.2$ y $K_V4.3$. Además, estudios donde se silencian los genes o se expresan mutantes dominantes negativos han mostrado la disminución de corrientes A en neuronas de roedores, confirmando así la relación entre dichas corrientes y las subunidades de los canales K_V4 .

Los rectificadores tardíos emiten corrientes que tardan más tiempo en llegar a su conductancia máxima y son ubicuos en las neuronas. Existen por lo menos 5 subfamilias de genes que codifican para corrientes tipo rectificador tardío en sistemas de expresión heteróloga: K_V1 , K_V2 , K_V3 , eag y K_V7 . En general se ha visto que este tipo de canales predomina en las interneuronas mientras que los tipo-A predominan en las neuronas piramidales. Al analizar el papel del rectificador tardío $K_V3.1$ en neuronas que emiten espigas rápidas se observó que su umbral de activación alto (-20 mV) y su cinética de inactivación rápida (<1 ms) lo hacen ideal para moldear espigas angostas e intervalos inter-espiga cortos, sin afectar la altura de la espiga y el umbral de la misma; al hacer espigas angostas la inactivación de los canales de sodio se reduce, lo que también potencia la actividad de espigas rápidas [5].

La caracterización electrofisiológica de corrientes únicas en neuronas es todavía un reto para los investigadores debido a la gran cantidad de canales que expresan y la falta de inhibidores específicos para silenciar las otras corrientes, sin embargo, la expresión en sistemas heterólogos ha sido y sigue siendo la herramienta diaria del neurobiofísico.

Muscular: Los K_V se encuentran principalmente en el tejido muscular liso y cardíaco. En el músculo liso están presente en el lecho vascular, entre otros sitios, y juegan un papel importante en la regulación del tono vascular. Se activan por despolarización, contribuyen al potencial de membrana y se inhiben por algunos vasoconstrictores.

En el músculo cardíaco existen marcadas diferencias regionales en la amplitud y duración de los potenciales de acción. Estas diferencias impactan en la propagación del impulso eléctrico y afecta la dispersión de la repolarización de los ventrículos. A pesar de que una neurona y un miocardiocito expresen el mismo K_V , las corrientes, la formación del potencial de acción y su regulación pueden variar, principalmente por la co-expresión de otros canales y proteínas reguladores, dando así más variabilidad a la función de los K_V [6, 7].

Epitelial: Recientemente se ha demostrado que las células epiteliales de varios órganos expresan una diversidad considerable de subunidades alfa de K_V . A diferencia de las neuronas y el músculo, las células epiteliales no general típicamente potenciales de acción ni muestran cambios dinámicos en el potencial de membrana, necesario para la activación de los K_V . Además, el hecho de que muchos de los K_V expresados en epitelios muestran inactivación, sugiere que sus actividades son relativamente transitorias, haciendo difícil adjudicarles una única función como transportadores de iones. Estudios más profundos en el tema han encontrado otras funciones de los K_V que incluyen: migración celular, cicatrización, proliferación celular, cáncer, apoptosis y detección de niveles de oxígeno. Actualmente se conoce la identidad de muchos de los canales expresados en diferentes epitelios como se muestra en la tabla 1.

Tipo de epitelio	Canal	Referencia
Alveolar	Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv2.2, Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3, Kv9.3 (mARN) Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3 (proteína)	Lee et al. (2003)
Intestinal	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv4.3, Kv9.3 (mARN)	Rao et al. (2002)
Plexo coroide	Kv1.1, Kv1.3 (proteína)	Speake et al. (2004)
Papilar renal	Kv1.2 (mARN)	Volk et al. (1994)
Conrenal	Kv2.1, Kv3.4 (proteína)	Wang et al. (2004)
Conducto colector interno renal	Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 (mARN) Kv1.1, Kv1.3 (proteína)	Escobar et al. (2004)
Carcinoma escamoso oral	Kv3.4	Lew et al. (2004)
Próstata	Kv1.3, Kv1.4, Kv1.6 (mARN, proteína)	Fraser et al. (2003)
Cáncer de mama	Kv1.3	Abdul et al. (2003)
Carcinoma colónico	Kv1.3	Abdul and Hoosein (2002)
Adenocarcinoma cervical	Kv2.1, Kv9.3	Suzuki and Takimoto (2004)

Tabla 1. Tipos de epitelio y expresión de K_V . Modificado de [8]

Conjuntivo: En el tejido conjuntivo la expresión de los K_V ha sido menos estudiada que en los demás tejidos. La atención se ha centrado principalmente en un tipo de células: los linfocitos. Desde que Spencer et al. describieron por primera vez al $K_V1.3$ en linfocitos T y B en 1993, una nueva puerta fuera de los tejidos excitables se abrió para los K_V y surgió la inquietud de buscar los K_V en más células de los tejidos epitelial y conjuntivo. A veinte años de la primera descripción, hoy en día se conoce la expresión de canales de calcio, magnesio, zinc, potasio y cloro. La participación de los K_V en estas células, representada por el $K_V1.3$, es principalmente importante para generar la fuerza motriz necesaria para la entrada de calcio, ion fundamental para la proliferación y activación de los linfocitos. La hiperpolarización de la membrana activa al $K_V1.3$ y la salida de potasio hiperpolariza más la membrana y promueve la entrada de cationes, principalmente calcio. Hoy en día el uso de moduladores específicos para estos canales ayudan en el tratamientos de enfermedades autoinmunes [9].

III. El canal K_V 10.1 ó éter-á-go-go1 (Eag1)

a. Características estructurales y funcionales

El canal $K_V10.1$ se codifica por el gen *KCNH1* y además de pertenecer a la subfamilia K_V10 de los K_V junto con $K_V10.2$, también es considerado miembro a la familia EAG (éter-a-go-go), que es una clasificación basada en el locus EAG de *Drosophila* que genera un fenotipo con temblor en las piernas estimulado por el éter cuando se muta. En mamíferos existen ocho genes de esta familia y se pueden dividir en tres subfamilias: *eag*, *erg* (EAG related gene) y *elk* (Eag-like K channel) [10] (Fig. 1.3.). Miembros de la misma subfamilia comparten 50-70 % de similitud en su secuencia, mientras que entre familias solamente el 30-40 %. La secuencia de aminoácidos codificada por esta familia de genes contienen dominios formadores de poro y sensores de voltaje tal como la familia de canales tipo Shaker, pero también tienen dominios de unión a nucleótidos cíclicos similares a los canales de potasio dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG), con los cuales tienen más relación filogenética que con los K_V . Durante décadas, la familia EAG permaneció olvidada

por muchos investigadores y fue hasta la década de los noventa donde resurgió el interés por estos canales.

Cada subunidad alfa de $K_v10.1$ consta de 962 aminoácidos en el humano. Cuenta con los segmentos S1-S6 que forman el sensor de voltaje y el poro, pero son sus porciones intracelulares N-terminal y C-terminal, especialmente largas, las que lo distinguen de otros K_v . En el dominio N-terminal, el $K_v10.1$ contiene un dominio Per-Arnt-Sim (PAS). Este tipo de dominios se encuentra generalmente en proteínas nucleares y actúan como sensores de luz, de hipoxia o del potencial redox, como por ejemplo en la proteína Period. Hasta la fecha no se ha identificado la función de este dominio en $K_v10.1$. El dominio C-terminal es casi el doble de los canales Shaker y contiene muchos dominios que probablemente interactúen con otras proteínas. Además del sitio de unión a nucleótidos cíclicos, existe una región similar al dominio autoinhibitorio de la cinasa dependiente de calmodulina II (CaMKII) que une a CaM, tres sitios probables de señales de localización nuclear (NLS), un motivo Src-homology 3 (SH3) y dos sitios de posible fosforilación por la proteína cinasa A (PKA) (Fig. 1.4).

La caracterización detallada de las propiedades electrofisiológicas de $K_v10.1$ ha permitido atribuirle una identidad única a sus corrientes y así facilitar su identificación. Las corrientes de $K_v10.1$ son salientes dependientes de voltaje que se activan entre -40 y -50 mV y aumentan conforme la despolarización aumenta. La activación es lenta y sufren sólo inactivación parcial. La porción de unión a nucleótidos cíclicos no ha mostrado tener efectos en la regulación de las corrientes. Una característica fundamental en la identificación del canal es el efecto Cole-Moore, que es el retraso en la cinética de activación cada vez más pronunciado conforme los potenciales pre-pulso se hacen más hiperpolarizados. El aumento en la concentración de iones de magnesio e hidrógeno potencia el fenómeno. Farmacológicamente el $K_v10.1$ es sensible al bario y a la quinidina, así como al antidepresivo tricíclico imipramina y al antihistamínico astemizol. Las elevadas concentraciones de calcio intracelular también bloquean las corrientes y el efecto es dependiente de calmodulina (CaM) que modula al canal mediante su unión al dominio C-terminal [11-13].

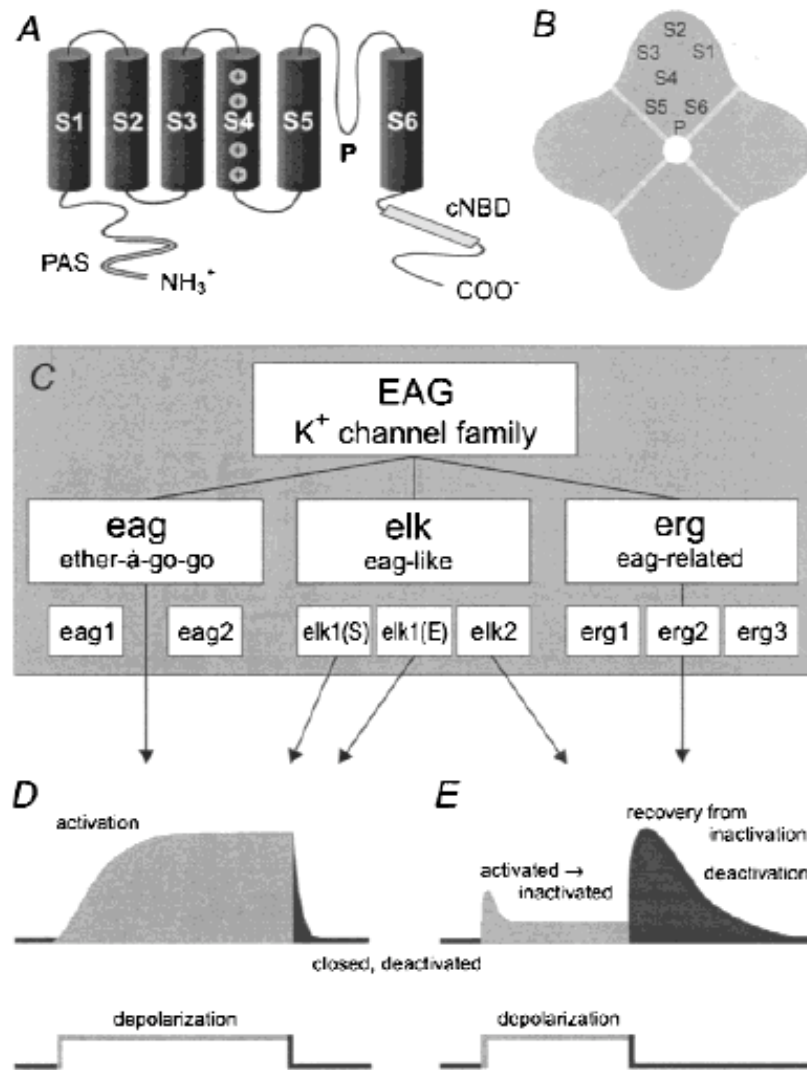


Figura 1.3. La familia EAG de canales de potasio, [10]. A. Esquema de los dominios de la subunidad alfa. B. Esquema de una vista superior de las cuatro subunidades alfa ensambladas. C. Clasificación de la familia EAG. D. Tipo de corriente que se registra para los canales eag, elk1S y elk1E. E Tipo de corriente que se registra para los canales erg y elk2.

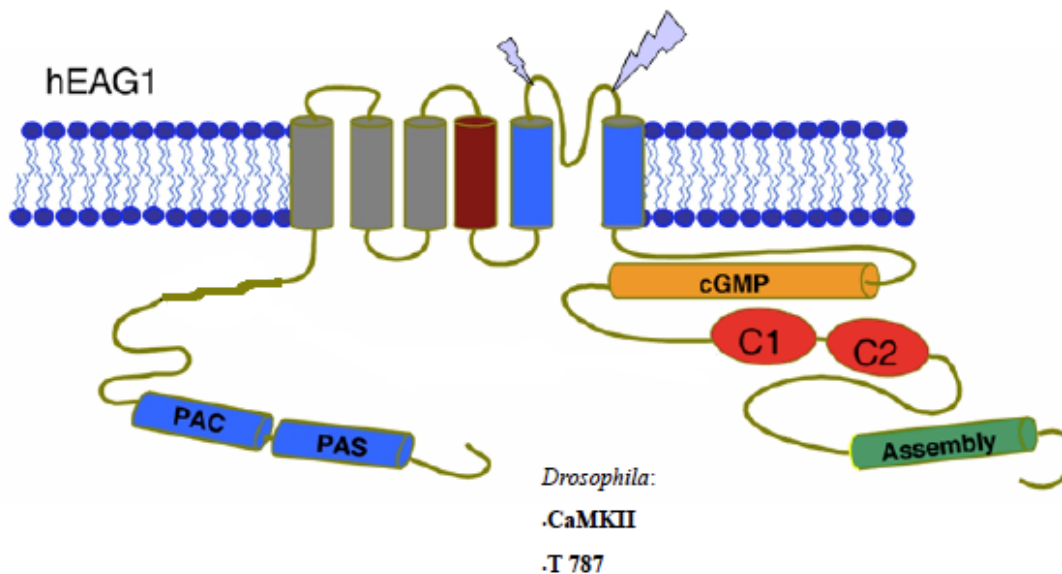


Figura 1.4. Esquema de la estructura del monómero alfa $K_V10.1$

b. Localización tisular y celular

En mamíferos el $K_V10.1$ se ha encontrado ampliamente en el sistema nervioso central incluyendo las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, la neocorteza, el bulbo olfatorio, el cerebelo y ganglios basales. Otros tejidos que también lo expresan son la placenta y los mioblastos, sin embargo su expresión en el resto de los tejidos es prácticamente despreciable tal y como se muestra en la figura 1.5.

En 1997, durante su estudio en sistemas heterólogos, se encontró que existía una regulación de la corrientes de $K_V10.1$ por inductores mitogénicos en ovocitos de *Xenopus* y esto llevó a pensar a los investigadores que $K_V10.1$ podría estar involucrado en procesos de proliferación celular. Un par de años después, un estudio fue publicado donde un “potencial oncogénico” le fue atribuido a esta proteína. Tres hallazgos principales fueron la base de la publicación: La transfección de $K_V10.1$, y no así de otros K_V , le adjudicaba a los fibroblastos una alta tasa de proliferación y una inhibición por contacto al crecer en cajas Petri (característica de células transformadas); el $K_V10.1$ se expresaba en líneas celulares de cáncer de distintos tipos y la tasa de proliferación disminuía significativamente cuando el gen era silenciado específicamente; y finalmente, los tumores en ratones SCID eran mayores y con más necrosis cuando las células injertadas expresaban el $K_V10.1$ que cuando no lo hacían. Desde entonces, se ha estudiado la expresión de $K_V10.1$ en diversos tipos de tumores y cánceres y hoy en día se sabe que se expresa en hasta el 70% de tumores humanos

de todo tipo de origen. Entre los tumores con mayor expresión se encuentran el cáncer cervicouterino, el de mama, el de próstata, el melanoma y diversos tumores del tracto gastrointestinal [14, 15].

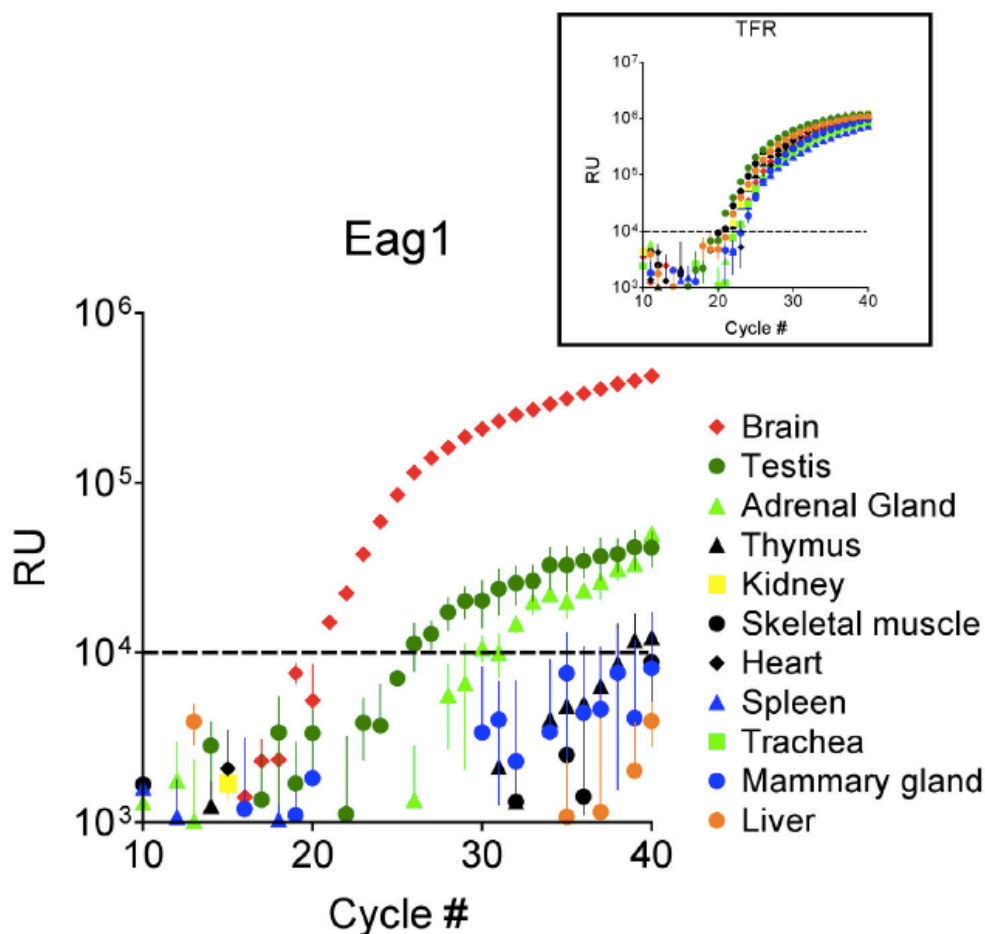


Figura 1.5. Expresión de mRNA de $K_v10.1$ en los diferentes tejidos, [14]. Recuadro: Expresión del receptor de transferrina (TFR) que se usó como control en los tejidos estudiados .

La localización intracelular de $K_v10.1$ no ha sido descrita con mucho detalle hasta la fecha. Naturalmente, su ubicación en la membrana plasmática es obvia por su naturaleza transmembranal, sin embargo hoy en día, el modelo de la membrana obliga a especificar más el compartimento preciso que ocupa dentro de este organelo. En neuronas, recientemente se encontró en la membrana presináptica y un estudio demostró que $K_v10.1$ se localiza y genera corrientes en la envoltura nuclear de células transfectadas [16, 17]. Detallar la descripción de su localización membranal en los diferentes tipos de células fue el tema principal de esta tesis.

c. Función y regulación

Las funciones de $K_V10.1$ se pueden dividir en 2 grupos, las que realiza fisiológicamente dentro del SNC y las que realiza bajo situaciones patológicas dentro y fuera del SNC. Dentro de las primeras, se observó en estudios de la unión neuromuscular en las larvas de las mutantes de *Drosophila* de EAG, que existía una hiperexcitabilidad en las células musculares, así como una regulación a la baja de las corrientes de potasio generalizada, que hasta la fecha sigue sin explicarse claramente [18]. En los noventas, otros investigadores también encontraron en las mismas mutantes, que la plasticidad sináptica y la adquisición de la memoria se ven afectada [19]. Sin embargo hasta la fecha ha sido casi imposible determinar la función específica de $K_V10.1$ en las diferentes regiones del SNC. Los efectos en la memoria causados por la mutación del canal en las moscas podrían ser explicados por su localización en el hipocampo en mamíferos, sin embargo, estudios de comportamiento no han evidenciado ninguna alteración en la memoria en murinos [20]. Un estudio reciente demostró la expresión de $K_V10.1$ en neuronas dopaminérgicas de ganglios basales, lo cual sugiere que $K_V10.1$ puede estar involucrado en el control motor a nivel del SNC y no solo en la unión neuromuscular [21]. La importancia de sus corrientes en el potencial de acción o en la liberación sináptica de neurotransmisor no ha podido esclarecerse hasta la fecha, aunque su descripción en la membrana presináptica de neuronas hipocámpales apunta hacia una participación en la transmisión sináptica. Por otro lado, en sistemas heterólogos existen avances considerables en cuanto a su función. Los primeros estudios se enfocaron en sus corrientes y la regulación de las mismas por distintos fármacos, anticuerpos y moléculas intra- o extracelulares. De esos estudios se conoce la sensibilidad de sus corrientes a la imipramina, astemizol, anticuerpos contra el poro, magnesio extracelular, calcio intracelular, CaM, CaMKII, cambios estructurales del citoesqueleto, factores promotores de la mitosis y ácido araquidónico [12, 22-25]. Posteriormente los estudios se enfocaron a determinar su papel en el efecto proliferativo que inducía al transfectarse en distintas células. Un estudio determinante fue el de Hegle et. al del 2006 donde se demostró que la mutante EAG-F456A que impide el paso de iones potasio en el $K_V10.1$ de *Drosophila*, induce el mismo nivel de proliferación al ser transfectado en fibroblastos [26]. Este hallazgo marcó la pauta para dejar de lado la función conductora de $K_V10.1$ en el efecto proliferativo y

enfocarse a los dominios intracelulares y su interacción con otras moléculas señalizadoras.

Para entender el papel de $K_V10.1$ fuera del SNC como “oncogen” o inductor de la proliferación son claves dos aspectos. Primero, identificar los factores involucrados en la regulación de la expresión que generan la transcripción del gen *KCNH1*, así como las circunstancias que provocan la acción de dichos factores. Segundo, conocer la serie de vías activadas que ayudan a sostener la proliferación y que desencadena la presencia de $K_V10.1$ en la membrana plasmática. Respecto al primer punto existe evidencia de que cada vez que una célula recibe un estímulo de proliferación o pérdida de la diferenciación, se promueve la transcripción de $K_V10.1$. Factores como los estrógenos, oncogenes del virus del papiloma humano E6/E7 o la pérdida de la expresión de los antioncogenes VHL y p53 aumentan la expresión del canal [27]. El promotor fue descrito recientemente, 152 pares de bases antes del codón iniciador de la traducción, sobre el cual E2F1 demostró ser un factor de transcripción involucrado en su expresión, que lo activa ante la ausencia de p53 [28]. Bajo esta premisa, los tumores iniciados por mutación del p53 (alrededor del 50 % de los carcinomas agresivos) deberían de expresar $K_V10.1$, sin embargo, ningún estudio al respecto se ha realizado hasta la fecha. Además, el mecanismo de regulación de expresión en el cerebro, debe diferir grandemente del encontrado en el resto de las células, puesto que las neuronas están en su mayoría arrestadas en G1 y no proliferan; la orden para la transcripción del *KCNH1* debe provenir de otras moléculas, que actualmente se desconocen.

Respecto a la vías activadas por la expresión de $K_V10.1$, todavía queda mucho por entender. En un estudio en el *Eag1* de *Drosophila*, se observó que el canal inducía la expresión de la proteína-quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa) p38 y que cuando esta quinasa era bloqueada específicamente el efecto proliferativo de *Eag1* desaparecía, indicando así una posible vía efectora del $K_V10.1$ [26]. Sin embargo, esto no ha sido demostrado en las variantes de mamíferos. En la variante de *Drosophila* también se ha observado que la actividad de CaMKII se regula por su unión a *Eag1* en su dominio C-terminal [29]. Esta quinasa está involucrada en las vías de regulación de la potenciación a largo plazo y memoria. Una vez más, la relación de ambas moléculas y su rol en la consolidación de la memoria en mamíferos aún no ha sido estudiada. Finalmente, estudios en células HEK-293 demostraron que $K_V10.1$ induce

la expresión del Factor Inducido por Hipoxia (HIF-1) que a su vez promueve el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la vascularización tumoral [30].

Identificar las características determinantes en la diferencia funcional del Kv10.1 en el SNC y en el resto de las células es una tarea clave en el entendimiento de su efecto proliferativo. Puesto que la secuenciación en células tumorales demuestra que se trata de la misma serie de aminoácidos que en cerebro, factores externos a su secuencia, como modificaciones post-transduccionales, unión de distintas proteínas o su asociación con distintas moléculas de membrana, podrían estar jugando un factor determinante en su función. Entender las diferencias entre ambos ambientes, daría indicios importantes en dirección a comprender tanto su función fisiológica como su rol en células tumorales.

IV. La Membrana Plasmática

a. Evolución, estructura y composición

Con el fin de desarrollarse, la vida sobre la tierra se valió de un evento muy importante que permitió el origen de la primera protocélula: la separación del medio interno y del medio externo. Para este proceso fundamental se necesitó la presencia de barreras biológicas o membranas. Dos características de la membrana fundamentales para la supervivencia de los organismos: una permeabilidad selectiva y la capacidad de transducir señales externas. Estas propiedades son el resultado de la interacción entre los lípidos y proteínas de membrana, siendo los primeros las moléculas clave para su estructura y su origen. Los lípidos anfipáticos con proporciones simétricas entre la cabeza polar y las cadenas de los acilos forman espontáneamente bicapas lipídicas, las cuales constituyen el elemento básico de las membranas biológicas [31]. Aunque hoy en día existen pocos laboratorios dedicados a descifrar cómo se originó la primera membrana biológica, todos coinciden que la formación de dicha barrera biológica constituyó un paso fundamental en el origen de la vida y que puede incluso haber precedido a los sistemas auto-replicables y auto-metabólicos. Puesto que algunos investigadores han descartado la probabilidad de que hubiera fosfolípidos en la era prebiótica de la tierra, se sabe que aquellas primeras membranas debían contener tres características básicas de una bicapa: retención del contenido, transporte a través de ella y adquisición de energía. En un estudio se demostró que los ácidos grasos en presencia de alquilfosfatos, alquilsulfatos e hidrocarburos anfipáticos

forman bicapas bajo condiciones muy específicas y proveen el ambiente necesario para diversas reacciones químicas, compartimentalización, permeabilidad selectiva, aislamiento de catalizadores o moléculas “con información” y fusión y separación de vesículas [32].

Cualquiera que haya sido el mecanismo que originó la primer membrana, el desarrollo de esteroides fue sin duda un paso importante en la evolución de las membranas. Evidencia apunta a que las células adquirieron la capacidad de modificar su composición lipídica membranar para mejorar su interacción con el medio ambiente y la introducción de esteroides en la membrana pudo haber contribuido dramáticamente a esta plasticidad. Los esteroides cambian las propiedades fisicoquímicas de las bicapas lipídicas proporcionalmente con su concentración y aquellos que promueven la co-existencia con dominios líquidos en una membrana fosfolipídica se llaman “esteroides funcionalmente competentes” o “esteroides activos de membrana”. Para poder ser un esteroide activo de membrana la molécula necesita: 1) un sistema plano de anillos fusionados, 2) un grupo polar pequeño (tipo -OH) en la posición 3, 3) una cola tipo-colesterol, y 4) un área de interacción aire/agua mínima (<4 nm/molécula). El colesterol es el esteroide más estudiado en mamíferos, tiene preferencia por los lípidos saturados aumentando el orden al final de las cadenas y disminuyéndolo cerca de la cabeza polar. Además el colesterol es capaz de alterar las propiedades de permeabilidad de la membrana puesto que la formación de fases genera fallas dentro de la estructura, por donde el paso de moléculas se facilita. La aparición de este molécula en la membrana plasmática y sus efectos sobre ella fue sin duda un paso fundamental en la generación de membranas complejas compartimentalizadas [31].

En mamíferos, las membranas contienen hasta 2000 especies de moléculas de lípidos incluyendo esfingolípidos y esteroides. Durante décadas se ha tratado de proponer un modelo estructural y funcional que explique la diversidad de lípidos y sus interacciones con las proteínas, sin embargo, hasta el momento no existe ninguno que sea completamente aceptado o considerado como único. La naturaleza dinámica de la estructura hace difícil encasillarla en un solo esquema, sin embargo importantes avances en los detalles de su organización se han hecho y se resumen en la siguiente sección.

b. Modelos

El primer modelo que conceptualizó a la membrana como una bicapa lipídica y proteínas integrales embebidas en ella fue el modelo de Singer y Nicholson de 1972, denominado modelo del mosaico fluido [33]. A través de estudios de termodinámica, espectros de dicroísmo circular y rayos X, los investigadores fueron capaces de modelar una matriz de fosfolípidos homogénea donde las proteínas integrales insertaban sus alfa hélices en las porciones hidrofóbicas de la membrana, ya fuera a lo largo de su grosor o en alguna de las dos capas. Ellos propusieron una distribución al azar de las proteínas que son capaces de distribuirse uniformemente en la membrana a través de difusión. Además, demostraron que la membrana es asimétrica a lo largo de la superficie, debido al glucocálix que está solamente del lado extracelular. Este modelo prevaleció como el único modelo de membrana durante décadas y a pesar de que existían avances en las propiedades fisicoquímicas de las bicapas lipídicas artificiales, su correlación con las membranas biológicas para proponer un nuevo modelo de la membrana tardaría un par de décadas más.

En 1997 Simons e Ikonen publicaron un artículo en la revista *Nature* denominado “balsas funcionales en las membranas celulares” donde propusieron un nuevo modelo de la membrana plasmática basado en la compartimentalización de la superficie basado en las propiedades fisicoquímicas de fosfolípidos saturados y colesterol. A diferencia del modelo del mosaico fluido, donde la interacción lípido-proteína era considerado intrascendente y la fluidez generaba una distribución aleatoria de las proteínas, el modelo de las balsas lipídicas propone la generación de fases líquido-ordenadas dentro de dominios más fluidos gracias a su contenido rico en esfingolípidos y colesterol, donde la interacción lípido-proteína es trascendental para la estructura y función de ambos componentes y las proteínas se agrupan y organizan gracias a las plataformas lipídicas que las contienen [34]. A pesar de la gran aceptación del modelo en las grandes áreas de las ciencias biomédicas como la inmunología, microbiología y oncología, entre otras, las discrepancias de resultados entre las distintas metodologías genera todavía mucha polémica con respecto a dos puntos: si realmente existen en las células vivas, cual es su tamaño y si los métodos de extracción de estos dominios obtienen realmente lo que se encuentra en las células vivas. Con el tiempo la duda sobre la existencia es cada vez menor, la agrupación de moléculas es evidente no sólo en la membrana plasmática sino en cada compartimento de la célula. Por lo tanto, la agrupación de ciertos lípidos y proteínas

en la membrana es algo que parece incluso inevitable. Que estas agrupaciones moleculares encajen completamente con el modelo propuesto de las balsas lipídicas en todas las células, falta por confirmarse con más detalle, sin embargo todo parece apuntar que el modelo es en esencia correcto y evidencia con tecnología de alta resolución lo apoya [35, 36]. Con respecto al tamaño, estos mismos avances tecnológicos los han ubicado en tamaños de decenas de nanómetros en condiciones basales, y de hasta micrómetros en condiciones de inducción donde se lleva a cabo la coalescencia [37]. Finalmente, las discusiones con respecto a si las balsas lipídicas están correctamente representadas con los métodos de extracción actuales (Membranas Resistentes a Detergentes, ver siguiente sección) es todavía incierto. Es difícil preservar una estructura tan dinámica y pequeña intacta con métodos bioquímicos, sin embargo, diferentes experimentos que combinan bioquímica con técnicas de alta resolución óptica confirman que las mismas moléculas son encontradas en los dominios por ambas metodologías.

Recientemente, un nuevo modelo denominado “orden jerárquico a mesoescala de la organización de los dominios de la membrana plasmática” salió a la luz guiado por el grupo del Dr. Kusumi [38]. En este nuevo modelo el factor más novedoso es la introducción de un nuevo participante clave en la organización de la membrana plasmática: el citoesqueleto. Desde 1972 la conexión de la membrana plasmática con el resto de la célula se había dejado de lado, asumiendo simplemente que envolvía todo el contenido sin ningún tipo de anclaje. Gracias a los avances tecnológicos el nuevo modelo tiene evidencia “in vivo” para proponer que proteínas transmembranales actúan como postes para anclar estructuras del citoesqueleto y formar cercas proteicas que delimitan dominios jerárquicamente inferiores como las distintas fases lipídicas y oligómeros proteicos. En este modelo las proteínas tienen un anillo de lípidos específicos para su estructura y con ellos se mueven restringidamente dentro del cerco, después de un tiempo difunden hacia otro cerco donde vuelven a tener más libertad de movimiento. Si este modelo es capaz de sostenerse en todas las membranas biológicas a través del tiempo, podría representar un nuevo esquema de las membranas (Fig. 1.6)

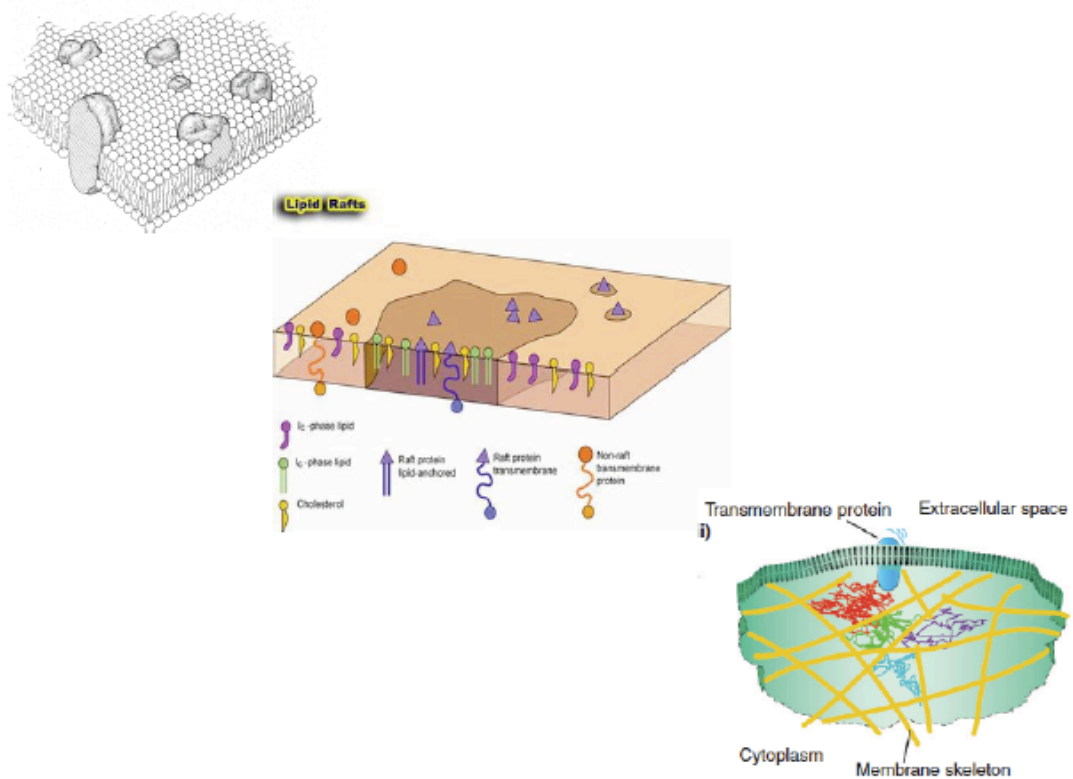


Figura 1.6. Cambios en los modelos de la membrana plasmática. [33, 38]

V. Las Membranas Resistentes a Detergentes

a. El origen del concepto

Las bicapas lipídicas tienen diferentes estados físicos, dos de los cuales son el sólido (gel ó *s*) y el líquido (fluido ó *l*). En el primero el empacamiento de las moléculas es más denso, principalmente debido a las cadenas acilos saturadas que dificultan la difusión lateral. En el estado fluido, las cadenas no saturadas tienen cadenas anguladas que generan más libertad de movimiento lateral. Existe un tercer estado físico que se ha denominado líquido-ordenado (*lo*) y comparte características tanto con el estado *s* como con el *l*. El estado *lo* fue identificado en mezclas de lípidos que contenían colesterol.

Por otro lado, la temperatura de fusión (T_m) de un lípido puro es la temperatura a la cual el estado *s* se funde al estado *l*. Una mayor T_m corresponde a un estado más ordenado, que representa más estabilidad en la membrana. El valor de T_m depende del largo de las cadenas acilo, su saturación y la naturaleza de la cabeza polar de un fosfolípido. Cadenas más largas y saturadas tienen T_m mayores y también se ha demostrado que la localización del doble enlace en las cadenas no saturadas es importante ya que disminuyen la T_m cuando están en la mitad de la cadena. Las

cadena de acilos de lípidos con altas T_m forman el estado l_o en presencia de colesterol, sin embargo la difusión lateral es tan rápida como el estado l . Los estados mencionados (s, l y l_o) pueden coexistir y formar fases como lo han mostrado estudios con diagramas de fases, figura 1.7 [39-41].

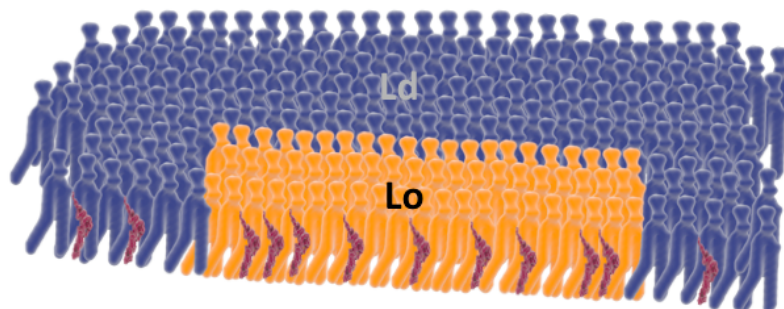


Figura 1.7. Diagrama de la coexistencia de la fase Lo y fase Ld.

En un sistema en equilibrio termodinámico la formación de fases se debe a las diferentes afinidades entre sus componentes. En una mezcla de moléculas lipídicas, la energía libre de Gibbs (G) entre dos diferentes moléculas puede medir el grado de “aversión” entre ellas. De acuerdo a este valor la existencia de fases puede establecerse. $G < 0$ indica que ambas moléculas se mezclan favorablemente, $G = 0$ significa mezcla al azar, $G > 0$ es para la segregación en fases. Los factores que influyen en el valor de G dependen de la naturaleza de las moléculas involucradas (incluyendo proteínas transmembranales) en la formación de la membrana. Hasta ahora los factores más importantes detectados son: 1) La discordancia del grosor de la parte hidrofóbica de los componentes, 2) la naturaleza de los residuos de aminoácidos de la región transmembranal de las proteínas, 3) la concentración de colesterol, 4) intracciones de van der Waals, y 5) la entropía de las cadenas de lípidos. La dependencia de G en estos factores ha sido demostrada en varios estudios que demuestran la coexistencia de fases. Estudios de espectroscopía detectaron las fases s , l y l_o en bicapas con esfingomiélin y colesterol. Sin embargo la interacción detallada entre ambos componentes ha sido difícil de describir [42, 43].

Un paso fundamental en la extrapolación de las fases de bicapas a los modelos biológicos fue el descubrimiento de una característica importante de las membranas con segregación de fases: la diferente solubilización de las fases con detergentes. El detergente más usado para generar dicha diferencia es el Tritón X-100. Las micelas de

Tritón X-100 se mezclan con las vesículas lipídicas y a partir de cierta concentración se forman micelas mixtas lípido-detergente, pero esta interacción depende fuertemente del estado físico del lípido. Una membrana que es insoluble con Tritón X-100 en un estado sólido, se vuelve soluble cuando la temperatura se eleva sobre la T_m . Sin embargo, parece que el estado sólido de las membranas necesita alejarse mucho de su T_m , puesto que estados sólidos cerca de este valor sí se solubilizan con Tritón X-100. Estos antecedentes llamaron la atención de los biólogos quienes comenzaron a realizar la separación de fases sólidas de las membranas biológicas con detergentes y las denominaron “membranas resistentes a detergentes” (MRD). Una vez que el análisis proteico mostró diferencias en la localización dependiendo de la fase y que las fases *lo* tenían incluso preferencia por ciertas zonas en células polarizadas, un nuevo campo en el estudio de las membranas biológicas comenzó a formarse y el modelo de las balsas lipídicas emergió después de varios años de experimentos [44, 45].

b. Características principales

Las MRD representaron el inicio de un nuevo enfoque de la membrana plasmática. La metodología clásica se basa en la incubación de las membranas con Tritón X-100 a 4°C (que garantiza un alejamiento considerable de la T_m) para su posterior separación por métodos de centrifugación con ayuda de gradientes discontinuos de sacarosa que por diferencia de densidades, permite la flotación de los lípidos insolubles. A pesar de las críticas a las MRD, basadas en la utilización de diferentes detergentes no iónicos que arrojan diferentes resultados, en el descenso en la temperatura necesario en la metodología y en la falta de minuciosidad en muchos estudios de utilizar solamente membrana plasmática aislada, existen muchas evidencias de que son una muy buena aproximación para iniciar el abordaje del estudio de partición de proteínas en la membrana con respecto a los microdominios lipídicos. Esto es apoyado por el hecho de que las MRD son ricas en colesterol y esfingolípidos; que cuando la membrana es alterada con extracción de colesterol, el aislamiento de las MRD se altera, es decir, las MRD representan realmente esfingolípidos y colesterol organizados en dominios; y que proteínas observadas en células vivas localizadas en dominios de GM1, son encontradas también en las MRD.

Sin embargo el hecho de que la membrana debe ser homogenizada y de que se utiliza prácticamente la misma técnica para diferentes células que difieren ampliamente en su organización membranal, contenido proteico y lipídico (neronales, musculares, epiteliales y de tejido conjuntivo), hacen esta técnica necesaria pero no suficiente para el estudio de microdominios lipídicos.

Estudios de proteómica y lipidómica han encontrado contenidos muy distintos en MRD obtenidos de diferentes células o con diferentes detergentes. Incluso células del mismo tipo en diferentes fases del ciclo celular o con diferentes grados de diferenciación (tumorales) muestran diferentes tipos de balsas lipídicas [46, 47]. Así mismo, al usar otros detergentes como Lubrol o Brij, el contenido de las MRD difiere [48]. Este tipo de resultados ha generado que surjan propuestas de que existen diferentes tipos de balsas lipídicas que son detectados por diferentes detergentes. Sin embargo, no hay evidencia de que en la célula viva existan estos “tipos” de balsas lipídicas y se trata más bien de los efectos “secundarios” de cada detergente al interactuar con las membranas que genera modificaciones en la organización de las micelas y por lo tanto del contenido lipídico y proteico que se detecta [49].

Los resultados de las MRD deben ser, por lo tanto, tomados como solo un primer acercamiento al estudio de microdominios lipídicos y deben siempre ser complementados con estudios de óptica (de preferencia de súper alta resolución) y de función.

c. Función de los dominios discretos en la membrana plasmática en los diferentes tejidos

Tomando en cuenta que las balsas lipídicas siguen siendo hoy en día solamente un modelo propuesto y no completamente confirmado, donde la estructura precisa y composición molecular queda todavía por detallarse; querer determinar la función de algo que todavía no es ciento por ciento identificado parece un poco complicado. Cuando se hace referencia a la función de las balsas lipídicas la literatura actual se basa casi en su totalidad en estudios de extracción de colesterol de la membrana plasmática. Es decir, se determina la función de cierta proteína en condiciones basales (previamente identificada como “residente” de las balsas) y posteriormente se determina esa misma función después de la extracción del colesterol. La extracción de colesterol tiene como objetivo desestabilizar o romper la estructura de las balsas y la

interpretación consiste en que los cambios detectados en la función de dicha proteína son el resultado de los cambios generados en la estructura de las balsas. Aunque esta interpretación es aceptada para proponer un mecanismo de regulación de la proteína en estudio por la estructura de la membrana, existen muchos detalles de la asociación de la proteína con los dominios, de los cambios de conformación de la proteína y por consecuencia de la verdadera función de los dominios con respecto a la regulación de la actividad de la proteína que la mayoría de los estudios sobre balsas lipídicas no consideran. La asociación de las proteínas a la membrana puede ser de distintas formas, así mismo, la asociación de una proteína a determinado compartimento de la membrana varía. Las proteínas más estudiadas se insertan a las balsas lipídicas a través de acilaciones, como las proteínas GPI, o se insertan en un solo lado de la bicapa lipídica, como las caveolinas. También se conocen casos donde la asociación a los dominios es indirecta a través de la unión a proteínas que a su vez están ancladas a los dominios. Finalmente, aunque más polémica, la inmersión de péptidos o segmentos de proteínas en los dominios membranales, también es un modelo propuesto para la asociación proteína-balsas [49]. La forma en que una proteína se asocia a los microdominios es un aspecto pocas veces estudiado, por su alto grado de dificultad experimental, sin embargo es trascendental para poder adjudicarle alguna “función reguladora” a las balsas. La metodología convencional previamente descrita, donde solamente se extrae el colesterol y se observa el cambio de función, tiene algunas desventajas, como por ejemplo algún efecto directo de la droga extractora de colesterol sobre la proteína en estudio ó que el efecto sea más bien mediado por otra proteína de anclaje y no por las balsas mismas [50]. También es posible que la extracción de colesterol no genere la disociación de la proteína con los lípidos a los que se ancla (existen núcleos de GM1 resistentes a extracción de colesterol que mantienen su estructura y podrían permanecer anclados a la proteína) [51]. Todas estas posibilidades no pueden ser descartadas mientras no se determine primero la forma en la que la proteína se asocia a las balsas y si las balsas son responsables o no de algún cambio de conformación y función en la proteína.

A pesar de estas desventajas mencionadas, hay una función que está demostrada y es de las principales descritas para las balsas lipídicas: la coalescencia de varios microdominios para generar plataformas mayores de agrupaciones de proteínas en determinadas vías de señalización. Esta generación de grupos proteicos es fundamental para que las funciones celulares se mantengan, y depende en un 100%

de la integridad del contenido lipídico y estructura proteica subyacente de la membrana [37, 38]. La generación de agrupaciones proteicas y lipídicos es un proceso conservado desde los organismos más simples y antiguos hasta los más complejos. Dos ejemplos clásicos de ellos son los que se encuentran en las sinapsis tanto neurológica como inmunológica. Ambos procesos requieren de la participación de un gran número de proteínas conglomeradas en un lugar específico de la membrana para la interacción con la siguiente célula [52, 53]. En ambos procesos se ha demostrado que la participación de las balsas lipídicas como plataformas acarreadoras de las proteínas involucradas es trascendental y que cuando las balsas son desestabilizadas con la extracción de colesterol, la membrana es incapaz de generar las agrupaciones proteicas necesarias para el proceso. Otras vías de señalización como las que involucran proteínas ras, MAPK, apoptosis o de factores de crecimiento también requieren de la integridad de dominios para poder llevarse a cabo [54]. En músculo esquelético, las balsas se han visto involucradas como sostén del andamiaje proteico extremadamente complejo y necesario para la generación y transmisión de fuerza tanto longitudinal como transversal [55].

En conclusión, los microdominios generan la compartimentalización de la membrana para la selección y organización de las diferentes estructuras proteicas y lipídicas, cuando el estímulo específico llega a la membrana, esta organización le permite la una respuesta rápida y precisa para que el proceso en juego se lleve a cabo. Desestabilizar la membrana en su totalidad con alteraciones en las concentraciones de sus componentes, genera por lo tanto, caos y falla en las funciones.

VI. **Canales iónicos y Membranas Resistentes a Detergentes.**

Desde el descubrimiento de los canales iónicos como protagonistas en la transmisión eléctrica de células excitables, la generación de conocimiento en torno a su estructura, actividad, regulación y localización ha crecido a pasos agigantados. Uno de los detalles que no pasó desapercibido por los investigadores fue la polarización y localización selecta de los distintos tipos de canales en las neuronas. La regulación de esta distribución tan precisa para el correcto funcionamiento de los potenciales eléctricos generó curiosidad, y cuando el modelo de las balsas lipídicas se dio a conocer, buscar una asociación entre ambas estructuras era muy tentador. El primer estudio al respecto se publicó en el año 2000 y encontró el canal de potasio

dependiente de voltaje $K_v2.1$ asociado a las MRD de cerebro de rata y no así el canal $K_v4.2$ [56]. Este hallazgo no solo abría las puertas al área de “canales iónicos y rafts” sino que aportaba además dos cosas muy importantes: que los canales, incluso de la misma familia, no necesariamente estaban siempre asociados a las balsas lipídicas, y que la extracción de colesterol tenía un efecto en la generación de corrientes de los canales cuando estos se asociaban a las MRD. A partir de aquí, un sin número de estudios comenzaron a realizarse en diferentes tejidos y estudiando diversos tipos de canales; en la Tabla 2 se resume los canales que hasta el momento se han encontrado asociados a las MRD [57].

Como se mencionó en la sección previa, en la mayoría de los casos se desconoce la forma en la que los canales se asocian a las balsas lipídicas, las propuestas se señalan en la figura 1.8. Uno de los canales mejores estudiados es el receptor nicotínico de acetilcolina, donde no solo se ha encontrado asociado con las MRD [58], sino que también se han hecho minuciosos estudios estructurales que encontraron sitios de unión a colesterol y se proponen sitios de unión a esfingomielinas. Ambas moléculas tienen funciones reguladoras en el proceso de unión a ligando y cambios conformacionales para la apertura del canal [59].

Canal	Célula ó tejido
$K_v2.1$	Cerebro, fibroblastos
$K_v1.5$	Fibroblastos
$K_v1.3$	Jurkat
$K_v12.1$	HEK-293
BK_{Ca}	MDCK
$Kir3.1$	Cerebro, CHO
Canal de Na^+ (SP-19)	Corazón
Canal de Ca^{2+}	Músculo esquelético y liso
TRP1	HSG y esperma
TRP3	HEK-293
VRAC	CPAE
VDAC	Neuroblastoma
CNGA2	HEK-293, OSN
nAChR	Neuronas ciliares, neuronas de peces
Receptor AMPA (GluR1, GluR2/3)	Neuronas hipocampales

Tabla 2. Lista de K_v en las balsas lipídicas, modificado de [57]

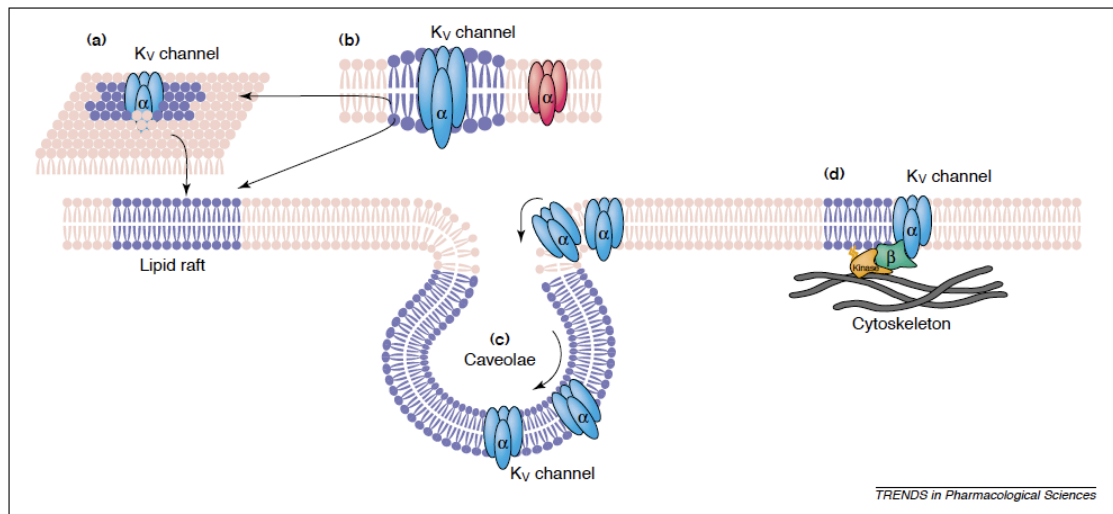


Figura 1.8. Modelos de los tipos de asociación de los K_V con las balsas lipídicas. [57]

Finalmente terminaremos esta sección ejemplificando la asociación de “canales iónicos y rafts” con dos canales de potasio dependientes de voltaje que constituyeron dos antecedentes muy importantes para esta tesis.

Kv2.1

Este fue el primer canal que se estudió y que se encontró asociado a MRD. Desde ese primer estudio, el conocimiento en torno a su asociación con las balsas lipídicas ha avanzado considerablemente. Los canales forman agrupaciones en la membrana plasmática de neuronas y células HEK-293 transfectadas, que colocalizan con caveolina [56]. Además se ha demostrado que estos canales tienen una difusión mucho menor comparada con otros canales que no se asocian a las balsas, lo cual corrobora la estancia en un dominio líquido-ordenado [60]. También se determinó que la formación de las agrupaciones sobre la membrana es dependiente de la actina subyacente, y se demostró que esta organización en grupos se pierde al disminuir la concentración de colesterol en la membrana [61]. Finalmente, se determinó que la actividad conductora de los canales que se encuentran dentro de las agrupaciones es mucho menor que cuando están fuera de los dominios [62]. Este último hallazgo es muy importante puesto que propone a la membrana como un regulador de la actividad del canal adicional al potencial de membrana. La generación de agrupaciones con grandes cantidades de proteína probablemente genere un hacinamiento molecular que impida los cambios conformacionales necesarios para la apertura del poro. Este es sin duda un grueso pero muy práctico medio de regulación de la actividad. Este tipo de

regulación es el precedente para apoyar los resultados de electrofisiología encontrados en Kv10.1 en esta tesis, que parecen ser similares a los encontrados en Kv2.1.

Kv1.3

Kv1.3 fue el primer canal de potasio en encontrarse en células no excitables y en ejercer una función conductora no involucrada en un potencial de acción. Desde su descubrimiento en los linfocitos T en 1993 se ha aprendido mucho de la participación de este canal en la respuesta inmunológica y se ha usado como blanco terapéutico para enfermedades autoinmunes [63-65]. El Kv1.3 es necesario para la activación de los linfocitos T en una respuesta inmune, y este hallazgo ha permanecido independiente de los resultados de otros grupos que han encontrado al Kv1.3 asociado con las balsas lipídicas [63, 66]. Los resultados demostraron que la extracción de colesterol ejerce efectos en las propiedades electrofisiológicas del canal, pero más aún, afectan la proliferación de los linfocitos. Aunque hasta el momento nadie ha estudiado que ambos efectos estén relacionados, es decir, que la activación y proliferación de los linfocitos dependa en parte de que el canal se localice en las balsas lipídicas, suena tentador investigarlo, y más aún para esta tesis, puesto que las similitudes en comportamiento con Kv10.1 son muchas. Kv10.1 es un canal que también está involucrado en la proliferación de muchos tipos de células, también se localiza en balsas lipídicas y se propone en esta tesis, que probablemente su localización tenga que ver con su efecto proliferativo. Si este efecto se pudiera corroborar con otro canal de la misma familia, sería sumamente interesante. De cualquier manera el antecedente de Kv1.3 fue muy importante en la planeación de este proyecto de investigación.

Una vez explicados todos los conceptos necesarios para la comprensión de los resultados mostrados en esta tesis, no queda más que proceder a presentarla:

2.- OBJETIVO

Determinar la partición del canal K_v10.1 dentro de las diferentes fases de la membrana plasmática en diferentes sistemas celulares, así como determinar si las concentraciones de colesterol y la estabilidad del citoesqueleto en la membrana, afectan su partición en los distintos dominios. Finalmente, identificar si la localización dentro y fuera de los dominios es factor determinante en su función conductora.

3.- HIPÓTESIS

El canal K_v10.1 se localizará dentro de los dominios ricos en esfingolípidos y colesterol y cambios en su localización membranal, a través de la modificación de las concentraciones de colesterol, afectarán su función.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Modelos experimentales

Ratones: Todos los experimentos con animales fueron realizados con la aprobación de las políticas de animales del Instituto Max Planck de Medicina Experimental y el estado de Baja Sajonia, Alemania. Se utilizaron ratones machos adultos nativos de la cepa C57BL/6J para el aislamiento de cerebros. **Células:** Las células HEK-293 se obtuvieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos y se cultivaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Células establemente transfectadas con pTracer-K_v10.1 y pTracer- K_v10.1-BBS fueron cultivadas en medio DMEM con F-12 y Glutamax-I (Invitrogen) suplementada con suero fetal bovino al 10 % y seleccionados con Zeocina (Calya, 0.3 mg/ml). Los cultivos primarios de células gliales se obtuvieron de cortezas de 8-10 ratones P0 y fueron recolectados en medio HEPES-DMEM. Las células se disociaron con tripsina-EDTA a 37°C por 15 min. Las células disociadas se lavaron tres veces con DMEM y se homogenizaron con una jeringa 18-g, se centrifugaron por 5 minutos a 500 x g y se resuspendieron en DMEM fresco para mantenerse bajo condiciones estándares de cultivo por dos semanas. Pasado el tiempo las células fueron cosechadas y vueltas a sembrar una vez alcanzada una confluencia de 80-90 %. Células HEK-293 transitoriamente transfectadas con la mutante C7-hEag1 (F714S/F717S) se cultivaron bajo las mismas condiciones que las otras células HEK-293 descritas.

PCR en tiempo real de células gliales

El RNA de células cultivadas fue aislado con el kit RNeasy (Quiagen, Hilden, Alemania) y transcrito reversamente usando Super Script (Invitrogen). La PCR-TR se realizó con el sistema TaqMan en un ciclador de detección de luz tal como fue descrito previamente [14]. Para los marcadores de glía y neuronas los cebadores se seleccionaron usando la “Universal Probe Library” (Roche) y fueron detectados por el método de SYBR Green.

Aislamiento de las membranas plasmáticas

Las membranas plasmáticas de tejido cerebral fueron aisladas usando el protocolo modificado de Schindler y Nothwang [67], que a continuación se describe brevemente. Cerebros de ratón aislados frescos o congelados (-80°C) se homogenizaron con homogenizador de pistilo de teflón anclado a un taladro en Buffer

A (15mM Tris-HCl, 320mM sacarosa e inhibidor de proteasa sin EDTA, pH7.8). Se centrifugó tres veces para eliminar núcleos y residuos (3000 xg, 10 minutos a 4°C). El sobrenadante se colocó sobre una cama de sacarosa a 850 mM (Buffer A) y se centrifugó por 30 minutos a 70,000 xg a 4°C. La capa flotante entre ambos gradientes corresponde a la mielina aislada del tejido y fue desechada. La muestra restante se centrifugó por 30 minutos a 20,000 xg a 4°C para eliminar mitocondrias y posible mielina residual localizadas en el precipitado. El sobrenadante se centrifugó por 1 hora a 100,000 xg a 4°C para precipitar los microsomas. Los microsomas se resuspendieron en Buffer A y se usaron para el método de unión a la aglutinina de germen de trigo (WGA) del sistema de afinidad de dos fases previamente descrito. Para evaluar el producto final se realizaron ensayos de actividad enzimática y experimentos de Western Blot. Para el aislamiento de membranas plasmáticas de células de cultivo se usó el protocolo descrito por Yao et. al [68].

Extracción de colesterol y del citoesqueleto

Se utilizó metil-beta ciclodextrina (MBCD) para extraer el colesterol tanto de membranas aisladas como de células vivas. Para las membranas aisladas, se incubó la muestra con 30 mM de MBCD por 1h a 37°C bajo agitación y se realizaron dos lavados con PBS. Las células HEK-K_v10.1, se lavaron con PBS, se sometieron a tratamiento con tripsina y se dividieron en alícuotas de 1ml con 5-7 millones de células cada una. Posteriormente se incubaron con 10 mM de MBCD en medio sin suero por 30 min a 37°C bajo agitación. Las muestras control se sometieron al mismo procedimiento, sustituyendo PBS por MBCD. Los precipitados de células fueron congelados a -80°C o directamente usados para el aislamiento de membrana plasmática y MRD.

Para eliminar la actina unida a las membranas plasmáticas de tejido cerebral se utilizó carbonato de sodio (Na₂CO₃). Alícuotas de 500ul de extracto de membrana se incubaron con 20 ml de 150 mM de Na₂CO₃ por 5 minutos en hielo. Posteriormente se lavaron una vez con PBS y el precipitado se resuspendió en PBS. Se preservó un volumen de 100 µl para determinación de proteína y WB y el resto se incubó con Tritón X-100 al 1 % para aislamiento de MRD. Para las células HEK-K_v10.1 se realizó un procedimiento similar al de la extracción de colesterol con MBCD, pero utilizando 1 µl de 10 µM de Latrunculina A (LatA) disuelta en DMSO. Las células se

incubaron 1 hora a 37°C bajo agitación. Para los controles se utilizó únicamente 1 µl de DMSO.

Aislamiento de las membranas resistentes a detergentes (MRD)

Las membranas plasmáticas controles y las tratadas provenientes de células o de tejido cerebral fueron suspendidas en PBS, incubadas con Tritón X-100 al 1 % por 30 minutos a 4°C y luego diluidas en un volumen equivalente de solución de sacarosa al 80 % (concentración final de sacarosa de 40 %). Posteriormente se formó un gradiente discontinuo con la sobreposición de soluciones de sacarosa al 30 % y al 5 %. Las muestras se centrifugaron por 18 horas a 200,000 x g a 4°C. Nueve fracciones se recolectaron de arriba hacia abajo. Se determinó concentración de proteína con el ensayo de ácido bicinónico (Pierce) y se realizaron Dot blots para la localización del gangliósido GM1 con la fracción β de la toxina colérica unida a HRP. Para los experimentos de WB las fracciones se fusionaron en 3 grupos: MRD (fracciones 2-4), No-MRD (fracciones 5-6 y fracciones 7-9). La proteína de cada grupo se precipitó usando el protocolo del ácido tricloroacético (TCA) y se resuspendió en buffer de carga para ser usado en electroforesis.

Determinación de colesterol

Para determinar la concentración de colesterol se utilizó el kit de Biovisión (Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro a 570 nm en platos de 96 pozos. La concentración de colesterol se expresó en mg de colesterol/mg de proteína.

Inmunoblots y densitometría

Los extractos de proteína se separaron por geles de SDS-PAGE de gradiente (Tris-acetato 3-8 % ó Bis-Tris 4-12 %, de NuPAGE, Invitrogen) y fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham). Para los experimentos de dot-blot, 3 µl de concentraciones iguales de proteína de cada fracción se colocaron directamente sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejaron secar por 15 minutos. Las membranas, usadas para WB o dot-blot se bloquearon por 30 minutos con 0.1 % de caseína (Roche Applied Science), 5 % de leche sin grasa (Bio-Rad) ó 5 % de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma). Seguidas de una incubación con el anticuerpo primario

correspondiente; la toxina del cólera conjugada con peroxidasa (1:50,000, Sigma), los anticuerpos; O1 pentamérico contra galactosilceramida (GalCer, 1:50, donado por el Prof. K.A. Nave, MPI-EM, Gotinga, Alemania), Caveolina-1 (Cav-1, 1:300, policlonal, Santa Cruz), Flotilina-2 (Flot-2, 1:1000, monoclonal, BD Bioscience), Kv10.1 (1:1500, policlonal, 9391/ref), Receptor de Transferrina (TfR, 1:1000, monoclonal, BD Bioscience), Marcador de Golgi (GM130, 1:500, BD), Subunidad alfa de la proteína asociada al translocon (TRAPalfa, 1:1000, Abcam), Proteína Básica de Mielina (MBP, 1:1000, Abcam), Proteína Proteolipídica (PLP, 3F4; 1:250, donado por el K.A. Nave, MPI-EM, Gotinga, Alemania) y Actina (1:1000, Abcam).

Después de lavar el anticuerpo primario se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (Invitrogen). El revelado de quimioluminiscencia se realizó con el sistema Immobilon de Millipore. La señal se detectó con el sistema de Bio-Rad Chemi-Doc luminescence. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

Electrofisiología

Las células se cultivaron de 24-72 horas sobre cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Para los experimentos con MBCD, las células se incubaron en medio sin suero con 30 mM de MBCD a temperatura ambiente justo antes de los registros. Las corrientes macroscópicas se registraron con la configuración de célula completa de la técnica de parche y pinza en un amplificador EPC 9 (HEKA). Las pipetas para los parches tenían una resistencia entre 2-5 megaohms y se hicieron con capilares de vidrio (WPI, Corning #0010). La resistencia en serie se compensó en un 70 %. La solución intracelular contenía: 100 mM KCl, 45 mM N-metil-D-Glutamina, 10 mM ácido 1,1-bis(O-aminofenoxi)etano-N,N',N'-tetracético (BAPTA) en sal de tetrapotasio. 10 mM HEPES/HCl, pH 7.35. La solución extracelular contenía: 160 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 8 mM glucosa, 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4. El potencial en reposo para todos los experimentos era de -70 mV. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, los registros se procesaron con el programa Igor Pro (WaveMetrics). Cuando corresponde, los resultados se presentan en promedio \pm error estándar.

Citoquímica por afinidad y microscopía confocal

Para los experimentos de microscopía se utilizaron células HEK-293 transfectadas con pTracer-Kv10.1-BBS. Las células se cultivaron en cubreobjetos cubiertos con

fibronectina de 12 mm de diámetro por 48 horas y luego se trataron con las diferentes técnicas. Para la extracción de colesterol las células se incubaron con 5mM de MBCD por 30 min a 37°C o con PBS para los controles. Para la eliminación de actina, se incubaron con 1 μ M de LatA ó 1 μ L de DMSO. Después de cada tratamiento las células se lavaron 3 veces con TBS (pH7.4), se incubaron con la Toxina Colérica-FITC (CT-FITC, sigma 1 μ L/mL) por 5 minutos a temperatura ambiente; se suspendían brevemente en TBS y luego se incubaron con Bungarotoxina-Alexa Fluor 555 (BTX-AF555, Invitrogen, 3 μ L/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con TBS. Finalmente se fijaban con 10 % de formalina durante 10 minutos a 4°C, se realizaban 5 lavados más y se montaban sobre portaobjetos con ProLong-DAPI (Molecular Probes). Las laminillas se mantenían por una noche a 4°C y se observaron en un microscopio confocal Leica SP5 (CLSM, Leica, Mannheim) de la siguiente manera: el microscopio equipado con detectores híbridos se uso para registrar campos representativos ocupados por células que contuvieran células con señal para FITC y BTX-AF555. Los parámetros para la adquisición se mantuvieron iguales para todas las adquisiciones. Se generó un macro en el programa ImageJ y se utilizó para cuantificar las señales de fluorescencia de las diferentes células fotografiadas. De las imágenes se tomaba una región de interés (ROI) marcada manualmente para cada célula de una imagen de la superficie de la membrana plasmática adherida al portaobjetos. Posteriormente se generó una imagen binaria para los canales de FITC y BTX-AF555 aplicando el método de umbral local “MidGrey” con un radio de 15 píxeles. Las imágenes binarias se sumaron para generar una tercera imagen donde las señales sobrepuestas pudieran cuantificar y normalizar con respecto al área completa de ROI para obtener el porcentaje área sobrepuesta. Las medias se calcularon de 91 células control y 92 células tratadas para cada experimento.

5.- RESULTADOS

I. Cerebro

a) Membranas plasmáticas purificadas

El aislamiento de la membrana plasmática del tejido cerebral se realizó por medio de centrifugación diferencial, gradientes discontinuos de sacarosa y un sistema de Dextran-AGT/Polietilenglicol basados en un protocolo descrito previamente por Schindler y Nothwang en 2009 [67], al cual le añadimos un paso de centrifugación para la extracción de mielina. Un esquema del protocolo se muestra en la figura. 5.1.

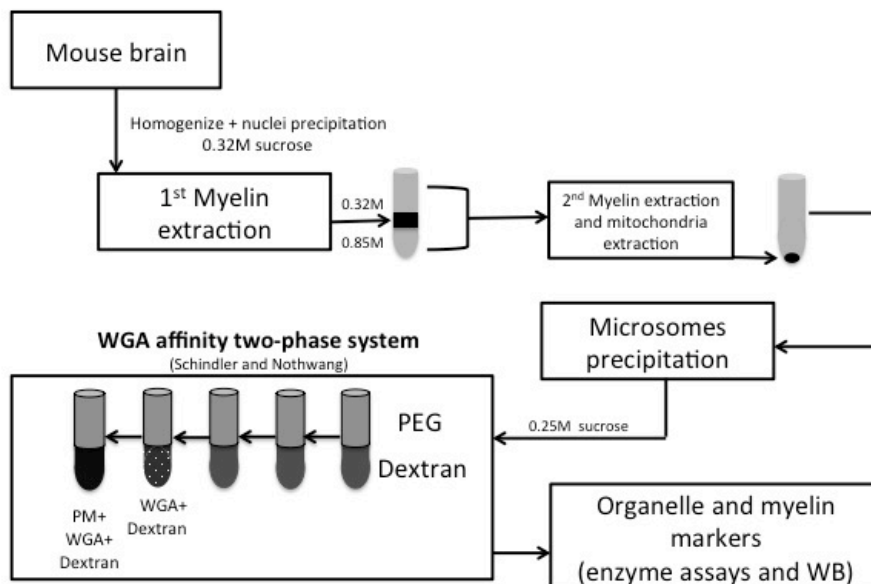


Fig 5.1 Esquema del procedimiento de aislamiento de las membranas plasmáticas (PM) a partir de tejido cerebral con el sistema por afinidad a la aglutinina de germen de trigo de dos fases modificado.

Caracterización de las membranas plasmáticas aisladas.

Un Dot Blot contra el lípido GalCer en las diferentes fases del proceso de aislamiento demostró que comparado con el homogenado inicial, las membranas plasmáticas pierden el 50 % del GalCer al usar el protocolo original, mientras que con el protocolo modificado, la membrana aislada pierde un 94% del lípido (Fig 5.2A). Un menor contenido de mielina en las membranas plasmáticas elimina resultados confusos al aislar las MRD, puesto que la mielina es rica en esfingolípidos. Al analizar la expresión de la Proteína Básica de la Mielina (MBP) y la Proteína proteolipídica (PLP) por WB en las membranas aisladas comparadas con el homogenado inicial se observó una disminución de la expresión del 35 % de la MBP y 37 % de la PLP por densitometría (Fig. 5.2B). Para continuar con el análisis de pureza de las fracciones se realizaron ensayos enzimáticos de tres proteínas que marcaban la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria. En la figura 5.2C se muestra la actividad específica relativa (ASR) de la fosfatasa alcalina, que es cinco veces mayor en las membranas plasmáticas que en el homogenado inicial. La ASR de la succinato deshidrogenasa es 0.19 ± 0.15 y la de la NADPH citocromo c reductasa es de 0.47 ± 0.03 , ambos valores menores de la unidad. Finalmente, se encontró por WB que en la membrana plasmática GM130 (marcador del aparato de Golgi) estaba ausente mientras que TRAP α (marcador de retículo endoplasmático) mostraba una reducción del 95% en comparación con el homogenado inicial (Fig. 5.2D).

Con estos resultados se demostró el enriquecimiento de nuestras fracciones con membrana plasmática y prácticamente sin contaminación de retículo, Golgi, mitocondrias y lípidos de la mielina.

a) El K_v10.1 se expresa en células neuronales y no en células de la glía en el SNC

La expresión de K_v10.1 en las neuronas se ha descrito ampliamente, sin embargo la expresión en las células gliales no ha sido reportada hasta ahora. La figura 5.3 muestra el valor normalizado de un análisis de RT-PCR realizado con marcadores de la glía y neuronas de ratón en tres diferentes cultivos celulares de glía. Los marcadores incluyen la identificación de astrocitos, microglia, oligodendrocitos y neuronas. Los resultados muestran que en tres cultivos diferentes de diferentes

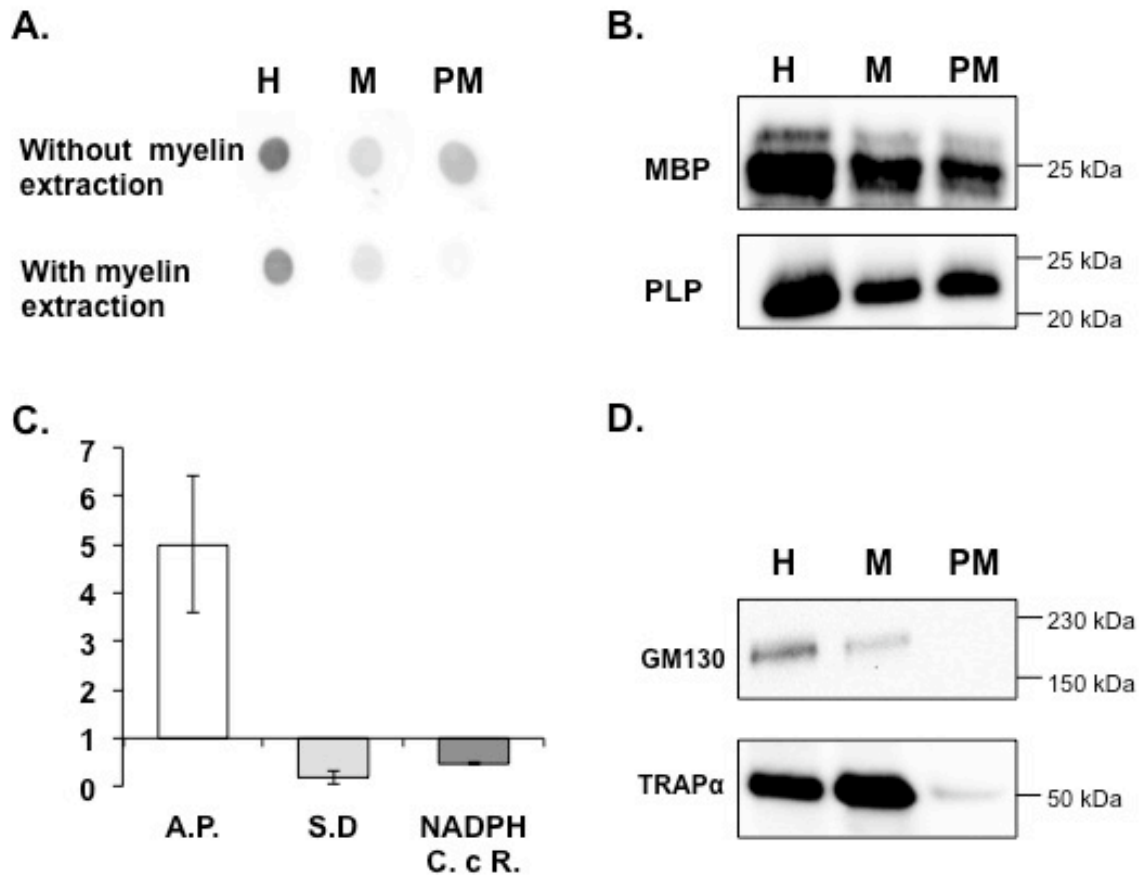


Fig. 5.2 Caracterización de las fracciones de membrana plasmática de cerebro. A) Dot-blot contra GalCer en fracciones obtenidas con el protocolo original (sin extracción de mielina) y nuestro protocolo modificado (con extracción de mielina). H: homogenado total, M: microsomas, PM: membrana plasmática. B) WB de dos de los principales marcadores de mielina MBP (Proteína que une mielina) y PLP (Proteína proteolípida). C) Ensayos de actividad enzimática, expresados en actividad relativa en la fracción PM comparada con el homogenado total; AP: fosfatasa alcalina (marcador de membrana; n=10 media \pm DS: 4.47 \pm 4.47), SD: succinato deshidrogenasa (marcador de mitocondria; n=6, 0.48 \pm 0.37), NADPH CcR: NADPH citocromo c reductasa (marcador de retículo endoplasmático; n=5; 0.43 \pm 0.08). D) Western Blot contra la proteína del aparato de Golgi GM130 y del retículo endoplasmático TRAP α en las diferentes fracciones membranales.

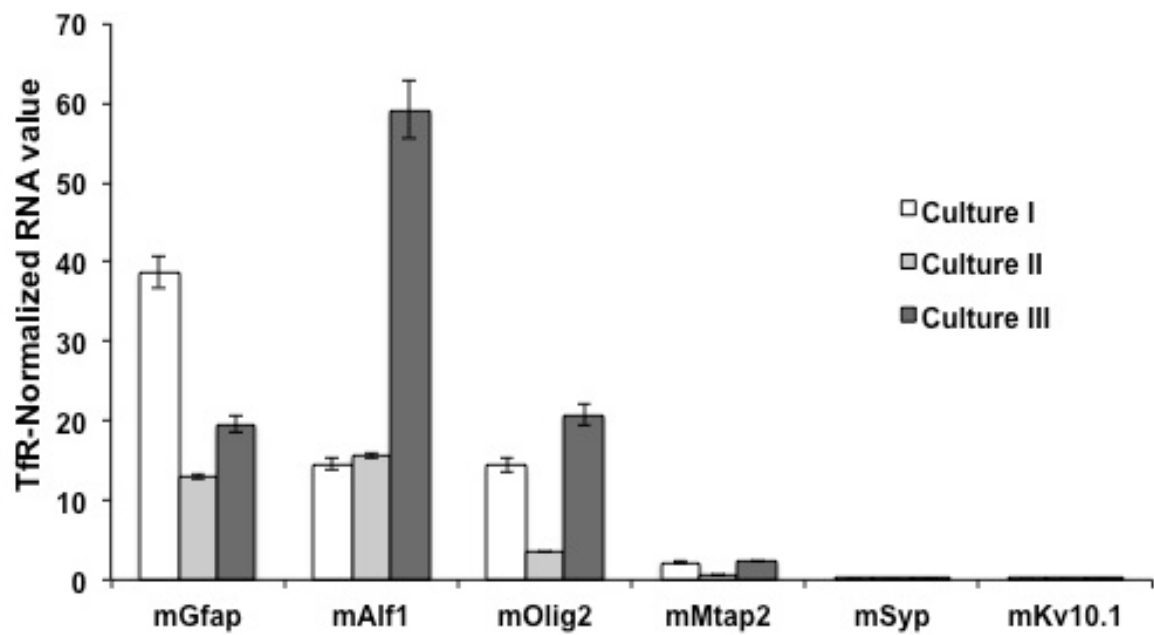


Fig 5.3 Caracterización de cultivos celulares primarios de glía de ratón. Kv10.1 no se expresa en células de la glía. PCR en tiempo real en tres diferentes cultivos enriquecidos en diferentes tipos de células de la glía. La gráfica se presenta en ARN normalizado con TqR para tres diferentes marcadores de glía (mGfap, mAlf1 y mOlig2), dos marcadores de neuronas (mMtap2 y mSyp) y Kv10.1.

pasajes y con un grado distinto en el predominio de las células gliales, solamente se identificaron ARN neuronal en cantidades mínimas y prácticamente no se expresaba el ARN de $K_V10.1$ (0.012 ± 0.03). Además de ser el primer reporte de que $K_V10.1$ está ausente en células gliales, estos hallazgos comprueban que los resultados subsecuentes se pueden considerar localizados en las neuronas únicamente.

b) Distribución de lípidos y proteínas en membranas plasmáticas aisladas de tejido cerebral

A partir de las membranas plasmáticas se aislaron las MRD para su caracterización. En un Dot Blot contra el gangliósido GM1 se observó la concentración de este lípido en las fracciones ligeras correspondientes a las MRD (F3 y F4) y su empobrecimiento en las fracciones pesadas ó no-MRD (F8 y F9) (Fig. 5.4A). Con respecto al contenido de proteína de las fracciones MRD y no-MRD, se demostró por WB que el receptor de transferrina se expresa exclusivamente en las fracciones no-MRD, mientras que caveolina-1 y flotilina-2 se localizan preferencialmente en las MRD (Fig. 5.4B). Para el caso de $K_V10.1$, 61 % ($n=8$) se encontró en las MRD y el resto fuera de estos dominios. Las mediciones de concentración de proteína y colesterol en cuatro fracciones representativas, dos de las MRD (3 y 4) y dos de las no-MRD (8 y 9), mostraron que las MRD contienen únicamente 9% de total de la proteína de la membrana plasmática mientras que el contenido de colesterol por mg de proteína es 3 veces mayor que en la membrana total (1.279 ± 0.43 mgCol/mgProt). Por otro lado, las fracciones no-MRD contienen 71% del total de la proteína total y una baja concentración de colesterol (en F9 0.167 ± 0.06 mgCol/mgProt) (Fig. 5.4C).

Con el fin de analizar una posible interacción física entre $K_V10.1$ y la proteína caveolina-1, como ocurre en el caso de HERG, realizamos ensayos de coinmunoprecipitación. En la figura 5.5 se muestran los WB contra $K_V10.1$ y caveolina-1 para las diferentes inmunoprecipitaciones con los mismos anticuerpos. En ningún caso se detectó alguna interacción.

Con estos resultados concluimos que existen por lo menos dos diferentes poblaciones de $K_V10.1$ a lo largo de la membrana plasmática de las neuronas, una que se reparte hacia los dominios enriquecidos en GM1, colesterol, caveolina-1 y flotilina-2 y otra que no lo hace.

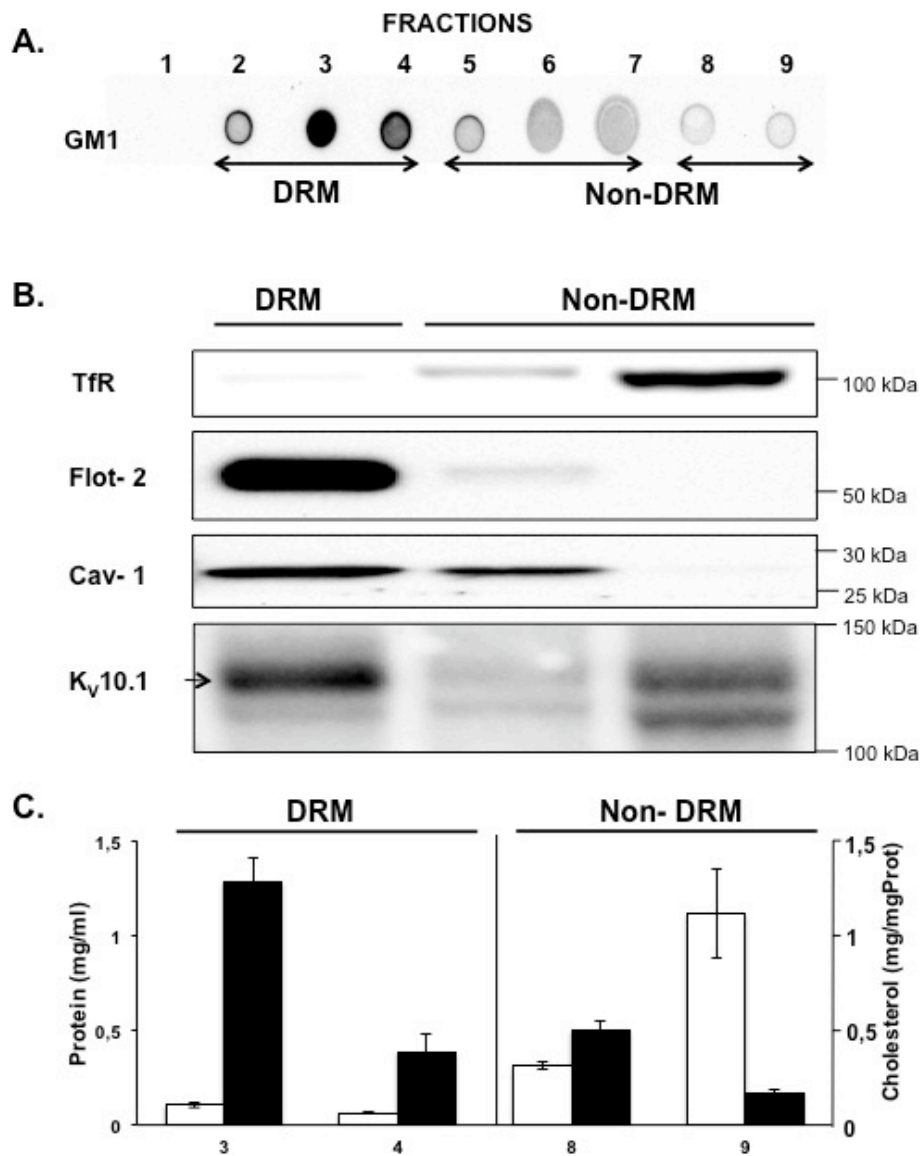


Fig.5.4 Caracterización de las MRD aisladas de membrana plasmática de cerebro de ratón, $K_{v10.1}$ se asocia con MRD. A) Dot-blot contra el gangliósido GM1 en las nueve fracciones separadas después del gradiente de sacarosa. MRD están formadas por las fracciones 2 a 4. Fracciones no-MRD 5 a 9 fueron divididas en dos: 5 a 7 y 8 y 9. B) Distribución de $K_{v10.1}$ en las fracciones de la membrana; 60% del $K_{v10.1}$ se expresa en las fracciones MRD donde también se expresan dos marcadores de MRD (flotilina-2 y caveolina-1), el 40% restante se encuentra en las fracciones no-MRD junto con el marcador de no-MRD, el TfR (n=8). C) Concentración de proteína en mg/ml (columnas blancas) en cuatro fracciones representativas (n=9): MRD (fr 3: 0.11 ± 0.05 ; fr4: 0.06 ± 0.03) y no-MRD (fr8: 0.31 ± 0.16 ; fr9: 1.11 ± 0.53) y concentración de colesterol en mg de colesterol/ mg de proteína (columnas negras) de las mismas fracciones (n=12); MRD (fr3: 1.28 ± 0.44 ; fr4 0.39 ± 0.31) y no-MRD (fr8: 0.5 ± 0.19 ; fr9: 0.17 ± 0.06).

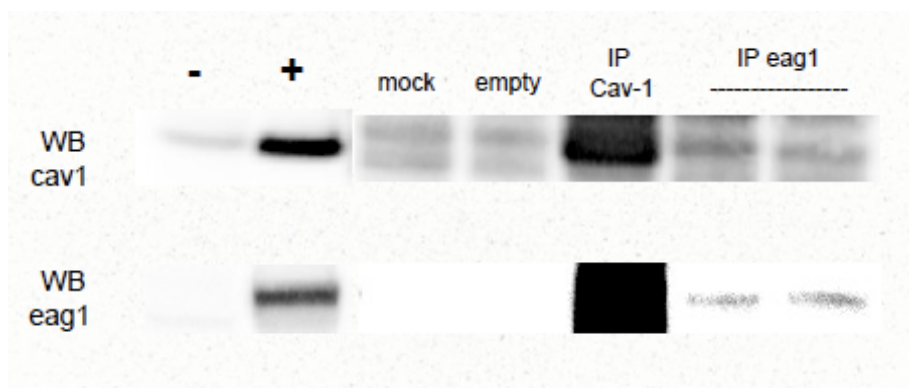


Fig.5.5 Western Blot representativo de experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP) entre $K_{V10.1}$ (eag1) y caveolina-1, donde no se observa co-IP entre ambas proteínas. - y + : controles negativo y positivo respectivamente para cada anticuerpo de WB, mock: IP con IgG inespecífica, empty: IP sin ningún anticuerpo. En el carril de IP Cav-1 abajo, la imagen es de un barrido contrastado para poder visualizar las bandas adyacentes de $K_{V10.1}$. Para ver las figuras originales y contrastadas completas ver anexos.

- a) La localización neuronal de $K_v10.1$ depende de la concentración de colesterol y la integridad del citoesqueleto submembranal.

Para determinar los factores que contribuyen a la distribución de $K_v10.1$ en los subdominios enriquecidos en colesterol, aislamos MRD de membranas plasmáticas previamente incubadas con M β CD, para la extracción del colesterol.

La figura 5.6 muestra la caracterización de las MRD posterior a la extracción de colesterol con 30 mM de M β CD. Utilizando esta concentración de M β CD se reduce en las membranas plasmáticas hasta un 81% de colesterol (Fig. 5.6A). Una vez extraído el colesterol en estas membranas, se procede al aislamiento de las MRD por gradiente y se analizan los lípidos y proteínas. A pesar del alto porcentaje de extracción de colesterol, la distribución de GM1 a lo largo de las fracciones del gradiente en las MRD no muestra mucha diferencia (Fig. 5.6B). En cuanto a la distribución de proteína, observamos que tanto caveolina-1 como flotilina-2 se redujeron su partición en las fracciones MRD y aumentaron en las no-MRD (Fig. 5.6C). La extracción de colesterol con M β CD redujo la concentración de colesterol en las MRD de 1.279 ± 0.43 a $0.25 \pm$ μ g colesterol/mg proteína en la fracción F3, pero la concentración en las fracciones no-MRD se mantuvo igual (Fig. 5.6D). Puesto que las proteínas caveolina y flotilina tienen interacciones proteicas submembranales en otros sistemas, investigamos la importancia de la integridad del citoesqueleto submembranal en la distribución de los lípidos y proteínas al aislar MRD. En la figura 5.6 se muestran los efectos de un choque alcalino (pH 11) con 150 mM de carbonato de sodio (Na_2CO_3) en la composición de las MRD. El tratamiento de carbonato de sodio redujo un 88% de la actina anclada a las membranas plasmáticas purificadas y el recuadro muestra un WB representativo con TfR como control interno (Fig. 5.6E). Lo cual indica que proteínas transmembranales como TfR y $K_v10.1$ se mantienen en la membrana mientras que las submembranales ya no. Con respecto a la distribución de GM1 se observó una señal similar a lo largo de todas las fracciones (Fig. 5.6F). En cuanto a la distribución de proteína, la

partición de caveolina-1 y flotilina-2 se distorsionó por completo sin mostrar ninguna preferencia por alguna fracción. Lo mismo ocurrió con el TfR (Fig. 5.6G). Finalmente en la figura 5.6H se observa que la concentración de colesterol en las MRD fue de 0.819 ± 0.369 mgCol/mgProt y en las no-MRD de 1.095 ± 0.570 mgCol/mgProt, ambas similares entre sí y con la concentración en la membrana plasmática total que fue de 0.638 ± 0.230 mgCol/mgProt. En conclusión, la ruptura de las interacciones proteicas entre la membrana y el citoesqueleto submembranal alteran la composición de las MRD, indicando que estas interacciones son necesarias para la estabilidad de los dominios membranales.

Después de observar el efecto de la extracción de colesterol con M β CD y de la alteración de la estructura submembranal del citoesqueleto con carbonato de sodio, nos enfocamos a analizar la distribución de K_V10.1 en estas mismas condiciones experimentales. En un WB representativo con anticuerpos contra K_V10.1 se muestra la distribución del canal en las diferentes fracciones en condiciones control y con los tratamientos (Fig. 5.7A); así como el análisis estadístico de las mediciones de densitometría (Fig. 5.7B). En la gráfica se muestra la razón K_V10.1-MRD/ K_V10.1-no-MRD en condiciones control con una media de 1.74 ± 0.644 (n=8). Posterior a la extracción de colesterol, la razón media fue de 0.175 ± 0.130 (n=6) y con el tratamiento de carbonato de sodio la razón media fue de 0.153 ± 0.105 (n=3), con una diferencia significativa en ambos casos ($p < 0.001$).

En conclusión estos resultados indican que tanto las concentraciones membranales de colesterol, como la integridad del citoesqueleto submembranal son factores clave que determinan que K_V10.1 se encuentre preferentemente en las MRD y que cuando se alteran ocasionan la salida del canal de los dominios.

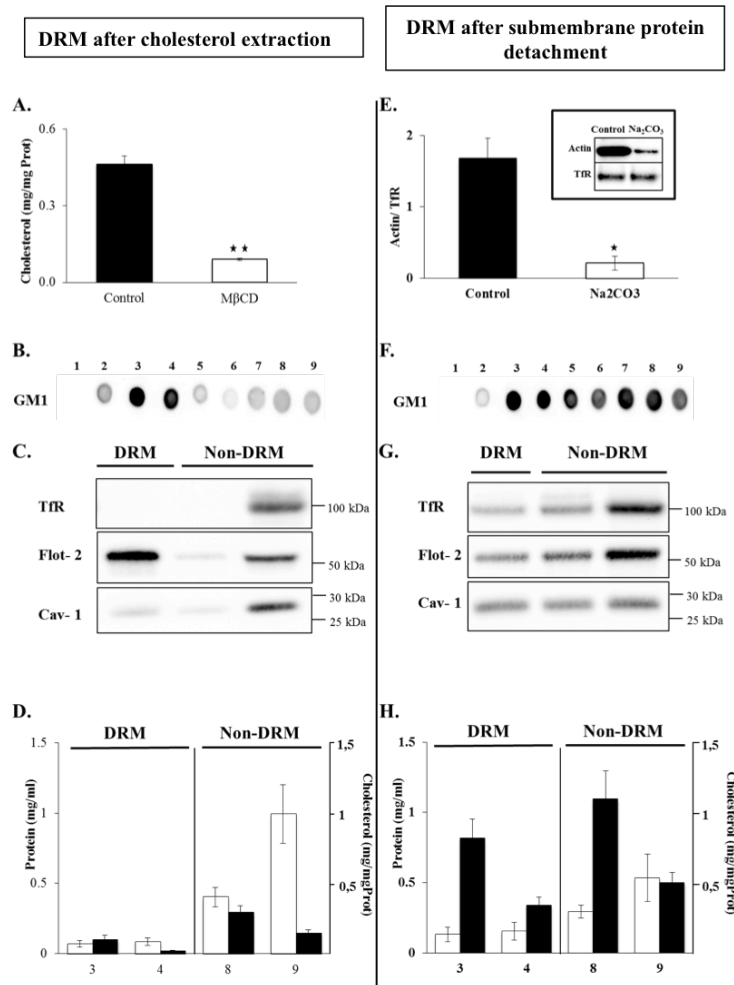


Fig. 5.6 Caracterización de las MRD de cerebro de ratón después de la extracción del colesterol de la membrana con MβCD (A-D) y después de la ruptura de las interacciones del citoesqueleto submembranal con Na₂CO₃ (E-H). A) Nivel de extracción de colesterol (mg col/mg prot) después de 1h de incubación con 30 mM de MβCD. El 81 % de la cantidad total de colesterol fue extraída de las membranas plasmáticas aisladas (n=8. Control: 0.462±0.1, MβCD: 0.09±0.01, p<0.01). B) Dot-blot contra GM1, se observa el enriquecimiento de este gangliósido en las fracciones 2-4. C) WB representativo que muestra la distribución de tres marcadores proteicos de las diferentes fracciones membranales flotilina-2, caveolina-1 y TfR. D) concentración de proteína en mg/ml (columnas blancas) en cuatro fracciones representativas (n=7): MRD (fr:3, 0.07 ± 0.05; fr:4, 0.09 ± 0.07) y no-MRD (fr:8, 0.4 ± 0.18; fr:9, 0.99 ± 0.56) y concentración de colesterol en mg col/mg prot (columnas negras) de las mismas fracciones (n=8): MRD (fr:3, 0.1 ± 0.08; fr:4, 0.02 ± 0.02) y no-MRD (fr:8, 0.29 ± 0.13; fr:9, 0.14 ± 0.07). E) Análisis densitométrico de la cantidad de actina eliminada de la membrana plasmática (normalizada con TfR). La cantidad de actina unida a la membrana disminuyó en un 88 % (n=5, control: 1.69±0.61, Na₂CO₃: 0.21±0.21, p<0.05). Recuadro: WB representativo para actina antes y después del tratamiento con 150 mM de Na₂CO₃; TfR usado como control. F) Dot-blot contra GM1, se observa una distribución homogénea del gangliósido a lo largo de todas las fracciones. G) WB representativo que muestra la distribución de tres marcadores proteicos de las diferentes fracciones membranales flotilina-2, caveolina-1 y TfR. H) concentración de proteína en mg/ml (columnas blancas) en cuatro fracciones representativas (n=3): MRD (fr:3, 0.13 ± 0.09; fr:4, 0.15 ± 0.1) y no-MRD (fr:8, 0.29 ± 0.08; fr:9, 0.53 ± 0.29) y concentración de colesterol en mg col/mg prot (columnas negras) de las mismas fracciones (n=8): MRD (fr:3, 0.82 ± 0.37; fr:4, 0.34 ± 0.15) y no-MRD (fr:8, 1.1 ± 0.57; fr:9, 0.5 ± 0.2).

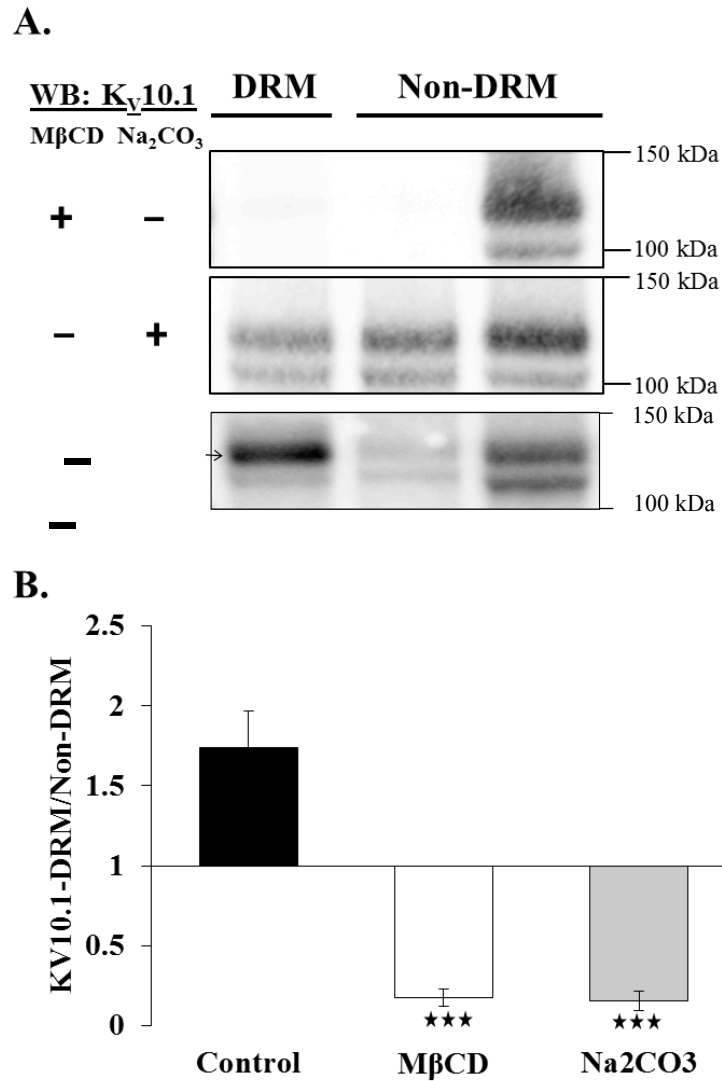


Fig. 5.7 La distribución de $K_V10.1$ en la membrana plasmática de cerebro se afecta por la extracción de colesterol y alteración del citoesqueleto de actina. A) WB contra $K_V10.1$ en las diferentes fracciones membranales después de los diferentes tratamientos con M β CD y Na_2CO_3 . B) Gráfica que muestra el cociente entre el $K_V10.1$ en MRD dividido entre el $K_V10.1$ en no-MRD en controles (n=8, 1.74±0.64), M β CD (n=6, 0.18±0.13) y Na_2CO_3 (n=3, 0.15±0.1).

II. Células de riñón embrionario humano (HEK)

a) Aislamiento de las membranas plasmáticas de las células HEK- $K_V10.1$

Con el fin de usar un sistema más simplificado para el estudio de las propiedades electrofisiológicas ante la extracción del colesterol en las corrientes de $K_V10.1$ usamos una línea estable de células HEK-293 transfectadas con el $K_V10.1$ humano. Se realizaron Dot blot para GM1 y WB para los marcadores proteicos comunes dentro (caveolina y flotilina) y fuera (receptor de transferrina) de las MRD como parte de la caracterización estándar de las MRD, mostrando los resultados esperados, MRD enriquecidas en GM1, caveolina y flotilina, y no-MRD con TfR. (Fig 5.8).

b) Distribución de $K_V10.1$ en la membrana de células HEK- $K_V10.1$

Los efectos de la M β CD en la distribución membranal de las células HEK- $K_V10.1$ se observan en la figura 5.9. En un WB con anticuerpos contra $K_V10.1$ en las fracciones MRD y no-MRD se observa que después de la extracción de colesterol con 10 mM de M β CD la proteína ya no se asocia a las MRD (Fig. 5.9A). Al calcular la razón MRD/no-MRD en los controles se obtuvo 0.789 ± 0.382 , en buen acuerdo con la relación 2:3 observada en la distribución de tejido cerebral (Fig. 5.9B). Después de la extracción de colesterol, el cociente disminuyó un 58% a 0.330 ± 0.220 (<0.01). Estos resultados realizados en células de cultivo confirman que la concentración de colesterol en la membrana plasmática es esencial para la distribución de $K_V10.1$ en los microdominios lipídicos de la membrana. Para seguir investigando el efecto de M β CD en las células HEK- $K_V10.1$ se realizaron experimentos de microscopía confocal. En la figura 5.9C se muestran imágenes representativas de la colocalización de $K_V10.1$ (rojo) con el gangliosido GM1 (verde) sin y con extracción de colesterol. El análisis estadístico mostró una disminución significativa del porcentaje de colocalización después del tratamiento con M β CD ($p < 0.001$) (Fig. 5.9D).

Cuando el citoesqueleto fue alterado, también observamos una tendencia del cociente a decrecer la cantidad de $K_V10.1$ en los dominios MRD, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. En los experimentos de microscopía confocal, el citoesqueleto tampoco demostró jugar un papel importante para la distribución de $K_V10.1$ en la membrana de las células (datos no mostrados).

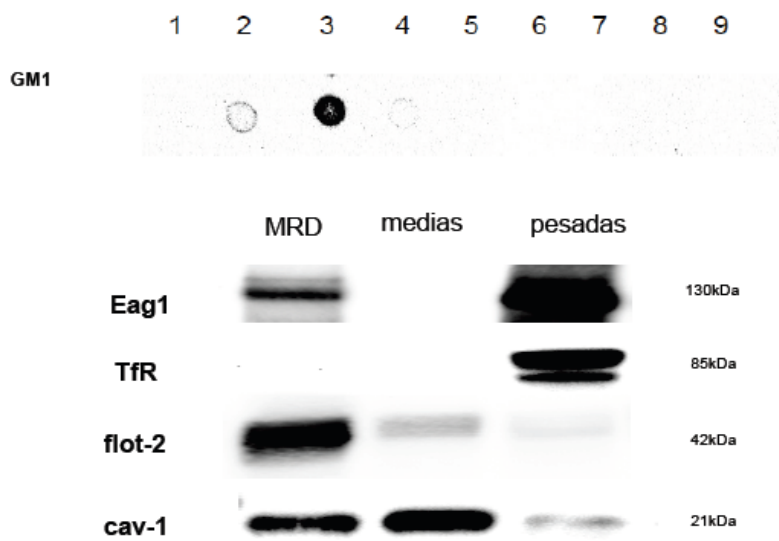


Fig. 5.8 Caracterización de las diferentes fracciones aisladas a partir de membrana plasmática de células HEK-K_V10.1 (Eag1). En la parte superior se aprecia un Dot-blot con anticuerpo para detectar GM1 y en la parte inferior WB representativos con anticuerpos para detectar K_V10.1 y los diferentes marcadores de MRD y no-MRD (medias, pesadas). La proporcionalidad de distribución de K_V10.1 en la membrana de estas células corresponde a la misma encontrada en la membrana de tejido cerebral con una relación 3:2.

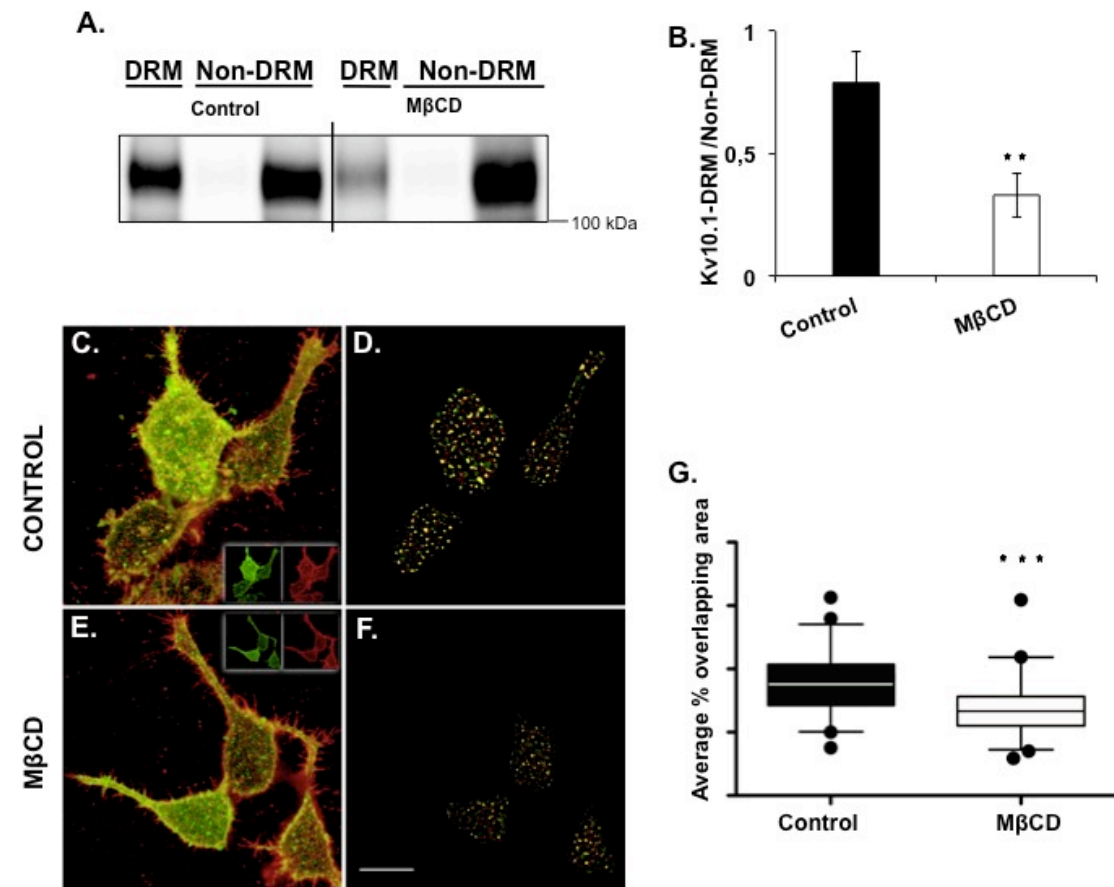


Fig.5.9 La distribución de $K_v10.1$ en la membrana de células HEK- $K_v10.1$ se afecta por la extracción de colesterol. A) WB contra $K_v10.1$ en fracciones aisladas de membrana plasmática de HEK- $K_v10.1$ después de tratamiento con PBS ó 10mM de MβCD. B) Gráfica de los cocientes entre el MRD- $K_v10.1$ y el no-MRD- $K_v10.1$ de membranas control y con MβCD (n=6, p<0.01). C y E) Imágenes superpuestas de microscopía confocal de células HEK-BBS- $K_v10.1$ marcadas con Bungarotoxina-AlexaFluor 555 para $K_v10.1$ (rojo) y CT-FITC para GM1 (verde), tratadas con PBS o 5mM de MβCD. Barra:10μm; Recuadro: imágenes de canal única para cada tinción. D y F) Imagen binaria que indica la localización de pixeles únicos teñidos de rojo o verde, así como los lugares de superposición (amarillos). G) Comparación del porcentaje de área de superposición entre $K_v10.1$ y GM1 tratados con PBS (n=91) ó MβCD (n=92) en células de tres diferentes experimentos (p<0.0001).

c) Las corrientes de $K_V10.1$ aumentan con la extracción de colesterol con M β CD

Después de haber identificado a $K_V10.1$ como una proteína asociada a MRD donde el colesterol juega un rol fundamental para la preservación de dicha asociación, procedimos a evaluar las propiedades electrofisiológicas de $K_V10.1$. En el año 2000, Camacho y cols. Describieron el efecto de las alteraciones del citoesqueleto sobre las corrientes de $K_V10.1$, mostrando que la densidad de corriente aumentaba después de la incubación con un agente que inhibe la polimerización de la actina llamado citocalasina B. Se realizaron experimentos de Patch-Clamp en la modalidad de célula completa después de una incubación con 30 mM de M β CD por 30 min. En células control, la densidad de corriente media a una despolarización de 60 mV fue de 262.414 ± 25.1 pA/pF, (n=7); y se duplicó después de la extracción de colesterol a 489.845 ± 79.37 pA/pF, n=7 (p=0.017, Fig. 5.10A y B). La curva de Densidad de Corriente-Voltaje mostró que el aumento es significativo a 20, 40, 60 y 80 mV (Fig. 5.10C). Con el fin de descartar un efecto de la extracción de colesterol en la apertura del canal a través de los distintos estados cerrados analizamos el efecto Cole-Moore del $K_V10.1$ en cada uno de los registros. Este efecto es característico de las corrientes del K_V10 y demuestra su apertura en diferentes tiempos que representan cambios de configuración. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo en que el canal tarda en alcanzar el 80% de la corriente máxima a diferentes prepulsos (Fig. 5.10D). Estos resultados muestran que el colesterol participa como un agente estabilizador para la asociación de $K_V10.1$ con las MRD y que cuando este factor se altera, $K_V10.1$ se sale de los dominios y las corrientes aumentan.

a) Efecto de la quelación de calcio e inhibición de la unión de calcio/calmodulina en la distribución membranal de $K_V10.1$

Puesto que el colesterol y el citoesqueleto son factores externos que modulan la membrana de $K_V10.1$, fue de nuestro interés descartar si existía algún factor intrínseco de la proteína que también contribuyera a la distribución membranal del canal. En 2000, Schönherr et al, publicaron un trabajo describiendo la regulación negativa de las corrientes de $K_V10.1$ dependiente de la unión de Ca^{2+} CaM. Puesto que, como se verá más adelante, las MRD modulan también negativamente las corrientes, nos preguntamos si Ca^{2+} y/o CaM pudieran jugar un papel en el reparto de $K_V10.1$ en la membrana.

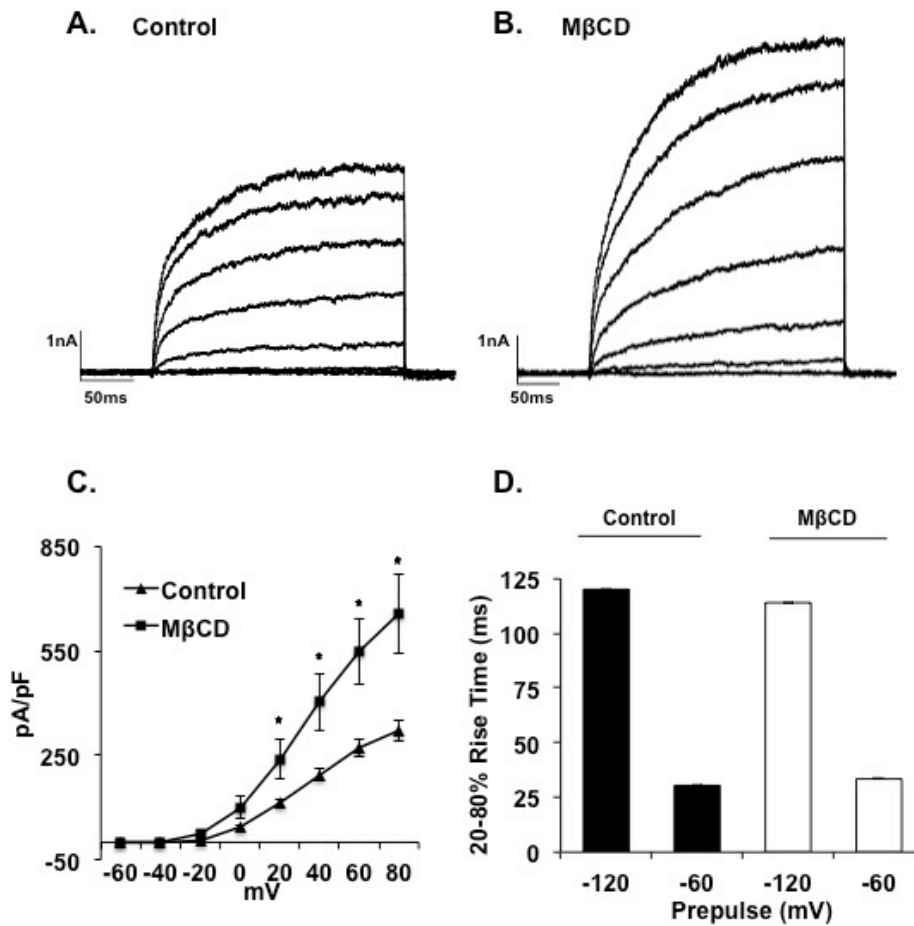


Fig. 5.10 La densidad de corriente de $K_v10.1$ aumenta después del tratamiento con $M\beta CD$. Trazo representativo de un experimento de Patch-Clamp en la modalidad de célula completa en células HEK- $K_v10.1$ A) control y B) después del tratamiento con 30 mM de $M\beta CD$. C) Representación gráfica de la densidad de corriente a diferentes voltajes de despolarización; de +20 mV a +80 mV el aumento es estadísticamente significativo ($n=7$, $p<0.05$). Tiempo de subida del 20 % al 80 % de las corrientes de $K_v10.1$ en células control y tratadas con $M\beta CD$ después de un pre-pulso de hiperpolarización de de 500 ms y una posterior despolarización a +40mV; no se encontraron diferencias en el tiempo de apertura con el tratamiento con $M\beta CD$.

Por este motivo se realizaron experimentos de quelación de calcio con EDTA en membranas de cerebro previo al fraccionamiento de las MRD. Los resultados se muestran en la figura 5.11. Arriba se muestran imágenes representativas de WB de los efectos del EDTA comparadas con el control en fracciones membranales de cerebro donde se observa una inversión de la distribución de $K_v10.1$ en las fracciones de membrana por el efecto de EDTA. El análisis densitométrico confirmó el cambio mostrando una razón MRD/no MRD de 0.284 ± 0.201 ($p < 0.001$). Posteriormente investigamos el papel de CaM en la distribución membranal de $K_v10.1$, para lo cual usamos la mutante generada y caracterizada por Schönherr C7 (F714S/F717S). Esta mutante carece la capacidad de unir una molécula de CaM en el dominio C-terminal y no es sensible electrofisiológicamente a la inhibición por ésta molécula. Nosotros transfectamos transitoriamente células HEK-293 con esta mutante y aislamos MRD. En la figura 5.11 se muestran imágenes representativas de WB y la gráfica de las razones calculadas para C7 comparadas con los controles (HEK- $K_v10.1$). En el caso de la mutante, la razón también disminuyó su valor a 0.233 ± 0.083 ($p < 0.001$). Estos resultados demuestran que tanto calcio como CaM son dos factores determinantes para la distribución membranal de $K_v10.1$ a las fracciones MRD, donde probablemente se lleve a cabo la regulación negativa de las corrientes.

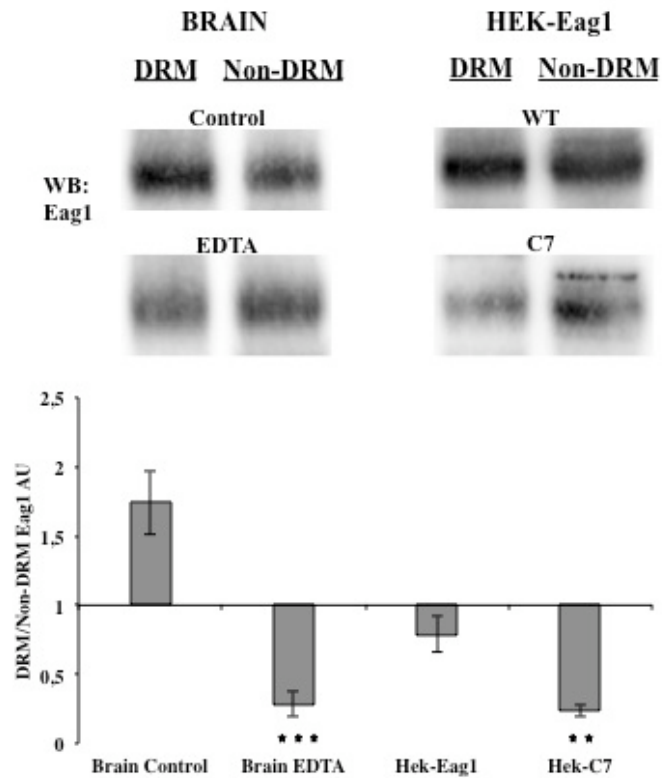


Fig. 5.11 Distribución de $K_v10.1$ (Eag1) en la membrana plasmática de diferentes modelos después de la quelación de calcio (cerebro) o la ausencia de unión de Ca^{2+} -CaM (mutate C7). Arriba: WB contra $K_v10.1$ en fracciones MRD y no-MRD de membranas plasmáticas de cerebro control y tratadas con EDTA y en células HEK- $K_v10.1$ y células HEK-C7. Abajo: Gráfica del cociente entre el $K_v10.1$ -MRD y el $K_v10.1$ -no-MRD en cerebro control (n=8, 1.74 ± 0.64), con EDTA (n=5, 0.28 ± 0.2 , $p < 0.001$), HEK- $K_v10.1$ (n=9, 0.79 ± 0.13) y HEK-C7 (n=4, 0.23 ± 0.04 , $p < 0.01$). Para ver imágenes con controles ir a Anexos.

III. Células de cáncer

a) Detección de $K_V10.1$ en la membrana plasmática de la línea celular de cáncer de próstata DU-145.

La expresión de $K_V10.1$ se ha descrito en diferentes líneas celulares de cáncer a nivel de mRNA, sin embargo la localización de la proteína funcional en la membrana de estas células no se había realizado hasta la fecha. En este trabajo se caracterizó primeramente la expresión y funcionalidad del canal $K_V10.1$ en la membrana plasmática de la línea celular de cáncer de próstata humano DU-145, antes de proseguir con el aislamiento de MRD.

Se analizó el valor de mRNA de $K_V10.1$ normalizado con el control de TfR en células DU-145 con respecto a un control de cerebro humano, encontrándose una alta expresión en estas células. Además, en experimentos de WB con anticuerpos contra $K_V10.1$ en membrana plasmática aislada de las mismas células se corroboró la expresión de la proteína (Fig. 5.12).

Posteriormente se realizaron experimentos de Patch-Clamp en la modalidad célula completa para detectar las corrientes de $K_V10.1$ en DU-145. Puesto que se trata de un sistema nativo sin sobre-expresión del canal, la dificultad de caracterizar las corrientes es mayor. Sin embargo se pudieron detectar en por lo menos 4 células corrientes rectificantes tardías con el efecto Cole-Moore esperado, compatibles con corrientes de $K_V10.1$. En la figura 5.12 se muestran registros representativos de las corrientes. Para una caracterización más detallada de dichas corrientes, futuros experimentos con bloqueadores específicos deberán ser realizados.

b) Reparto membranal de $K_V10.1$ las líneas celulares de cáncer DU-145, HeLa y SH-SY5Y.

Para analizar la localización del $K_V10.1$ en los dominios membranales de tres diferentes células de cáncer, se realizó el mismo protocolo de aislamiento de MRD a partir de membranas plasmáticas de células de cáncer. Dichas células han sido previamente caracterizadas con el expresión y funcionalidad de $K_V10.1$, DU-145 en este trabajo y HeLa y SH-S5Y5 en trabajos previos no publicados. En el análisis de Dot-blot se encontró enriquecimiento de GM1 en las fracciones ligeras correspondientes a MRD de las células DU-145, y en los experimentos de WB de las

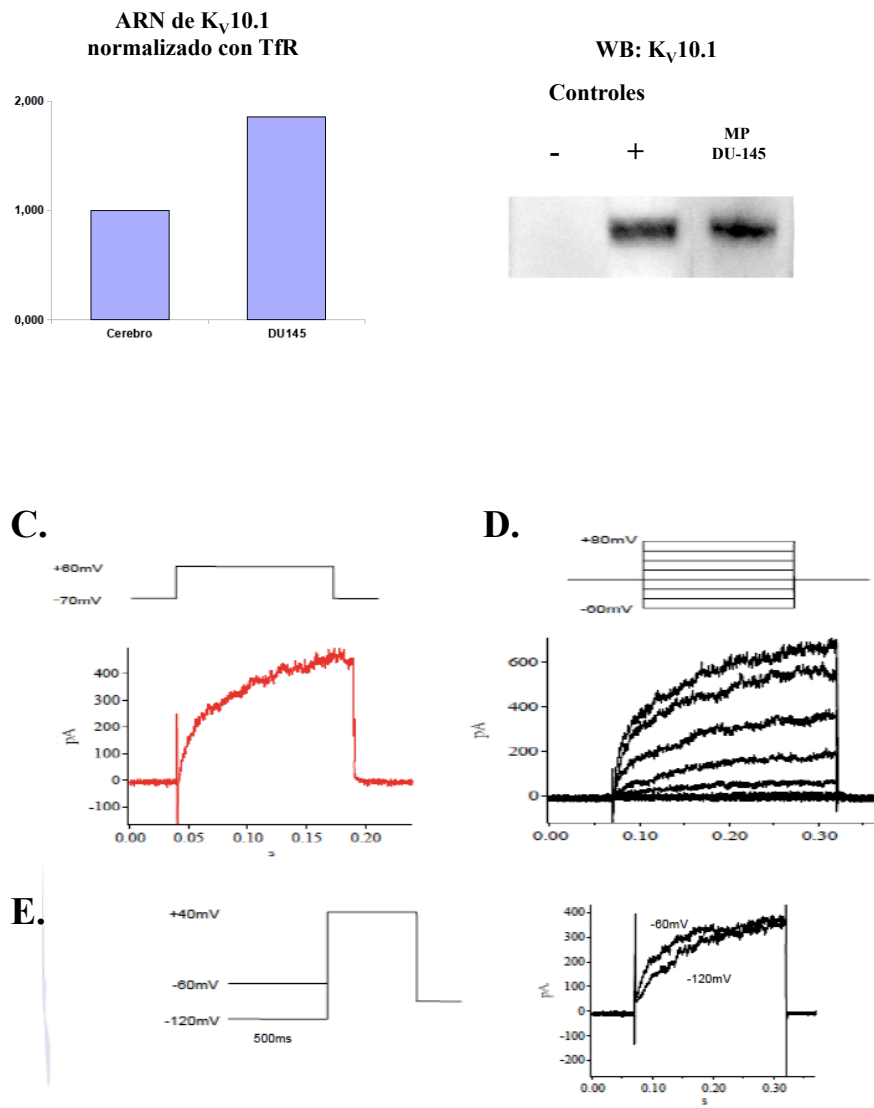


Fig. 5.12 Detección del $K_v10.1$ en la línea celular de cáncer de próstata DU-145. **A.** gráfica de la cantidad de ARN de $K_v10.1$ medido por PCR-TR, **B.** imagen representativa de WB donde se demuestra la expresión de la proteína $K_v10.1$ en la membrana plasmática (MP) de las células DU-145. Abajo: tres registros representativos con sus respectivos protocolos de estimulación **C.** corrientes salientes rectificantes tardías a 60mV, **D.** corrientes con la escalera ascendente de -60mV a +80mV; y **E.** del efecto Cole-Moore presente en las corrientes encontradas, característico de $K_v10.1$.

fracciones se encontraron los marcadores esperados (Fig. 5.13). En el caso de estas células, el porcentaje de Kv10.1 que hasta ahora se había encontrado dentro de MRD (en el caso de cerebro y HEK- Kv10.1) no está presente y todo el Kv10.1 de la membrana se localiza en las fracciones no-MRD. Para corroborar si este resultado era común para todas las líneas de cáncer o sólo un caso específico de la línea DU-145, analizamos la localización de Kv10.1 en otras dos líneas celulares con alta expresión de Kv10.1. Los resultados se muestran en la figura 5.14. Los WB representativos de Kv10.1 en las diferentes fracciones corrobora que efectivamente, Kv10.1 se localiza en ambos casos (HeLA y SH-S5Y5) fuera de las MRD en las membrana plasmática.

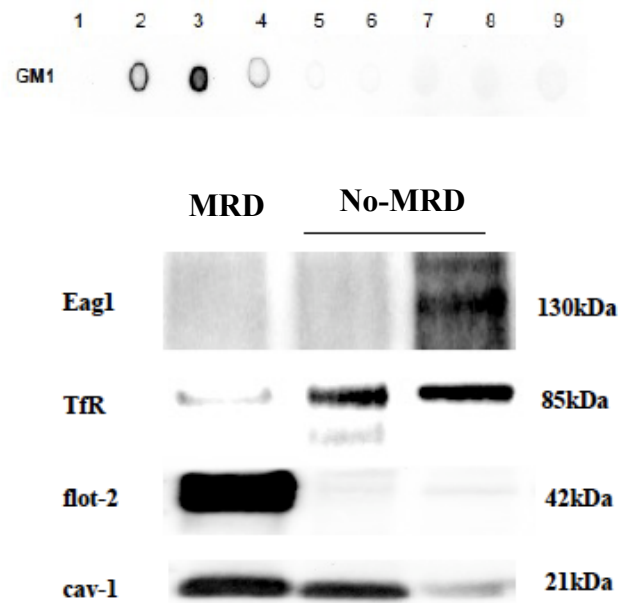


Fig. 5.13 Caracterización de las MRD aisladas de la línea DU-145. Arriba: Dot-blot para GM1 en las diferentes fracciones. Abajo: WB representativos donde se muestran las proteínas de MRD (flotilina-2 y caveolina-1) y la de no-MRD (TfR) en sus respectivas fracciones. $K_v10.1$ (Eagl) se encuentra completamente en las fracciones no-MRD

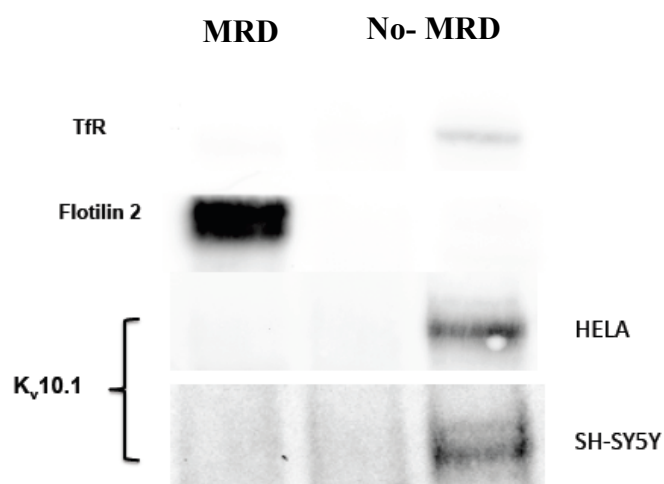


Fig. 5.14 WB representativo en células HeLa y SH-SY5Y. En ambas células $K_v10.1$ se localiza fuera de las MRD.

6.- DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que reporta la partición membranal del canal $K_V10.1$ en un sistema de expresión endógena. La expresión de $K_V10.1$ en el cerebro parece tener relevancia en funciones de la memoria y control del movimiento, sin embargo una propuesta mecánica de su papel en la actividad neuronal aún no ha sido publicada. La importancia de describir con mayor detalle el ambiente lipídico en el que esta proteína transmembranal se localiza ayuda indudablemente al entendimiento de su regulación estructural y funcional. Además, la descripción de los lípidos y proteínas que rodean e interactúan con $K_V10.1$ en los micro dominios de la membrana es importante para entender su función neuronal. Los dominios parecen ejercer un efecto regulador en las propiedades electrofisiológicas de $K_V10.1$ y este hecho abre las posibilidades de especular igualmente sobre los cambios en sus propiedades de señalización dependiendo del dominio donde se encuentre.

En el presente trabajo se demostró que: 1) $K_V10.1$ se expresa en células neuronales, pero no en células de la glía, 2) la expresión de $K_V10.1$ se divide en dos poblaciones que se reparten en diferentes dominios de la membrana plasmática, 3) la importancia de las concentraciones de colesterol para la regulación de su distribución y del citoesqueleto y la Ca-CaM como factores adicionales dependiendo del sistema, 4) la dependencia de la actividad conductora de $K_V10.1$ de la concentración de colesterol membranal en un sistema heterólogo y 5) el diferente reparto de $K_V10.1$ en líneas celulares de cáncer.

a) $K_V10.1$ se expresa en células neuronales únicamente

La expresión de $K_V10.1$ en el tejido neuronal se ha demostrado por varios grupos usando diferentes técnicas. Saganich y cols. demostraron en 2001 la presencia de mRNA de $K_V10.1$ por medio de hibridación in situ en neuronas de la corteza, hipocampo, cerebelo y bulbo olfatorio [69]. Las neuronas que expresaban NeuN eran negativas para el marcador de neuronas inhibitorias, expresaban el mRNA de $K_V10.1$, lo cual sugería que el $K_V10.1$ se expresaba principalmente en neuronas, no así en glía. Martin y cols. demostraron en 2008 la expresión de la proteína $K_V10.1$ en diferentes regiones del cerebro de ratas por inmunohistoquímica [70] y Gomez-Varela mostró en 2010 la localización presináptica de $K_V10.1$ en cultivos de neuronas hipocampales [16]. En ninguno de los estudios se buscó dirigidamente la expresión de $K_V10.1$ en glía. En este trabajo hemos demostrado que en cultivos de células gliales de ratón no existe expresión de $K_V10.1$. La importancia del resultado reside en el hecho de que

50% de los gliomas humanos expresan $K_V10.1$, así como también el 70% de tumores de otros tejidos.

b) Reparto de $K_V10.1$ en los diferentes subdominios de la membrana plasmática

Hoy en día se conocen muchas proteínas que se asocian a las MRD, tales como caveolinas, flotilinas, Src, Lck, Rab11, H-ras, distroglicanos, Herg, $K_V1.5$, $K_V1.4$ y $K_V4.3$, entre otros. También existe otro grupo amplio de proteínas que no interaccionan con esos dominios membranales tales como TfR, calnexina, la Na/K ATPasa, K-ras, $K_V3.2$ y $K_V4.2$ [57, 71-79]. En este trabajo, nuestros resultados demuestran que el $K_V10.1$ de tejido neuronal se distribuye tanto en MRD como fuera de ellas y sugiere que existen dos poblaciones del canal que difieren entre sí por su afinidad para interactuar con lípidos y proteínas específicas.Cuál de las dos formas del $K_V10.1$ es la forma estable y cuál la transitoria necesita estudiarse en el futuro. Otros canales han mostrado tener la misma característica que $K_V10.1$ y parecen moverse fuera y dentro de las MRD, como es el caso de Kir2, $K_V2.1$, $K_V4.1$ y el receptor nicotínico de acetilcolina [60, 78, 80]. Experimentos de mutación de los dominios transmembranales de las proteínas han demostrado que la secuencia de aminoácidos es importante para encajar con el grosor de las MRD y poder asociarse a ellas. El estado conformacional de las proteínas también juega un papel importante en el reparto a los diferentes dominios de la membrana [81-83]. Dichos cambios conformacionales pueden deberse a interacciones proteína-proteína o lípido-proteína. Por ejemplo, la cinasa PKC- β II se asocia con las MRD dependiendo de la co-expresión de la proteína ZAP70 en células de leucemia [84]. El receptor de la lipoproteína de baja densidad-1 (LPR-1) reside fuera de las MRD en líneas celulares de fibroblastos y células epiteliales, pero se asocia con las MRD en líneas de músculo liso [85]. Estos ejemplos indican que existe una regulación más compleja de tipo post-traducciona que se encarga del proceso de distribución membranar de las proteínas. Dichos eventos pudieran incluir fosforilaciones, glucosilaciones, interacciones entre proteínas de membrana, como el caso de Lck y CD45 en la sinapsis inmunológica o interacciones entre proteínas de membrana y el citoesqueleto como en el caso de la transmisión de fuerza lateral entre distroglicano y distrofina en el músculo esquelético [55, 86]. Cualquiera que sea el caso, la asociación de una misma proteína a fases membranales con diferentes propiedades fisicoquímicas implica forzosamente un cambio de conformación.

- c) La distribución de $K_{V10.1}$ en la membrana depende del colesterol, el citoesqueleto y la disponibilidad del calcio intracelular.

La extracción de colesterol con M β CD demostró la estrecha relación que existe entre la concentración de este lípido y la distribución de $K_{V10.1}$. Aunque la M β CD tiene un efecto directo sobre el colesterol, y uno indirecto sobre GM1 y las proteínas, existe núcleo de esfingolípidos resistente a M β CD que se mantiene flotante en los gradientes, a pesar de la disminución en la concentración del colesterol [51]. En nuestros experimentos, pudimos observar este efecto puesto que la distribución de GM1 sufrió pocos cambios a pesar de extraer un 80% del colesterol de las membranas neuronales. Existen varios ejemplos de que los efectos de la extracción de colesterol varía ampliamente entre sistemas. En las membranas aisladas de cerebro se requirió 30 mM de M β CD para extraer 80% del colesterol total, mientras que en las células HEK- $K_{V10.1}$, la misma cantidad de colesterol pudo ser extraída con tan solo 10 mM del mismo compuesto. En otros tejidos, como el músculo esquelético, 15 mM de M β CD extrae únicamente 12 % de colesterol, pero con un efecto importante en la contractilidad muscular. El efecto en la distribución de las proteínas también puede presentar amplias variaciones. Mientras algunas pierden su asociación completamente con las MRD con el tratamiento con M β CD, como es el caso de Lck, otras se disocian sólo parcialmente en las mismas condiciones, como el caso de Thy-1 [51]. En nuestro caso, tanto $K_{V10.1}$ como flotilina-2 sufrieron sólo disociación parcial con el tratamiento. Este resultado podría indicar que el 20% de colesterol remanente es capaz de sostener alguna asociación residual de $K_{V10.1}$ con las MRD que se han mantenido sin colesterol ó que existen otros factores además del colesterol que participan en la asociación de $K_{V10.1}$ con dominios ricos en esfingolípidos. Puesto que la proporción en la que $K_{V10.1}$ se disocia de las MRD no es proporcional a la pérdida del colesterol, decidimos buscar otros factores asociados en la estabilización del canal con los micro dominios.

El papel del citoesqueleto anclado a la membrana plasmática para la estabilización de su estructura ha quedado establecida en las últimas décadas y se ha reforzado con el nuevo modelo de la membrana propuesto por Kusumi y cols [38]. En 2008, el grupo de Lebreton mostró a través de microscopía de fluorescencia que la actina juega un papel muy importante para anclar y agrupar proteínas transmembranales en los dominios basales y apicales de células epiteliales caninas [87]. Lillemeier y cols demostraron a través de microscopía de fuerza atómica que la actina es el principal

regulador para el agrupamiento de las proteínas membranales en “islas” independientemente del contenido lipídico [88]. Y finalmente, el mencionado modelo de membrana donde los “cercos” de actina tienen la mayor jerarquía organizadora de los dominios de la membrana, es capaz de explicar la difusión 20 veces menor de las moléculas en las membranas biológicas cuando se compara con membranas artificiales. A pesar de los descubrimientos respecto al rol del citoesqueleto por medios ópticos, en la bioquímica, la importancia del citoesqueleto cortical sobre el efecto de la solubilización diferencial de las fases de las membranas parece no estar claro todavía. En la bibliografía existen muchos estudios que varían en el tipo de proteína analizada, en la forma de perturbar al citoesqueleto y en la forma de aislar las MRD. En sistemas de células vivas los agentes más utilizados son las latrunculinas y las citocalasinas, que bloquean y previenen la polimerización de la actina respectivamente. En varios estudios se ha observado que la integridad de las redes de actina son importantes para la asociación de ciertas proteínas con las MRD, como es el caso de receptores nicotínicos de acetilcolina, y canales de aniones, calcio y potasio [89-92]. Sin embargo, el uso de estos agentes a las concentraciones y tiempos de incubación usuales no desprende el citoesqueleto cortical fuertemente anclado a la membrana, un aspecto trascendental al manipular las membranas crudas. En este trabajo nosotros usamos concentraciones necesarias de los agentes removedores del citoesqueleto para que las membranas purificadas tuvieran la menor cantidad de actina posible, algo que generalmente no se considera en otros estudios. Con nuestra metodología el citoesqueleto es prácticamente rasurado de las membranas, lo cual permite observar el efecto puro de los detergentes en las fases. Ciana y cols mostraron en membranas de eritrocitos, que sin la incubación con carbonato de sodio para la remoción del citoesqueleto, las MRD no se podían aislar [93]. Una desventaja de la metodología que usaban en ese artículo era que el carbonato de sodio era incorporado después de la solubilización con Tritón X-100. En nuestros experimentos, nosotros eliminamos primero el citoesqueleto y después realizamos la solubilización con detergente y mostramos que sin ese “cerco” proteico, las membranas de neuronas pierden su organización original. Esto coincide con el modelo de la jerarquía a mesoescala de la membrana plasmática.

En nuestros experimentos, el papel del citoesqueleto no parece ser el mismo en las membranas aisladas de cerebro que en las células HEK- K_v10.1. Tanto los experimentos de bioquímica como de microscopía indican fuertemente que la

asociación de $K_v10.1$ con los dominios MRD persiste a pesar de los efectos de Lat A sobre la polimerización de la actina. Dichas disparidades entre ambos modelos de estudio puede atribuirse a las diferencias en la constitución del citoesqueleto en ambos tipos de células. Para apoyar este argumento se ha observado que radixin, una proteína que conecta al receptor GABA A alfa5 al citoesqueleto de actina en cerebro, no interactúa con el receptor cuando se analiza en células HEK-293 transfectadas [94]. También se ha reportado que el receptor adrenérgico 2c modifica su localización celular dependiendo del tipo de célula que se analiza y del grado de diferenciación de la misma [95]. Las interacciones entre $K_v10.1$ y proteínas del citoesqueleto que pudieran estarse llevando a cabo en neuronas pueden diferir completamente de las que se llevan a cabo en células HEK- $K_v10.1$ y por lo tanto, al ser alteradas, muestran efectos diferentes en la partición membranal de $K_v10.1$.

Finalmente nos preguntamos si existiría algún otro factor importante para la distribución de $K_v10.1$ en la membrana plasmática. Para esto decidimos usar factores que tuvieran claros efectos en sus propiedades electrofisiológicas, tales como el calcio y la calmodulina. En el trabajo de Schönherr y cols de 2000, se describió que a una concentración de 200 nM de calcio intracelular, en presencia de CaM, las corrientes de $K_v10.1$ prácticamente son abolidas y generaron la mutante denominada C7 que es incapaz de unir la molécula Ca-CaM en su dominio C-terminal y es resistente a este efecto. En este estudio observamos que cuando el calcio se quelaba del medio en las membranas aisladas de cerebro o cuando se usaba la mutante C7 transfectada en células HEK-293 pudimos observar el mismo efecto, que $K_v10.1$ perdía su asociación con las MRD [13]. Este es el primer estudio que propone a la Ca-CaM como un factor determinante en la asociación proteína-MRD. Buscando en la literatura se pueden obtener indicios indirectos de que el calcio o la calmodulina participan en esta asociación, sin embargo no se abordan en detalle por los autores. En el trabajo de Suzuki y cols describieron la asociación de CaMKII a las MRD y en un trabajo subsecuente demostraron por análisis mutacional que los dominios de interacción y no la acilación eran los determinantes para su asociación a las MRD. Con un análisis detallado de sus resultados podemos observar que cada vez que el sitio de unión a CaM falta, la asociación con MRD se pierde [96]. En otro estudio Crossthwaite y cols analizan la asociación con MRD de las adenilil ciclasas y encuentran que sólo las que son sensibles a calcio se reparten a las MRD y que los dominios citosólicos y no los transmembranales son los determinantes en dicho reparto [97]. Finalmente, los

canales dependientes de calcio como los BK se han encontrado asociados a estos microdominios [98]. Por qué el calcio o proteínas que unen calcio podrían estar jugando un papel en la regulación de la localización de algunas proteínas de membrana es algo que debe ser estudiado con más profundidad. Algunos estudios han demostrado que el calcio libre es capaz de unirse a la membrana, cambiar la carga de superficie y disminuir la tasa de flip-flop, una condición que contribuye al estado sólido membranal, tipo MRD [99]. También está el estudio de Han y cols donde se demuestra que cambios en los fosfolípidos de membrana hacia un patrón similar de fosfolípidos típicamente encontrados dentro de las MRD se puede estimular con ionóforos de calcio en células de leucemia. Demostraron que un aumento en la concentración intracelular de calcio es una condición suficiente para generar el efecto [100]. Esto, en conjunto con nuestros resultados, indican que la regulación de la distribución de algunas proteínas de membrana podría formar parte de la lista de funciones del calcio intracelular. El hecho que diversos canales de calcio y muchas proteínas reguladoras de calcio (calcequestrina, calreticulina y bombas de calcio) residan dentro de los dominios lipídicos podría explicar la fina regulación de los picos de calcio zonas muy específicas de la región submembranal.

d) La conductancia de potasio del $K_v10.1$ depende de las concentraciones de colesterol en la membrana.

Hemos demostrado que cuando se pierde la estabilidad de las MRD por extracción de colesterol con MBCD, la densidad de corriente de las células HEK- $K_v10.1$ aumentan significativamente con despolarizaciones positivas. Este aumento no se debe a un volumen mayor de las células o por efectos en los estados cerrados del canal, lo cual sugiere que se debe a que más canales están abiertos cuando la probabilidad de apertura es mayor, o que los canales conducen más, esto últimos siendo lo menos probable. El trabajo previo de Camacho y cols mostró que cuando el citoesqueleto se perturba con citocalasina B, las densidades de corriente se modifican dependiendo de la parte del citoesqueleto que se altere [23]. Estos resultados, en conjunto con los de Schönherr sobre la inhibición de $K_v10.1$ con Ca-CaM y los nuestros con el efecto de la MBCD sugieren que alteraciones en la organización de la membrana y por consecuencia la deslocalización de $K_v10.1$ fuera de las DRM parecer favorecer la apertura de esos canales liberados. Podríamos hipotetizar que la población de $K_v10.1$ residente de las MRD, que constituye aproximadamente el 60% de la membrana en tejido nativo, podría estar actuando como una reserva de canales “en espera”, que

probablemente no contribuyan a las corrientes rectificadoras tardías totales. Las MRD constituirían una especie de “corrales” donde los $K_V10.1$ son menos conductores. Esta línea de pensamiento ha sido considerada por otros grupos que también han demostrado que cuando los canales dependientes de voltaje son extraídos de las MRD a través de algún tipo de perturbación de la membrana, las corrientes aumentan, como en el caso de Herg, $K_V1.5$ y $Ca_V2.2$ [91, 101-103]. En el caso de $K_V2.1$ se ha propuesto que los canales se agrupan en “cercos” o “corrales” en la membrana donde son incapaces de ejercer su función conductora eficientemente y probablemente realizan alguna otra función [62]. La forma en que los canales sufren cambios en sus propiedades electromecánicas por el ambiente lipídico y las proteínas de unión es algo estudiado ampliamente hoy en día. En la literatura hay evidencia de que un aumento en la concentración de colesterol en la membrana, así como de las ceramidas C2, C6 y C18, aumentan la capacitancia de la membrana. Además el potencial de membrana, la permeabilidad de la misma y las propiedades de apertura de algunos transportadores se ven afectadas por las concentraciones de colesterol. Este hecho apunta a que la membrana ha logrado generar medios de regulación intrínsecos para la modulación de su permeabilidad a través de interacciones lípido-proteína. En el caso de $K_V10.1$, un canal localizado en la membrana presináptica podría estar regulado negativamente en estas regiones ricas en colesterol, Ca-CaM y una compleja estructura del citoesqueleto; mientras que los $K_V10.1$ localizados en otras regiones fuera de la membrana presináptica ejercen su función conductora libremente.

Finalmente, con respecto a la expresión de $K_V10.1$ en las líneas celulares de cáncer, los resultados mostrados en este trabajo, abren una nueva posibilidad a que las diferencias encontradas en los efectos de $K_V10.1$ en células de expresión nativa, como lo son las neuronas, comparado con los efectos oncogénicos encontrados en células no neuronales, puedan radicar en su diferente localización en la membrana plasmática de las células. Como se ha discutido, la localización de $K_V10.1$ en la membrana ejerce un efecto regulador en la función conductora de $K_V10.1$. Si en el caso de las células de cáncer, la población de canales regulada a la baja o “apagados” dentro de las MRD está ausente, estaríamos ante la presencia de un exceso de actividad de $K_V10.1$ en la membrana de dichas células, ejerciendo así sus efectos oncogénicos. Varios estudios han demostrado que las corrientes salientes de potasio son indispensables para sostener una alta tasa de mitosis [104], lo cual, estaría a favor de la hipótesis de que canales “encendidos” fuera de las MRD favorecen el efecto transformador de $K_V10.1$

en células no neuronales. Por otro lado, si tomamos en cuenta la hipótesis del efecto transformador no conductor de $K_v10.1$, el cual establece que el potencial oncogénico está ligado a cascadas de señalización intracelular y no a una conductancia aumentada del canal, la localización membranal de $K_v10.1$ también juega un papel importante, puesto que la localización en diferentes microdominos o microambientes, regula las diferentes interacciones con otras proteínas de membrana o perimembranales, que a su vez, regulan diferentes vías de señalización. La ausencia de $K_v10.1$ en las MRD de células cancerosas, podría estar evitando la activación de vías reguladoras antimitóticas y promover vías mitóticas fuera de las MRD, por ejemplo. Sea cual sea el caso, la diferencia en la localización de $K_v10.1$ en la membrana plasmática de células no transformadas versus las transformadas encontrada en este trabajo, abre las puertas a una nueva hipótesis en el papel de $K_v10.1$ en el cáncer, tomando en cuenta principalmente vías pro-mitóticas desencadenadas por proteínas preferencialmente localizadas fuera de las MRD.

7.- CONCLUSIÓN

El canal K_v10.1 expresado en neuronas presenta dos poblaciones distintas en la membrana plasmática, una asociada a las MRD que depende de colesterol, el citoesqueleto y la disponibilidad de calcio, y otra fuera de estos dominios. Esta localización en la membrana regula su función conductora a la alta cuando se sale de los dominios. Las diferentes localizaciones podrían jugar un papel en su función oncogénica.

8.- REFERENCIAS

1. Harvey Lodish, A.B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, *Molecular Cell Biology*. 5th ed 2003, USA: Freeman, W.H. & Company.
2. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell* 2002, New York: Garland Science.
3. Blunck, R. and Z. Batulan, *Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels*. *Front Pharmacol*, 2012. **3**: p. 166.
4. Gutman, G.A., et al., *International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels*. *Pharmacol Rev*, 2003. **55**(4): p. 583-6.
5. Song, W.J., *Genes responsible for native depolarization-activated K⁺ currents in neurons*. *Neurosci Res*, 2002. **42**(1): p. 7-14.
6. Nerbonne, J.M. and W. Guo, *Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002. **13**(4): p. 406-9.
7. Pongs, O., *Ins and outs of cardiac voltage-gated potassium channels*. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. **9**(3): p. 311-5.
8. O'Grady, S.M. and S.Y. Lee, *Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(8): p. 1578-94.
9. Feske, S., E.Y. Skolnik, and M. Prakriya, *Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(7): p. 532-47.
10. Bauer, C.K. and J.R. Schwarz, *Physiology of EAG K⁺ channels*. *J Membr Biol*, 2001. **182**(1): p. 1-15.
11. Bruggemann, A., et al., *Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP*. *Nature*, 1993. **365**(6445): p. 445-8.
12. Garcia-Ferreiro, R.E., et al., *Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole*. *J Gen Physiol*, 2004. **124**(4): p. 301-17.
13. Schonherr, R., K. Lober, and S.H. Heinemann, *Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca(2+)/calmodulin*. *EMBO J*, 2000. **19**(13): p. 3263-71.
14. Hemmerlein, B., et al., *Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours*. *Mol Cancer*, 2006. **5**: p. 41.
15. Pardo, L.A., et al., *Oncogenic potential of EAG K(+) channels*. *EMBO J*, 1999. **18**(20): p. 5540-7.
16. Gomez-Varela, D., et al., *Characterization of Eag1 channel lateral mobility in rat hippocampal cultures by single-particle-tracking with quantum dots*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8858.
17. Chen, Y., et al., *Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19257.
18. Kaplan, W.D. and W.E. Trout, 3rd, *The behavior of four neurological mutants of Drosophila*. *Genetics*, 1969. **61**(2): p. 399-409.

19. Chouinard, S.W., et al., *A potassium channel beta subunit related to the aldo-keto reductase superfamily is encoded by the Drosophila hyperkinetic locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6763-7.
20. Ufartes, R., et al., *Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(11): p. 2247-62.
21. Ferreira, N.R., et al., *Ether-a-go-go 1 (Eag1) potassium channel expression in dopaminergic neurons of basal ganglia is modulated by 6-hydroxydopamine lesion*. Neurotox Res, 2012. **21**(3): p. 317-33.
22. Ludwig, J., et al., *Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the Drosophila channel and its mammalian counterpart*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4451-8.
23. Camacho, J., et al., *Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels*. Pflugers Arch, 2000. **441**(2-3): p. 167-74.
24. Pardo, L.A., et al., *Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels*. J Cell Biol, 1998. **143**(3): p. 767-75.
25. Gavrilova-Ruch, O., R. Schonherr, and S.H. Heinemann, *Activation of hEAG1 potassium channels by arachidonic acid*. Pflugers Arch, 2007. **453**(6): p. 891-903.
26. Hegle, A.P., D.D. Marble, and G.F. Wilson, *A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-a-go-go K⁺ channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2886-91.
27. Tajima, N., et al., *Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein*. J Physiol, 2006. **571**(Pt 2): p. 349-59.
28. Lin, H., et al., *Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for oncogenic overexpression of ether a go-go K⁺ channel*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20362.
29. Griffith, L.C., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and potassium channel subunit eag similarly affect plasticity in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 10044-8.
30. Downie, B.R., et al., *Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36234-40.
31. Barenholz, Y., *Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts"*. Prog Lipid Res, 2002. **41**(1): p. 1-5.
32. Thomas, J.A. and F.R. Rana, *The influence of environmental conditions, lipid composition, and phase behavior on the origin of cell membranes*. Orig Life Evol Biosph, 2007. **37**(3): p. 267-85.
33. Singer, S.J., *A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure*. Ann N Y Acad Sci, 1972. **195**: p. 16-23.
34. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
35. Cai, M., et al., *Direct evidence of lipid rafts by in situ atomic force microscopy*. Small, 2012. **8**(8): p. 1243-50.
36. Gaus, K., et al., *Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15554-9.

37. Coskun, U. and K. Simons, *Membrane rafting: from apical sorting to phase segregation*. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1685-93.
38. Kusumi, A., et al., *Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(11): p. 604-15.
39. Shimshick, E.J. and H.M. McConnell, *Lateral phase separation in phospholipid membranes*. Biochemistry, 1973. **12**(12): p. 2351-60.
40. Shimshick, E.J. and H.M. McConnell, *Lateral phase separations in binary mixtures of cholesterol and phospholipids*. Biochem Biophys Res Commun, 1973. **53**(2): p. 446-51.
41. Shimshick, E.J., et al., *Lateral phase separations in membranes*. J Supramol Struct, 1973. **1**(4): p. 285-94.
42. Almeida, P.F., A. Pokorny, and A. Hinderliter, *Thermodynamics of membrane domains*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1720**(1-2): p. 1-13.
43. Hinderliter, A., R.L. Biltonen, and P.F. Almeida, *Lipid modulation of protein-induced membrane domains as a mechanism for controlling signal transduction*. Biochemistry, 2004. **43**(22): p. 7102-10.
44. London, E. and D.A. Brown, *Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1508**(1-2): p. 182-95.
45. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. Science, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
46. Pike, L.J., et al., *Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis*. Biochemistry, 2002. **41**(6): p. 2075-88.
47. Avisar, D., et al., *Cell-cycle-dependent resistance to Bacillus thuringiensis Cry1C toxin in Sf9 cells*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 14): p. 3163-71.
48. Koumanov, K.S., C. Wolf, and P.J. Quinn, *Lipid composition of membrane domains*. Subcell Biochem, 2004. **37**: p. 153-63.
49. Brown, D.A., *Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 430-9.
50. Rodal, S.K., et al., *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 961-74.
51. Ilangumaran, S. and D.C. Hoessli, *Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane*. Biochem J, 1998. **335** (Pt 2): p. 433-40.
52. Lang, T., *SNARE proteins and 'membrane rafts'*. J Physiol, 2007. **585**(Pt 3): p. 693-8.
53. Zuidscherwoude, M., et al., *Microdomains in the membrane landscape shape antigen-presenting cell function*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(2): p. 251-63.
54. George, K.S. and S. Wu, *Lipid raft: A floating island of death or survival*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **259**(3): p. 311-9.
55. Vega-Moreno, J., et al., *Cholesterol depletion uncouples beta-dystroglycans from discrete sarcolemmal domains, reducing the mechanical activity of skeletal muscle*. Cell Physiol Biochem, 2012. **29**(5-6): p. 905-18.
56. Martens, J.R., et al., *Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7443-6.

57. Martens, J.R., K. O'Connell, and M. Tamkun, *Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(1): p. 16-21.
58. Bermudez, V., et al., *Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution*. J Lipid Res, 2010. **51**(9): p. 2629-41.
59. Fantini, J. and F.J. Barrantes, *Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(11): p. 2345-61.
60. O'Connell, K.M. and M.M. Tamkun, *Targeting of voltage-gated potassium channel isoforms to distinct cell surface microdomains*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 10): p. 2155-66.
61. O'Connell, K.M., et al., *Kv2.1 potassium channels are retained within dynamic cell surface microdomains that are defined by a perimeter fence*. J Neurosci, 2006. **26**(38): p. 9609-18.
62. O'Connell, K.M., R. Loftus, and M.M. Tamkun, *Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K⁺ channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12351-6.
63. Aiyar, J., S. Grissmer, and K.G. Chandy, *Full-length and truncated Kv1.3 K⁺ channels are modulated by 5-HT_{1c} receptor activation and independently by PKC*. Am J Physiol, 1993. **265**(6 Pt 1): p. C1571-8.
64. Wulff, H., C. Beeton, and K.G. Chandy, *Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003. **6**(5): p. 640-7.
65. Spencer, R.H., K.G. Chandy, and G.A. Gutman, *Immunological identification of the Shaker-related Kv1.3 potassium channel protein in T and B lymphocytes, and detection of related proteins in flies and yeast*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **191**(1): p. 201-6.
66. Pottosin, II, et al., *Methyl-beta-cyclodextrin reversibly alters the gating of lipid rafts-associated Kv1.3 channels in Jurkat T lymphocytes*. Pflugers Arch, 2007. **454**(2): p. 235-44.
67. Schindler, J. and H.G. Nothwang, *Enrichment of brain plasma membranes by affinity two-phase partitioning*. Methods Mol Biol, 2009. **528**: p. 119-26.
68. Yao, Y., et al., *The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae*. Cell Res, 2009. **19**(4): p. 497-506.
69. Saganich, M.J., E. Machado, and B. Rudy, *Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain*. J Neurosci, 2001. **21**(13): p. 4609-24.
70. Martin, S., et al., *Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain*. Neuroscience, 2008. **155**(3): p. 833-44.
71. Zhao, H., et al., *Neurite outgrowth is dependent on the association of c-Src and lipid rafts*. Neurochem Res, 2009. **34**(12): p. 2197-205.
72. de Diesbach, P., et al., *Differential subcellular membrane recruitment of Src may specify its downstream signalling*. Exp Cell Res, 2008. **314**(7): p. 1465-79.
73. Rajendran, L., S. Le Lay, and H. Illges, *Raft association and lipid droplet targeting of flotillins are independent of caveolin*. Biol Chem, 2007. **388**(3): p. 307-14.

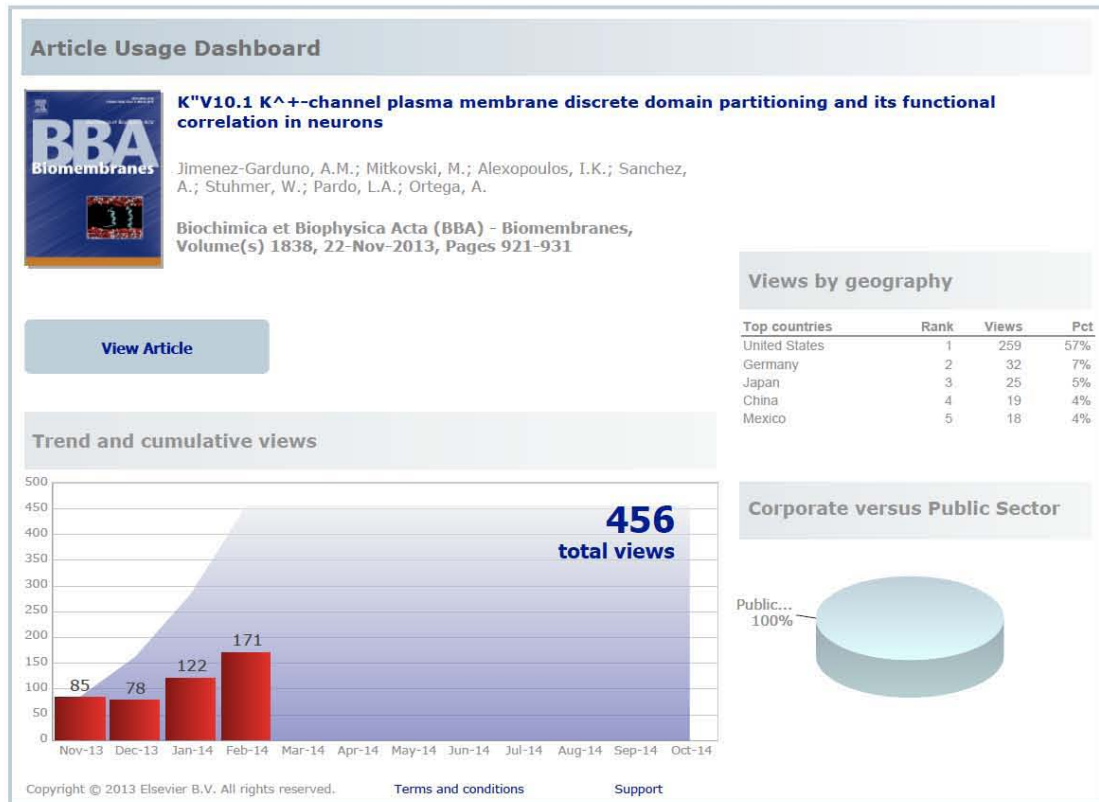
74. Lommerse, P.H., et al., *Single-molecule diffusion reveals similar mobility for the Lck, H-ras, and K-ras membrane anchors*. Biophys J, 2006. **91**(3): p. 1090-7.
75. Niv, H., et al., *Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells*. J Cell Biol, 2002. **157**(5): p. 865-72.
76. Foster, L.J., C.L. De Hoog, and M. Mann, *Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5813-8.
77. Yu, M.J., et al., *Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(3): p. C661-78.
78. Xia, F., et al., *Targeting of voltage-gated K⁺ and Ca²⁺ channels and soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins to cholesterol-rich lipid rafts in pancreatic alpha-cells: effects on glucagon stimulus-secretion coupling*. Endocrinology, 2007. **148**(5): p. 2157-67.
79. Lam, R.S., A.R. Shaw, and M. Duszyk, *Membrane cholesterol content modulates activation of BK channels in colonic epithelia*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1667**(2): p. 241-8.
80. Tikku, S., et al., *Relationship between Kir2.1/Kir2.3 activity and their distributions between cholesterol-rich and cholesterol-poor membrane domains*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(1): p. C440-50.
81. Kundu, A., et al., *Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6508-15.
82. Lee, A.G., *Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1612**(1): p. 1-40.
83. McIntosh, T.J., A. Vidal, and S.A. Simon, *Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts*. Biophys J, 2003. **85**(3): p. 1656-66.
84. zum Buschenfelde, C.M., et al., *Recruitment of PKC-betaII to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70*. Leukemia, 2010. **24**(1): p. 141-52.
85. Wu, L. and S.L. Gonias, *The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts*. J Cell Biochem, 2005. **96**(5): p. 1021-33.
86. Irles, C., et al., *CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 189-97.
87. Lebreton, S., S. Paladino, and C. Zurzolo, *Selective roles for cholesterol and actin in compartmentalization of different proteins in the Golgi and plasma membrane of polarized cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 29545-53.
88. Lillemeier, B.F., et al., *Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 18992-7.
89. Bruses, J.L., N. Chauvet, and U. Rutishauser, *Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(2): p. 504-12.

90. Kizhatil, K. and L.M. Albritton, *System y^+ localizes to different membrane subdomains in the basolateral plasma membrane of epithelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(6): p. C1784-94.
91. Robinson, P., et al., *Formation of N-type (Cav2.2) voltage-gated calcium channel membrane microdomains: Lipid raft association and clustering*. *Cell Calcium*, 2010. **48**(4): p. 183-94.
92. Brainard, A.M., et al., *Maxi-K channels localize to caveolae in human myometrium: a role for an actin-channel-caveolin complex in the regulation of myometrial smooth muscle K^+ current*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **289**(1): p. C49-57.
93. Ciana, A., et al., *On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1808**(1): p. 183-90.
94. Loebrich, S., et al., *Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton*. *EMBO J*, 2006. **25**(5): p. 987-99.
95. Hurt, C.M., F.Y. Feng, and B. Kobilka, *Cell-type specific targeting of the alpha 2c-adrenoceptor. Evidence for the organization of receptor microdomains during neuronal differentiation of PC12 cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(45): p. 35424-31.
96. Du, F., et al., *Mechanisms for association of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II with lipid rafts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **347**(3): p. 814-20.
97. Crossthwaite, A.J., et al., *The cytosolic domains of Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 6380-91.
98. Weaver, A.K., et al., *BK channels are linked to inositol 1,4,5-triphosphate receptors via lipid rafts: a novel mechanism for coupling $[Ca^{2+}]_i$ to ion channel activation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(43): p. 31558-68.
99. Von Tscharner, V. and G.K. Radda, *The effect of fatty acids on the surface potential of phospholipid vesicles measured by condensed phase radioluminescence*. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **643**(2): p. 435-48.
100. Han, X., et al., *IgE receptor-mediated alteration of membrane-cytoskeleton interactions revealed by mass spectrometric analysis of detergent-resistant membranes*. *Biochemistry*, 2009. **48**(27): p. 6540-50.
101. Lin, J., et al., *The regulation of the cardiac potassium channel (HERG) by caveolin-1*. *Biochem Cell Biol*, 2008. **86**(5): p. 405-15.
102. Balse, E., et al., *Cholesterol modulates the recruitment of Kv1.5 channels from Rab11-associated recycling endosome in native atrial myocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(34): p. 14681-6.
103. Tajima, N., et al., *Activity of BK(Ca) channel is modulated by membrane cholesterol content and association with Na^+/K^+ -ATPase in human melanoma IGR39 cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(7): p. 5624-38.
104. Takahashi, A., H. Yamaguchi, and H. Miyamoto, *Change in K^+ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(2 Pt 1): p. C328-36.

9.- ANEXOS

I.

Estadística del artículo

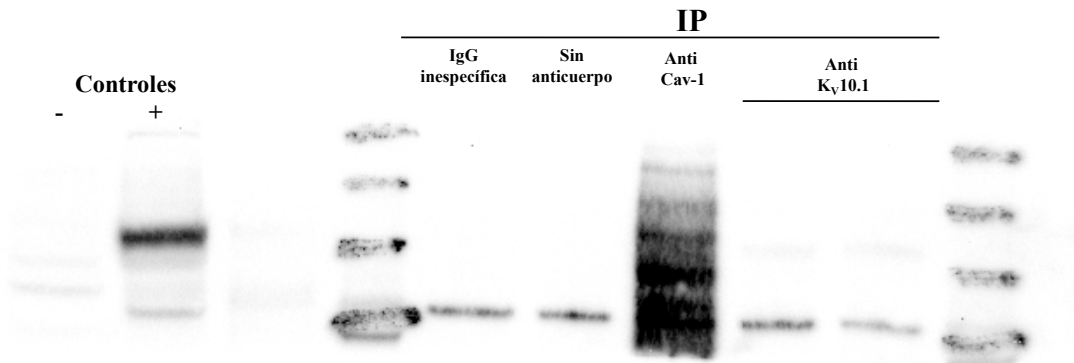


II.

Imágenes originales sin y con contraste completas de la Fig. 5.5

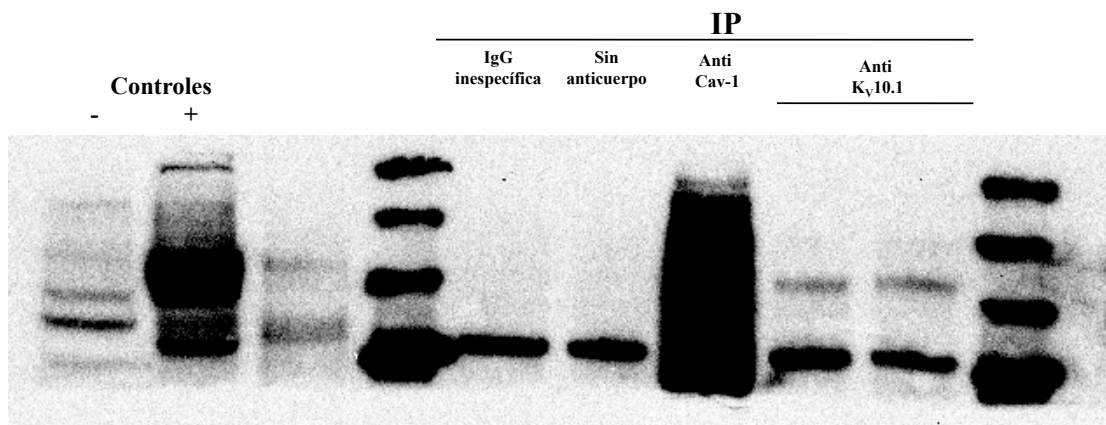
Sin contraste:

WB: K_v10.1



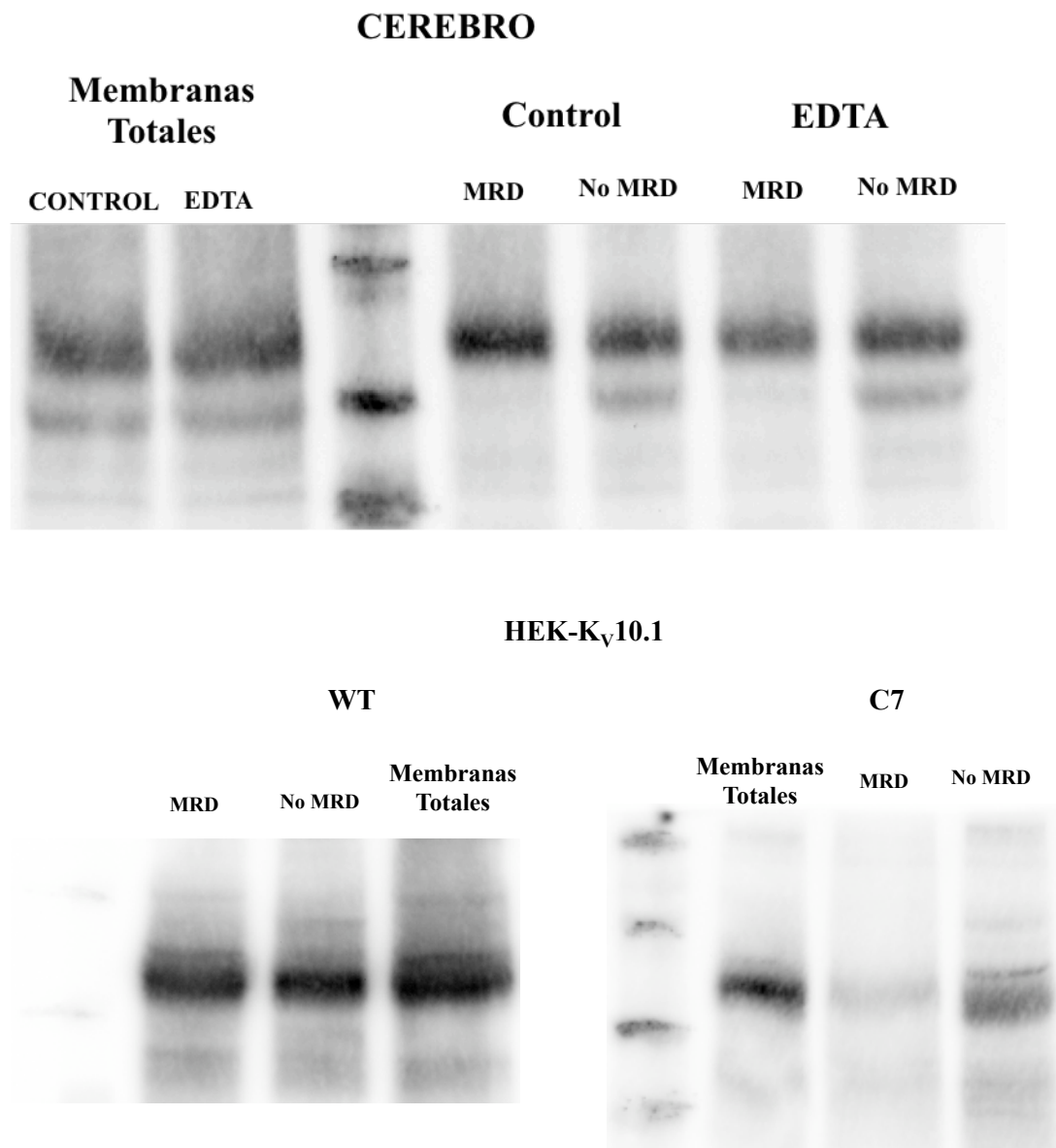
Con contraste:

WB: K_v10.1



III.

Imágenes con controles de la figura 5.11



IV. Artículo Publicado

Biochimica et Biophysica Acta 1838 (2014) 921–931



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem



K_v10.1 K⁺-channel plasma membrane discrete domain partitioning and its functional correlation in neurons[☆]



Aura M. Jiménez-Garduño^{a,b}, Miso Mitkovski^c, Ioannis K. Alexopoulos^c, Araceli Sánchez^b, Walter Stühmer^b, Luis A. Pardo^{b,*}, Alicia Ortega^{a,**}

^a Biochemistry Department, Medicine Faculty, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Av. Universidad #3000, 04510 Coyoacán, Mexico City, Mexico

^b Molecular Biology and Neuronal Signaling Department (MBNS), Max Planck Institute for Experimental Medicine (MPI-EM), Hermann-Rein-Str. 3, 37075 Göttingen, Germany

^c Light Microscopy Facility, Max Planck Institute for Experimental Medicine (MPI-EM), Hermann-Rein-Str. 3, 37075 Göttingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2013

Received in revised form 27 October 2013

Accepted 5 November 2013

Available online 22 November 2013

Keywords:

K_v10.1

Eag1

Cholesterol

Membrane

Cyclodextrin

ABSTRACT

K_v10.1 potassium channels are implicated in a variety of cellular processes including cell proliferation and tumour progression. Their expression in over 70% of human tumours makes them an attractive diagnostic and therapeutic target. Although their physiological role in the central nervous system is not yet fully understood, advances in their precise cell localization will contribute to the understanding of their interactions and function. We have determined the plasma membrane (PM) distribution of the K_v10.1 protein in an enriched mouse brain PM fraction and its association with cholesterol- and sphingolipid-rich domains. We show that the K_v10.1 channel has two different populations in a 3:2 ratio, one associated to and another excluded from Detergent Resistant Membranes (DRMs). This distribution of K_v10.1 in isolated PM is cholesterol- and cytoskeleton-dependent since alteration of those factors changes the relationship to 1:4. In transfected HEK-293 cells with a mutant unable to bind Ca²⁺/CaM to K_v10.1 protein, K_v10.1 distribution in DRM/non-DRM is 1:4. Mean current density was doubled in the cholesterol-depleted cells, without any noticeable effects on other parameters. These results demonstrate that recruitment of the K_v10.1 channel to the DRM fractions involves its functional regulation.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The human *ether à-go-go1* protein (Eag1, K_v10.1, encoded by *KCNH1*) is a voltage-gated potassium channel and is a member of the EAG family. It is expressed almost exclusively in brain tissue and is involved in cell excitability [1,2], memory processes [1,3] and cell

proliferation [4]. The function of K_v10.1 in the central nervous system (CNS) is not yet clear, but its biophysical properties have been studied in heterologous systems. These properties, including delayed rectification and low activation voltage [5], as well as its extreme long cytoplasmic regions compared to other non-EAG K_v channels [6], and its expression in highly proliferative tumour tissues suggest that K_v10.1 might be involved in non-canonical K⁺ channel activities. Several intracellular protein interactions, including its regulation by calmodulin [7], calcium-calmodulin kinase II (CaMKII) [8], rabaptin [9] and cortactin [10], as well as its effect on the hypoxia inducible factor (HIF) expression in heterologous systems [11], imply an involvement with intracellular signalling processes and with cell cycle-related events [12]. Recently, the use of imaging techniques indicated that synaptic K_v10.1 localises to the presynaptic membrane [13]; nevertheless, a more detailed description of its PM localisation at this and other locations is still lacking.

The discovery of different lipid phases-like, known as lipid rafts [14], within the PM of eukaryotic cells has changed the understanding of membrane protein dynamics and their interaction with intra- and extracellular proteins [15–19]. Discrete membrane domain formation is promoted not only by the lipid composition but also by the specific localised protein content. The transmembrane protein domains, the cytoplasmic regions interacting with the cytoskeleton and the co-expression and interactions with different proteins have also been shown to participate in the formation of discrete PM domains [20–22]. A higher content of sphingolipids and cholesterol confers to those

Abbreviations: PM, plasma membrane; DRM, detergent resistant membrane; Ca-CaM, calcium calmodulin; CaMKII, calcium calmodulin kinase II; HIF, hypoxia inducible factor; SNARE, Soluble NSF Attachment Protein; HERG, human EAG related gene, HEK, human embryonic kidney; GalCer, galactosylceramide; GM1, monosialotetrahexosylganglioside; TCA, trichloroacetic acid; Cav-1, caveolin-1; Flot-2, flotillin-2; TfR, transferrin receptor; GM130, Golgi marker 130; TRAPα, translocon associated protein alpha; MBP, myelin basic protein; PLP, proteolipid protein; Lat-A, latrunculin A; BTX, bungarotoxin; RSA, relative specific activity; Gfap, glial fibrillary acidic protein; AIF1, allograft inflammatory factor-1; Olig2, oligodendrocyte transcription factor2, Mtap1, microtubule associated protein1; Syn, synaptophysin; LPR-1, lipoprotein receptor-1

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Correspondence to: LA. Pardo, MBNS, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Hermann-Rein-Str. 3, 37075 Göttingen, Germany. Tel.: +49 551 3899643; fax: +49 551 3899646.

** Correspondence to: A. Ortega, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Av. Universidad #3000, CP 04510, Coyoacán, México-City, Mexico. Tel.: +52 55 56232511; fax: +52 55 56162419. E-mail addresses: pardo@em.mpg.de (L.A. Pardo), aortega@unam.mx (A. Ortega).

0005-2736/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2013.11.007>

regions a more hydrophobic, less dynamic environment [23,24] and resistance to non-ionic detergent extraction. This property is the basis of the concept of DRM [25,26]. Functional studies have confirmed that the lipid compartmentalisation in the PM affects the organisation and function of proteins involved in several forms of signalling processes. Examples include the immunological synapse, where the tyrosine kinase Lck found in lipid rafts is activated by the phosphatase CD45 localised in non-rafts [17]; the lateral force transmission of skeletal muscle where the interaction of the membrane protein β -dystroglycan with and the costameric protein dystrophin is dependent on membrane cholesterol content in lipid rafts [16]; the neurological synapse, where most proteins of the Soluble NSF Attachment Protein (SNARE) complex have been shown to be in cholesterol rich domains [27]; and signalling cascades, in which the human EAG-related gene channel (HERG, member of the EAG family) localises to caveolae and participates in a transmembrane signalling complex [15]. In addition to HERG, other voltage-gated ion channels, including $K_v2.1$, $K_v1.5$ and BK_{Ca} , are located in PM subdomains, where their restricted PM localisation influences not only conductance-related functions but also signalling processes [15,28–30]. Because $K_v10.1$ is not detected in any other normal tissue but has been described as a marker in many tumour tissues [31], the question arises as to whether $K_v10.1$ has different functions within the same cell, depending on its partitioning in the lipid subdomains of the plasma membrane.

The aim of this study was to examine the subdomain distribution of the $K_v10.1$ -channel in the neural PM isolated from brain tissue as well as in transfected human embryonic kidney cells. We examined the effects of partial membrane cholesterol depletion, membrane cytoskeleton detachment and Ca^{2+} /CaM binding inhibition on the partitioning of $K_v10.1$ within the different domains. We also investigated the effect of M β CD treatment on the K^+ currents. We show two different $K_v10.1$ populations in the membrane, one of which is dependent on membrane cholesterol concentration, actin submembranal cytoskeleton integrity and Ca^{2+} /CaM binding.

2. Materials and methods

2.1. Experimental models

2.1.1. Mice

All animal experiments were performed in compliance with approved animal policies of the Max Planck Institute of Experimental Medicine and the State of Lower Saxony. Adult male wild-type C57BL/6j mice were used for the isolation of brains.

2.1.2. Cells

The HEK-293 cell line was obtained from DSMZ (DSMZ ACC 305, Germany) and maintained according to the instructions of the supplier. Stable transfectants with pTracer- $K_v10.1$ [32] and pTracer- $K_v10.1$ -BBS [33] were grown in DMEM/nutrient mixture F-12 with Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% foetal calf serum and selected with Zeocin (Calya, 0.3 mg/ml in culture medium). Glial cell primary cultures were obtained from 8 to 10 isolated P0 mice cortices that were dissected (both hemispheres) and maintained in HEPES-DMEM. The cells were dissociated by Trypsin-EDTA digestion at 37 °C for 15 min. The isolated cells were washed three times with DMEM and homogenised through an 18-gauge syringe. The dissociated cells were collected by centrifugation for 5 min at 500 \times g and resuspended in fresh DMEM. The cells were maintained in 10 ml flasks for 2 weeks under standard incubator parameters and then harvested and/or subcultured when they reached 80–90% confluence. The HEK-293 cells transiently transfected with the C7-hEag1 mutant (F714S/F717S) were maintained under the same conditions. The C7 mutant is unable to bind one Ca^{2+} /CaM molecule in the C-terminal of $K_v10.1$ and shows a resistance to intracellular calcium inhibition [7].

2.2. RT-PCR of glial cells

The RNA from the cultured cells was isolated using RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) and was reverse transcribed using Super Script (Invitrogen). Real-time PCR was performed using the TaqMan system in a Light Cycler Detector as previously described for $K_v10.1$ detection [31]. For the glial and neuronal markers, primers were selected using the Universal Probe Library (Roche) and detected with SYBR Green.

2.3. Plasma membrane isolation

The plasma membranes from the brain tissue were isolated using a modification of the protocol described by Schindler and Nothwang [34]. Briefly, isolated fresh or frozen (–80 °C) brains were homogenised with a Teflon pestle homogeniser attached to a drill in Buffer A (15 mM Tris-HCl, 320 mM sucrose and EDTA-free protease inhibitor, pH7.8) and centrifuged three times to eliminate nuclei and debris (3000 \times g, 10 min, 4 °C). The supernatant was layered over 850 mM sucrose in Buffer A and centrifuged for 30 min at 70,000 \times g, at 4 °C. The interface between 320 mM and 850 mM sucrose, which corresponds to myelin cloud [35], was discarded, and the remaining sample was centrifuged for 30 min at 20,000 \times g, at 4 °C to eliminate the mitochondria and possible residual myelin. The supernatant was then centrifuged for 1 h at 100,000 \times g at 4 °C to sediment the microsomes. The microsomes were resuspended in Buffer A with 250 mM sucrose and used for the wheat germ agglutinin (WGA) binding method of the two-phase affinity system as previously described [34]. To evaluate the final product, enzyme activity assays [36] and Western blotting were performed. The plasma membranes from the cultured cells were isolated using the protocol described by Yao et al. [37].

2.4. Cholesterol depletion and cytoskeleton detachment

Methyl- β -cyclodextrin (M β CD, Sigma-Aldrich) was used to extract the cholesterol from isolated crude membranes or living cells. The purified PM from the brain tissue was incubated with 30 mM M β CD for 1 h at 37 °C with agitation and then washed twice with PBS (pH 7.4). The pellet of the last wash step underwent the DRM isolation protocol. In the case of the HEK- $K_v10.1$ cells, the cells were washed with PBS, trypsinised and divided into 1 ml aliquots of 5–7 million cells each and then incubated with 10 mM M β CD in serum-free medium for 30 min at 37 °C with agitation. The control samples were treated in the same manner substituting PBS for the M β CD. The pellets were subsequently frozen at –80 °C or used directly for the PM and DRM isolation procedures.

2.4.1. Actin cytoskeleton detachment

Sodium carbonate (Na_2CO_3) was used to detach actin from the isolated brain PM. A 500 μ l aliquot of PM was incubated with 20 ml of 150 mM Na_2CO_3 for 5 min on ice and then washed once with PBS. The pellet was resuspended in PBS. A 100 μ l aliquot was reserved and the remainder of the sample was incubated with 1% Triton X-100 for isolation of the DRM. For the HEK- $K_v10.1$ cells, a similar procedure in which 1 μ l of 10 μ M Latrunculin A (Lat A, Sigma) dissolved in DMSO replaced the M β CD. The cells were incubated for 1 h at 37 °C with agitation. The control samples were incubated with 1 μ l DMSO alone.

2.5. Isolation of detergent-resistant membrane (DRM)

Unless otherwise specified, the tissue or cell PM was resuspended in PBS (pH 7.4), incubated in 1% Triton X-100 for 30 min at 4 °C and then diluted in an equal volume of an 80% sucrose solution. A discontinuous gradient formed by the addition of 30% and 5% sucrose solutions was then centrifuged for 18 h at 200,000 \times g, at 4 °C. Nine fractions were recollected from the top to the bottom. The protein content was determined using the bicinchoninic acid (BCA) protein

assay (Pierce), and the fractions were analysed for the presence of monosialotetrahexosylganglioside (GM1) using a dot-blot. For the Western blot analysis, the fractions were pooled into three samples: DRM (fractions 2–4), and non-DRM (fractions 5–6 and 7–9). The same amount of protein of each pooled sample was precipitated using trichloroacetic acid (TCA) [38]. The precipitated proteins were then resuspended in a loading buffer.

2.6. Cholesterol determination

For cholesterol concentration measurement the Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit (Biovision) was used according to the manufacturer's instructions. Absorbance measurements were performed at 570 nm in a 96-well plate. Cholesterol concentration is expressed in mg cholesterol/mg protein.

2.7. Immunoblotting and densitometry

Protein extracts were separated by gradient SDS-PAGE (either 3–8% Tris–acetate gel or 4–12% Bis–Tris gel, NuPAGE, Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham). For dot-blot assays, 3 μ l with the same amount of protein concentration of each fraction was put onto a nitrocellulose membrane and let dry for 15 min. Membranes from either Western blot or dot-blot were blocked at least 30 min with 0.1% casein (Roche Applied Science), 5% non-fat dry milk (Bio-Rad) or 5% BSA (Sigma) and incubated with the corresponding antibody or toxin. Peroxidase conjugated cholera toxin (1:50,000, Sigma), O1 pentameric antibody against galactosylceramide (GalCer) (1:50; a gift from Prof. K.A. Nave, Max-Planck-Institute of Experimental Medicine, Göttingen), Caveolin-1 (Cav-1; 1:300, Polyclonal, Santa Cruz), Flotillin-2 (Flot-2; 1:1000, monoclonal, BD Bioscience), Kv10.1 (1:1500, Polyclonal, 9391; [39]), Transferrin Receptor (TfR; 1:1000, monoclonal, BD Bioscience), Golgi marker (GM130; 1:500, BD), Translocon associated protein alpha subunit (TRAP α ; 1:1000, Abcam), Myelin Basic Protein (MBP; 1:1000, Abcam), Proteolipid Protein (PLP, 3F4; 1:250, a gift from Prof. K.A. Nave, Max-Planck-Institute of Experimental Medicine, Göttingen) and Actin (Abcam; 1:1000). After washing and incubation with the corresponding peroxidase-labelled secondary antibody (Invitrogen) if needed, blots were developed using Millipore Immobilon system. Signals for Western blot and dot-blot were detected in a Bio-Rad Chemi-Doc Luminescence detection system. Densitometry analysis was performed with ImageJ.

2.8. Electrophysiology

Cells were grown for 24–72 h on poly-L-lysine-coated glass coverslips. For M β CD experiments, cells were incubated in serum-free medium with 30 mM M β CD at room temperature just before the measurements. Macroscopic currents were recorded in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique [40] using an EPC-9 amplifier (HEKA). Patch pipettes with a tip resistance of 2–5 M Ω were made from Corning #0010 capillary glass (WPI). Series resistance was compensated by 70%. Internal solution contained (in mM): 100 KCl, 45 N-Methyl-D-Glutamine, 10 1,1-bis(O-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) tetrapotassium salt, 10 HEPES/HCl, pH 7.35 and the external solution contained (in mM): 160 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 8 glucose, 10 HEPES/NaOH, pH 7.4. The holding potential for all experiments was –70 mV. Electrophysiological experiments were carried out at room temperature. Data processing and curve fitting were performed with Igor Pro (WaveMetrics). Where applicable, data are presented as the mean \pm standard error.

2.9. Affinity cytochemistry and confocal microscopy

For imaging experiments, HEK-293 stably transfected with pTracer-Kv10.1-BBS was used. Cells were grown on 12 mm fibronectin coated

coverslips for 48 h and then treated with different drugs. For cholesterol depletion cells were incubated with 5 mM M β CD for 30 min at 37 °C or with PBS. For actin detachment, incubation with 1 μ M of Lat A or 1 μ l/ml DMSO was performed. After each treatment cells were washed three times with TBS (pH 7.4), incubated with Cholera Toxin-FITC (CT-FITC, Sigma, 1 μ l/ml) for 5 min at RT, then briefly suspended in TBS and incubated with Bungarotoxin-Alexa Fluor® 555 (BTX-AF555, Invitrogen, 3 μ l/ml) for 15 min at RT, washed three times, fixed with 10% formalin for 10 min at 4 °C, washed 5 times and mounted on slides with ProLong-DAPI (Molecular Probes). Slides were kept overnight at 4 °C and were observed in a Leica SP5 confocal microscope. The image analysis was performed as follows: A Leica SP5 confocal laser-scanning microscope (CLSM, Leica, Mannheim) equipped with hybrid detectors was used to record representative fields of view occupied by cells containing the FITC and BTX-AF555 signals. Care was taken to ensure identical acquisition settings. A macro was generated for the ImageJ software package "Fiji" [41] and applied to quantify fluorescent signal originating from the differently treated cells. Herein, a region of interest (ROI) was drawn manually for each cell, which delineated the lower, planar cell membrane, but excluded cell edges, where the membrane curls upward and is more difficult to quantify due to out-of-focus signal. A binary image of the respective FITC and BTX-AF555 channels was generated by applying the "MidGrey" local thresholding method with a 15-pixel radius [41]. The binary images were then added to generate an image in which the area covered by the overlapping signals could be measured and normalised to the overall ROI area in order to obtain the percent overlapping area. The means were then calculated from 91 CTRL and 92 M β CD-treated cells.

2.10. Statistical analysis

For the statistical analysis we used Excel and StatPlus. For all densitometric and microscopy image analyses ImageJ programme was used and a non-paired two-tailed *t* test was performed. In the case of current recording, analysis was performed with the Igor programme and a non-paired one-tailed *t* test was used.

3. Results

3.1. Purified plasma membranes

Plasma membranes from brain tissue were isolated using a modification of a previously described differential centrifugation and a discontinuous sucrose gradient procedure [34]. The major modification was the addition of a sequential centrifugation step for myelin extraction based on classical isolation methods [42]. Fig. 1 shows the characterisation of the isolated PM. Fig. 1A shows a dot blot for GalCer in the isolated PM compared with the initial homogenate, where only 50% of GalCer was removed. However, after myelin extraction, 94% of the GalCer was removed. Fig. 1B shows that the content of the two major myelin proteins, MBP and PLP, diminished by 35% and 37%, respectively, in the isolated PM relative to the initial homogenate. To further analyse the purity of the final PM fraction, assays of the three major membrane enzymes selective for intracellular membrane sources were performed. Fig. 1C shows that the Relative Specific Activity (RSA) of alkaline phosphatase increased 5-fold in the PM fraction compared with the initial homogenate. The RSA of succinate dehydrogenase was 0.19 ± 0.36 and for NADPH cytochrome c reductase was 0.47 ± 0.08 ; the RSA was less than one in both cases. Fig. 1D shows Western blots for GM130, a marker for the Golgi membranes, and TRAP α , a marker for the endoplasmic reticulum, in the different membrane fractions. GM130 was absent from the PM fraction, and the TRAP α content in this fraction was reduced to 5% of the signal observed in the initial homogenate. Further analysis of the Kv10.1 membrane distribution was performed in an enriched PM fraction with minimal or no contribution from myelin and inner membranes.

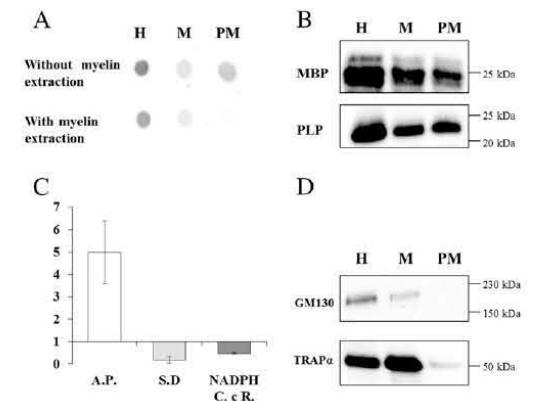


Fig. 1. Characterization of PM fractions isolated from the brain. **A)** Dot-blot against GalCer in fractions obtained with the original protocol (without myelin extraction) and our modified protocol (with myelin extraction); H: total homogenate, M: microsomes, PM: Plasma membrane fraction. **B)** Western blot detection of two of the main myelin protein markers MBP (Myelin Binding Protein) and PLP (Proteolipid Protein). **C)** Enzyme activity assays, expressed as the PM relative activity compared to the total homogenate; A.P: Alkaline Phosphatase (PM marker; $n = 10$, mean \pm SD = 4.47 ± 4.47), S.D: Succinate Dehydrogenase (mitochondria marker; $n = 6$, 0.48 ± 0.37), NADPH C.c.R: NADPH Cytochrome c Reductase (endoplasmic reticulum marker; $n = 5$; 0.43 ± 0.08). **D)** Western blot detection of the Golgi protein GM130 and the reticulum protein TRAP α in the different membrane fractions.

3.2. *K_v10.1* is expressed in neurons but not in glia cells

Neuronal *K_v10.1* expression has been widely described [43,44]; however, *K_v10.1* expression in glia has not previously been studied. Fig. 2 shows the normalised value of the RT-PCR analysis performed for mouse glia and neuron markers in three different cell cultures. The marker for astrocytes was Glial fibrillary acidic protein (*Gfap*); for microglia, Allograft inflammatory factor-1 (*Aif1*); for oligodendrocytes, Oligodendrocyte transcription factor-2 (*Olig2*); and for neurons, Microtubule-associated protein (*Mtap1*) and synaptophysin (*Syn*). The results showed in three independent cultures of different passages and different distributions of glia cell types, only traces of neuronal RNA could be detected, and the *K_v10.1* message was virtually absent (0.012 ± 0.03). These results allow us to interpret the subsequent results as essentially specific to neurons.

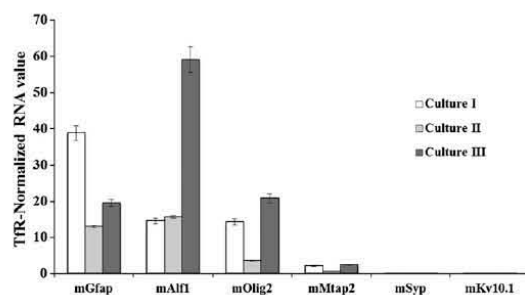


Fig. 2. Characterization of primary mouse glia cell cultures, *K_v10.1* is not expressed by glia cells. RT-PCR in three separate cultures enriched in different glia cells. Normalized RNA content with TIR for three different glia markers (mGfap, mAif1 and mOlig2), two neuron markers (mMtap2 and mSyn) and mKv10.1.

3.3. Lipid and protein distribution in isolated neuronal plasma membrane from brain tissue

From the purified PM, the DRMs were isolated and characterised. Fig. 3A shows a dot-blot for the ganglioside GM1, which was primarily present in fractions F3 and F4 and absent in fractions F8 and F9. Regarding the specific protein content of the DRM and non-DRM fractions, Fig. 3B shows that TIR was exclusively detected in the non-DRM fractions, while Cav-1 and Flot-2 preferentially localised in the DRM. In the case of *K_v10.1*, 61% ($n = 8$) was found in the DRM and the rest in the non-DRM. Fig. 3C shows the protein and cholesterol concentrations of four representative fractions, two corresponding to the DRM (3 and 4) and two to the non-DRM fraction (8 and 9). The DRM fractions accounted only for 9% of the total PM protein concentration, whereas the cholesterol content was 3 times higher in F3 than in the total PM: F3 contained 1.279 ± 0.43 mg chol/mg prot. In contrast, the non-DRM fractions contained 71% of the total protein and a lower cholesterol concentration (fraction 9, 0.167 ± 0.06 mg chol/mg prot). Therefore, there were at least two different populations of *K_v10.1* within the neuronal PM, one that partitioned into the DRM subdomain of the PM, enriched in GM1, cholesterol, Cav-1 and Flot-2, and another population that was not associated with the DRM. Co-immunoprecipitation assays to test for a possible physical interaction between Cav-1 and DRM-*K_v10.1* were negative (data not shown).

3.4. Neuronal PM-DRM *K_v10.1* localisation is dependent on the cholesterol concentration and the integrity of submembrane cytoskeleton

To investigate the factors that determine the distribution of *K_v10.1* in the cholesterol-enriched PM subdomains, we isolated DRM from PM previously incubated with 30 mM M β CD to deplete the cholesterol. Fig. 4A–D shows the PM and DRM characterisation after cholesterol depletion. Fig. 4A shows that the M β CD treatment reduced the total PM cholesterol content by 81%; however, this procedure did not substantially alter the GM1 distribution between DRM and non-DRM fractions (Fig. 4B). In terms of protein distribution, the M β CD treatment reduced the content of Cav-1 and Flot-2 in the DRM fractions and increased their concentrations in the non-DRM fractions (Fig. 4C). The extraction of cholesterol with M β CD reduced the cholesterol concentration in the DRM from 1.279 ± 0.43 to 0.100 ± 0.09 mg cholesterol/mg protein in F3, but the concentration in non-DRM fractions was not changed (Fig. 4D). Because DRM proteins such as Cav-1 and Flot-2 interact with the submembrane cytoskeleton proteins in other systems [16], we investigated the importance of the submembrane cytoskeleton integrity on the DRM lipid and protein composition. Fig. 4E–H shows the effect of a basic pH shock with 150 mM Na₂CO₃ (pH 11) on the DRM lipid and protein composition. After the Na₂CO₃ treatment, the PM-associated actin was reduced by 88% (Fig. 4E); the inset in Fig. 4E shows a Western blot of a representative experiment in which TIR was used as an internal control. After the pH shock, GM1 was evenly distributed among the DRM and non-DRM fractions (Fig. 4F). This treatment also caused loss of the signals for Cav-1 and Flot-2 in the DRM fractions and for TIR in the non-DRM fractions (Fig. 4G). As shown in Fig. 4H, cholesterol concentration in the DRM (0.819 ± 0.369 mg chol/mg prot) and the non-DRM (1.095 ± 0.570 mg chol/mg prot) fractions was similar to the concentration in the PM (0.638 ± 0.230 mg chol/mg prot).

Because M β CD and Na₂CO₃ modified the DRM lipid and protein composition, the *K_v10.1* distribution was studied following treatment with these agents. Fig. 5A shows a representative Western blot with an anti-*K_v10.1* antibody showing changes in the distribution of *K_v10.1* in the DRM and non-DRM fractions. Densitometric quantification of the DRM-*K_v10.1*/non-DRM-*K_v10.1* ratio is shown in Fig. 5B. Under the control conditions, the average ratio was 1.74 ± 0.644 ($n = 8$). This ratio was significantly reduced by both cholesterol depletion (ratio 0.175 ± 0.130 ; $n = 6$) and actin detachment (0.153 ± 0.105 ; $n = 3$)

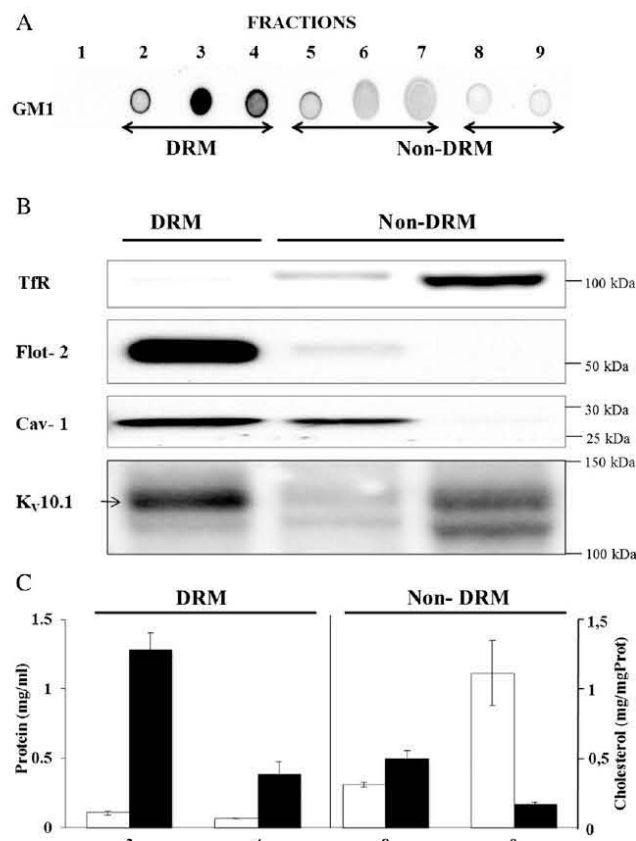


Fig. 3. Characterization of DRM isolated from brain PM. *K_v10.1* associates with DRM. A) Dot-blot against GM1 ganglioside in the 9 fractions of the sucrose gradient. DRM are constituted by fractions 2–4. Non-DRM from fractions 5–9 were divided into two: 5–7 and 8,9. B) Distribution of *K_v10.1* in the membrane fractions; 60% of *K_v10.1* expresses in DRM fractions where two other raft markers are also present (*Flot-2* and *cav-1*), the other 40% is found in the lowest non-DRM fraction together with the non-raft marker *TFR* (n=8). C) Protein concentrations in mg/ml (white columns) of four representative fractions (n=9): DRM (Fr:3, 0.11 ± 0.05 ; Fr:4, 0.06 ± 0.03) and non-DRM (Fr:8, 0.31 ± 0.16 ; Fr:9, 1.11 ± 0.53) and cholesterol concentration in mg Chol/mg Prot (black columns) of the same fractions (n=12): DRM (Fr:3, 1.28 ± 0.44 ; Fr:4, 0.39 ± 0.31) and non-DRM (Fr:8, 0.5 ± 0.19 ; Fr:9, 0.17 ± 0.06).

($p < 0.001$ in both cases). These results strongly indicate that the *K_v10.1* relocates from the DRM fraction to the non-DRM fraction after M β CD and Na_2CO_3 treatments. To evaluate the degree of relocation of the DRM-associated *K_v10.1* with respect to other DRM- and non-DRM-resident proteins, we calculated the ratios of *K_v10.1/Flot-2* and *K_v10.1/TFR* (Fig. 5C). For the control DRM fractions, the *K_v10.1/Flot-2* ratio was 0.697 ± 0.205 , and in the non-DRM fractions, the *K_v10.1/TFR* ratio was 0.433 ± 0.150 , in good agreement with the DRM-*K_v10.1/non-DRM-*K_v10.1** ratio of 3:2. For the M β CD treated membranes we observed a *K_v10.1/Flot-2* ratio of 0.155 ± 0.119 in the DRM fractions and a *K_v10.1/TFR* ratio of 0.9 ± 0.087 for the non-DRM fractions. This result suggests that cholesterol depletion with M β CD has a greater effect on the DRM-associated *K_v10.1* than it does on *Flot-2*. After the removal of the submembrane cytoskeleton with Na_2CO_3 , we observed a *K_v10.1/Flot-2* ratio of 1.827 ± 0.561 for the DRM fractions and a *K_v10.1/TFR* ratio of 0.939 ± 0.016 for the non-DRM fractions. Thus, our results show that the submembrane cytoskeleton is needed for proper PM protein partitioning of both *K_v10.1* and *Flot-2*. The effect of the detachment of the submembrane cytoskeletal proteins on *K_v10.1* PM partitioning was stronger than the effect of cholesterol depletion.

These results indicate that both cholesterol and the submembrane cytoskeleton are key factors determining the K^+ channel distribution in the two populations.

3.5. *K_v10.1* localisation in HEK cells is dependent on cholesterol concentration

The effects of M β CD on *K_v10.1* membrane distribution in cultured HEK cells can be seen in Fig. 6. Fig. 6A shows a Western blot for *K_v10.1* in the DRM and non-DRM fractions after cholesterol depletion with 10 mM M β CD compared to the control. Fig. 6B shows the DRM-*K_v10.1/non-DRM-*K_v10.1** ratios for the control membranes incubated with PBS and the ratio of 0.789 ± 0.382 was compatible with a 2:3 ratio. After cholesterol depletion, the DRM-*K_v10.1/non-DRM-*K_v10.1** ratio decreased by 58% to 0.330 ± 0.220 ($p < 0.01$). These results, obtained from a cultured cell system, confirm that the cholesterol concentration in the PM is essential for *K_v10.1* partitioning into the cholesterol-enriched membrane domains. When the cytoskeleton integrity was altered, we also observed a tendency to decrease the amount of *K_v10.1* in the DRM domains, although the difference was

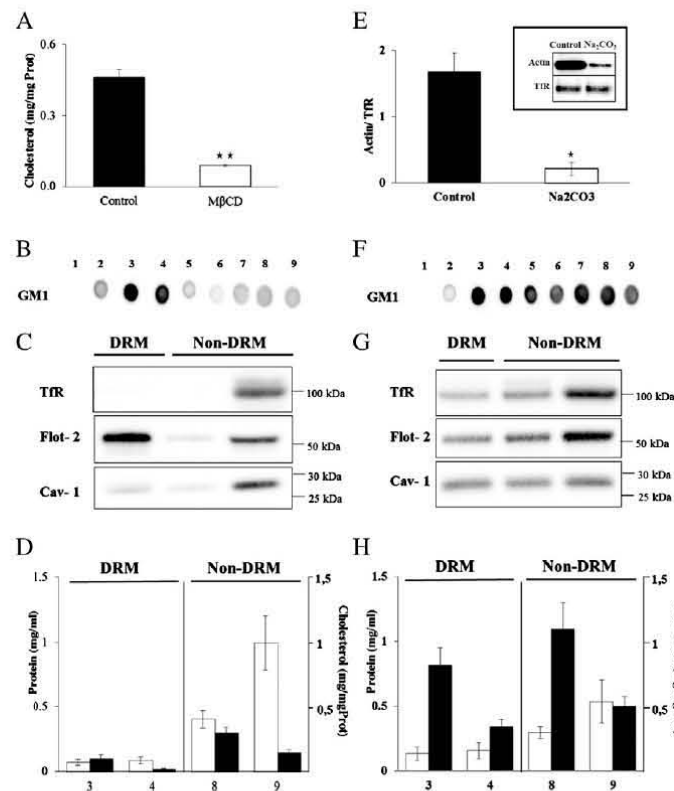


Fig. 4. Brain DRM characterization after cholesterol depletion with M β CD (A–D) and after actin cytoskeleton detachment with Na₂CO₃ (E–H). **A**) Cholesterol (mg/mg Prot) depletion after 1 h incubation with 30 mM of M β CD. 81% of the initial amount was extracted from the isolated PM (n = 8, control: 0.462 \pm 0.1, M β CD: 0.09 \pm 0.01, p < 0.01). **B**) Dot-blot against GM1. **C**) WB showing the distribution of the three domains markers flot-2, cav-1 and TTR in the different fractions. **D**) Protein concentrations in mg/ml (white columns) of four representative fractions (n=7); DRM (Fr:3, 0.07 \pm 0.05; Fr:4, 0.09 \pm 0.07) and non-DRM (Fr:8, 0.4 \pm 0.18; Fr:9, 0.99 \pm 0.56) and cholesterol concentration in mg chol/mg prot (black columns) of the same fractions (n=8); DRM (Fr:3, 0.1 \pm 0.08; Fr:4, 0.02 \pm 0.02) and non-DRM (Fr:8, 0.29 \pm 0.13; Fr:9, 0.14 \pm 0.07). **E**) Densitometric analysis of actin detachment (normalized with TTR). Actin decreased in 88% (n = 5, control: 1.69 \pm 0.61, sodium carbonate: 0.21 \pm 0.21, p<0.05). Inset: Representative Western blot of isolated PM after treatment with 150 mM of Na₂CO₃; TTR was used as control. **F**) Dot-blot against GM1. **G**) WB showing the distribution of the three domain markers flot-2, cav-1 and TTR in the different fractions. **H**) Protein concentrations in mg/ml (white columns) of four representative fractions (n = 3); DRM (Fr:3, 0.13 \pm 0.09; Fr:4, 0.15 \pm 0.1) and non-DRM (Fr:8, 0.29 \pm 0.08; Fr:9, 0.53 \pm 0.29) and cholesterol concentration in mg Chol/mg Prot (black columns) of the same fractions (n=8); DRM (Fr:3, 0.82 \pm 0.37; Fr:4, 0.34 \pm 0.15) and non-DRM (Fr:8, 1.1 \pm 0.57; Fr:9, 0.5 \pm 0.2).

not statistically significant (data not shown). To further investigate the effect of M β CD on the HEK-K_v10.1 cells, we performed confocal microscopy experiments. Fig. 6C shows representative images of the colocalisation of K_v10.1 (red) and CTX (green) after the M β CD treatment. The statistical analysis is shown in Fig. 6D; a significant decrease in the percent of co-localisation is observed after the M β CD treatment (p < 0.001). In the case of Lat A treatment, the overlapping area showed a significant increase (data not showed). In contrast to the brain membranes, the cytoskeleton does not appear to play a key role in the K_v10.1 membrane distribution in the HEK-K_v10.1 cells. We therefore investigated whether other factors could be contributing to the partitioning of these channels in the PM of the HEK-K_v10.1 cells.

3.6. Ca²⁺/CaM binding modulates Eag1 DRM partitioning in HEK-K_v10.1 cells

We transiently transfected HEK-293 cells with the C7 mutant (see Materials and methods) and isolated the DRM. Fig. 8A and B shows images of a representative Western blot and the plotted ratios, respectively. A reduction in the DRM-associated K_v10.1 is observed, reflected by the

decrease of the DRM-K_v10.1/non-DRM-K_v10.1 ratio to 0.233 \pm 0.083 (p < 0.01). This result strongly suggests that Ca²⁺/CaM is also a contributing factor for the K_v10.1 partitioning to the raft domains, where presumably the negative current modulation occurs.

3.7. K_v10.1 currents in HEK cells increase after M β CD treatment

To determine the functional correlate of cholesterol depletion, we measured K_v10.1 currents in whole-cell patch clamp experiments before and after M β CD incubation (Fig. 7). After cholesterol extraction, the current density in response to a depolarisation to +60 mV increased by approximately two-fold, from 262.4 \pm 25.1 pA/pF (n = 7) to 489.8 \pm 79.37 pA/pF (n = 7, p < 0.05); representative recordings are shown in Fig. 7A and B. In the current–voltage relationship shown in Fig. 7C, it can be appreciated that the increase was already significant in the range from +20 mV to +80 mV. Because the activation time constant of K_v10.1 shows a characteristic dependence on pre-pulse potential [45], we also measured the 20–80% rise time of currents elicited by a depolarisation to +40 mV after 5 s prepulses to –120 or –60 mV. Cholesterol extraction did not affect the time required for the channel to

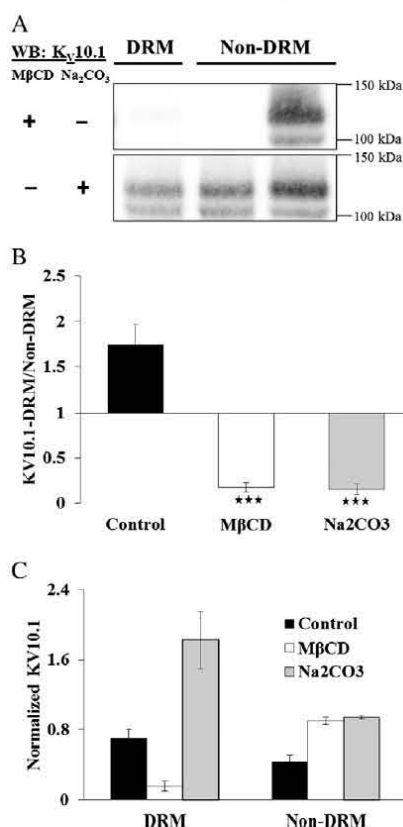


Fig. 5. Brain $K_v10.1$ membrane distribution is affected by cholesterol depletion and actin cytoskeleton disturbance. A) Western blot against $K_v10.1$ in the different fractions after treatment with $M\beta CD$ and Na_2CO_3 . B) $K_v10.1$ ratio between the amount of $K_v10.1$ in DRM divided by the amount in $K_v10.1$ -non-DRM in control ($n = 8$, 1.74 ± 0.64) and $M\beta CD$ ($n = 6$, 0.18 ± 0.13) and Na_2CO_3 ($n = 3$, 0.15 ± 0.1) treated membranes. C) $K_v10.1$ percentage normalized with the loading control of each fraction. For DRM the percentage of flotillin was used (control: $n = 4$, 0.7 ± 0.2 ; $m\beta cd$: $n = 5$, 0.15 ± 0.12 ; Na_2CO_3 : $n = 3$, 1.83 ± 0.56), for non-DRM TIR percentage was used. (control: $n = 4$, 0.43 ± 0.15 ; $m\beta cd$: $n = 5$, 0.9 ± 0.08 ; sodium carbonate: $n = 3$, 0.94 ± 0.03).

reach the open state. These results, together with our previous study [46], suggest that cytoskeleton integrity and cholesterol concentration participate as stabilising factors for $K_v10.1$ currents. Specifically, when these factors are disturbed, the currents increase.

4. Discussion

In the present study, we demonstrate that 1) $K_v10.1$ is expressed in neural but not in glial cells of mice; 2) two populations of $K_v10.1$ partition into different membrane domains; 3) partitioning to the DRM depends on cholesterol, the cytoskeleton and Ca^{2+}/CaM ; and 4) cholesterol depletion increases $K_v10.1$ K^+ current density in HEK- $K_v10.1$ cells.

4.1. $K_v10.1$ is expressed in neural cells

The expression of $K_v10.1$ in neurons has been demonstrated using in situ hybridisation and immunohistochemistry, but expression in glial cells has not been specifically addressed [13,43,44]. We did not observe

expression of $K_v10.1$ in cultured mouse glia cells. This result is specifically interesting because over 50% of human gliomas express $K_v10.1$ [47]. Thus, the presence of $K_v10.1$ appears to be an abnormal acquired expression in gliomas, as it is in other solid tumours [31].

4.2. Partitioning of $K_v10.1$ in plasma membrane subdomains

Several proteins, such as caveolins, flotillins, Src, Lck, Rab11, H-Ras, dystroglycans, BK channels, HERG, $K_v1.5$, $K_v1.4$ and $K_v4.3$ are known to associate with detergent-resistant membrane domains enriched in cholesterol and sphingolipids, while other transmembrane proteins such as TfR, calnexin, Na^+/K^+ ATPase, K-ras, $K_v3.2$ and $K_v4.2$ are excluded from these membrane domains [19,29,48–59]. Our results indicate that the $K_v10.1$ present in PM isolated from neurons distributes between the DRM and non-DRM fractions, suggesting the existence of at least two populations of the protein with respect to their affinity to interact with specific lipids and proteins. Whether $K_v10.1$ partitioning into the DRM is a stable or a transient state needs to be further investigated. $K_v10.1$ thus belongs to the group of K-channels, such as $Kir2$ [60], $K_v2.1$ [55] and $K_v4.1$ [56], that have also been shown to partition to the DRM as well as to the non-DRM domains. In order to reside in the DRM, the length of a transmembrane segment must match the thickness of the cholesterol-enriched membranes [61–63]. This depends on protein sequence, but changes in protein conformation can also induce mismatching with membrane thickness and therefore result in exclusion. Such conformational changes can be an effect of protein–protein and protein–lipid interactions. For example, the kinase PKC- βII associates with DRM, depending on the co-expression of the protein ZAP70 in leukaemia cells [22]. The Low Density Lipoprotein Receptor 1 (LPR-1) resides in the non-DRM domains in cultured fibroblasts and epithelial cells but is present in the DRM isolated from a smooth muscle cell line [64]. This evidence indicates that the distribution process of membrane proteins involves a more complex regulation than the amino acid sequence alone. The factors involved in this regulation could include post-translational events (phosphorylation and glycosylation), protein–protein interactions within membrane domains, as the case of CD45 and Lck associations within the immunological synapse [17] or interactions between membrane proteins and cytoskeletal proteins as has been shown for the transmission of the lateral force between β -dystroglycan and dystrophin in skeletal muscle [16]. In any case, different membrane distributions of a protein are incompatible with identical structures and conformations.

4.3. $K_v10.1$ PM distribution is dependent on cholesterol, cytoskeleton integrity and Ca^{2+}/CaM binding

Cholesterol extraction with $M\beta CD$ revealed a close relationship between the concentration of this lipid and DRM/non-DRM partitioning of $K_v10.1$ in brain and HEK cells. Although $M\beta CD$ has a direct effect on cholesterol and an indirect effect on glycolipids (GM1) and proteins, there are reports that demonstrate that a fraction of the sphingolipid core domain remains buoyant after cholesterol depletion [65]. We observed the same effect in our experiments (Fig. 5B), in which isolation of GM1-rich fractions was still possible despite the extraction of membrane cholesterol. There are several examples that demonstrate that the extraction of cholesterol with $M\beta CD$ varies widely among membrane proteins and cell systems. Our results show that 30 mM $M\beta CD$ reduces the cholesterol content in isolated neural PM by 80%, but only 10 mM of $M\beta CD$ is required to obtain the same effect in cultured HEK- $K_v10.1$ cells. In other tissues, including the skeletal muscle, a 10 mM concentration of the same compound reduces the membrane cholesterol by only 12% but has a large effect on muscle contractility [16]. Furthermore, different proteins may behave differently after $M\beta CD$ treatment. For example, some proteins such as Lck dissociate completely from the DRM after cholesterol depletion, while others, including the antigen Thy-1 [65] and Flot-2, dissociate only partially

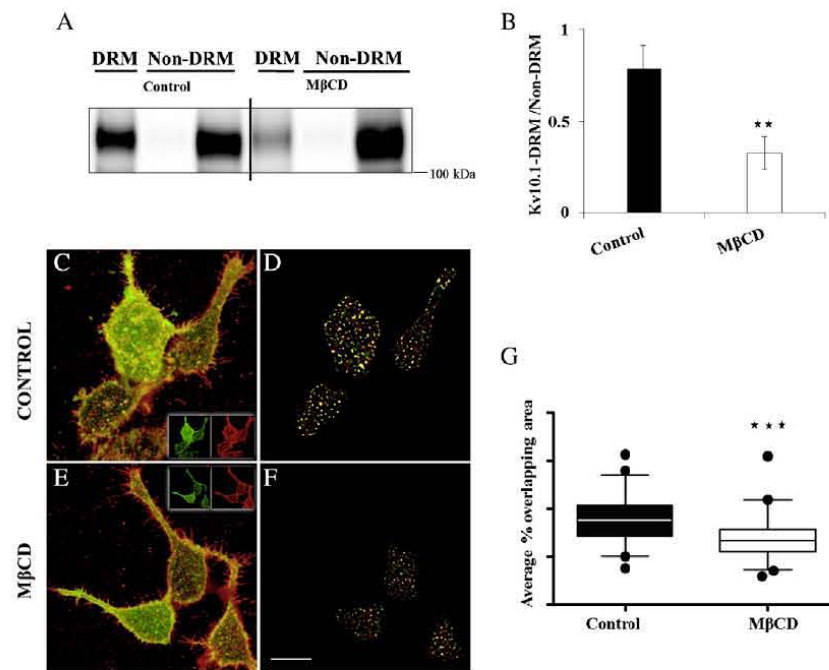


Fig. 6. K_v10.1 membrane distribution is affected by cholesterol depletion in HEK-K_v10.1 cells. A) Western blot against K_v10.1 in the fractions of isolated PM from HEK-K_v10.1 after treatment with PBS or 10mM MβCD. B) K_v10.1 ratio between K_v10.1-DRM and the K_v10.1-non-DRM of control and treated membranes (n = 6, p < 0.01). C and E) Merged confocal microscopy images of HEK-BBS-K_v10.1 cells marked with bungarotoxin-AlexaFluorá 555 for K_v10.1 signal (red) and CF-FITC for GM1 signal (green), treated with PBS or 5 mM of MβCD; scalebar: 10 μm; Inset: Single channel images for each staining. D and F) Binary masks indicating the location of either single-stained BIX-AF555 (red) or GM1 (green) pixels, as well as areas in which both stains are present (yellow). G) Comparison of the percent overlapping area between K_v10.1 and GM1 treated with either PBS (control, n = 91) or MβCD (n = 92) in cells originating from three different experiments (p < 0.0001).

even after complete cholesterol extraction. The present study shows that K_v10.1 belongs to the second group. Because no direct interaction of K_v10.1 with cav-1 was found, it seemed unlikely that cholesterol alone determined the location of K_v10.1 at DRM; therefore, we looked for additional regulating factors.

Although it was not evident when the first lipid raft model was proposed [66], it is now accepted that in addition to the lipid content, the proteins associated with the PM are important for stabilising the domain structures. Actin is the key regulator for clustering the proteins in "islands" independent of the lipid content [67]; thus, the PM-bound cytoskeleton and transmembrane protein pickets form fences dividing the cell surface into compartments of 40–300 nm [68]. Experiments with Lat A and Cytochalasin B indicate that the actin meshwork integrity is important for the association of certain proteins including acetylcholine receptors and anion, calcium, and potassium channels with the DRM [69–72]. In our study, the use of Na₂CO₃ removed almost 90% of the attached actin from the brain tissue PM. We show that in the absence of the underlying protein structure, neuronal membranes lose their original organisation (Fig. 5E–H), domains are drastically disrupted and their detergent resistance is altered. These results are in good agreement with the mesoscale membrane model, which states that the cytoskeleton-defined compartments are the highest hierarchical level of the PM in determining and limiting the behaviour of the lipid phases [68]. However, the role of the cytoskeleton integrity in the association of K_v10.1 with the DRM in the HEK cells appears to be different; both biochemical and confocal microscopy results strongly indicate that the association of K_v10.1 with the DRM remains, despite the effects of Lat A on actin polymerisation. Such disparities could be attributed to

the differences in the cytoskeleton structure of the two types of cells. In support to this concept, radixin, a protein that connects the α5-GABA A receptor to the actin cytoskeleton in brain tissue, does not interact with the receptor when analysed in HEK-293 transfected cells [73]. It has been reported that the targeting of the alpha 2c adrenoreceptor depended not only on the cell type but also on the differentiation state of a neuroendocrine cell line [74]. The different interactions between K_v10.1 and the cytoskeletal proteins that might be taking place in neurons compared to the HEK-K_v10.1 cells could account for the differences observed in the channel dependence on actin integrity for DRM association.

Finally, we asked whether another factor besides cholesterol could contribute to K_v10.1 PM partitioning in HEK-K_v10.1 cells. Both the N- and the C-terminal domains of K_v10.1 have very well defined binding sites for Ca²⁺/CaM and a mutant channel (C7) resistant to the Ca²⁺-CaM binding effect has already been described [7,75]. We analysed the PM partitioning of K_v10.1 when the C7 mutant was transfected to HEK-293 cells, and we observed a reduction in the DRM-associated K_v10.1 (Fig. 8). Although this is the first report where the binding of Ca²⁺/CaM is explicitly tested as a determining factor for a raft-protein association, a closer examination into the literature provides additional evidence indicating that this can be a general feature of CaM-binding proteins. Du and co-workers reported that association of CaMKII mutants lacking the CaM binding site (291–301) to raft domains was partial or absent [76], compared to the behaviour of wild-type CaMKII [77]. Similarly, only the Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases partition to membrane rafts, and the cytosolic domains (CaM binding sites) and not the transmembrane spans are responsible for their partitioning

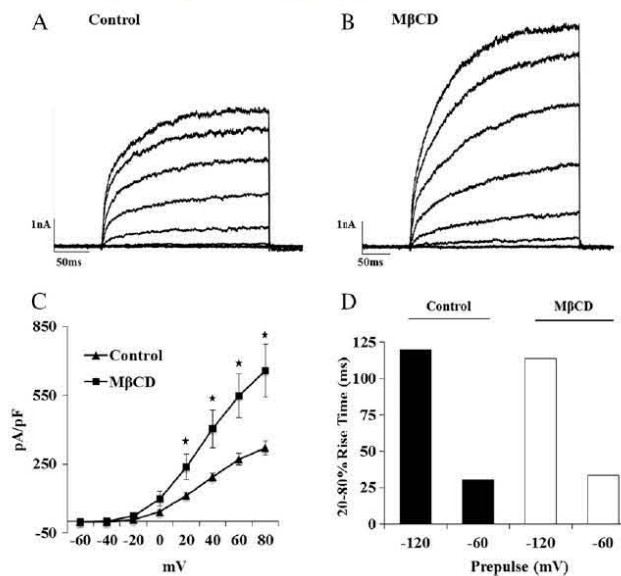


Fig. 7. $K_v10.1$ density current increases after M β CD treatment. Representative whole cell recordings in HEK- $K_v10.1$ cells A) control and B) in 30 mM M β CD. C) Graphical representation of the current density at different depolarizing stimuli; from +20 mV to +80 mV the increase is statistically significant ($p < 0.05$, $n = 7$). D) Time to rise of control and treated cells after a 500 ms hyperpolarization pre-pulse and a depolarization to +40 mV; no difference in the opening time is observed after cholesterol depletion.

[21]. It is not yet clear why Ca^{2+} -binding proteins would play a role in the regulation of the localisation of some lipid raft proteins. However, calcium is able to bind to the membrane and diminish the flip-flop rate of lipids, a condition that supports the gel state [78]. Furthermore, it has been demonstrated that an increase in the intracellular Ca^{2+} is a contributing, but not necessary, factor for changes in the phospholipid content of leukaemia cells [79]. Together with our results, these findings suggest that Ca^{2+} and/or Ca^{2+} /CaM could play a role in the regulation of some protein or lipid partitioning within the PM. The fact that Ca^{2+} channels and many Ca^{2+} -regulating proteins such as calsequestrin, calreticulin and Ca^{2+} pumps reside inside these domains [21,71,80] could explain the tight regulation of the Ca^{2+} concentrations in those localised regions of the membrane.

4.4. Cholesterol-dependent K^+ -current density in HEK- $K_v10.1$ cells

After cholesterol depletion with M β CD, the current density of HEK- $K_v10.1$ cells increases significantly (Fig. 8A and B). We also demonstrate that the disruption of cytoskeleton through the inhibition of actin

polymerisation is associated with a delocalisation of GM1, $K_v10.1$, flot-2 and cav-1 from the DRM domains. Disturbance of actin cytoskeleton with cytochalasin B also increases the current density of $K_v10.1$ -transfected CHO cells [46]. One interpretation of these observations is that perturbations of the membrane structure by either cholesterol depletion or cytoskeleton-disrupting agents induce an increase in current due to dissociation of the $K_v10.1$ protein from the DRM. If this is the case, the DRM-associated $K_v10.1$, which accounts for approximately 60% of all PM $K_v10.1$, would not contribute to the total current recorded, and DRM domains would constitute a discrete domain where $K_v10.1$ might be stored or exert a different DRM-related function. This behaviour is shared by other channels, for example HERG, $K_v1.5$, BK and $Ca_v2.2$ [57,71,81,82]. $K_v2.1$ channels are organised into clusters ("corals") where they do not contribute to the whole cell current [83]. In general, changes in lipids and anchoring of proteins can influence the electromechanical properties of channels. In the case of the nicotinic acetylcholine receptor [84], changes in the fatty acid and steroid content of the membrane are responsible for the transition between the resting and desensitised states. Direct contact between the lipids and transmembrane regions of this receptor has been described, and the membrane is proposed as a key player for the fine-tuning of the channel activity within specific submembrane domains [85].

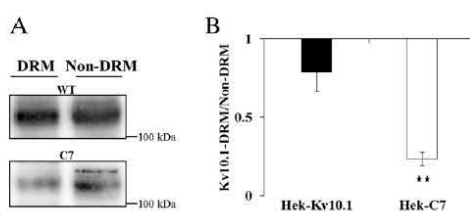


Fig. 8. DRM distribution of the C7 $K_v10.1$ mutant in HEK-293 cells. A) Western blot against $K_v10.1$ in HEK- $K_v10.1$ and HEK-C7 cells after DRM isolation. B) $K_v10.1$ ratio between the amount of $K_v10.1$ in DRM and the amount in $K_v10.1$ -non-DRM in control ($n = 9$, 0.79 ± 0.13) and C7 ($n = 4$, 0.23 ± 0.04 , $p < 0.01$) cells.

5. Conclusion

In isolated PM from neuronal tissue, $K_v10.1$ is segregated into two different populations, one associated with the DRM and dependent on the PM cholesterol and on the actin-cytoskeleton and to Ca^{2+} /CaM in PM from transfected HEK-293 cells, with a mutant unable to bind Ca^{2+} /CaM to $K_v10.1$ protein, and another associated with non-DRM fraction. The partition of $K_v10.1$ to the different PM DRM/non-DRM seems to play a role in the regulation of its conductive properties as it is dependent on cholesterol in PM of living cells.

Acknowledgements

We wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; #267035) in Mexico and the Deutsche Akademische Austausch Dienst (DAAD; #A/08/74166) in Germany and the Dirección General del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM-DGAPA-IN219812) for their financial support to AMJG during her PhD programme (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México); Dr. Roser Ufartes and Sabine Martin for helpful suggestions on the manuscript; Sabine Klöppner, Barbara Scheufler, Tanja Nilson, Ursula Kutzke, Bärbel Heidrich and Victor Díaz for technical support. We thank Pavel Vazquez (PAVNET) for the design of the graphical abstract.

References

- [1] W.D. Kaplan, W.E. Trout III, The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*, *Genetics* 61 (2) (1969) 399–409.
- [2] V. Budnik, Y. Zhong, C.F. Wu, Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability, *J. Neurosci.* 10 (11) (1990) 3754–3768.
- [3] J.E. Engel, C.F. Wu, Genetic dissection of functional contributions of specific potassium channel subunits in habituation of an escape circuit in *Drosophila*, *J. Neurosci.* 18 (6) (1998) 2254–2267.
- [4] L.A. Pardo, et al., Oncogenic potential of EAG K(+) channels, *EMBO J.* 18 (20) (1999) 5540–5547.
- [5] A. Bruggemann, et al., Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP, *Nature* 365 (6445) (1993) 445–448.
- [6] T. Occhiodoro, et al., Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion, *FEBS Lett.* 434 (1–2) (1998) 177–182.
- [7] R. Schonherr, K. Lober, S.H. Heinemann, Inhibition of human ether a-go-go potassium channels by Ca²⁺/calmodulin, *EMBO J.* 19 (13) (2000) 3263–3271.
- [8] L.C. Griffith, et al., Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and potassium channel subunit EAG similarly affect plasticity in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (21) (1994) 10044–10048.
- [9] M. Ninkovic, et al., Physical and functional interaction of KV10.1 with Rabaptin-5 impacts ion channel trafficking, *FEBS Lett.* 586 (19) (2012) 3077–3084.
- [10] S. Herrmann, et al., Cortactin controls surface expression of the voltage-gated potassium channel K(V)10.1, *J. Biol. Chem.* 287 (53) (2012) 44151–44163.
- [11] B.R. Downie, et al., EAG1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors, *J. Biol. Chem.* 283 (52) (2008) 36234–36240.
- [12] L.A. Pardo, et al., Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-EAG K⁺ channels, *J. Cell Biol.* 143 (3) (1998) 767–775.
- [13] D. Gomez-Varela, et al., Characterization of EAG1 channel lateral mobility in rat hippocampal cultures by single-particle-tracking with quantum dots, *PLoS One* 5 (1) (2010) e8858.
- [14] H.J. Kaiser, et al., Order of lipid phases in model and plasma membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (39) (2009) 16645–16650.
- [15] A. Cherubini, et al., Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling, *Mol. Biol. Cell* 16 (6) (2005) 2972–2983.
- [16] J. Vega-Moreno, et al., Cholesterol depletion uncouples beta-dystroglycans from discrete sarcolemmal domains, reducing the mechanical activity of skeletal muscle, *Cell. Physiol. Biochem.* 29 (5–6) (2012) 905–918.
- [17] C. Irles, et al., CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling, *Nat. Immunol.* 4 (2) (2003) 189–197.
- [18] C. Irles, et al., Plasma membrane subdomain partitioning of Lck in primary human T lymphocytes, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88 (4) (2010) 487–496.
- [19] H. Zhao, et al., Neurite outgrowth is dependent on the association of c-Src and lipid rafts, *Neurochem. Res.* 34 (12) (2009) 2197–2205.
- [20] S. Lebreton, S. Paladino, C. Zurzolo, Selective roles for cholesterol and actin in compartmentalization of different proteins in the Golgi and plasma membrane of polarized cells, *J. Biol. Chem.* 283 (43) (2008) 29545–29553.
- [21] A.J. Crosshwaite, et al., The cytosolic domains of Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts, *J. Biol. Chem.* 280 (8) (2005) 6380–6391.
- [22] C.M. zum Buschenfelde, et al., Recruitment of PKC-betaII to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70, *Leukemia* 24 (1) (2010) 141–152.
- [23] K. Bacia, et al., Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes, *Biophys. J.* 87 (2) (2004) 1034–1043.
- [24] C. Eggeling, et al., Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature* 457 (7233) (2009) 1159–1162.
- [25] E. London, D.A. Brown, Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts), *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (1–2) (2000) 182–195.
- [26] J. Sot, et al., Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers, *Biophys. J.* 90 (3) (2006) 903–914.
- [27] T. Lang, SNARE proteins and membrane rafts, *J. Physiol.* 585 (Pt 3) (2007) 693–698.
- [28] R.H. Scannevin, et al., Identification of a cytoplasmic domain important in the polarized expression and clustering of the Kv2.1 K⁺ channel, *J. Cell Biol.* 135 (6 Pt 1) (1996) 1619–1632.
- [29] J.R. Martens, K. O'Connell, M. Tamkun, Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts, *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (1) (2004) 16–21.
- [30] A.K. Weaver, et al., BK channels are linked to inositol 1,4,5-triphosphate receptors via lipid rafts: a novel mechanism for coupling [Ca²⁺]_i to ion channel activation, *J. Biol. Chem.* 282 (43) (2007) 31558–31568.
- [31] B. Hemmerlein, et al., Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours, *Mol. Cancer* 5 (2006) 41.
- [32] R.E. Garcia-Ferreiro, et al., Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole, *J. Gen. Physiol.* 124 (4) (2004) 301–317.
- [33] T. Kohl, et al., Rapid internalization of the oncogenic K⁺ channel K(V)10.1, *PLoS One* 6 (10) (2011) e26329.
- [34] J. Schindler, H.G. Nothwang, Enrichment of brain plasma membranes by affinity two-phase partitioning, *Methods Mol. Biol.* 528 (2009) 119–126.
- [35] J.N. Larocca, W. Norton, Isolation of myelin, *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons, 2007, pp. 1–19, (3.25).
- [36] J. Schindler, et al., Proteomic analysis of brain plasma membranes isolated by affinity two-phase partitioning, *Mol. Cell. Proteomics* 5 (2) (2006) 390–400.
- [37] Y. Yao, et al., The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae, *Cell Res.* 19 (4) (2009) 497–506.
- [38] E. Kirchner, K. Gruhn, Comparative investigations on the precipitation behavior of various protein precipitates in organs and tissues, *Nahrung* 29 (7) (1985) 703–709.
- [39] Y. Chen, et al., Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane, *PLoS One* 6 (5) (2011) e19257.
- [40] O.P. Hamill, et al., Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.* 391 (2) (1981) 85–100.
- [41] J. Schindelin, et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (7) (2012) 676–682.
- [42] H. Jurevics, et al., Normal metabolism but different physical properties of myelin from mice deficient in proteolipid protein, *J. Neurosci. Res.* 71 (6) (2003) 826–834.
- [43] M.J. Saganich, E. Machado, B. Rudy, Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain, *J. Neurosci.* 21 (13) (2001) 4609–4624.
- [44] S. Martin, et al., Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain, *Neuroscience* 155 (3) (2008) 833–844.
- [45] J. Ludwig, et al., Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a-go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart, *EMBO J.* 13 (19) (1994) 4451–4458.
- [46] J. Camacho, et al., Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels, *Pflügers Arch.* 441 (2–3) (2000) 167–174.
- [47] S. Patt, et al., Expression of ether a-go-go potassium channels in human gliomas, *Neurosci. Lett.* 368 (3) (2004) 249–253.
- [48] P. de Driesbach, et al., Differential subcellular membrane recruitment of Src may specify its downstream signalling, *Exp. Cell Res.* 314 (7) (2008) 1465–1479.
- [49] L. Rajendran, S. Le Lay, H. Illges, Raft association and lipid droplet targeting of flotillins are independent of caveolin, *Biol. Chem.* 388 (3) (2007) 307–314.
- [50] P.H. Lommerse, et al., Single-molecule diffusion reveals similar mobility for the Lck, H-ras, and K-ras membrane anchors, *Biophys. J.* 91 (3) (2006) 1090–1097.
- [51] H. Niv, et al., Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells, *J. Cell Biol.* 157 (5) (2002) 865–872.
- [52] L.J. Foster, C.L. De Hoog, M. Mann, Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (10) (2003) 5813–5818.
- [53] M.J. Yu, et al., Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 (3) (2008) C661–C678.
- [54] K.M. O'Connell, J.R. Martens, M.M. Tamkun, Localization of ion channels to lipid Raft domains within the cardiovascular system, *Trends Cardiovasc. Med.* 14 (2) (2004) 37–42.
- [55] K.M. O'Connell, M.M. Tamkun, Targeting of voltage-gated potassium channel isoforms to distinct cell surface microdomains, *J. Cell Sci.* 118 (Pt 10) (2005) 2155–2166.
- [56] F. Xia, et al., Targeting of voltage-gated K⁺ and Ca²⁺ channels and soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins to cholesterol-rich lipid rafts in pancreatic alpha-cells: effects on glucagon stimulus-secretion coupling, *Endocrinology* 148 (5) (2007) 2157–2167.
- [57] J. Lin, et al., The regulation of the cardiac potassium channel (HERG) by caveolin-1, *Biochem. Cell Biol.* 86 (5) (2008) 405–415.
- [58] J.R. Martens, et al., Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts, *J. Biol. Chem.* 275 (11) (2000) 7443–7446.
- [59] R.S. Lam, A.R. Shaw, M. Duszyk, Membrane cholesterol content modulates activation of BK channels in colonic epithelia, *Biochim. Biophys. Acta* 1667 (2) (2004) 241–248.
- [60] S. Tikku, et al., Relationship between Kir2.1/Kir2.3 activity and their distributions between cholesterol-rich and cholesterol-poor membrane domains, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293 (1) (2007) C440–C450.
- [61] A. Kundu, et al., Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells, *J. Virol.* 70 (9) (1996) 6508–6515.
- [62] A.G. Lee, Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (1) (2003) 1–40.
- [63] T.J. McIntosh, A. Vidal, S.A. Simon, Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts, *Biophys. J.* 85 (3) (2003) 1656–1666.

- [64] L. Wu, S.L. Gonik, The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts, *J. Cell Biochem.* 96 (5) (2005) 1021–1033.
- [65] S. Ilanigunanan, D.C. Hoessli, Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane, *Biochem. J.* 335 (Pt 2) (1998) 433–440.
- [66] K. Simons, E. Ilonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (6633) (1997) 569–572.
- [67] B.F. Jilkaemper, et al., Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (50) (2006) 18992–18997.
- [68] A. Kusumi, et al., Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane, *Trends Biochem. Sci.* 36 (11) (2011) 604–615.
- [69] J.L. Bruses, N. Chauvet, U. Rauschauser, Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons, *J. Neurosci.* 21 (2) (2001) 504–512.
- [70] K. Kitzball, L.M. Abbitton, System γ + localizes to different membrane subdomains in the basolateral plasma membrane of epithelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283 (6) (2002) C1784–C1794.
- [71] P. Robinson, et al., Formation of N-type (Ca_v2.2) voltage-gated calcium channel membrane microdomains: lipid raft association and clustering, *Cell Calcium* 48 (4) (2010) 183–194.
- [72] A.M. Brannard, et al., Maxi-K channels localize to caveolae in human myotubium: a role for an actin-channel- α -synolin complex in the regulation of myotubular smooth muscle K⁺ current, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289 (1) (2005) C49–C57.
- [73] S. Loeblich, et al., Activated radixin is essential for Ca_v1A receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton, *EMBO J.* 25 (5) (2006) 987–999.
- [74] C.M. Hunt, F.Y. Teng, B. Kohliha, Cell-type specific targeting of the alpha 2c-adrenergic receptor: Evidence for the organization of actin microdomains during neuronal differentiation of PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 275 (45) (2000) 35424–35431.
- [75] J.T. Gonçalves, W. Stuhner, Calmodulin interaction with Hsp91 visualized by FRET microscopy, *PLoS One* 5 (5) (2010) e10873.
- [76] F. Du, et al., Mechanisms for association of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with lipid rafts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (3) (2006) 814–820.
- [77] T. Suzuki, et al., Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 89 (1–2) (2001) 20–28.
- [78] V. Von Tscharner, G.K. Radda, The effect of fatty acids on the surface potential of phospholipid vesicles measured by condensed phase radioluminescence, *Biochim. Biophys. Acta* 643 (2) (1981) 435–448.
- [79] X. Han, et al., IP₃ receptor-mediated alteration of membrane-cytoskeleton interactions revealed by mass spectrometric analysis of detergent-resistant membranes, *Biochemistry* 48 (27) (2009) 6540–6550.
- [80] P.J. Darby, C.Y. Kwan, E.E. Daniel, Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca²⁺ handling, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279 (6) (2000) L1226–L1235.
- [81] E. Balise, et al., Cholesterol modulates the recruitment of Kv1.5 channels from Rab11-associated recycling endosome in native atrial myocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (34) (2009) 14681–14686.
- [82] N. Tajima, et al., Activity of BK(Ca) channel is modulated by membrane cholesterol content and association with Na⁺/K⁺-ATPase in human melanoma (CER39 cells, *J. Biol. Chem.* 286 (7) (2011) 5624–5638.
- [83] K.M. O'Connell, R. Loftus, M.M. Tamkun, Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K⁺ channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (27) (2010) 12351–12356.
- [84] C.A. Fernandez-Nieves, F.J. Bararinas, S.S. Anandini, Modulation of nicotinic acetylcholine receptor cell surface lateral state by free fatty acids and steroids, *J. Biol. Chem.* 283 (31) (2008) 21478–21486.
- [85] V. Bermudez, et al., Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstruction, *J. Lipid Res.* 51 (9) (2010) 2629–2641.