



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Felipe Barros

Centro de Estudios Científicos
(CECS)

Profesor Co-Patrocinante

Dra. Ilona Concha

Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**MODULACIÓN DE TASK-2 POR LA ACIDIFICACIÓN
EXTRACELULAR Y POSIBLE PAPEL EN LA REGULACIÓN DEL
VOLUMEN CELULAR**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de ***Licenciado en
Bioquímica*** y Título Profesional de
Bioquímico

CAROLINA AIDA MONTENEGRO VENEGAS

VALDIVIA – CHILE

2004

***"La verdadera esencia de las cosas se logra, al colocar magia en cada momento
de nuestras vidas."***

***A mis queridos hermanos,
Padres y maestros***

AGRADECIMIENTOS

Quiero darle las gracias al Dr. Felipe Barros, por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio. Es importante recalcar que sus enseñanzas no sólo comprendieron el área profesional, también me dio consejos relacionados con actitudes frente a la vida y las personas, los cuales ayudaron a que pudiera enfrentar mis problemas desde un punto de vista más amplio y seguro. Quiero agradecer además, a los Drs. Francisco Sepúlveda, Pablo Cid, María Isabel Niemeyer, Steffen Häertel quienes mostraron siempre una disposición a enseñar. Deseo agradecer en forma especial a la Dra. Ilona Concha y al Dr. Alejandro Reyes del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile, por su eterna disposición a ayudar a que esta tesis se realizara de la mejor manera posible. Quiero darle las gracias a mis compañeros de laboratorio y amigos, en especial a Alejandro Avendaño, Carla Bittner, Ingrid Carvacho, Marcelo Catalán, Joel Castro, Yasna Jaramillo, Anitzi Loaiza, Noemí Montes, Omar Porras, Patricio Rojas, Etienne Verdugo y Enrique Werner por sus palabras, tiempo y ayuda. También quiero expresar de todo corazón mis agradecimientos a Iván Montenegro por su cariño, apoyo y paciencia incondicional.

Finalmente quiero darle las gracias a mis padres y en especial a mis 4 hermanos, por el apoyo y seguridad que me entregaron para llevar a cabo esta tesis y mi mayor sueño, el cual es ser un Bioquímico.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biofísica y Fisiología Molecular perteneciente al Centro de Estudios Científicos (CECS) y fue financiada por FONDECYT, proyecto de responsabilidad de Dra María Isabel Niemeyer y contó con el apoyo de la Fundación Andes.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Materiales	14
3.2 Métodos	15
3.2.1 Biología Molecular	15
3.2.1.1 Diseño partidores	15
3.2.1.2 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	16
3.2.1.3 Mutagénesis-sitio dirigida	16
3.2.1.4 Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGMET	19
3.2.1.5 Transformación de células DH5 α con el vector pGMET	20
3.2.1.6 Doble digestión del DNA plasmidial con las enzimas de restricción <i>BsrGI</i> y <i>SacII</i>	20
3.2.1.7 Purificación del DNA plasmidial	21
3.2.1.8 Subclonamiento del DNA mutado en el vector de expresión	21

	pCR3.1/mTASK-2	
3.2.2	Líneas celulares y cultivo celular	24
3.2.3	Transfecciones transitorias	25
3.2.4	Mediciones de fluorescencia celular	26
3.2.4.1	Características de la sonda fluorescente calceína-AM	28
3.2.4.2	Medición de volumen celular relativo en tiempo real	30
3.2.4.3	Detección de la presencia de uniones intercelulares mediante FRAP	31
3.2.5	Desarrollo y estandarización de un método para medir AVD	32
3.2.6	Liberación de citocromo-c: otro parámetro para medir apoptosis	37
3.2.7	Análisis estadístico	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Fabricación de los constructos de interés mediante mutagénesis-sitio dirigida	40
4.2	Las células HEK-293 frente a estrés osmótico regulan su volumen celular	56
4.2.1	Las células HEK-293 en cultivo presentan uniones intercelulares	58
4.2.2	Ausencia de uniones en hendidura en células HeLa en cultivo	60
4.2.3	La RVD de células HeLa nativas frente a cambios de solución hipotónica a distintos pHs, es independiente de la concentración de protones	62
4.2.4	A las 12 horas de postransfección TASK2-WT-GFP se expresa homogéneamente en la membrana plasmática de células HeLa	65
4.2.5	Medición del volumen relativo de células HeLa transfectadas con	68

	TASK2-WT-GFP	
4.2.6	La acidosis extracelular inhibe la RVD dependiente de TASK-2	70
4.3	No es posible medir AVD inducida por H ₂ O ₂ o 2μM de estaurosporina a través de cambios de la fluorescencia de la calceína	74
4.3.1	Es posible medir volumen celular mediante la reconstrucción de imágenes	79
4.3.2	Con cortes de 1μm de espesor en el plano Z (Z-slices) se logran representaciones más fieles del volumen de una célula	82
4.3.3	Estaurosporina induce disminución de volumen apoptótica (AVD) en células	85
4.3.4	La liberación de citocromo-c inducida por estaurosporina es lenta y varía de una célula otra	89
5.	DISCUSIÓN	93
6.	BIBLIOGRAFÍA	100

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Topología y árbol filogenético de los canales de potasio humano 2P/4TM	6
Figura 2 Topología putativa para el canal de potasio TASK-2	10
Figura 3 Esquema de protocolo utilizado para la Reacción de la Polimerasa en Cadena	18
Figura 4 Esquema del vector pCR3.1/TASK-2	23
Figura 5 Medición de fluorescencia celular mediante microscopía confocal	27
Figura 6 La intensidad de fluorescencia de la calceína no es afectada por la excitación constante	29
Figura 7 Proceso de deconvolución y reconstrucción en 3D de una imagen	36
Figura 8 Células HeLa 2H18 que expresan en forma estable citocromo-c-GFP	38
Figura 9 Electroforesis de gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación de PCR 1	43
Figura 10 Evaluación del producto de amplificación de PCR 2	44
Figura 11 Ensayo de restricción con la enzima <i>EcoRI</i> del DNA plasmidial, extraído de bacterias transformadas con el producto de PCR 2 y el vector pGMET	46
Figura 12 Análisis de restricción de la doble digestión del DNA plasmidial (pGMET/PCR2) con <i>SacII</i> y <i>BsrGI</i>	48
Figura 13 Doble digestión del plasmidio pCR3.1/TASK2-WT con <i>SacII</i> y <i>BsrGI</i>	50
Figura 14 Verificación de la ligación del plasmidio pCR3.1/TASK2-Y190F	53
Figura 15 Rectificación de la presencia del plasmidio pCR3.1/TASK2-Y219F	54

Figura 16	Ensayo de restricción del plasmidio pCR3.1/TASK2-Y225F	55
Figura 17	Las células HEK-293 frente a estrés osmótico regulan su volumen celular	57
Figura 18	Las células HEK-293 en cultivo presentan uniones intercelulares	59
Figura 19	Ausencia de uniones en hendidura en células HeLa en cultivo	61
Figura 20	La RVD de células HeLa nativas frente a cambios de solución hipotónica a distintos pHs, es independiente de la concentración externa de protones	64
Figura 21	A las 12 horas de postransfección TASK2-WT-GFP se expresa homogéneamente en la membrana plasmática de células HeLa	67
Figura 22	Medición del volumen celular relativo de células HeLa transfectadas con TASK2-WT-GFP	69
Figura 23	La acidosis extracelular inhibe la RVD dependiente de TASK-2	71
Figura 24	No es posible medir la AVD inducida por H ₂ O ₂ a través de los cambios de fluorescencia de la calceína	76
Figura 25	La medición de AVD inducida con 2 µM de estaurosporina no se puede cuantificar por el método de la calceína	78
Figura 26	Es posible medir volumen celular mediante la reconstrucción de imágenes	81
Figura 27	Con cortes de 1µm de espesor en el plano Z se logran representaciones más fieles del volumen de una célula	84
Figura 28	Estaurosporina induce disminución apoptótica de volumen (AVD) en células HeLa	86
Figura 29	Las células HeLa expuestas a 2µM de estaurosporina experimentan cambios morfológicos	88
Figura 30	La liberación de citocromo-c-GFP inducida por estaurosporina es lenta	92

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I La RVD de células HeLa nativas frente a cambios de solución hipotónica a distintos pHs es independiente de la concentración externa de protones	64
Tabla II Cambios de volumen de células HeLa nativas y transfectadas en forma aguda con mTASK2-WT	73

ABREVIATURAS

AM	Acetoximetil-éster
AVD	Disminución apoptótica de volumen
CIT-C	Citocromo-c
DEPC	Dietilpirocarbonato
FRAP	Fluorescence recovery after <i>photobleaching</i>
IDL	Lenguaje de Datos Interactivo
IPTG	Isopropil β -D-tiogalacto-piranósido
MTS	Metanosulfonato
NMDG	N-metil-D-glucamina
PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena
ROI	Región observada de interés
RVD	Disminución regulada de volumen
ST	Estaurosporina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TNBS	Trinitrobencenosulfónico
2P4TM	2 poros 4 segmentos transmembrana
Y190F	Mutación de la tirosina 190 por fenilalanina de TASK-2
Y219F	Mutación de la tirosina 219 por fenilalanina de TASK-2
Y225F	Mutación de la tirosina 225 por fenilalanina de TASK-2

1. RESUMEN

Se ha sugerido que los canales de potasio tipo TASK, mediarían el proceso de disminución regulada de volumen (RVD) y participarían también en la disminución apoptótica de volumen (AVD). Como este canal es inhibido por acidosis extracelular, es posible que el efecto antiapoptótico de la acidosis se deba a una inhibición de TASK y de la AVD. El presente trabajo reúne experimentos destinados a evaluar el papel de TASK-2 y su sensibilidad a pH en la RVD y AVD. La transfección aguda de células HeLa nativas con mTASK-2 aceleró la RVD desde un $t_{1/2}$ $11,1 \pm 0,1$ minutos a un $t_{1/2}$ $3,9 \pm 0,2$ minutos pH 7,5 (células transfectadas), siendo el efecto inhibido a pH 6,0 y acelerado a pH 8,5. En presencia de clofilio pH 7,5, un bloqueador de las corrientes de potasio mediadas por mTASK-2, la RVD fue inhibida. Estos resultados concuerdan con mediciones electrofisiológicas de la actividad de TASK-2. Además, se llevaron a cabo estudios preliminares de AVD en células HeLa nativas expuestas a 2 μ M de estaurosporina, mediante la utilización de un programa de reconstrucciones en 3D. Después de 15 minutos de exposición a la droga las células comenzaron a realizar una AVD rápida, llevándolas finalmente a una reducción en volumen de un 25% con respecto a su volumen original. Como la corriente emitida por este canal es alterada por el pH extracelular, se efectuaron mutagénesis sitio-dirigidas de posibles residuos aminoacídicos implicados como los sensores de pH. Se sugiere la participación de la tirosina 219, ya que su mutación cambió en forma significativa el pKa del efecto del pH extracelular sobre las corrientes de K^+ del canal TASK-2.

SUMMARY

It has been suggested that the potassium channel TASK would mediate in the process of RVD (regulated volume decrease) and would participate in the apoptotic volume decrease (AVD) as well. Since this channel is inhibited by extra-cellular acidosis, it is likely that the antiapoptotic effect of acidosis occurs due to an inhibition of TASK and AVD. This work gathers experiments to evaluate the role of TASK-2 and their sensitivity to the RVD and AVD. The acute transfection of native HeLa cells with mTASK-2 accelerated the RVD from a $t_{1/2}$ 11.1 ± 0.1 minutes to a $t_{1/2}$ 3.9 ± 0.2 minutes pH 7.5 (transfected cells); the effect was inhibited at pH 6.0 and accelerated at pH 8.5. In the presence of clofilium pH 7.5, a blocker of potassium currents mediated by TASK-2, RVD was inhibited. These results agree with the electrophysiological measurements of the activity of TASK-2. By using a 3-D reconstruction program, we made preliminary-AVD studies in native HeLa cells exposed to 2 μ M of staurosporine. After 15 minutes of exposure to the drug, the cells carried out a rapid AVD that led finally to a reduction of 25% in relation to their original volume. As the activity of the current is altered by the extra-cellular pH, we carried out site-directed mutagenesis of the possible aminoacidic residues involved in the pH-sensing. We suggest the participation of tyrosine Y219, because its mutation changed the pKa of the effect of the extra-cellular pH upon the TASK-2 potassium channel current significantly.

2. INTRODUCCIÓN

En condiciones fisiológicas, muchos tipos de células de mamífero responden a cambios agudos de la tonicidad del medio con la ganancia ó pérdida de iones, agua que las llevan a recuperar su volumen inicial. Sin embargo, cuando las células sufren apoptosis (muerte celular programada) ellas exhiben una persistente disminución de su volumen celular, en cambio, en la necrosis se observa un considerable aumento de volumen, aún en condiciones de osmolaridad normales para ambas situaciones. Por lo tanto bajo condiciones fisiopatológicas las células a menudo sufren una marcada disminución o aumento de tamaño, sin mostrar regulación de volumen. Tales anomalías se observan en los pasos iniciales de apoptosis y necrosis, respectivamente (Okada *et al*, 2001).

Un tipo particular de regulación de volumen es gatillado cuando las células son sometidas a medios hipotónicos, donde el edema inicial es seguido por un reajuste de volumen, mecanismo conocido como disminución regulada de volumen o en inglés “regulatory volume decrease” (RVD). Los mecanismos que regulan estos procesos son muy complejos y difieren en los distintos tipos celulares. La RVD, es mediada por la activación de canales y transportadores que dejan pasar iones K^+ , Cl^- y osmolitos orgánicos (Okada *et al*, 1997).

Muchos canales de potasio que se activan por aumento de volumen celular han sido implicados en la salida de K^+ durante la RVD, dentro de los cuales tenemos: a) Canales de potasio maxi K^+ dependientes de Ca^{2+} en células tubulares proximales, células corticales proximales, hepatocitos embrionarios y glóbulos rojos de anfibio b) Canales de K^+ dependientes de voltaje que incluyen a los minK, Kv 1.3 y Kv 1.5 vistos en linfocitos, que son tanto resistentes como sensibles a caribdotoxina (Lang *et al*, 1993) c) Canales de potasio insensibles a voltaje y activados por estiramiento permeables a rubidio, insensibles a TEA e inhibidos completamente

por Ba^{2+} presentes en la membrana basolateral de las células epiteliales de la vesícula biliar de *Necturus* (Vanoye *et al*, 1999) d) Canales de K^+ de baja conductancia dependientes de calcio intracelular y con rectificación interna moderada presentes en células HeLa (Díaz *et al*, 1995) e) Canales de K^+ de dos poros y cuatro segmentos transmembrana (2P/4TM) activados por pH extracelular alcalino e inhibidos por pH ácido externo, entre los que se incluye a TASK-1 presentes en células de Ehrlich (Hougaard *et al*, 2001) y TASK-2 en células de Ehrlich (Niemeyer *et al*, 2001), células de túbulo corticales proximales y túbulo corticales distales de ratón (Barriere *et al*, 2003), y células de túbulo colectores (Reyes *et al*, 1996).

La disminución de volumen apoptótico (AVD) es una de las primeras características que se observa en la apoptosis, la cual precede a otros eventos, tales como liberación de citocromo-c, activación de caspasas, disipación del potencial de membrana mitocondrial, fragmentación del DNA y externalización de fosfatidilserina (Maeno *et al*, 2000; Trimarchi *et al*, 2002). Reportes previos sugieren que la liberación de potasio desde las células participa en AVD (Bortner *et al*, 1997; Yu *et al*, 2000). Además, características similares existentes entre AVD y disminución regulada de volumen (RVD) en respuesta a *shock* hipoosmótico, predicen que los canales de K^+ responsables de la RVD participan también en AVD (Maeno *et al*, 2000). La inhibición de los canales de K^+ y Cl^- involucrados en regulación de volumen impiden el desarrollo de los eventos bioquímicos y morfológicos conducentes a la muerte celular (Okada *et al*, 2001). Recientemente se ha sugerido que la RVD y AVD en embriones de ratón unicelulares serían mediadas por los canales de potasio de 2 poros y 4 segmentos transmembrana (2P/4TM), ya que la salida de K^+ inducida por la AVD es bloqueada por derivados de quinina, es insensible a calcio o voltaje, características que pertenecen a los canales de potasio tipo 2P/4TM (Trimarchi *et al*, 2002).

Los canales de potasio de dos dominios de poro y 4 segmentos transmembrana están abiertos al potencial de membrana de reposo y se clasifican como canales de K^+ “*background o leak*”. En términos de corriente la palabra “*leak*” es aplicada a las corrientes *background* fijas presentes al potencial de reposo y a las corrientes en las cuales con pasos de voltaje, se observa un aumento instantáneo a un nivel estable. Estas corrientes pueden ser no selectivas, en el caso de daño en la membrana celular o como resultado del movimiento específico de iones (Goldstein *et al*, 2001). La actividad basal típica de los canales de potasio 2P/4TM sugiere que ellos influyen tanto el potencial de reposo como la duración del potencial de acción (Talley *et al*, 2003; Connell *et al*, 2002; Goldstein *et al*, 2001). Además se les ha implicado en la regulación de la excitabilidad por neurotransmisores, segundos mensajeros o anestésicos volátiles (North *et al*, 2000). Los canales de potasio funcionales de 2, 4 y 6 segmentos transmembrana son tetrámeros, contribuyendo cada subunidad con un dominio de poro, en cambio, los de 2P/4TM se unen a la membrana actuando como dímeros para formar el poro selectivo a K^+ (Lesage *et al*, 1996). Aunque las subunidades de los canales de potasio de 2 dominios de poro muestran motivos estructurales similares con 4 segmentos transmembrana y un extenso *loop* extracelular M1P1 y ambos extremos carboxilo y amino terminal a nivel intracelular (figura 1), ellos muestran una pequeña homología en la secuencia de poro externa.

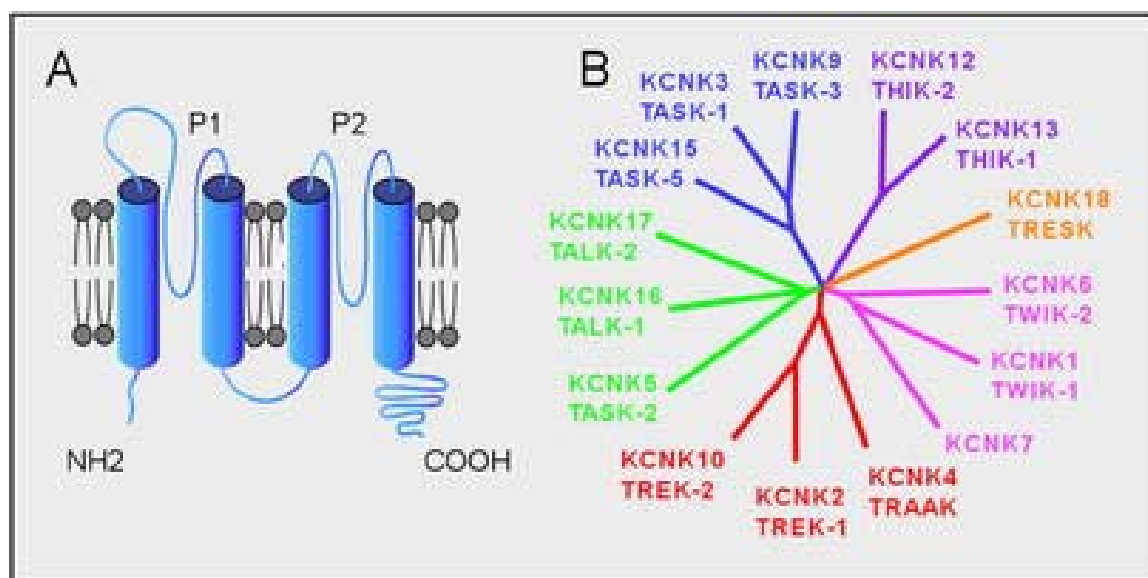


Figura 1. Topología y árbol filogenético de los canales de potasio humano 2P/4TM.

En **a**, se muestra la estructura de los canales de 2 dominios de poro P, los cuales están formados por 4 segmentos transmembrana y dos poros en tandem P1 y P2, ubicándose ambos extremos amino y carboxilo terminal en el lado intracelular. En **b** se esquematiza el árbol filogenético de los canales de potasio pertenecientes a la familia de 2P/4TM (Patel *et al*, 2004).

En sistemas heterólogos estos canales muestran conductancias que son selectivas a potasio e independientes de voltaje (Goldstein *et al*, 1996), las cuales exhiben generalmente un comportamiento llamado rectificación de Goldman-Hodking-Katz o “rectificadores abiertos”, debido a que la corriente cambia de una manera lineal como función del voltaje, cuando las concentraciones de potasio son idénticas a ambos lados de la membrana. Una característica diagnóstica de ellos, es su sensibilidad o su baja sensibilidad a bloqueadores convencionales de los canales de potasio, tales como: tetraetilamonio, 4-aminopiridina y Ba^{2+} (Patel *et al*, 2001; Lesage *et al*, 1996). A la fecha la familia de canales de 2P-4TM (TASK por “*TWIK related acid-sensitive K^+ channel*”), comprende 5 canales. Todos muestran características comunes en cuanto a su sensibilidad a pH extracelular, siendo sus corrientes máximas a pHs alcalinos, decreciendo a medida que aumenta la acidez extracelular (Reyes *et al*, 1998).

Se ha visto además que en células transfectadas con TASK-2 la corriente es modulada por cambios en el volumen celular (Niemeyer *et al*, 2001). Debido a estas sensibilidades se les ha catalogado como sensores, los que traducirían los cambios de pH o de tonicidad del medio en cambios en el potencial de membrana, alterando así su excitabilidad (Goldstein *et al*, 2000). La homología entre los miembros de la familia de los TASK es relativamente baja, existiendo una división en dos grupos: a) TASK-1, 3, y 5 b) TASK-2 y 4. Las regiones de más alta homología en la secuencia son los dominios de poro y los segmentos transmembrana, mientras que los extremos carboxilo y amino terminal varían ampliamente, lo cual sugiere una regulación distinta por agentes intracelulares.

Hasta ahora el más estudiado es TASK-1 por ser el primero en clonarse. En humanos, se le ha encontrado en cerebro, particularmente en cerebelo, así como también, en placenta, pulmón, páncreas (Duprat *et al*, 1998). Análisis de RT-PCR e hibridación *in situ* de tejidos de rata han

encontrado abundante mRNA de TASK-1 en células de cuerpo carotídeo tipo I y células de arteria pulmonar sensibles a O_2 (Gurney *et al*, 2002; Hartness *et al*, 2001). Se han registrado corrientes endógenas tipo TASK-1 en miocitos de rata con una fuerte expresión en el atrio derecho, siendo el bloqueo de este canal un efecto potenciador de la inhibición por anandamida (Barbuti *et al*, 2002). En motoneuronas somáticas de rata y neuronas granulares cerebelares, la inhalación de anestésicos locales activa una corriente tipo TASK-1 causando hiperpolarización de la membrana y la supresión de la descarga del potencial de acción (Maingret *et al*, 2001; Sirois *et al*, 2000; Bayliss *et al*, 2001; Washburn *et al*, 2002). En estas mismas células la apertura de TASK-1 probablemente contribuye a la inmovilización inducida por anestésicos locales. La corriente llevada por este canal muestra rectificación externa en presencia de una gradiente de potasio fisiológica, comportándose como un canal “*leak*” selectivo a K^+ . Con pulsos de voltaje se cierra y se abre en dos fases, una parece ser inmediata y la otra dependiente de tiempo (Lopes *et al*, 2000) es sensible a las variaciones de pH extracelular en el rango fisiológico (Duprat *et al*, 1997). Su pKa es de 7,3 en concentraciones de K^+ simétrico. La inhibición de este canal por acidez extracelular es dependiente de voltaje y de la concentración de K^+ , ya que el bloqueo por protones es prevenido en un medio rico en K^+ . La protonación de la histidina 98 en el dominio P1 es responsable en parte de la sensibilidad de pH de este canal (Morton *et al*, 2003). La conductancia de canal único es de 14 pS (Han *et al*, 2002). Es inhibido débilmente por ácido araquidónico e insensible a una serie de bloqueadores clásicos de canales de potasio.

TASK-3 en humano se ha encontrado en cerebro, particularmente en cerebelo (Chapman *et al*, 2000; Rajan *et al*, 2000; Kim *et al*, 2001). TASK-3 y TASK-1 poseen un 54% de homología, exhibiendo ambos canales corrientes macroscópicas similares. TASK-3 a nivel de canal único posee una conductancia de 27 pS, siendo inhibido por pH extracelular ácido en forma

reversible con un pKa 6,5 – 6,7, alrededor de 0,5 unidades de pH más ácido que TASK-1 (Rajan *et al*, 2000). Es bloqueado por Ba^{2+} y quinidina. La presencia de un residuo de ácido glutámico en posición 70, le da sensibilidad al bloqueo por rojo rutenio. En forma similar a TASK-1, la sensibilidad a anestésicos radica en la secuencia VLRFLT en el extremo carboxilo terminal (Talley *et al*, 2002). La corriente emitida por este canal no es activada por moduladores de la proteína quinasa C o A, sin embargo la protonación de la histidina 98 está involucrada en la inhibición de este canal por pH ácido, dado que su mutación por asparragina o tirosina elimina completamente la sensibilidad a pH extracelular (Rajan *et al*, 2000). Recientemente se ha señalado que la expresión de este canal en neuronas cerebrales granulares de rata, se relaciona con el alto porcentaje de apoptosis visto en este tipo celular en presencia de concentraciones extracelulares de potasio fisiológicas y alcalosis externa, lo cual es revertido en condiciones de acidosis extracelular y en presencia de rojo rutenio (Lauritzen *et al*, 2003).

TASK-2 es un polipéptido de 499 residuos aminoacídicos con un peso molecular de 55,1 kDa. El perfil hidropático indica la presencia de 4 segmentos transmembrana designados M1 a M4; los segmentos M1 y M2 flanquean el primer dominio de poro (P1); y M3 y M4 flanquean el segundo (P2), además de un extenso interdominio extracelular característico de esta familia como TWIK-1 (figura 2).

Esquema de la estructura putativa del canal de potasio TASK-2, perteneciente a la familia de canales de potasio de 2 poros y 4 segmentos transmembrana tomadas de Connell *et al*, 2002. Los círculos amarillos y los números en rojo, resaltan las mutantes de Y190F; Y219F e Y225F analizadas en este trabajo.

Esta región contiene un sitio potencial de N-glicosilación y un residuo de cisteína en posición 51, el cual se encuentra conservado en TWIK-1, TREK-1 y TRAAK (Reyes *et al*, 1998). En TWIK-1 este residuo está implicado en la formación de un puente disulfuro entre las subunidades y su mutación por serina produce la pérdida completa de la función del canal (Lesage *et al*, 1996). La mutación de C51 en TASK-2 impide la formación del dímero pero no tiene efecto sobre la función del canal (Niemeyer *et al*, 2003). A pesar de la similitud estructural de TASK-2 con respecto a los otros canales de la familia 2P/4TM, posee sólo entre un 18%-22% de homología en la secuencia, siendo relacionado con la familia de los TASK debido a su sensibilidad a pH extracelular (Reyes *et al*, 1998).

La distribución de este canal en humanos analizado por Northern Blot arroja una abundante expresión en túbulo corticales distales y túbulo colectores (Reyes *et al*, 1998) y mediante hibridación *in situ*, en túbulo corticales proximales (Barriere *et al*, 2003). También se encuentra presente, pero en menor cantidad, en médula espinal, pulmón, páncreas, hígado, placenta y intestino delgado. El análisis de tejidos de ratón por RT-PCR indica la presencia de TASK-2 en riñón, intestino, hígado en la misma abundancia que en humano, así como también, su presencia en cerebro, corazón, músculo esquelético, colon, útero; demostrándose así una diferencia de la distribución de este canal entre humano y ratón.

La corriente de TASK-2 es activada por pH extracelular alcalino e inhibida por acidez externa, es independiente de calcio intracelular, obedece al formalismo de Goldman-Hodgkin-Katz sugiriendo de esta manera que el canal carece de dependencia de voltaje (Reyes *et al*, 1998). Se sabe también que a diferencia de otros canales de potasio no es sensible a trietilanolamina, 4-aminopiridina y Ba^{2+} (Niemeyer *et al*, 2001) pero si a quinina, quinidina, lidocaína, bupivacaína (Kindler *et al*, 2003). La corriente no es estimulada por cAMP o por activación de la

proteína quinasa C, pero si por medios hipotónicos. Es bloqueada por el desacoplante mitocondrial dinitrofenol (Gray *et al*, 2000) y por el antiarrítmico clofilio en una manera que es independiente de voltaje (Niemeyer *et al*, 2001). Esta droga bloquea además la corriente de K^+ activada por volumen en las células de Ehrlich. En estas células se ha demostrado la presencia de TASK-2 junto con una RVD robusta, sugiriendo una participación directa de este canal en el fenómeno de la disminución regulada de volumen (Niemeyer *et al*, 2001; Barbieri *et al*, 2003). Su distribución en túbulo corticales distales y colectores indican un posible rol en el transporte renal de K^+ y regulación de volumen (Reyes *et al*, 1998). Trabajos recientes en ratones TASK-2^{-/-} que exhiben acidosis metabólica causada por pérdida renal de HCO_3^- , demuestran el acoplamiento específico de la actividad de TASK-2 al transporte de HCO_3^- a través de alcalinización externa (Warth *et al*, 2004). Los datos reportados a la fecha demuestran la importante función que desempeña TASK-2 en cuanto a la mantención de la homeostasis celular y por lo tanto es necesario entender a nivel molecular la modulación de la actividad de este canal. Como ya habíamos señalado anteriormente, TASK-2 es un canal que participa en la regulación de volumen de células de Ehrlich y su corriente es fuertemente modulada por el pH extracelular, siendo estimulada por alcalosis externa e inhibida por acidez extracelular. Paralelo a esto se ha sugerido que los canales involucrados en RVD también participarían en AVD y que estos tendrían las mismas características compatibles con las del grupo de canales de 2P/4TM (Trimarchi *et al*, 2002), entre los que se encuentra TASK-2, además de la evidencia reciente que señala la participación de TASK-3 en la apoptosis de neuronas granulares cerebelares (Lauritzen *et al*, 2003).

Por lo tanto el fin de este trabajo de tesis es buscar a través de mutagénesis sitio-dirigida él o los posibles residuos aminoacídicos sensores de pH extracelular de TASK-2 y reforzar la

evidencia que señala a este canal como mediador de la RVD. Además se propone poner a prueba la idea que señala que TASK-2 participa en la AVD y que la inhibición de la muerte celular apoptótica debido a la acidez extracelular se debe a una inhibición directa de este canal.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El canal de potasio TASK-2 es el mediador principal de la salida de potasio durante la disminución regulada de volumen (RVD). La corriente de este canal es modulada por el pH extracelular, por lo tanto él o los posibles residuos aminoacídicos sensores de pH se encontrarían en la cara externa de la proteína. Como hipótesis secundaria se postula que TASK-2 participa en el fenómeno de AVD (Disminución Apoptótica de Volumen) y su activación es por lo tanto un evento temprano y esencial en el proceso de apoptosis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol fisiológico de TASK-2 como mediador de la RVD y AVD.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el efecto del pH extracelular sobre la RVD en células epiteliales nativas y transfectadas con TASK2-WT murino.
- Desarrollo y estandarización de un método para el estudio de la AVD en células adherentes.
- Construcción de mutantes de TASK-2, Y190F, Y219F e Y225F.
- Evaluar el papel de los residuos de tirosina 190, 219 y 225 sobre la sensibilidad de TASK-2 a pH extracelular, a través de la cuantificación de la corriente emitida por este canal.
- De encontrarse la mutante insensible a pH, se evaluará su efecto sobre la RVD y AVD.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Materiales

Las sondas fluorescentes (calceína)-AM, DIC18 y el ácido plurónico fueron adquiridos en Molecular Probes (Eugene, OR). El tosilato de clofilio se obtuvo de RBI. El Kit de extracción de DNA desde geles de agarosa se adquirió en Qiagen. El Wizard Purification Systems para la extracción de DNA plasmidial y el pGEMT Vector Systems fueron suministrados por Promega. El estándar de peso molecular para DNA y las enzimas Taq DNA polimerasa, Pfu DNA polimerasa, *SacII*, *EcoRI* y fosfatasa alcalina se adquirieron en Fermentas. El vector de expresión pCR3.1, la agarosa y la enzima DNA Ligasa se obtuvieron de Invitrogen. Las microesferas (Dynabeads M-450) para la identificación de células individuales transfectadas en los estudios electrofisiológicos, fueron suministradas por Dynal. Los dNTPs y las células competentes DH5 α TM para las transformaciones, se obtuvieron de Gibco. Los partidores utilizados en Biología Molecular fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies, Inc (USA). La enzima de restricción *BsrGI* se adquirió en Biolabs. La lipofectamina plus para las transfecciones agudas fue adquirida de Life Technologies. La estaurosporina empleada en los estudios de AVD fue adquirida de Alomone Labs. Todos los demás reactivos fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO). Las secuenciaciones se realizaron en Medigenomix (Alemania).

3.2 Métodos

3.2.1 BIOLOGIA MOLECULAR

3.2.1.1 Diseño de partidores.

Para elegir los aminoácidos que posiblemente fueran los sensores de pH extracelular de TASK-2, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: que estuvieran presentes en la cara externa del canal, debido a que TASK-2 es sensible a pH extracelular y que estos residuos no estuvieran presentes en la misma posición en TWIK-1, canal de 2P insensible a pH externo. Es importante señalar que previo a este trabajo de tesis ya se habían realizado varias mutaciones sitio-dirigidas del canal, por lo tanto residuos tales como histidinas y lisinas extracelulares, las cuales son titulables dentro del rango de pH fisiológico, ya habían sido estudiadas. Para crear cada una de las mutantes **Y190F**, **Y219F** e **Y225F** (figura 2), se diseñaron partidores específicos. Para ello se consideró la secuencia nucleotídica de mKCNK5, (mTASK-2, GenBank código de acceso N^o AF AF319542), subclonada en el vector pCR3.1 y que fue obtenida de riñón de ratón (Niemeyer *et al*, 2001). La introducción de mutaciones puntuales se llevó a cabo por protocolos estándares (Ausubel, 1998) mediante pasos secuenciales de PCR utilizando la enzima *Pfu* DNA polimerasa. Se diseñaron dos partidores mutagénicos en direcciones opuestas, los cuales contenían el cambio de nucleótido necesario para la transformación en cada caso del aminoácido tirosina por fenilalanina (el nucleótido sustituido se indica en negrita y subrayado).

Y190F:

sentido	5'-AATGGAAC T <u>C</u> ATTGAGGGCC-3'
antisentido	5'-GGCCCTCAATG A <u>A</u> AGTTCCATT-3'

Y219F:

sentido 5'-GTGCCAACTTCCACGCCCTA-3'

antisentido 5'-AGGGCGTGGAAGTTGGCACT-3'

Y225F:

sentido 5'-CTATACCGATTCTTTGTGGAG-3'

antisentido 5'-CTCCACAAAGAATCGGTATAG-3'

Por otra parte se diseñaron dos partidores no mutagénicos, los cuales se localizan flanqueando la región a mutar. En orientación sentido **ERH6T₇for** 5'-GCCTGACATGGATCAGTG-3' ubicado río arriba del sitio a mutar y un partidor antisentido **aspCR3.1** 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' ubicado río abajo de este sitio.

3.2.1.2 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 2400, usando una mezcla de reacción estándar que contenía: templado cDNA de mTASK-2 (10 ng), 0,2 µM de cada partidor, 1,0 U de *Taq* DNA polimerasa, 0,3 U de *Pfu* DNA polimerasa, 200 µM de dNTPs en un volumen final de reacción de 50 µl. Las condiciones de PCR fueron similares para todas las reacciones de PCR realizadas: denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 20 ciclos con una temperatura de denaturación de 94°C por 15 segundos, una fase de alineamiento a 56°C por 45 segundos y una fase de elongación a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

3.2.1.3 Mutagénesis sitio dirigida.

La introducción de mutaciones puntuales fue realizada mediante un protocolo estándar basado en pasos secuenciales de PCR (Ausubel, 1998) (figura 3). Este protocolo consiste en dos

pasos de PCR, el primer paso corresponde a dos reacciones de PCR separadas (PCR 1), en cada una de éstas se usó como templado el cDNA de mTASK-2 clonado en el vector de expresión pCR3.1 (pCR3.1/mTASK-2), usando partidores mutagénicos en direcciones opuestas (p2 y p3), los cuales contenían el cambio de nucleótido necesario para transformar la tirosina en fenilalanina, y partidores no mutagénicos (p1 y p4), que flanqueaban la región a mutar. Esto generó dos productos de amplificación, uno por cada tubo. Estos productos presentan una región terminal complementaria (región correspondiente a los partidores mutagénicos). Posteriormente se realizó una electroforesis de un gel de agarosa al 1% a 60V por 45 minutos donde se cargaron las alícuotas de 50 µl de los productos de PCR 1, siendo el tampón de corrida utilizado TAE 1X (TRIS-ACETATO-EDTA). Las bandas de interés obtenidas fueron extraídas desde el gel de agarosa, mediante el Kit de extracción de DNA (QiaexII, Qiagen) según el protocolo descrito por el fabricante. El segundo paso corresponde a una nueva reacción de PCR (PCR 2), usando como templado los productos de amplificación obtenidos en la primera ronda, previa purificación de las bandas y los partidores no mutagénicos que flanquean la región a mutar (P1 Y P4). Finalmente la banda de DNA que se obtiene de la segunda PCR, es extraída desde el gel de agarosa para su utilización en los pasos siguientes.

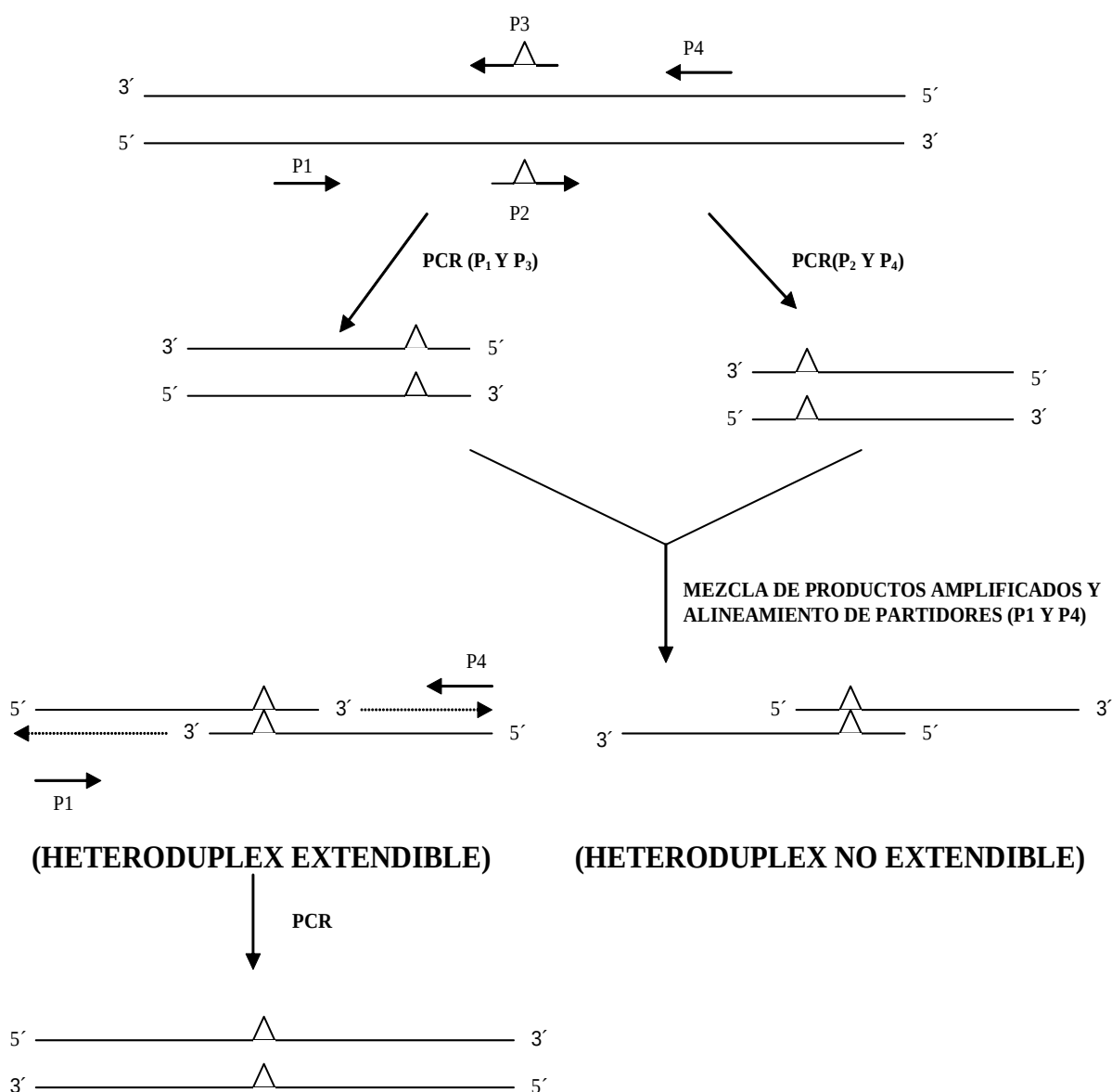


Figura 3. Esquema de protocolo utilizado para la Reacción de la Polimerasa en Cadena. El protocolo se basa en dos pasos de PCR, el primero corresponde a dos reacciones de PCR separadas, en donde se utiliza como templado el DNA que se quiere amplificar y partidores mutagénicos en direcciones opuestas (p2 y p3) y no mutagénicos (p1 y p4). El segundo paso consiste en una nueva PCR (PCR 2), en la cual se usa como templado los productos de amplificación de la PCR 1 y partidores no mutagénicos que flanquean la región a mutar (P1 y P4) (Ausubel, 1998).

3.2.1.4 Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGEM-T.

Con el fin de aumentar la cantidad del producto de PCR obtenido, se procedió a insertar este fragmento en el vector de clonamiento pGMET. Este vector presenta en los extremos 3' terminal del sector colindante a la región de inserción del producto a clonar, el nucleótido timidina, mejorando así la eficiencia de la reacción de ligación. Además posee el gen que le confiere resistencia a ampicilina. La selección de las bacterias que han incorporado el plasmidio con el inserto de interés, se llevó a cabo gracias a que este vector posee el gen que codifica para la B-galactosidasa, de esta forma las colonias que han sido transformadas con el vector religado metabolizan X-Gal, presentando una coloración azul, diferente de las colonias que presentan el vector ligado con el inserto deseado, ya que como éste interrumpe la secuencia del gen de esta enzima, las bacterias son incapaces de metabolizar X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolil-beta-D-galactosido) exhibiendo una coloración blanca.

Como la enzima *Pfu* DNA polimerasa utilizada en la PCR genera extremos romos, se tuvo que adicionar al fragmento de PCR final una adenosina extra en los extremos 5' terminal para poder lograr el clonamiento del fragmento de la PCR en este vector. Para tal efecto se utilizaron 7 μ l de producto de PCR purificado, 1 μ l de tampón de reacción de *Taq* DNA Polimerasa 10X, dATP a una concentración final de 0,2 mM, 1 μ l de *Taq* DNA Polimerasa (5 U/ μ l) y $MgCl_2$ a una concentración final de 1,5 mM en un volumen total de reacción de 10 μ l. Esta mezcla fue incubada a 70°C por 30 minutos y luego se utilizó 1 μ l de ésta en una reacción de ligación usando el vector pGEM-T (la relación molar entre inserto y vector fue de 9/1, siendo la concentración molar del vector igual a 50 ng/ μ l). Para la reacción de ligación se utilizaron 2 μ l de la enzima T4 DNA ligasa (1 U/ μ l) (Invitrogen) en un volumen final de 15 μ l. Posteriormente esta mezcla se mantuvo a 4°C por 16 horas.

3.2.1.5 Transformación de células competentes DH5α con el vector pGMET.

Una vez realizada la reacción de ligación, se procedió a la transformación de bacterias competentes con el vector pGMET, el cual llevaba inserto nuestro fragmento de DNA de interés. Para tal efecto se depositaron 5 µl de la reacción de ligación en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se dejó incubar con 25 µl de células competentes DH5α (previamente descongeladas a 4⁰C) por 30 minutos en hielo. Posteriormente se aplicó un shock térmico de 42⁰C por 1,5 minutos y de ahí la mezcla fue mantenida por dos minutos en hielo. En el siguiente paso se adicionaron al tubo 450 µl de medio de cultivo LB sin antibiótico y se mantuvo por una hora a 37⁰C con una agitación constante de 225 rpm. La última etapa descrita, se lleva a cabo con el fin de permitir la expresión de los genes que le dan la resistencia a antibióticos que proporciona el pGMET, a las células transformadas efectivamente. Transcurrido este tiempo las células se cultivaron en placas de agar que contenían 100 µg/ml ampicilina, 80 µg/ml X-Gal y 0,5 mM de IPTG y se dejaron incubando toda la noche a 37⁰C, para permitir el óptimo crecimiento de las bacterias. Sólo las colonias bacterianas que presentaron una coloración blanca, se cultivaron en 5 ml de medio líquido LB, en presencia de 100 µg/ml ampicilina y con agitación constante de 225 rpm a 37⁰C.

La extracción de DNA plasmidial se realizó mediante el método de hervido (Holmes & Quigley, 1981). Posteriormente se realizó un análisis de restricción para la confirmación de la presencia del inserto.

3.2.1.6 Doble digestión del DNA plasmidial con las enzimas de restricción *BsrGI* y *SacII*.

La existencia del producto de amplificación en el plasmidio extraído desde las bacterias transformadas con la reacción de ligación, se verificó realizando un análisis de restricción con

enzimas que cortan en posiciones específicas en la secuencia de DNA de interés. Las enzimas utilizadas para tal efecto fueron *BsrGI* y *SacII*. Para la reacción de digestión se tomaron: 10 µl del DNA extraído, 2 µl de tampón de digestión de la enzima *BsrGI* 10X, 2 µl de RNAsa, 0,3 µl de *BsrGI* (10,000 U/ml), 0,3 µl de *SacII* (10 U/µl) y se dejó incubar por dos horas a 37⁰C.

La verificación del análisis de esta digestión se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % usando como tampón de corrida TAE 1X. Las bandas de DNA se visualizaron por medio de la tinción con bromuro de etidio en un transiluminador con una lámpara U.V. y fotografiadas para luego ser procesadas.

3.2.1.7 Purificación del DNA plasmidial.

Cuando se confirmó la presencia del producto de amplificación, una de estas colonias se seleccionó y se dejó creciendo en 100 ml medio de cultivo líquido LB con 100 µg/µl de ampicilina, a 37⁰C y con agitación constante a 225 rpm durante toda la noche para poder aumentar la cantidad de DNA. La extracción y purificación del DNA plasmidial se realizó mediante el uso del sistema de purificación de DNA Wizard plus midipreps basado en lisis alcalina y purificación del DNA mediante resinas. La cuantificación del DNA extraído se hizo por medio de un espectrofotómetro (Génesis 2), midiendo la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nm.

3.2.1.8 Subclonamiento del DNA mutado en el vector de expresión pCR3.1/mTASK-2.

El paso siguiente fue extraer el fragmento con la mutación desde el vector pGEM-T e incorporarlo al vector de expresión de células de mamíferos pCR3.1/mTASK-2 (figura 4). La

digestión del primero se realizó con las enzimas *BsrGI* e *SacII* (ver protocolo de digestión 3.2.7) recuperándose una banda de 1080 pb que correspondía al inserto. Ésta fue extraída desde un gel de agarosa al 1% y se purificó el DNA mediante mini columnas. Una vez extraído, el DNA fue ligado en el vector pCR3.1/mTASK-2WT previamente digerido con *BsrGI* y *SacII* y desfosforilado con fosfatasa alcalina intestinal con lo que se restableció la secuencia del mTASK-2 con la mutación incorporada.

La reacción de ligación se llevó a cabo usando la T4-DNA ligasa 1 U/μl. Se utilizó un control para estudiar una posible religación del vector, en que la única diferencia con respecto a la reacción de ligación experimental fue la falta del inserto, en este caso el DNA de 1080pb. Estas mezclas se utilizaron para transformar células competentes DH5α. Lo que se debía observar era la presencia de colonias en las placas de agar sembradas con bacterias que habían sido transformadas con la reacción de ligación que contenía el inserto y ningún crecimiento en las placas que sólo contenían el vector. Como sucedió lo esperado, se tomó una de estas colonias (reacción de ligación más inserto) y se dejó creciendo toda la noche en 100 ml de medio LB con 100 μg/ml de ampicilina, para la posterior extracción del DNA plasmidial. La verificación de la presencia del DNA de interés fue analizada por medio de un ensayo de restricción con la enzima *EcoRI*. El vector de expresión pCR3.1 presenta dos sitios de corte para esta enzima, por otra parte, el inserto (mTASK-2) posee un sitio de corte para *EcoRI*. Por lo tanto el uso de *EcoRI* además de indicar la presencia de nuestro inserto, señaló su correcta orientación. Finalmente la presencia de la mutación se confirmó por medio de la secuenciación del fragmento clonado, incluyendo los sitios de restricción en los cuales se realizó el clonamiento (Medigenomix Alemania).

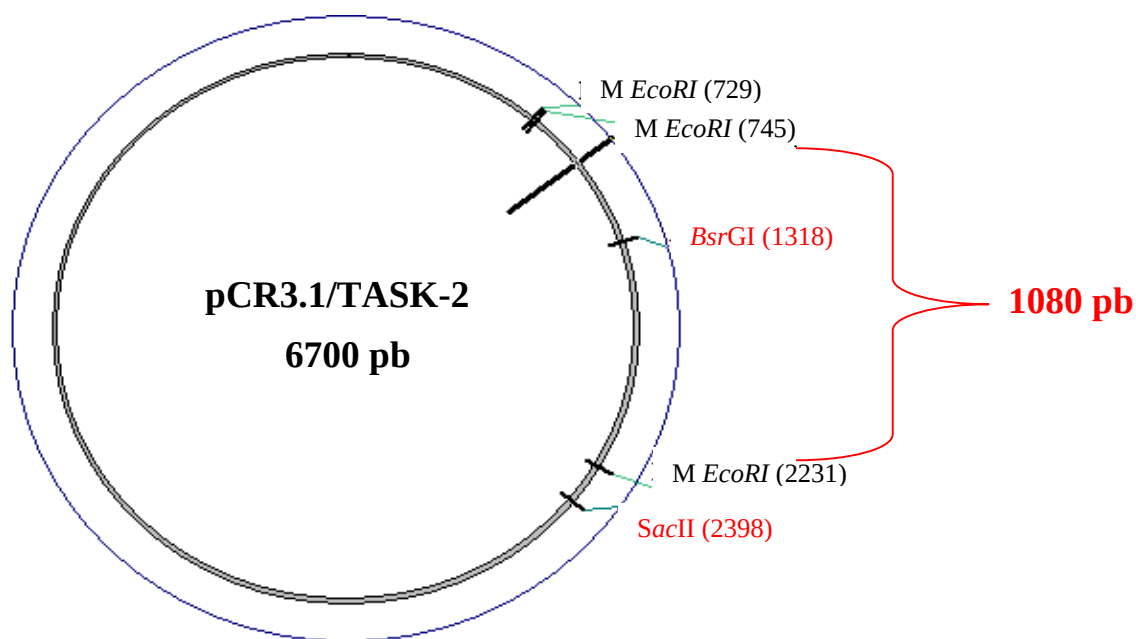


Figura 4. Esquema del vector pCR3.1/TASK-2.

Esquema del vector de expresión pCR3.1/TASK-2, en el cual en rojo se indican los sitios de corte que se encuentran en la secuencia de TASK-2 para las enzimas *BsrGI* y *SacII*, en cambio, en negro se señalan los sitios de corte para la enzima *EcoRI* existentes en el vector pCR3.1 y en el inserto.

3.2.2 Líneas celulares y cultivo celular.

Las células epiteliales de riñón humano HEK-293 fueron obtenidas de *American Tissue Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD) ATCC y se mantuvieron en medio DMEM/F12 5,5 mM glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) sin antibióticos, a 37⁰C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ - 95% aire.

La línea celular HeLa 2H18 que presenta la transfección estable de citocromo-c-GFP, fue obsequiada por el Dr. Douglas R.Green (perteneciente al Instituto la Jolla de Alergia y Inmunología del Centro de Ciencia en San Diego, California, USA) y se mantuvo en medio DMEM/F12 5,5 mM glucosa suplementado con 10% SFB en presencia de 1 mg/ml de geneticina a 37⁰C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ - 95% aire.

Una vez a la semana las células fueron pasadas a una nueva placa, para ello se utilizó: solución de 0,05% tripsina – 5,53 mM EDTA por 2 minutos a temperatura ambiente, para luego neutralizar el proceso agregando 8 ml del medio correspondiente a cada línea celular conteniendo SFB. Las células HeLa 2H18 fueron utilizadas entre 1-3 días de crecidas con pasajes que fluctúan entre el 1 y 19 (P1-P19) para los mediciones de RVD y AVD. Para los estudios de electrofisiología se utilizaron las células HEK-293.

3.2.3 Transfecciones transitorias.

Para los estudios fisiológicos usando microscopía confocal, se utilizó la línea celular HeLa 2H18. Las células se sembraron a una confluencia del 60% aproximadamente (día previo a la transfección) sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro depositados en placas de poliestireno de 35 mm de diámetro, usando medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB e incubadas a 37°C en un 5% de CO₂. Una vez que alcanzaron la confluencia deseada, se transfectaron con 0,75 µg del vector de expresión pCR3.1/TASK-2WT-GFP más lipofectamina plus según el protocolo descrito por el fabricante. Los estudios de RVD se realizaron entre 8 y 12 horas de postransfección. Para los experimentos electrofisiológicos las células HeLa y HEK-293 se crecieron en placas petri de 35 mm de diámetro en DMEM/F12 suplementado con 10% SFB a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, el día previo a la transfección. Cuando alcanzaron una confluencia de 60-80% se cotransfectaron con 1,0 µg del plasmidio de expresión para mTASK2-WT ó para cada una de las mutantes creadas (mTASK2-Y190F; mTASK2-Y219F; mTASK2-Y225F) y 0,3 µg de π H3-CD-8 en una razón 3:1 usando para ello lipofectamina plus. Se utilizó la expresión del antígeno CD-8 para identificar las células que habían sido transfectadas efectivamente (Jurman *et al*, 1994). Después de 8-12 horas de postransfección, las células fueron incubadas por 3 minutos con microesferas cubiertas con el anticuerpo contra el antígeno CD8 (Dynabeads) luego se realizaron lavados para eliminar las esferas en exceso. Posteriormente las placas petri que contenían a las células, se colocaron sobre un microscopio invertido Nikon Diaphot para la realización a temperatura ambiente de los experimentos respectivos (20°C-25°C).

3.2.4 Mediciones de fluorescencia celular.

Células HeLa 2H18 fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio (Nº 1 Erie Scientific, USA) de 25 mm de diámetro. Estos fueron montados en una cámara abierta construida por BioJSP (Santiago, Chile).

La fluorescencia se midió en regiones de interés (*Regions Of Interest*; ROIs) posicionadas sobre las células, cada 20-30 segundos utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 5 Pascal equipado con un láser de Argón y Helio/Neón con líneas de excitación a 488 nm y 543 nm, respectivamente.

La sonda fluorescente verde calceína-AM fue registrada utilizando 488 nm de excitación y 505-530 nm de emisión. Para la sonda fluorescente roja, DIC-18 se excitó con 543 nm y la emisión se registró entre 630-660 nm.

En este sistema confocal, la fluorescencia es convertida a una imagen digital (256x256 o 512x512 píxeles), donde a cada pixel se le ha asignado un valor entre 0 (negro) y 256 (blanco). Las imágenes se obtuvieron usando un pinhole de 157 μm , lo cual corresponde a registrar la fluorescencia emitida por un corte óptico de aproximadamente 2,0 μm de grosor.

La señal de fondo (*background*) se mide en aquellas regiones del campo desprovisto de células, y este valor es restado a la señal recogida de los ROIs que se encuentran sobre las células (figura 5). Para poder comparar los valores emitidos por diferentes células, los datos son estandarizados asignando a la fluorescencia basal (F_0) el valor de 1.

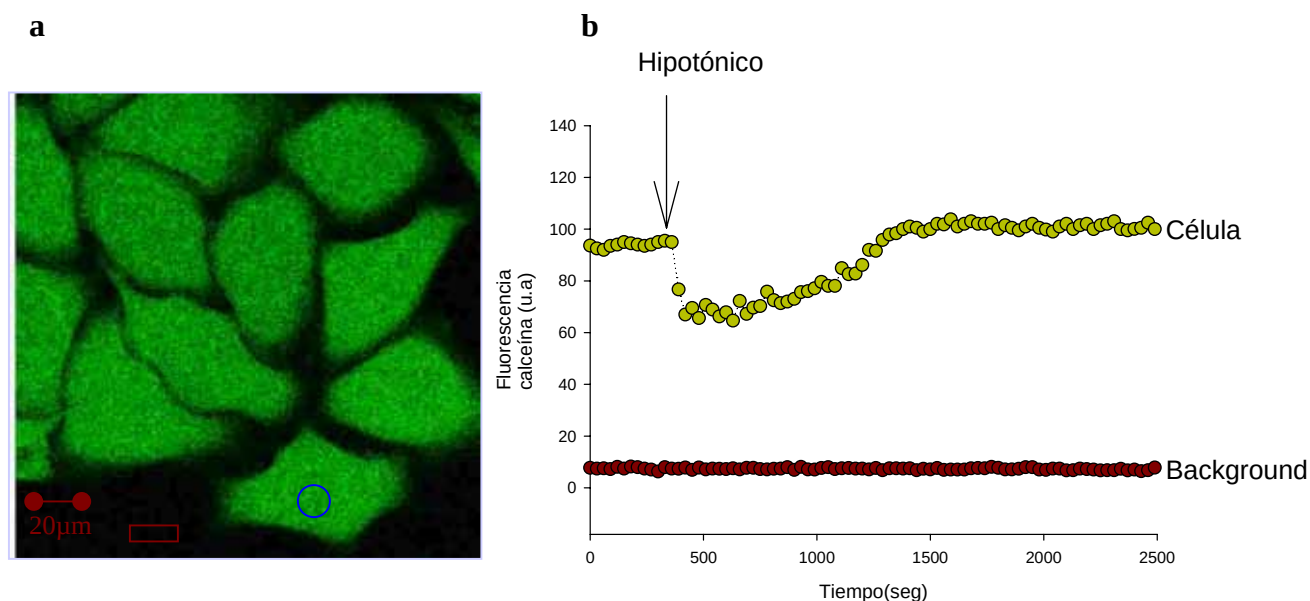


Figura 5. Medición de fluorescencia celular mediante microscopía confocal. **a**, la fluorescencia de células HeLa cargadas con calceína se registra en el ROI que se posiciona sobre una de ellas (azul) ó en zonas libres de células (rojo) para medir la señal de fondo (*background*). La barra roja representa 20 μm . En **b**, se muestra el curso temporal de la exposición a cambios de osmolaridad “hipotonicidad” (flecha negra) en los ROIs posicionados en la figura **a**, (●) representa la fluorescencia del ROI celular y (○) el extracelular.

3.2.4.1 Características de la sonda fluorescente calceína-AM.

La calceína presenta máximos de absorción y emisión de 494 y 517 nm, respectivamente. Calceína-AM (5 mM) se preparó en 0,02 % de ácido plurónico en DMSO. Las células se incubaron con 5 μ M de la sonda durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para verificar la ausencia de destrucción irreversible o *photobleaching* de la sonda fluorescente por la luz de excitación, se realizaron experimentos control en los cuales las células HeLa 2H18 cargadas con la calceína, se excitaron un número elevado de veces con intervalos de 5 segundos entre cada toma determinando así, si existe alguna variación en el comportamiento de la sonda. Del gráfico expuesto en la figura 6a podemos concluir que bajo este protocolo de estimulación la calceína no es quemada en forma apreciable luego de 200 exposiciones, por lo tanto este protocolo fue utilizado en experimentos posteriores. Para demostrar la ausencia de compartimentalización ó extrusión de la sonda, en 6b se ilustra el registro de una línea base estable de células expuestas a una excitación con una intensidad de láser de 5% cada 30 segundos sin efectuar sobre ellas ningún tipo de estímulo. Es importante destacar que antes de realizar cualquier experimento se debe comenzar teniendo líneas bases estables, lo cual nos llevará posteriormente a analizar en forma correcta los datos obtenidos.

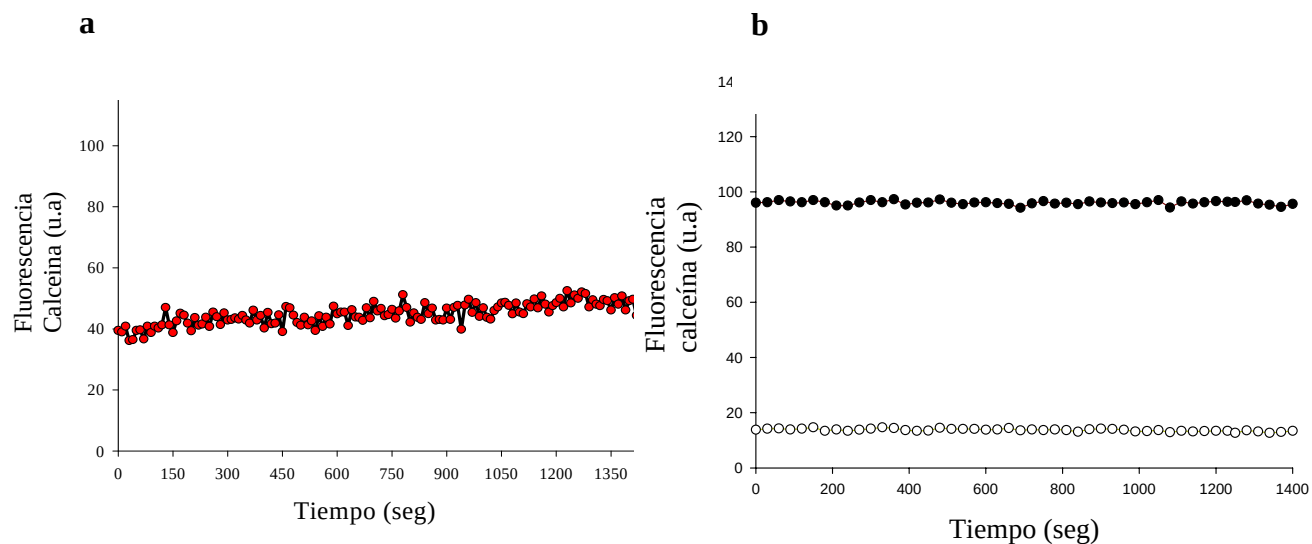


Figura 6. La intensidad de fluorescencia de la calceína no es afectada por la excitación constante. **a**, curso temporal de la fluorescencia de células cargadas con 5 μ M de calceína-AM excitadas aproximadamente unas 300 veces cada 5 segundos con 5% de intensidad de láser. En **b**, se muestra el registro de una línea base obtenida por la excitación de células cargadas con 5 μ M de la sonda con 5% de intensidad de láser cada 30 segundos sin efectuar ningún estímulo ó cambios de tonicidad en el medio. Los círculos negros corresponden a la fluorescencia de las células y los círculos blancos al background. Los datos representan el promedio de 3 células.

3.2.4.2 Medición de volumen celular relativo en tiempo real.

Los cambios en el volumen celular fueron estudiados en células HEK-293 (ATCC) y HeLa 2H18 midiendo las variaciones que se producen en la concentración intracelular de calceína, al exponer las células a soluciones extracelulares con distinta osmolaridad, entendiendo que en medios hipotónicos la intensidad de fluorescencia de la sonda disminuye debido a la dilución de ésta (entrada de agua) y que en soluciones hipertónicas ocurre el efecto contrario, cuando se las compara con el comportamiento del fluoróforo en medios isotónicos (Alvarez-Leefmans *et al*,1995). Las células HEK-293 y HeLa transfectadas con TASK2WT-GFP (el día previo a la realización de los experimentos) fueron sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm y cargadas por 5 minutos a temperatura ambiente con 5 μ M de calceína-acetoximetiléster (calceína-AM). Posteriormente fueron perfundidas con solución isotónica 316 mosM (90 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 110 mM manitol, 10 mM Hepes/Tris pH 7,5) suplementado con 5,5 mM glucosa y 25 mM de potasio, antes de comenzar el experimento y de ahí fueron expuestas a una solución hipotónica 216 mosM suplementada con 5,5 mM glucosa, que contenía los mismos componentes que la solución isotónica excepto manitol y 25 mM de potasio. Cabe destacar que las células son mantenidas, desde el momento en que se detiene la reacción de transfección hasta que se procede a realizar los estudios, a concentraciones de potasio de 25 mM, con el objeto de mantener la misma osmolaridad y disminuir el nivel de muerte celular que se produce al llevar a cabo una transfección aguda con un canal de potasio perteneciente a la familia de los TASK. La pérdida de potasio intracelular se ha relacionado con muerte celular en dos puntos, el primero es que la salida de potasio, uno de los eventos tempranos que ocurren en apoptosis, va acompañado de la salida de agua lo cual lleva a las células a disminución apoptótica de volumen (AVD) y como segundo punto, se ha sugerido que el K⁺ actuaría como regulador

negativo de nucleasas intracelulares y caspasas, impidiendo así que ellas actúen. Por lo tanto aumentando el potasio extracelular, evitamos que el K^+ intracelular abandone la célula y por ende la apoptosis.

En los experimentos en los cuales se midió el efecto del pH extracelular sobre la RVD, el tampón Hepes/Tris utilizado (para el rango de pH entre 7,0 y 8,5) en la solución hipotónica, fue reemplazado por MES (Ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico) para el pH 6,0. En el caso del estudio de la inhibición de RVD por clofilio, la concentración utilizada fue 100 μ M a pH 7,5. Estos experimentos se ejecutaron a temperatura ambiente (22⁰-25⁰C).

Los estudios se efectuaron utilizando un microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM Pascal 5. La longitud de excitación fue de 488 nm, y la emisión fue medida a longitudes de onda mayores que 515 nm. Las imágenes de fluorescencia provenientes de regiones intracelulares de interés (ROI) de células individuales se obtuvieron cada 30 segundos. Los datos se presentan como F_o/F_t , donde F_t = fluorescencia a tiempo=t y F_o = fluorescencia en solución isotónica, a t = 0. La razón F_o/F_t , es proporcional al volumen celular. En los experimentos con transfecciones agudas de TASK2-WT, se usó TASK2WT-GFP para visualizar las células que expresaron el canal.

3.2.4.3 Detección de la presencia de uniones intercelulares mediante FRAP (Fluorescence Recovery after *photobleaching*).

La determinación de la existencia de uniones intercelulares en células HEK-293 y HeLa 2H18 en cultivo se llevó a cabo por FRAP. Esta técnica es útil para medir la difusión de una molécula fluorescente dentro de un medio. Esta molécula puede ser un fluoróforo extrínseco, el cual es introducido específicamente en un sistema para las mediciones de FRAP, tales como

uniones entre las células, fluidez de membrana. Las mediciones consisten en dos fases experimentales: 1) Un área seleccionada de la muestra (célula cargada con la sonda) es excitada con una gran intensidad de luz (100% láser) por un corto período de tiempo con el objeto de causar un *photobleaching* de las moléculas dentro de la zona. 2) Monitoreo secuencial de la intensidad de fluorescencia del área de *bleaching* y en las regiones vecinas que se encuentran en contacto directo con la zona apagada. El comportamiento de la sonda fue ajustado a una ecuación exponencial simple de tres parámetros.

$$Y = Y_{MAX} + (Y_0 - Y_{MAX}) \cdot e^{-kt}$$

$$\text{Cuando: } t \rightarrow 0, Y = Y_{MAX} + (Y_0 - Y_{MAX})$$

$$t \rightarrow \infty, \quad Y = Y_{MAX}$$

Donde Y= fluorescencia a tiempo t, Y_{MAX} = fluorescencia máxima e Y_0 = fluorescencia basal a tiempo = 0

3.2.5 Desarrollo y estandarización de un método para el estudio de la AVD.

En primera instancia la disminución apoptótica de volumen fue estudiada en células HeLa 2H18 nativas cultivadas el día previo a la realización de los experimentos en una cámara de vidrio de borosilicato compuesta de 4 compartimentos de $1,7 \text{ cm}^2$ de área cada uno (N⁰ 155382 NUNC BRAND Products), esta cámara se colocó dentro de una caja de vidrio de forma rectangular que poseía una base y una tapa. La tapa de la caja posee 2 orificios en uno de sus costados conectados a dos mangueras diferentes, las cuales permiten un constante flujo de agua

que viene de un baño termorregulado (JULABO SW23) a 37°C. La cámara con las células se depositó en la base y se tapó, de esa manera la temperatura no varió de 37°C, ya que se chequeó con un termómetro que estaba directamente conectado al pocillo con células. Posteriormente la cámara rectangular con las células se depositó sobre una plataforma de aluminio en el microscopio confocal. Para evitar la condensación del objetivo producto de los cambios de temperatura, se depositó sobre él un anillo de cobre, evitando dañar esta parte del instrumento. Cada pocillo de la cámara tenía un orificio de entrada con una aguja por el cual se pueden hacer cambios de soluciones, incluir inductores de apoptosis, etc. y un orificio de salida al cual iba conectada una manguera, que gracias a una bomba peristáltica sacaba las soluciones en el momento indicado. En los primeros experimentos se trató de medir la AVD en células cargadas con 5 μM de calceína-AM y utilizando como inductor apoptótico 200 μM de peróxido de hidrógeno. Antes de agregar cualquier reactivo, las células fueron perfundidas con solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH; 136 mM NaCl; 10 mM HEPES; 4,7 mM KCl; 1,25 mM MgSO_4 ; 1,25 mM CaCl_2 ; pH 7,4) suplementado con 25 mM glucosa (KRG-glc). Una vez lograda una línea base estable de aproximadamente unos 1000 segundos se adicionaron 200 μM de H_2O_2 . Las imágenes de fluorescencia provenientes de las regiones intracelulares de interés de células individuales se obtuvieron cada 2 minutos, utilizando para ello un corte óptico de 2,0 μm de grosor. Como no se pudo medir AVD por este método (resultados que se analizarán más adelante) debido al *bleaching* sufrido por la sonda y a la interacción de ésta con peróxido, se decidió evaluar este punto induciendo la muerte de células HeLa nativas cargadas con la sonda con 2 μM estaurosporina. Lamentablemente tampoco se pudo evaluar el efecto ya que la sonda igual disminuyó su intensidad de fluorescencia en forma rápida a medida que transcurría el tiempo. Finalmente la AVD de células HeLa nativas se cuantificó por medio de la reconstrucción

tridimensional de las imágenes obtenidas durante el curso temporal de la exposición a 2 μM de estaurosporina. Basándonos en el programa IDL (Lenguaje de Datos Interactivo), el cual es un software comercial desarrollado por RSI (Research Systems, Inc.) para obtener información de datos a través de la visualización y el software Huygens Professional para la deconvolución de imágenes, pudimos realizar la segmentación y la reconstrucción de objetos en 3D. Para estos experimentos se utilizaron 5 μM de una sonda lipofílica DiIC₁₈, la cual posee máximos de absorción a 543 nm y de emisión a 630-660 nm. Ésta sonda fue la candidata de elección para nuestros estudios debido a sus características: es fotoestable, de naturaleza altamente lipofílica, se distribuye homogéneamente en la membrana celular, no se compartimentaliza y no es citotóxica. Para estos experimentos, células HeLa cargadas con la sonda fueron sometidas a cortes en el plano Z de 1 μm de grosor abarcando todo el espesor de la célula. Las imágenes se obtuvieron cada 5 minutos con láser de 543 nm e intensidad de 1%. Es importante señalar que las imágenes se toman cada 5 minutos, ya que se pudo observar que a intervalos más cortos, como por ejemplo 2 minutos las células presentaban la aparición de *blebs*, en ausencia de cualquier inductor de muerte. Como este patrón no se presentó al realizar los controles tomando los Z-stack cada 5 minutos se seleccionó este tiempo para realizar los estudios. Paralelo a esto se hicieron los respectivos controles para ver si la excitación constante producía un *bleaching* apreciable de la sonda y como resultado se pudo ver que esto no ocurría, por lo tanto seguimos con la estandarización del método. Una vez terminado los experimentos, las imágenes fueron “deconvolucionadas” (restauradas) con el fin de corregir o recuperar la información dentro de la imagen que se ha perdido durante el proceso de adquisición de las fotografías. Las correcciones para la pérdida de información, distorsión se logran mediante la deconvolución, la cual permite reinvertir el proceso logrando una re aproximación al objeto real, es decir, eliminando el ruido y

las distorsiones introducidas por el sistema. (figura 7**a** y **b**). Después de esto y previo a la reconstrucción, las imágenes sufren un proceso llamado segmentación. Este es un proceso que permite elegir una región de interés que define finalmente los píxeles dentro de la imagen que pertenecen a un objeto y los que corresponden al fondo. Este paso se lleva a cabo al pasar las imágenes por una serie de filtros, logrando así una aproximación más real del objeto inicial. Esta etapa es imprescindible para realizar las reconstrucciones, ya que a través de ella se logra reconocer, analizar estructuras y reducir aquella información que esta demás.

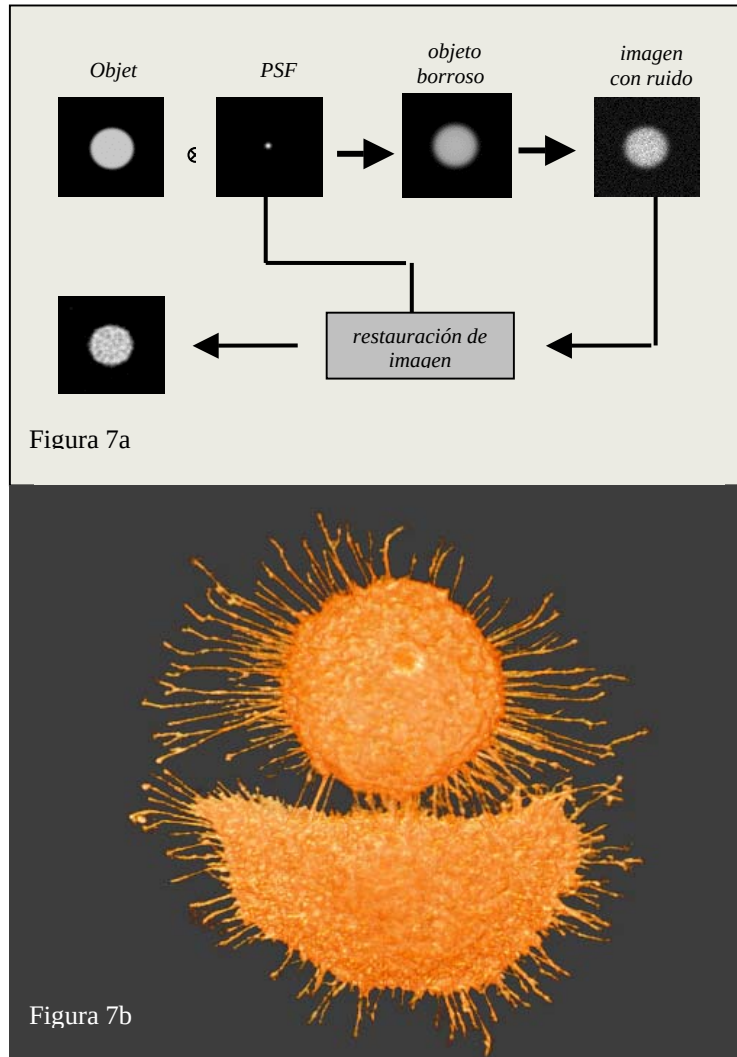


Figura 7. Proceso de deconvolución y reconstrucción en 3D de una imagen. En 7a, se muestra el diagrama del procedimiento general de la restauración de la imagen. El símbolo $\otimes$ denota el operador matemático de convolución, PSF point spread function. El esquema de la restauración de una imagen, se logra mediante el *software* de deconvolución. La adquisición de la imagen en su estado inicial presenta distorsión y ruido, en cambio, una vez terminada la restauración se logra una imagen más cercana a la original lográndose distinguir estructuras más definidas, como lo que se puede apreciar en la figura 7b, que es la reconstrucción de la imagen de dos células HeLa.

3.2.6 Liberación de citocromo-c: otro parámetro para estudiar apoptosis.

Trabajos anteriores señalaban a la liberación de citocromo-c como uno de los primeros eventos y por lo tanto un buen marcador de la apoptosis (Goldstein *et al*, 2000; Luetjens *et al*, 2001). Como en el laboratorio disponemos de la línea celular HeLa 2H18, las cuales expresan en forma estable citocromo-c-GFP, se quiso monitorear la salida de citocromo-c (cit-c) en el tiempo, provocado por el tratamiento con 2 μ M de estaurosporina. Para ello se utilizaron células HeLa 2H18 con 2 días de crecidas, sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm a una confluencia del 60%. Durante todo el transcurso de los experimentos, las células fueron mantenidas en solución KRH a 37°C suplementada con 25 mM de glucosa, una vez que se eligió el campo celular a estudiar se adicionaron 2 μ M de estaurosporina al medio. De ahí las células fueron expuestas a excitación con láser de 488 nm y 90% de intensidad a intervalos de 5 minutos entre cada toma. Cabe destacar que con el protocolo utilizado la fluorescencia emitida por la GFP no sufrió *bleaching*, por lo tanto pudimos seguir con nuestro ensayo sin problemas. La toma de las imágenes se llevó a cabo usando el objetivo de 40X y zoom de 2,5 veces. Las células que expresan en forma estable citocromo-c-GFP se observan al microscopio con una distribución de la fluorescencia que presenta un patrón punteado y perinuclear para la GFP cuando se excitan con láser de 488 nm y 60% de intensidad, (figura 8).

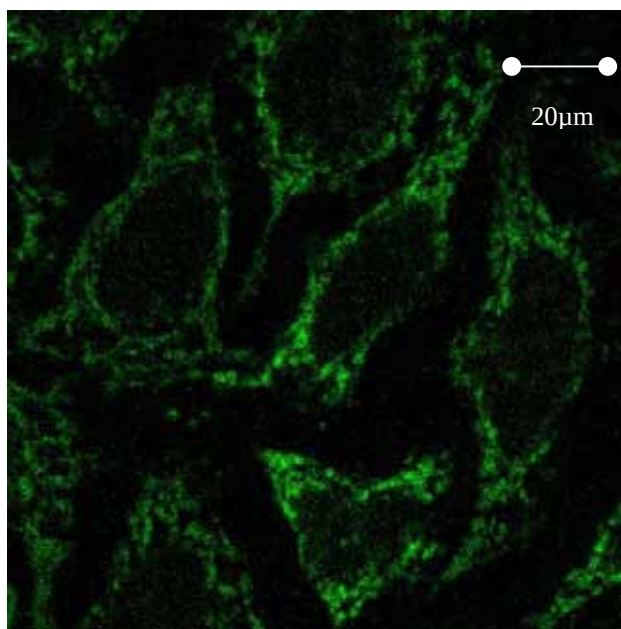


Figura 8. Células HeLa 2H18 que expresan en forma estable citocromo-c-GFP. Imagen de fluorescencia de células HeLa 2H18 tomada con láser de 488 nm y 60% de intensidad con un zoom de 2,0 veces. Se observa claramente el patrón punteado y perinuclear que presenta la GFP en condiciones normales, lo cual corresponde a una localización mitocondrial. La barra blanca corresponde a 20μm.

En el caso de que exista liberación de citocromo-c-GFP este patrón se tornará difuso y homogéneo en el tiempo, después de haber aplicado algún estímulo apoptótico. El método para medir la liberación de la proteína se basa en la medida de la desviación estándar (sd) del promedio de la intensidad de fluorescencia de todos los píxeles de una imagen de una célula individual. Entonces en condiciones normales (inicio de los experimentos, previo a cualquier tratamiento con agentes inductores de muerte) la desviación estándar es alta (grande) en condiciones de fluorescencia punteada, y baja (menor) durante una fluorescencia difusa, siendo expresados los datos como porcentaje de la sd de razón de fluorescencia punteada/difusa en el tiempo. Al comienzo el porcentaje de desviación estándar que se toma es el máximo (100%), el cual disminuye a medida que la fluorescencia de la GFP se va tornando más difusa y homogénea (Goldstein *et al*, 2000; Düssmann *et al*, 2003).

3.2.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Sigma STAT (Jandel). Los datos son presentados como promedio $\pm$ error estándar (número de células). La significancia estadística fue evaluada usando la prueba t-student para comparar dos muestras. Se consideró de significancia estadística cuando $p < 0,05$. Para los experimentos de AVD los datos se analizaron en el programa Origin. Múltiples grupos fueron evaluados usando ANOVA. En estos experimentos la significancia estadística se evaluó usando el test de Bonferroni. Se consideró como significancia estadística cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Fabricación de los constructos de interés, mediante mutagénesis sitio-dirigida.

Uno de los objetivos de este trabajo fue la búsqueda del posible sensor de pH del canal de potasio TASK-2. Se sabía que la activación o inhibición de la corriente emitida por el canal, se debía a la modulación ejercida por el pH extracelular, no así el intracelular. Adicionalmente reportes previos indicaban a H-98 adyacente al sitio que forma el filtro de selectividad en el primero de los dos segmentos de poro como sensor del pH extracelular en TASK-3 (Rajan *et al*, 2000), dado que su mutación por asparragina o aspártico elimina su sensibilidad al pH extracelular. Este residuo también se encuentra conservado en TASK-1 y su mutación por asparragina o aspártico disminuye la sensibilidad a pH extracelular de este canal pero no la elimina, indicando que H-98 no es el único residuo que sensa el pH en este caso (Morton *et al*, 2003). Por otro lado, en TASK-2 no se encuentra conservada H-98 siendo el residuo equivalente a una asparragina. La mutación de este aminoácido por histidina N103H, produce un descenso en la sensibilidad a pH extracelular, comparada con el tipo silvestre (WT), pero en forma parcial (Morton *et al*, 2003). En base a los siguientes antecedentes: 1) al modelo topológico propuesto para KCNK5 por Reyes y colaboradores, 2) el uso de reactivos que atacan residuos susceptibles a pH tales como 5 mM de dietilpirocarbonato (DEPC), agente químico que no atraviesa la membrana celular y que a altas concentraciones esterifica grupos amino (lisina) entre pH 4,0 y 7,0 grupos fenólicos (tirosina) y a menores concentraciones grupos imidazolio (histidina), a 3 mM de ácido trinitrobencenosulfónico que reacciona en forma irreversible con grupos amino a pHs cercanos ó mayores que 7,0 y de manera reversible con grupos sulfhidrilos a pH neutro y de metanosulfonato, agente químico que reacciona con residuos SH de grupos cisterna y 3) teniendo en cuenta que a concentraciones de K^+ simétricas el canal presenta un $pK_{1/2}$ de 7,6 y uno de 8,2 a

concentraciones de potasio extracelulares fisiológicas con un n_H cercano a 1,0, se llegó a pensar en la probable participación de residuos de tirosina. En estudios anteriores a esta tesis ya se habían realizado las siguientes mutaciones sitio-dirigidas: H30D, H44D, H174N, H220N, K32A, K107A C51S y C115S obteniéndose como resultado a través de las mediciones electrofisiológicas de la corriente, que solamente la mutante H174N muestra una diferencia significativa con respecto al tipo silvestre (WT) para $pK_{1/2}$ y n_H . Por lo tanto se construyeron 3 mutantes, en donde el aminoácido ionizable tirosina en posiciones Y190, Y219 e Y225 se substituyó para cada caso en forma individual por el residuo no cargado fenilalanina. La creación de las tres mutantes, se realizó mediante la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) esquematizado en el gel de la figura 9 (ver materiales y métodos 3.24). Para ello se utilizaron los partidores mutagénicos siguientes: **sY190F**, **asY190F**; **sY219F**, **asY219F** y **sY225F**, **asY225F** además de dos partidores no mutagénicos uno de ellos ubicado río arriba del sitio a mutar y en orientación sentido **ERH6T₇for** y otro en orientación antisentido ubicado río abajo **aspCR3.1**. En cada caso se emplearon como templado 10 ng de pCR3.1/TASK2-WT. La figura 9a muestra los productos de amplificación obtenidos para la PCR 1 de Y190F empleando los partidores **asY190F** y **ERH6T₇for** (carril 3 y 4) y **aspCR3.1** y **sY190F** (carril 5 y 6), indicando la presencia de bandas de 203 pb y 1069 pb, respectivamente. En **b** se muestra el resultado de la PCR 1 para Y219F usando los partidores ERH6T₇for y asY219F (carril 3 y 4) dando un fragmento de 288 pb, mientras que los carriles 5 y 6 indican la presencia de una banda de 991pb, generada utilizando los partidores **asY219F** y **aspCR3.1**. En **c** se muestran las bandas generadas por la PCR 1 para Y225F, carriles 1 y 2 fragmento de DNA de 307 pb generado en presencia de los partidores **ERH6T₇** y **asY225F**, en cambio, líneas 3 y 4 muestran producto de 973 pb obtenido mediante los partidores **sY225F** y **aspCR3.1**.

Cuando se corroboró la presencia de los productos de PCR 1 de interés, para cada caso en particular, se procedió a la extracción de las bandas desde el gel de agarosa para purificarlas y posteriormente utilizarlas en la reacción de PCR 2. Para el segundo paso de PCR como templado se utilizaron las bandas provenientes de la PCR 1, las cuales fueron extraídas desde el gel para cada mutante en forma individual (**Y190F**: 203 y 1069 pb; **Y219F**: 288 y 991 pb; **Y225F**: 307 y 973 pb) y los partidores no mutagénicos **ER6H₇for** y **aspCR3.1**, obteniéndose en los tres experimentos independientes un producto de amplificación de 1260 pb. La figura 10 corresponde a un gel de agarosa al 1,5% en donde en el carril 3 se visualiza el fragmento de 1260 pb esperado de la PCR 2, en el carril 1 se visualiza el marcador de peso molecular de 1 Kb y en el carril 4 el estándar de peso molecular de 100 pb. Cabe destacar que para cada mutante en particular, se obtuvo el mismo fragmento, pero en la fotografía sólo se ilustra el fragmento obtenido para una mutante. El carril 2 corresponde al control negativo, en donde, la única diferencia que existe con respecto a las reacciones de amplificación, radica en la ausencia de templado y su reemplazo por agua.

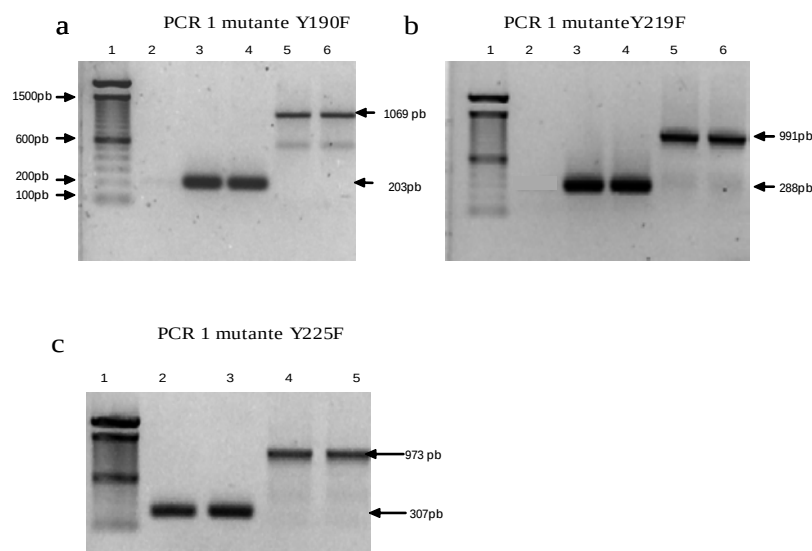


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de productos de amplificación de PCR 1 con partidores para las mutantes Y190F(a), Y219F (b), Y225F(c) usando como templado cDNA pCR3.1/TASK2-WT. Carril 1 estándar de peso molecular de 100 pb (a, b y c) **a**, carril 2 control negativo (H₂O), carril 3 y 4 producto de amplificación de 203 pb obtenido usando los partidores ERH6T₇for y asY190F, carriles 5 y 6 producto de PCR 1 de 1069 pb generado mediante los partidores as pCR3.1 y sY190F. En el carril 2 de la figura **b**, se tiene el control negativo (H₂O), carriles 3 y 4 fragmento de 288 pb obtenido usando los partidores asY219F y ERH6T₇, carriles 5 y 6, banda de 991 pb generada por as pCR3.1 y sY219F. En los carriles 2 y 3 de la figura **c**, se muestra el producto de amplificación de 307 pb generado por los partidores asY225F y ERH6T₇, carriles 4 y 5 banda de 973 pb obtenida mediante los partidores as pCR3.1 y sY225F

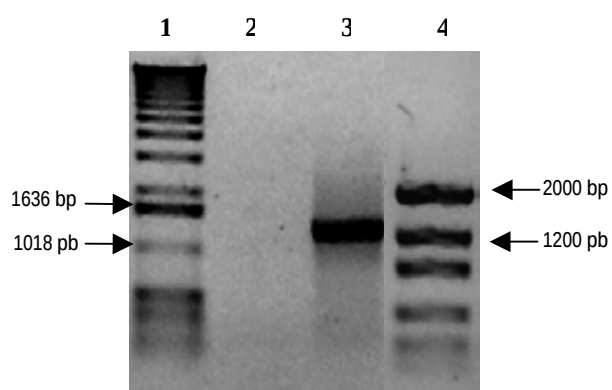


Figura 10. Evaluación del producto de amplificación de PCR 2. Carril 1 estándar de peso molecular de 1 Kb, carril 2 corresponde a la amplificación del control negativo, el cual posee agua en vez de templado, carril 3 fragmento de PCR de 1260 pb, que se obtiene usando los partidores no mutagénicos en posición sentido ER6H₇ for y aspCR3.1, carril 4 estándar de peso molecular de 100 pb.

Cuando se logró amplificar la banda deseada de 1260 pb, ésta se ligó al vector de clonamiento pGEMT con el fin de aumentar la cantidad de DNA obtenida. El paso siguiente consistió en una extracción del DNA plasmidial, seguido de un análisis de restricción para verificar la presencia ó ausencia del inserto (fragmento de 1260 pb obtenido de la PCR 2, figura 10). El vector pGEMT posee un tamaño de 3015 pb y presenta dos sitios de corte para la enzima de restricción *EcoRI*, uno en posición 52 (ubicado río arriba del sitio de múltiple clonamiento) y otro en posición 70 (río abajo del sitio de clonamiento), por lo tanto si este vector no incorpora el inserto, se verán sólo 2 bandas una de 2997 pb y otra de 18 pb, en el caso contrario, se verán 3 fragmentos; 285 pb, 992 pb y 2997 pb debido a la existencia de otro sitio de corte para esta enzima en el inserto. La figura 11 muestra el resultado final del análisis de restricción de las colonias de bacterias seleccionadas para el caso de cada mutante en particular. Se señalan las bandas y su correspondiente peso molecular, mostrando todas las muestras el patrón de digestión positivo. En el carril 6 se observa la digestión de una colonia azul, indicándonos la religación del vector (banda de aproximadamente 3 Kb) y por tal motivo la ausencia de los fragmentos esperados en el caso de que se estuviera en presencia del inserto.

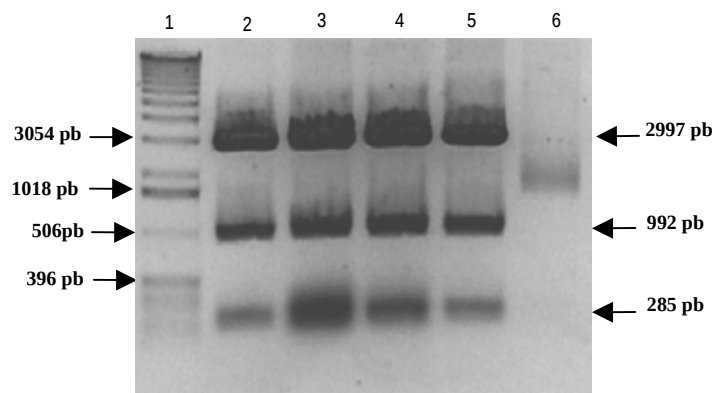


Figura 11. Ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* de DNA plasmidial extraído de bacterias transformadas con el producto de PCR 2 y el vector pGMET. Gel de agarosa al 1,2 % teñido con bromuro de etidio, de las digestiones realizadas con la enzima *EcoRI* a 37°C por 2 horas al DNA plasmidial correspondiente a cada mutante en forma particular. Carril 1 estándar de peso molecular de 1 Kb, carril 2 patrón de digestión del control positivo (pGMET/TASK2-WT), indicando los fragmentos de 2945, 927 y 257 pb esperados. Carril 3, 4 y 5 digestión del DNA aislado de células transformadas con reacción de ligación de las mutantes Y190F, Y219F e Y225F respectivamente, en donde se observan fragmentos de un peso molecular idéntico a los obtenidos para el control positivo. Carril 6 control negativo, ensayo de restricción de vector pGMET religado.

Una vez que se corroboró la presencia del inserto ligado en el vector pGEMT para cada mutante en particular, cada una de estas colonias fue crecida en forma independiente, con el objeto de aumentar su número y poder así extraer posteriormente la mayor cantidad de DNA (ver material y métodos). Este DNA plasmidial fue sometido a una doble digestión con las enzimas *BsrGI* y *SacII*, con el fin de extraer el fragmento de 1080 pb que posee la mutación para cada caso: mTASK2-Y190F; mTASK2-Y219F; mTASK2-Y225F, y poder ligarlo en una reacción de ligación final al vector de expresión pCR3.1/TASK-2WT, restableciéndose de este modo la secuencia completa. El vector pGEMT posee sólo un sitio de corte para *SacII* en posición 49 río arriba del sitio de múltiple clonamiento, en cambio, el inserto tiene un sitio de restricción para *BsrGI* y otro para *SacII*, por lo tanto la doble digestión nos dará la presencia de tres bandas: 3075 pb, 1080 pb y 119 pb. En la figura 12, es posible observar en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1 Kb, los carriles 2, 3 y 4 nos indican la presencia de las bandas esperadas para la doble digestión de Y190F, Y219F y Y225F, respectivamente. Es importante destacar que como se está trabajando con colonias que habían dado positivas a la incorporación de los insertos (verificado anteriormente por análisis de restricción con *EcoRI*), las digestiones realizadas para extraer la banda importante de 1080 pb, deben mostrar un patrón de corte positivo. El paso siguiente consistió en extraer y purificar esta banda desde el gel (en el caso de cada mutante) para las ligaciones posteriores.

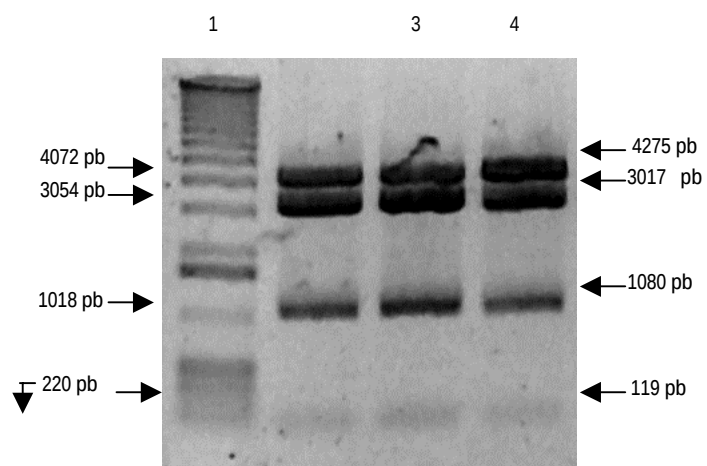


Figura 12. Análisis de restricción de la doble digestión del DNA plasmidial (pGEMT/PCR2) con *SacII* y *BsrGI*. Carril 1 marcador de peso molecular de 1 Kb, carriles 2, 3 y 4 patrón de digestión de pGEMT/PCR2 para las mutantes Y190F, Y219F y Y225F respectivamente, observándose las bandas esperadas de 3017, 1080 y 119 pb.

Antes de realizar la reacción de ligación final, 1µg del vector pCR3.1/TASK-2WT fue digerido con las enzimas *BsrGI* y *SacII*. Como este vector posee un sitio de restricción en posición 1317 para la enzima *BsrGI* y otro en posición 2397 para la enzima *SacII* después de la digestión se obtuvieron 2 fragmentos; uno de 1080pb y otro de 5620pb (figura 13, carril 1 estándar de peso molecular de 1 Kb, carriles 2, 3 y 4 digestión de pCR3.1/TASK2-WT). Posteriormente el fragmento de 5620 pb fue purificado desde el gel de agarosa y desfosforilado con fosfatasa alcalina para impedir su religación. La concentración de DNA usado para la reacción de ligación se estimó por medio de la intensidad de las bandas (gel teñido con bromuro de etidio), siendo finalmente la proporción molar inserto: vector (9:1).

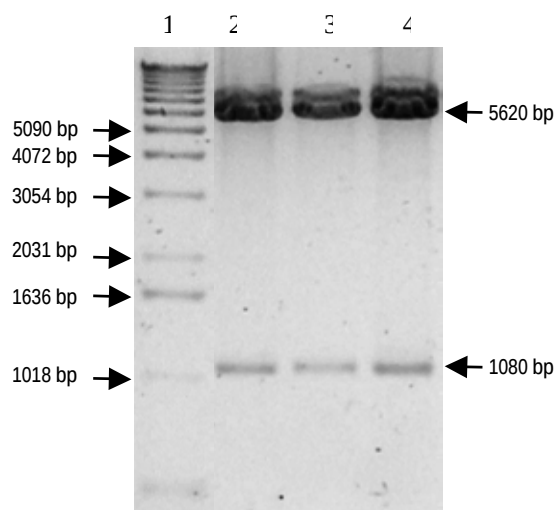


Figura 13. Doble digestión del plasmidio pCR3.1/TASK-2WT con *SacII* y *BsrGI*. Gel de agarosa al 1% de las digestiones realizadas por 2 horas a 37°C con las enzimas *SacII* y *BsrGI* al vector pCR3.1/TASK2-WT, visualizándose en el carril 1 el estándar de peso molecular de 1Kb, y en los carriles 2, 3 y 4 se observan las bandas de 5620 pb y 1080 pb esperadas, producto de la digestión del plasmidio pCR3.1/TASK2-WT con las enzimas anteriormente mencionadas.

Posteriormente esta reacción de ligación se utilizó para restablecer la secuencia de mTASK-2 con la mutación específica en cada caso en particular. Para verificar si las bacterias transformadas habían incorporado efectivamente la secuencia de mTASK-2 restablecida, se extrajo el DNA plasmidial y se realizó un análisis de restricción con la enzima *EcoRI*. El inserto pCR3.1/mTASK-2 tiene un tamaño de 6700 pb y posee 3 sitios de corte para esta enzima, entonces si tenemos el DNA correcto, el patrón de digestión nos mostrará la presencia de 3 bandas: 16 pb, 1486 pb y 5198 pb. Cabe destacar que los geles utilizados para la identificación de las bandas fueron hechos al 1%, por lo tanto después de la corrida electroforética la pequeña banda de 16 pb fue imposible de visualizar. La figura 14 corresponde a un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del análisis de restricción de Y190F con *EcoRI*. En el carril 1 se muestra el estándar de peso molecular de 1 Kb, en el carril 2 se observan 2 bandas, una de 3054 pb y otra de aproximadamente 1018 pb, las cuales podrían corresponder al vector religado (el cual migra más rápido que el vector linearizado, explicando así que no se encuentre esta banda en los 5620 pb) y la otra al fragmento de 1080pb, respectivamente. Por lo tanto este DNA se descarta por no presentar los fragmentos esperados. En el carril 3 se observan 2 bandas, las cuales concuerdan con las esperadas que son de 5198 y 1486 pb, es así que se concluye que esta colonia es positiva para el inserto, llevando la mutante mTASK2-Y190F. En la figura 15 carril 2 se tiene un gel con el patrón de digestión de DNA plasmidial aislado de una colonia bacteriana que posee el inserto para la mutante mTASK2-Y219F, ya que presenta las bandas de 5198 y 1486 pb, en cambio, en el carril 3 se observan 2 bandas, una que podría corresponder al vector de 5620 pb y otra de aproximadamente 2160 pb que sería la ligación de dos fragmentos de 1080 pb cada uno, de esta manera esta colonia queda descartada. Finalmente en la figura 16, se tiene en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1 Kb, en el carril 2 dos bandas una de 5620 pb aproximadamente

y otra cercana a los 5090, las cuales podrían estar representando al vector linearizado y religado, respectivamente, en ausencia de ligación con el inserto. En el carril 3 se ven las bandas esperadas de 5198 y 1486 pb, lo que indica a esta colonia positiva para mTASK2-Y225F.

Posteriormente se seleccionó para cada mutante la colonia bacteriana que dio positiva al análisis de restricción (figura 14 carril 3, figura 15 carril 2 y figura 16 carril 3). Finalmente el DNA extraído fue secuenciado para confirmar la presencia de la mutación específica deseada para cada caso en particular.

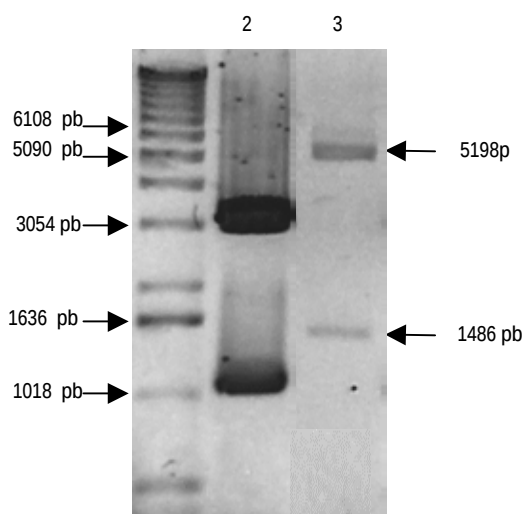


Figura 14. Verificación de la ligación del plasmidio pCR3.1/TASK2-Y190F.

Después de la reacción de ligación, se sometió al DNA plasmidial a digestión con la enzima *EcoRI* por 2 horas a 37°C. Carril 1, estándar de peso molecular de 1 Kb, carril 2 patrón de digestión de una colonia que dio negativa a la presencia del vector restablecido, carril 3 se observa el patrón de restricción de una colonia que dio positiva a la presencia del vector pCR3.1/TASK2-Y190F debido a la presencia de las bandas esperadas de 5198 pb y 1486 pb.

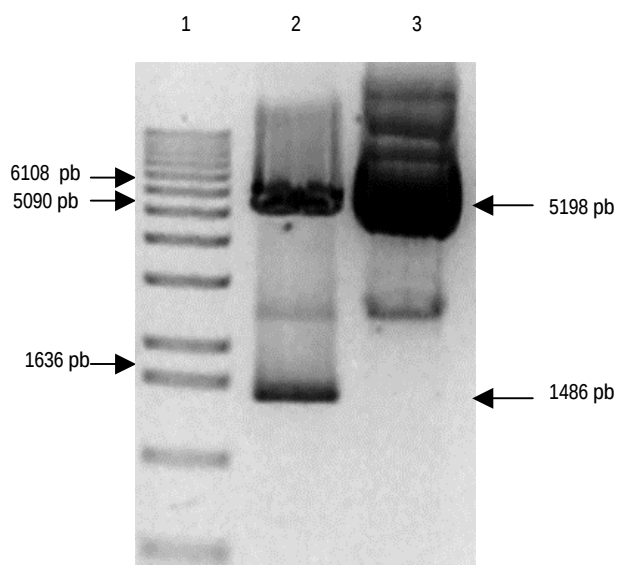


Figura 15. Rectificación de la presencia del vector pCR3.1/TASK2-Y219F.

Carril 1, estándar de peso molecular de 1 Kb, el carril 2 corresponde a la digestión del plasmidio pCR3.1/TASK2-Y219F con la enzima *EcoRI* debido a la aparición de las bandas esperadas de 1486 y 5194 pb respectivamente. En el carril 3, se observa una banda de aproximadamente 5198 pb, la cual podría corresponder al vector religado.

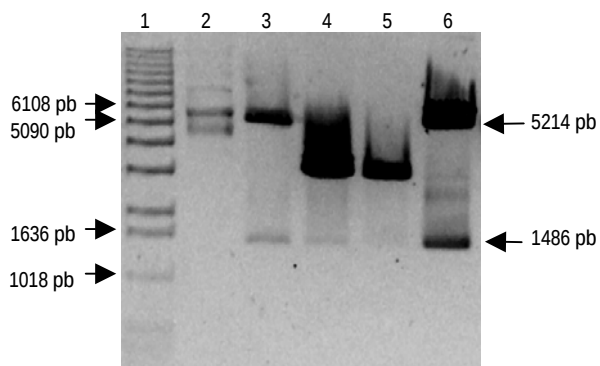


Figura 16. Ensayo de restricción del plasmidio pCR3.1/TASK2- Y225F.

Para asegurar la presencia del fragmento de interés en el DNA plasmidial extraído de las células transformadas, se realizó un análisis de restricción con la enzima *EcoRI* por 2 horas a 37°C. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb, en el carril 2 se muestra una banda de aproximadamente 5090 pb, lo cual podría corresponder al vector pCR3.1/TASK2-WT religado. En el carril 3, se observan las bandas de 5214 pb y 1486 pb, obtenidas después de la digestión del DNA plasmidial de la mutante Y225F con *EcoRI*, las cuales son concordantes con las que se obtienen de la digestión del control positivo, que se muestra en el carril 6, lo que nos lleva a corroborar la presencia del inserto. Los carriles 4 y 5 corresponden a la digestión de DNA plasmidial que no presenta el inserto, ya que sólo se observa la presencia de un fragmento de aproximadamente 3054 pb. Finalmente en el carril 6, se muestran las bandas de 5214 y 1486 pb obtenidas de la digestión de pCR3.1/TASK2-WT (control positivo) con *EcoRI*.

4.2 Las células HEK-293 frente a estrés osmótico regulan su volumen celular.

Para los estudios preliminares de regulación de volumen celular (RVD) se utilizaron células HEK transfectadas en forma aguda con 0,75 μg de mTASK2-WT-GFP (ver métodos 3.4) y células nativas (figura 17a y b), diferenciándose claramente las células transfectadas de las que no lo están (figura 17c), debido a la fluorescencia verde emitida por ellas al ser excitadas con láser de 488 nm y 30% de intensidad. Posteriormente se cargaron por 5 minutos a temperatura ambiente con 5 μM de calceína-AM, transcurrido ese tiempo las células fueron bañadas con una solución isotónica por 30 minutos antes de comenzar los experimentos.

La figura 17d muestra el curso temporal de células HEK-293, frente a cambios de medio hipotónico. Una vez que se logró una línea estable de aproximadamente 5 minutos (la cual, indica que las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia de la sonda son mínimas), se procedió a reemplazar el medio isotónico de 316 mosM por uno hipotónico de 216 mosM. De la figura 17d observamos que las células responden inmediatamente al cambio de tonicidad, esto se refleja por un aumento de tamaño (F_0/F_T proporcional al volumen) consistente con un comportamiento osmométrico y posterior regulación de volumen, efecto que se ve producto de la tendencia a la recuperación de la fluorescencia basal. El $t_{1/2}$ de la RVD para las células transfectadas y las nativas fue de 225 segundos (3,75 minutos). Este resultado no era el esperado, pues las células HEK nativas no regulan volumen en forma tan rápida comparadas con la que expresan TASK-2 (Niemeyer *et al*, 2001). Esto nos llevó a considerar la posible existencia de uniones intercelulares en este cultivo celular, lo que explicaría que la calceína difundiera a través de estas uniones desde una célula no transfectada a una que si expresa el canal, provocando que ambas mostraran un mismo comportamiento frente al cambio de tonicidad del medio.

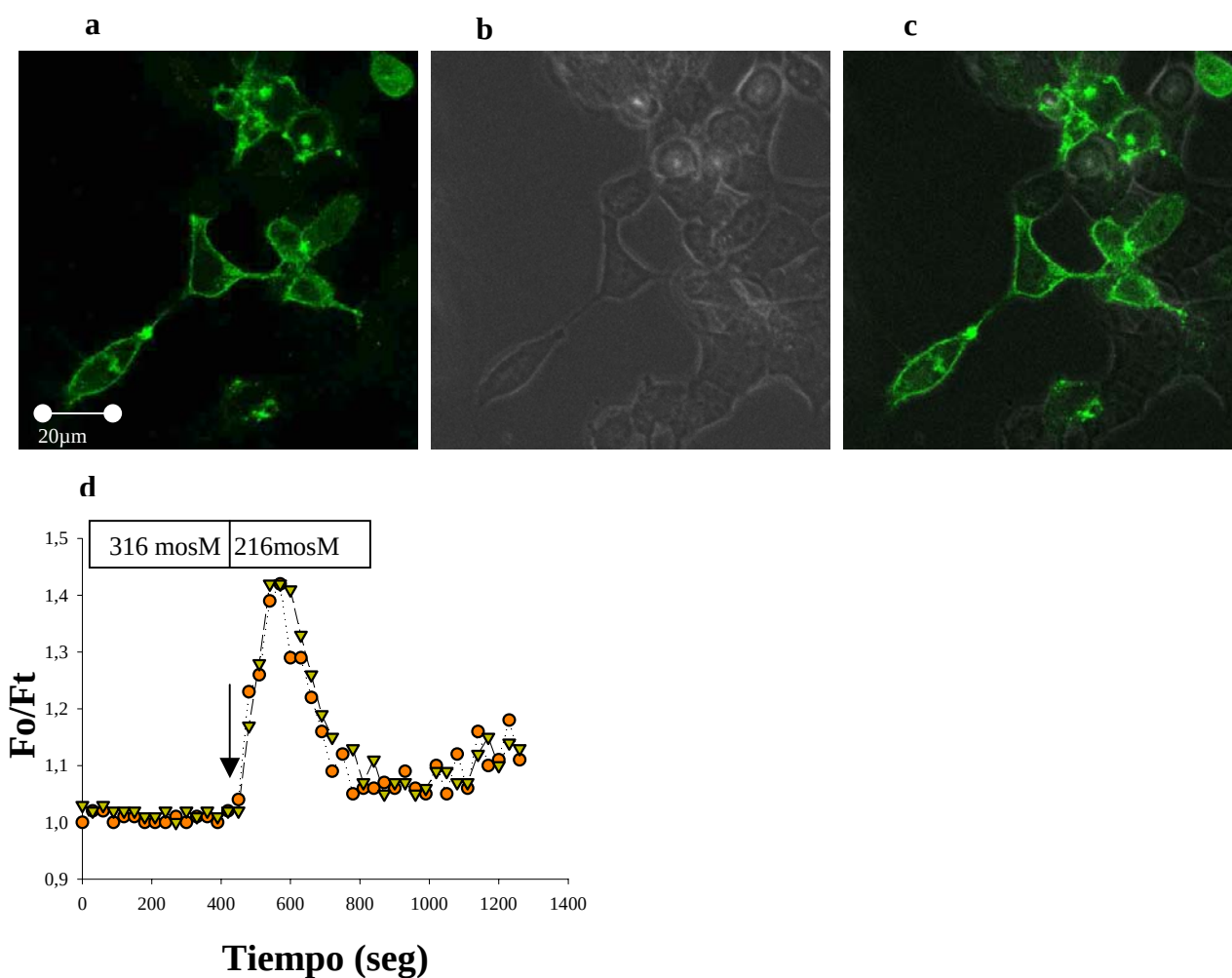


Figura 17. Las células HEK-293 frente a estrés osmótico regulan su volumen celular. **a**, imágenes de fluorescencia de células HEK transfectadas en forma transitoria con mTASK2-WT-GFP, identificándose directamente las que expresan el canal en la superficie celular. **b**, mismo campo celular que en **a**, explorado con contraste de fase. **c**, superposición de las imágenes **a** y **b** con el objeto de distinguir las células transfectadas de las que no lo están. **d**, curso temporal de la RVD de células HEK nativas (círculos) y transfectadas (triángulos), al ser sometidas a cambios de medio hipotónico (216 mosM pH 7,5). La flecha negra indica cambio de osmolaridad del medio. Medición representativa de tres experimentos independientes. La barra corresponde a 20 um.

4.2.1 Las células HEK en cultivo presentan uniones intercelulares.

Para evaluar la presencia de uniones intercelulares en cultivo de células HEK, se utilizó la técnica de FRAP. En la figura 18 se ilustra un campo de células nativas cargadas con 5 μ M de calceína-AM, en **b** la flecha blanca indica la zona del campo que ha sido quemada con láser de 488 nm y 100% de intensidad, con el objeto de monitorear si en un corto período de tiempo se recupera la fluorescencia del área analizada, **c** fotografía del mismo campo celular que en **a** tomada al término del curso temporal, en la cual se observa la recuperación de la fluorescencia de la zona quemada debido al paso de la calceína desde unas células que no sufrieron *bleaching* a otras que sí, esta respuesta se esquematiza en el gráfico 18**d**, en el cual los círculos negros señalan la respuesta de una célula que no ha sufrido daño, pudiéndose observar claramente que la fluorescencia se mantiene estable en el tiempo. En cambio, la señal de la zona que fue quemada previamente (círculos blancos) tiende a recuperarse en el tiempo hasta alcanzar la misma intensidad de fluorescencia que las células no sometidas a daño. Este resultado permite concluir la existencia de uniones intercelulares en las células HEK-293 en cultivo, debido al paso de la sonda desde una zona que presenta fluorescencia a otra que no, hasta llegar a una concentración que permita que ambas zonas estén en equilibrio, obteniéndose finalmente en ambas regiones la misma fluorescencia (figura 18 **c** y **d**). En base a estos resultados, se descarta el uso de este tipo celular para los estudios de disminución regulada de volumen, debido a que no se puede demostrar que la aceleración de la RVD de las células transfectadas es debido a la presencia del canal de potasio TASK-2, ya que las células nativas muestran el mismo comportamiento.

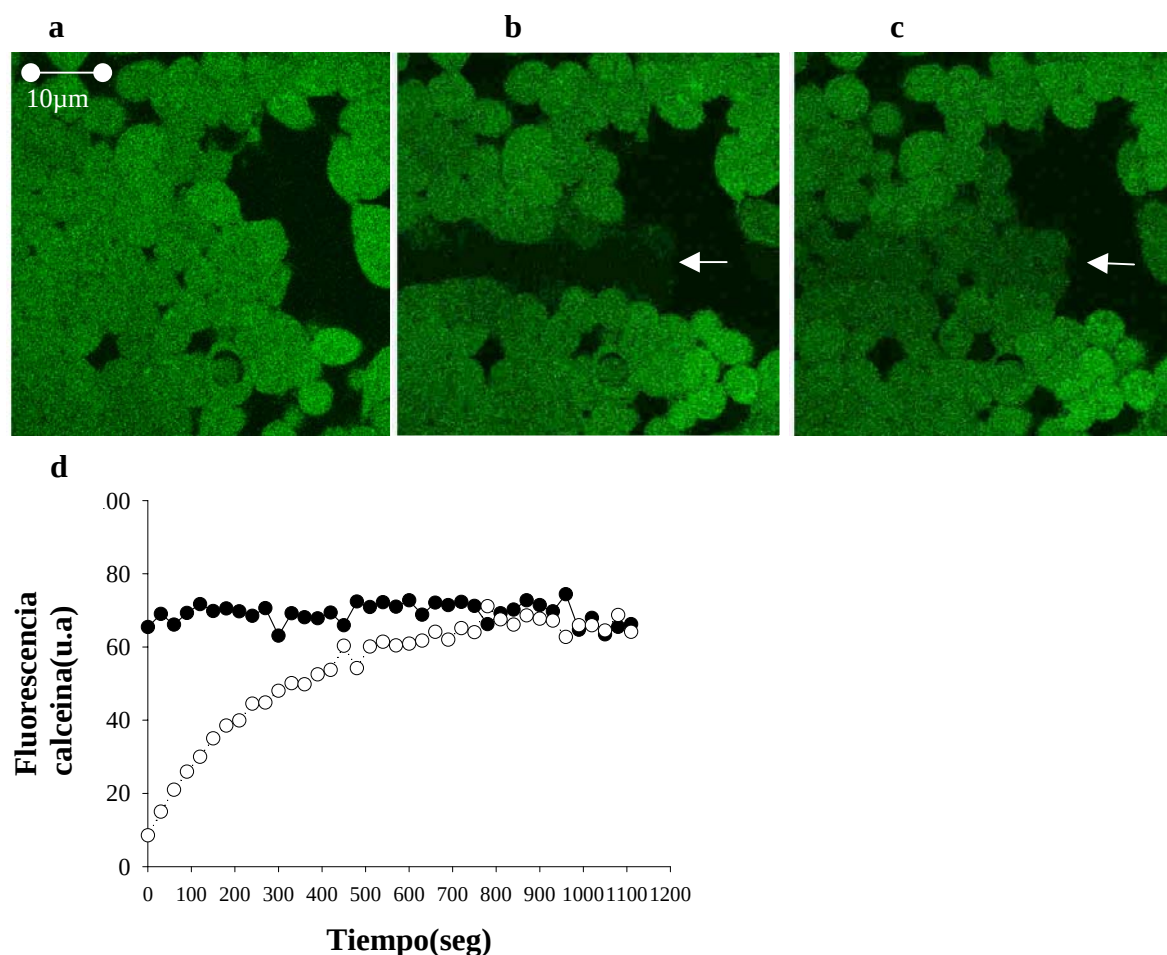


Figura 18. Las células HEK-293 en cultivo presentan uniones intercelulares.

a, imagen de fluorescencia de un cultivo de células HEK nativas cargadas con 5 μM de calceína-AM. **b**, fotografía del campo en **a**, en la cual se observa una zona oscura (flecha blanca indica la región de interés), producto del *photobleaching* realizado. **c**, mismo campo celular que en **a** explorado al término del curso temporal, en donde se puede observar la recuperación de la fluorescencia. **d**, curso temporal de células HEK cargadas con 5 μM de calceína-AM, excitadas cada 30 segundos con 2% de intensidad de láser (○) corresponde a una célula que ha sufrido un *photobleaching* en un área seleccionada y (●) muestra el comportamiento de una célula (condiciones normales), vecina a la que ha sufrido el *bleaching*.

4.2.2 Ausencia de uniones en hendidura en células HeLa en cultivo.

El paso siguiente fue buscar un cultivo celular que no presentase este tipo de uniones, siendo las células HeLa 2H18 las elegidas para la realización de los estudios de RVD. Al igual que con las células HEK-293, la ausencia de conexiones celulares se determinó mediante FRAP. En la figura 19a se muestra una imagen de fluorescencia de células HeLa cargadas con 5 μ M de calceína-AM, **b** mismo campo que en **a** en donde la flecha blanca indica el área quemada, **c** fotografía tomada al término del curso temporal en donde se observa que la fluorescencia basal de la zona afectada no fue recuperada, por lo tanto se dedujo la ausencia de la difusión de la sonda desde una célula a otra, permitiendo este resultado la continuación de los experimentos. La figura 19d corresponde al curso temporal del estudio de FRAP realizado, en donde los círculos negros señalan el comportamiento de una célula (de la zona que fue dañada), después del *photobleaching*, en cambio, los círculos blancos corresponden a la fluorescencia emitida por una célula que no sufrió daño. Como se deduce del gráfico, la fluorescencia basal de la zona dañada no se recupera debido a que obtenemos una línea recta que permanece estable en el tiempo, sin lograr llegar al término del curso a equilibrarse con la fluorescencia emitida por la célula vecina (sin daño). Se concluye que no hay difusión de la calceína entre las células y por ende, la ausencia de conexiones entre ellas.

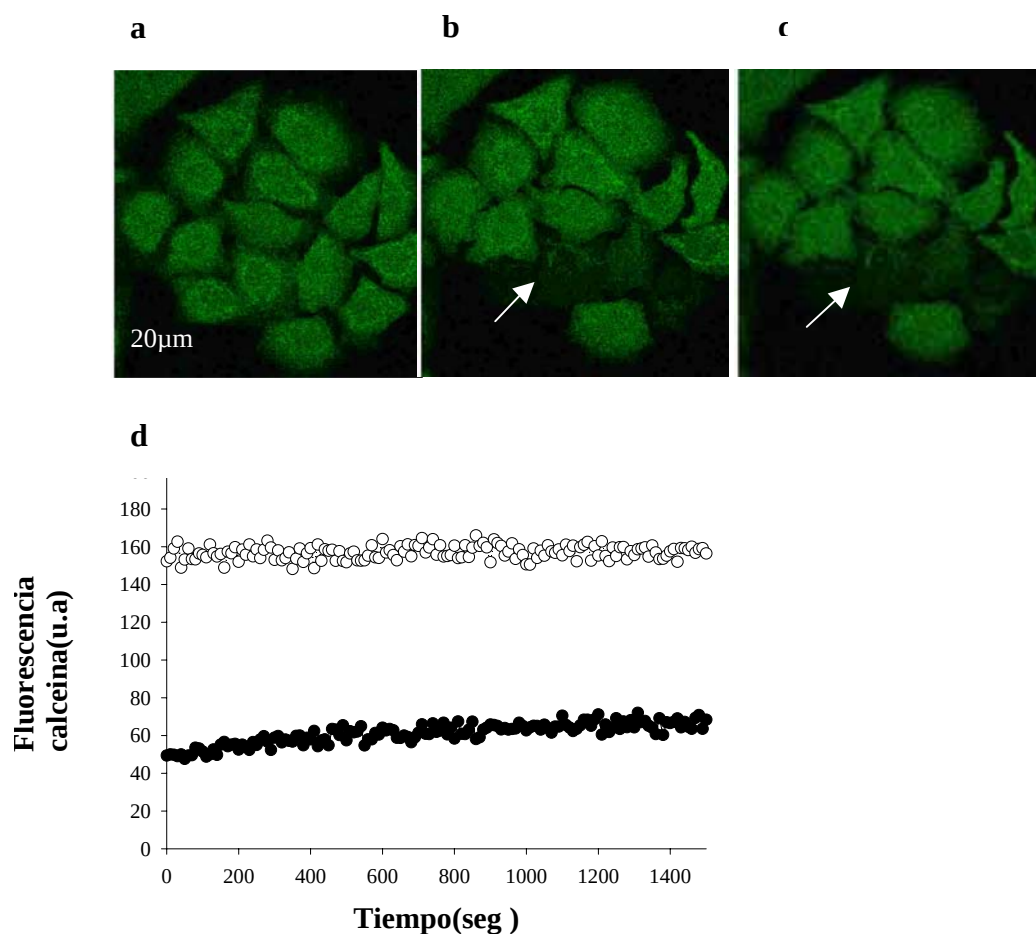


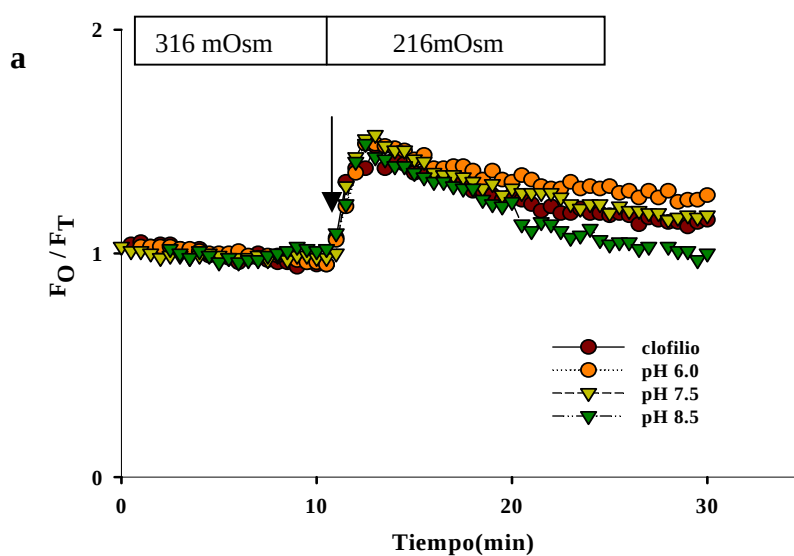
Figura 19. Ausencia de uniones en hendidura en células HeLa en cultivo.

a, fotografía de un campo de células HeLa cargadas con calceina-AM previo a la realización de FRAP. **b**, mismo campo celular que en **a** después de FRAP. La flecha blanca indica la zona expuesta a una intensidad de 100% láser por un corto periodo de tiempo. **c**, imagen obtenida al término del curso temporal, la cual indica la ausencia de la recuperación de la fluorescencia del área en estudio. **d**, curso temporal de células HeLa, excitadas cada 30 segundos con láser de 488 nm y una intensidad de 2%. Los círculos negros corresponden a la zona expuesta a *photobleaching*. Círculos blancos señalan la respuesta de la célula vecina al área dañada.

4.2.3 La RVD de células HeLa nativas frente a cambios de solución hipotónica a distintos pHs es independiente de la concentración externa de protones.

Se seleccionó a las células de la línea celular HeLa para llevar a cabo los estudios de RVD. El primer punto a determinar fue si esta regulación de volumen era dependiente de pH y sensible a clofilio, un inhibidor de los canales de potasio de 2 poros y 4 segmentos transmembrana. Para tal efecto se utilizaron células HeLa 2H18 a una confluencia de un 60% y 2 días de crecidas, las cuales se cargaron con 5 μM de calceína-AM y posterior al lavado se mantuvieron en una solución isotónica suplementada con 25 mM de potasio y 5,5 mM glucosa 30 minutos antes de comenzar el experimento. La figura 20a muestra un curso temporal representativo del promedio de 6 experimentos para cada caso, del comportamiento de células HeLa cuando son sometidas a cambios de medio hipotónico a distintos pHs y en presencia de 100 μM de clofilio a pH 7,5, pudiendo observar que las células responden rápidamente al cambio de tonicidad del medio aumentando su volumen (flecha negra indica el momento en el cual se lleva a cabo el estímulo) siendo la amplitud de la respuesta similar para los distintos pHs. El aumento de tamaño celular fue seguido por una disminución de volumen, debido al eflujo de los iones K^+ y Cl^- , además de moléculas de agua. Los datos de $t_{1/2}$ obtenidos por interpolación en la curva se ilustran en la tabla I (figura 20b). Se puede ver que al comparar el valor de $t_{1/2}$ de la RVD a pH 7,5 con los otros pHs, se evidencia que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). De esto se concluye que la RVD de células HeLa nativas no es dependiente de pH ni sensible a clofilio, por lo tanto esta regulación de volumen podría atribuirse a canales distintos a TASK-2. Estos podrían ser los canales K^+ de baja conductancia dependientes de Ca^{2+} intracelular (Díaz *et al*, 1995), además de la contribución de los canales de cloruro, como por ejemplo el

canal ClC3 sensible a volumen y que se encuentra presente en este tipo celular (Hermoso *et al*, 2002).



b

pH	$t_{1/2}$ (minutos)
pH 7,5	$11,08 \pm 0,11$
pH 6,0	$11,07 \pm 0,18$
pH 8,5	$11,15 \pm 0,42$
Clofilio 100 μ M pH 7,5	$11,1 \pm 0,18$

Figura 20. La RVD de células HeLa nativas frente a cambios de solución hipotónica a distintos pHs es independiente de la concentración externa de protones.

En **a**, se tiene el curso temporal representativo de fluorescencia relativa (F_0/F_T) proporcional al tamaño celular de células HeLa cargadas con 5 μ M de calceína-AM y sometidas a cambios de medio hipotónico 216 mosM (flecha negra) a distintos pHs. En **b**, se ilustra una tabla (I), de la cual se deduce que al comparar los resultados de $t_{1/2}$ de la RVD realizada por las células HeLa nativas a los diferentes pHs versus el control que es pH 7,5, se evidencia que no existe una diferencia estadísticamente significativa. ($p > 0,05$). Los datos corresponden al promedio de 6 experimentos independientes.

4.2.4 A las 12 horas de postransfección TASK2-WT-GFP se expresa homogéneamente en la membrana plasmática de células HeLa.

Antes de poder determinar la posible participación del canal de potasio TASK-2 en la aceleración de la RVD en células HeLa 2H18, se procedió a estandarizar el número de horas de postransfección a las cuales se debía someter a las células para: 1) observar la expresión de la proteína en la membrana plasmática, 2) disminuir el nivel de muerte que se produce debido a la transfección aguda con un canal de potasio tipo TASK y 3) mantenerlas en las condiciones óptimas para que ellas pudieran responder positivamente al estímulo ejercido. Para ello, células se transfectaron con 0,75 µg mTASK2-WT-GFP y una vez que se detuvo la reacción de transfección, el medio sin suero que cubría a estas células fue reemplazado por uno que contenía 10% de suero fetal bovino (SFB) y suplementado con 25 mM de potasio hasta el momento de la realización de los estudios. En la figura 21 se ilustran 4 imágenes de microscopía confocal de células HeLa 2H18 transfectadas con mTASK2-WT-GFP tomadas con láser de 488 nm y 30% de intensidad, a distintas horas de postransfección. Como se aprecia en las fotografías, a las 4 horas se tienen cúmulos con una alta intensidad de fluorescencia dada por la GFP cercana al núcleo, lo que se interpretó como presencia de un alto porcentaje de la proteína en retículo endoplásmico que todavía estaba siendo sintetizada. A las 8 horas la distribución de la señal fue heterogénea, viéndose ya sea distribuida tanto en citoplasma, como en la membrana plasmática. En cambio, al observar las células a las 12 horas de postransfección se apreció que un gran número de éstas presentaba fluorescencia a nivel de la superficie celular, lo cual nos señaló que ese era el tiempo indicado para la realización de los experimentos. Al estudiar las células a las 16 horas, obtuvimos un patrón distinto, un gran número presentó una señal intensa distribuida en forma heterogénea en citoplasma y núcleo, además muchas células no respondieron regulando su

volumen cuando se sometieron a cambios de medio hipotónico, por ende se concluyó que transcurridas 12 horas de postransfección, se debían llevar a cabo los experimentos para tener a las células en las condiciones óptimas, además de observar la expresión del canal en la superficie celular.

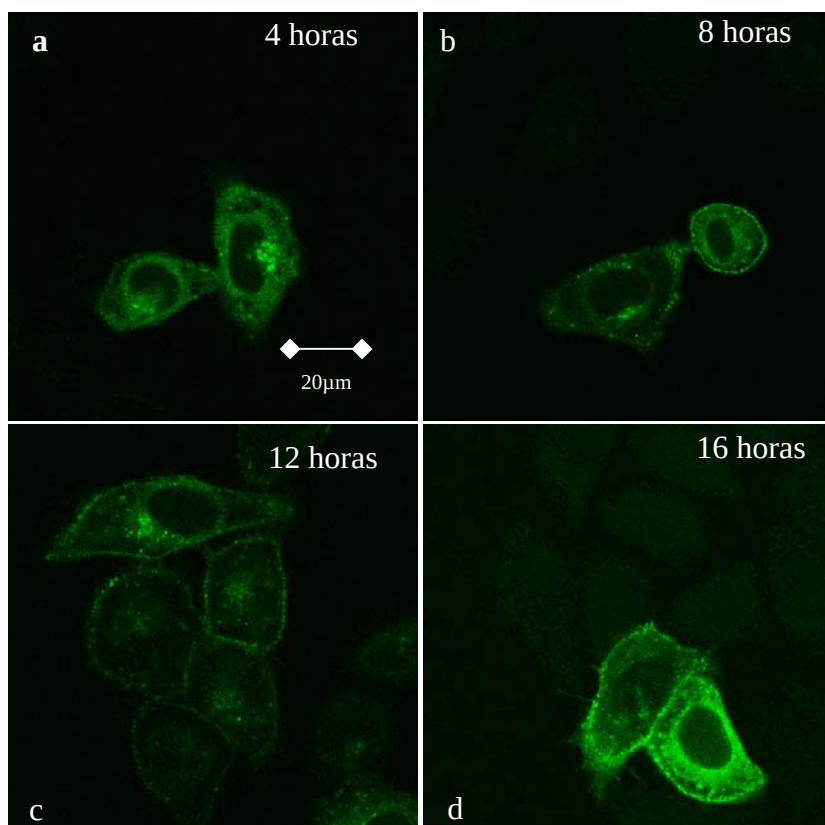


Figura 21. A las 12 horas de postranfección TASK2-WT-GFP se expresa homogéneamente en la membrana plasmática de células HeLa.

Imágenes de fluorescencia de células HeLa transfectadas con mTASK2-WT-GFP y visualizadas a distintas horas como se detalla en cada una de las fotografías. La barra blanca corresponde a 20 μm .

4.2.5 Medición del volumen relativo de células HeLa transfectadas con TASK2-WT-GFP.

TASK-2 es un canal de potasio que se expresa fuertemente en células de Ehrlich (Niemeyer *et al*, 2001). Reportes previos señalan que la activación de una corriente de potasio osmosensible conduce en células de Ehrlich a una disminución regulada de volumen (Niemeyer *et al*, 2000) y que esta respuesta sería dependiente del pH extracelular, siendo fuertemente inhibida a pH 6,4 y estimulada a pH 8,4 (Hougaard *et al*, 2001). Para demostrar la participación de este canal en la aceleración de la RVD, se utilizó el método de la calceína, que se basa en los cambios de fluorescencia mostrados por la sonda cuando las células se someten a condiciones anisotónicas; los que son directamente proporcionales a sus cambios de volumen experimentados. Para este efecto, se transfectaron células HeLa 2H18 con mTASK2-WT-GFP (figura 22a) y una vez que se hubo identificado específicamente las que expresaron el canal, las células se cargaron con 5 μ M de calceína-AM en medio isotónico (316 mosM) (figura 22b). Después de 30 minutos se removió el medio que bañaba a las células, siendo reemplazado por una solución hipotónica (216 mosM). Producto de este cambio de tonicidad las células aumentaron su volumen, lo cual se reflejó por una disminución de la intensidad de fluorescencia de la sonda (figura 22c). De acuerdo a lo descrito por Alvarez-Leefmans, *et al*, (1995) la recuperación de la fluorescencia basal se interpreta como la recuperación de volumen celular.

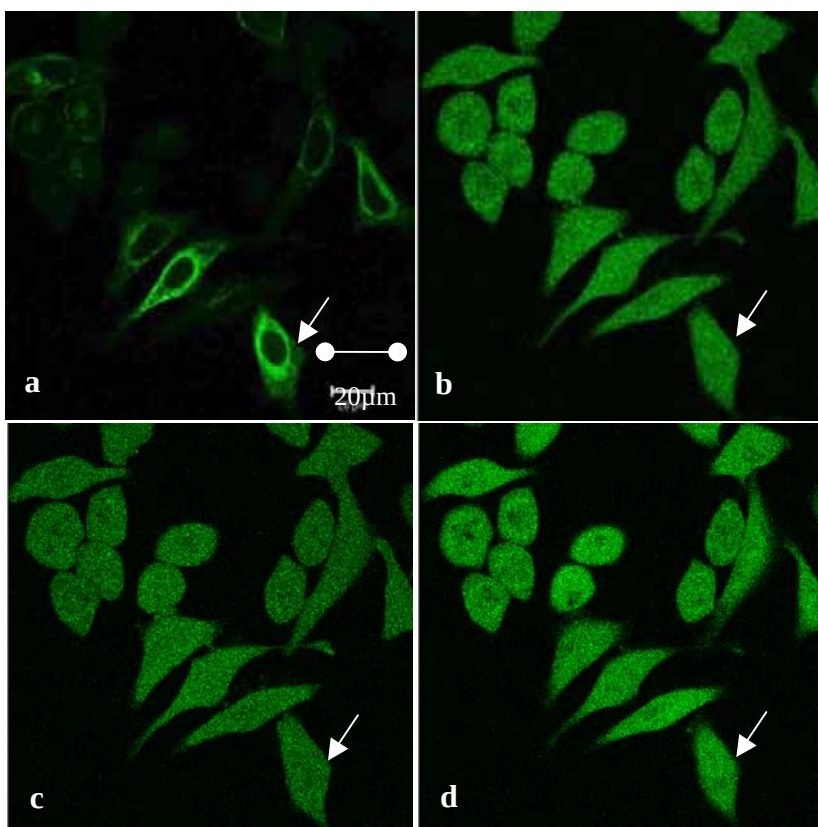


Figura 22. Medición del volumen relativo de células HeLa transfectadas con TASK2-WT-GFP **a**, imágenes de fluorescencia con intensidad de láser de 30% de células transfectadas en forma transitoria con TASK2-WT-GFP. **b**, mismo campo celular que en **a** explorado con láser de intensidad de 2% luego de cargar las células por 5 minutos con calceína-AM en medio isotónico (316 mosM). **c**, disminución de la intensidad de fluorescencia de calceína, tras exposición a medio hipotónico (216 mosM). **d**, RVD de HeLa TASK2-WT-GFP, efecto que se observa debido a una recuperación de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo. La barra blanca corresponde a 20 μm .

4.2.6. La acidosis extracelular inhibe la RVD dependiente de TASK-2.

En la figura 23a se muestra un curso temporal representativo de la RVD realizada por células HeLa 2H18 transfectadas con mTASK2-WT-GFP. Es importante señalar que al estudiar los cambios de volumen de acuerdo a la fluorescencia emitida por la calceína en las células transfectadas, no existe interferencia debido a la fluorescencia que emite la proteína fluorescente verde, ya que los *ROIs* se posicionaron en el centro de la célula y TASK2-WT-GFP se distribuye en la superficie celular a las 12 horas de postransfección. Los valores de $t_{1/2}$ para la RVD de las células transfectadas sometidas a pH 7,5 y pH 8,5, calculadas por interpolación en la curva fueron $3,9 \pm 0,2$ minutos y $3,7 \pm 0,1$ minutos, respectivamente, no existiendo entre ambos valores una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Con respecto a la respuesta emitida por las células a pH 6,0 y pH 7,5 en presencia de 100 μ M de clofilio (inhibidor de los canales de potasio 2P4TM), se observa que no existe regulación del volumen celular debido a que la fluorescencia basal no se recupera. Esto es concordante con los reportes que demuestran la inhibición de la corriente del canal de potasio TASK-2 por pH ácido (Reyes *et al*, 1998).

Para poder realizar una comparación entre el tiempo en el cual las células transfectadas y nativas recuperan el 50% de su tamaño original, se calculó un promedio del cambio de volumen en porcentaje para cada caso en particular (diferentes pHs) a los 3, 5, 7 y 10 minutos, después de haber sido expuestas a cambios de medio hipotónico. Para el caso de las células nativas se tomó como 100% el valor correspondiente al aumento de volumen máximo alcanzado por las células control (pH 7,5) después de haber sido sometidas al estrés hipoosmótico. Para las células transfectadas, en cambio, se tomó como un 100% el valor de aumento de volumen máximo alcanzado por las células que fueron sometidas a pH 7,5 y 100 μ M de clofilio, que no regulan

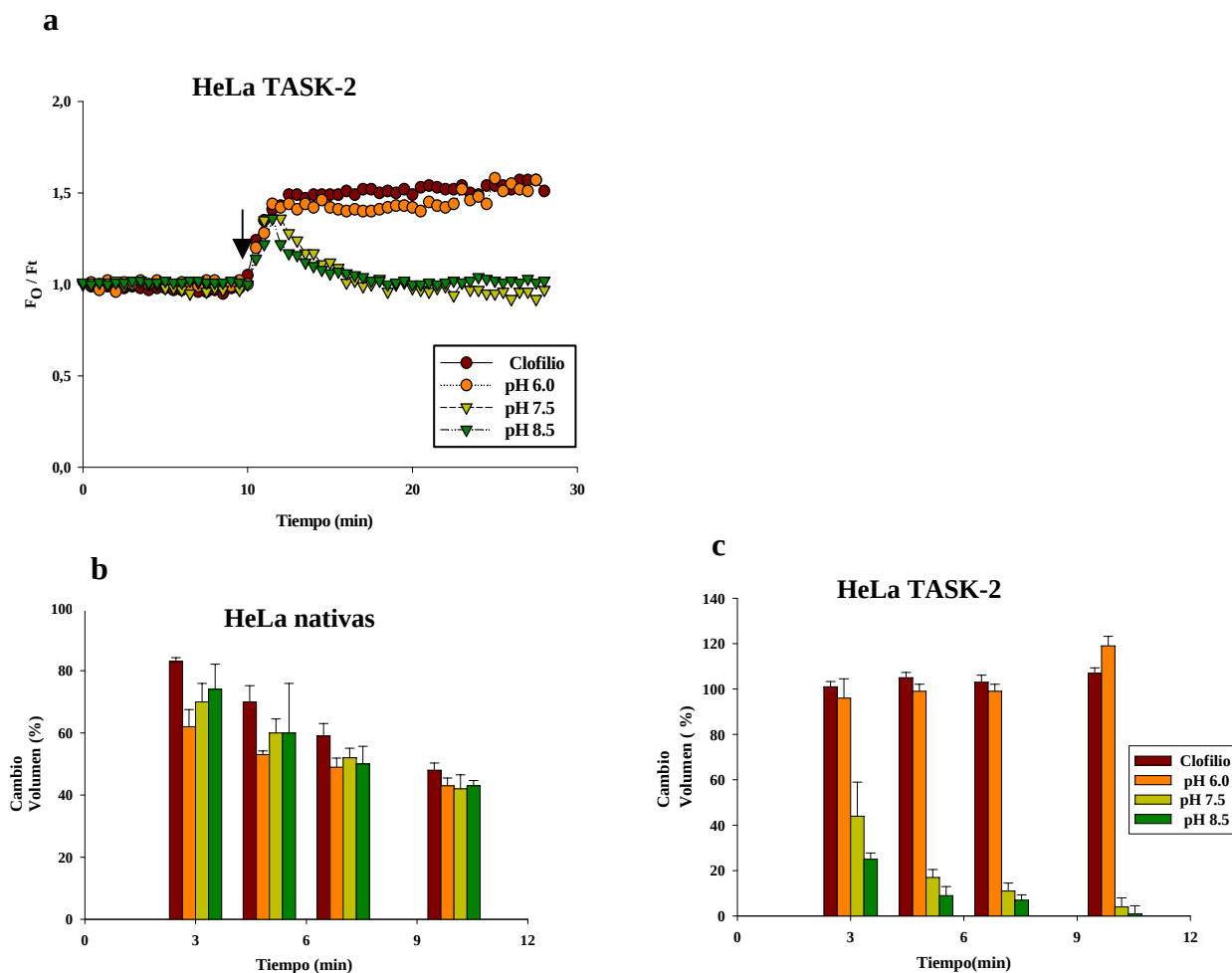


Figura 23. La acidosis extracelular inhibe la RVD dependiente de TASK-2.

a, curso temporal representativo de fluorescencia relativa (F_0/F_t) proporcional al tamaño celular, de células HeLa TASK2-WT-GFP cargadas con 5 μM de calceína-AM y sometidas a cambios de medio hipotónico 216 mosM (flecha negra) a distintos pHs o en presencia de 100 μM clofilio pH 7,5 **b y c** representan el promedio de 6 experimentos similares, a los de la figuras 20 y 23a respectivamente, donde se muestran los volúmenes relativos a los 3, 5, 7 y 10 minutos, después de haber sido expuestas a cambios de medio hipotónico. F_0 = fluorescencia inicial y F_t = fluorescencia a tiempo t.

volumen debido a la presencia del inhibidor del canal. La figura 23**b** señala el porcentaje de volumen original recuperado a los diferentes tiempos para el caso de las células nativas. Además se puede ver que la respuesta al cambio de tonicidad no es afectada por el pH extracelular ni sensible a 100 μ M clofilio, debido a que para todos los casos se tiene el 50% de recuperación del volumen original aproximadamente a los 7 minutos, no existiendo entre estos valores una diferencia significativa ($p > 0,05$). La figura 23**c** corresponde a lo mismo que 23**b** pero para el caso de las células transfectadas, pudiéndose observar que la respuesta de ellas es dependiente de pH y sensible a 100 μ M clofilio pH 7,5. Para el caso de pH 7,5 y 8,5 tenemos a los 3 minutos una recuperación del 56% y 75% respectivamente, del volumen original, en cambio, a pH 6,0 y 100 μ M clofilio pH 7,5 las células no tienden a recuperar su tamaño original. En la tabla II se resumen los valores en porcentaje del volumen recuperado respecto al original, para las células nativas y transfectadas a los 3 y 7 minutos, respectivamente. De esto se concluye claramente que el canal de potasio TASK-2 acelera el proceso de RVD en células HeLa 2H18 y que tal efecto se ve aumentado a pH básico e inhibido a pH ácido ó en presencia de clofilio pH 7,5. El hecho que las células transfectadas no hayan regulado su volumen a pH 6,0 y en presencia de clofilio pH 7,5 y que las nativas sí, pudiera deberse a que la presencia de la sobreexpresión de TASK-2 bloquee a los demás canales de potasio presentes en estas células, de otro modo las células transfectadas hubiesen regulado su volumen de la misma manera que las células nativas en estas condiciones de pH y en presencia del inhibidor.

Tabla II. Cambios de volumen de células HeLa nativas y transfectadas en forma aguda con mTASK2-WT.

Tratamiento	Cambio volumen % 3 minutos		Cambio volumen % 7 minutos	
	nativas	transfectadas	Nativas	transfectadas
pH 6,0	71,33 ± 1,63	42,2 ± 1,60	51 ± 2,53	12 ± 1,26
pH 7,5	70,33 ± 4,46	97,5 ± 1,76	50,3 ± 1,86	100,83 ± 4,45
pH 8,5	72 ± 1,79	25,67 ± 1,51	50,83 ± 1,83	7,83 ± 0,98
Clofilio 100µM pH 7,5	72,5 ± 5,36	101,7 ± 1,97	54,33 ± 3,08	102,67 ± 3,27

Los datos representan el promedio de 6 experimentos independientes para cada pH, siendo todas las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.3 No es posible medir AVD inducida por H₂O₂ o 2μM de estaurosporina, a través de los cambios de fluorescencia de la calceína.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue evaluar si el canal de potasio TASK-2 participa en el fenómeno de AVD, que viene siendo uno de los primeros eventos que ocurre en este tipo de muerte celular apoptótico (Okada *et al*, 2001). Reportes previos señalaban que los canales de K⁺ responsables de la RVD también participarían en AVD, debido a que ambos eventos presentan características similares en respuesta a *shock* hipoosmótico (Maeno *et al*, 2000). Además recientemente se sugirió que la RVD y AVD en embriones de ratón unicelulares serían mediadas por los canales de potasio de 2 poros y 4 segmentos transmembrana (2P/4TM), ya que la salida de K⁺ inducida por la AVD fue bloqueada por derivados de quinina. Este efecto mostró además ser insensible a calcio o voltaje, características que pertenecen a los canales de potasio tipo 2P/4TM (Trimarchi *et al*, 2002). En base a esto nos propusimos poner a prueba la hipótesis que señala a TASK-2 como mediador de la AVD. Como primera meta debíamos desarrollar y estandarizar un método para medir AVD en células nativas. Una vez logrado este punto se transfectarían células HeLa con el canal TASK-2 y se estudiaría la AVD de éstas en presencia de 2 μM de estaurosporina. En el caso de que TASK-2 tuviera alguna participación en este evento, las células transfectadas con el canal deberían mostrar una AVD acelerada, efecto que debería potenciarse a pH 8,5 e inhibirse a pH 6,0 y en presencia de clofilio pH 7,5 comparada con las células nativas. El estandarizar el método para el estudio de AVD nos llevó mucho tiempo, por lo tanto los experimentos destinados a estudiar la participación de TASK-2 en este tipo de muerte celular es trabajo de experimentos futuros.

Al principio optamos por medir AVD de la misma forma en la que se cuantificó la RVD, es decir, utilizando los cambios en intensidad de fluorescencia sufridos por la calceína, ya sea

cuando la célula aumenta o disminuye de volumen. En estos estudios se utilizó un sistema de perfusión para mantener la temperatura a 37⁰C, dado que como este evento es de proceso lento, al aumentar la temperatura logramos acelerar un poco la respuesta de las células en presencia de un agente inductor de apoptosis. Con este fin se utilizaron células HeLa 2H18 a una confluencia de un 60% y 2-3 días de crecidas, las cuales fueron cargadas con 5 μ M de calceína-AM. Después del lavado, las células se mantuvieron en una solución de KRH-glc pH 7,4 a 37⁰C aproximadamente 20 minutos antes de comenzar los experimentos. En la figura 24a se muestra un curso temporal representativo, de la respuesta de células HeLa cuando son sometidas a 200 μ M de H₂O₂. Del gráfico podemos observar que inmediatamente después de haber adicionado peróxido de hidrógeno, la señal de fluorescencia de la sonda comenzó a disminuir. Esto fue totalmente contrario al encogimiento esperado, ya que mediante este método se esperaba ver reflejado un aumento de la intensidad de fluorescencia de la sonda. Para descartar la posibilidad que se estuviera estimulando la entrada de Na⁺, con un consecuente aumento del volumen de la célula y por lo tanto disminución de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo, repetimos el experimento pero con el Na⁺ reemplazado por N-metil-D-Glucamina (NMDG), un catión no permeante. En la figura 24b tenemos un curso temporal representativo de 3 experimentos en donde se ilustra la respuesta de 2 células frente a peróxido, pudiéndose ver que se obtiene el mismo patrón que vimos en 24a. De esto podemos concluir que la baja en la fluorescencia no es debida al edema celular y que para los estudios de AVD inducidos por peróxido no se puede utilizar a la calceína, debido a que aparentemente H₂O₂ interacciona con ella produciendo su apagamiento, compartimentalización o extrusión en el tiempo.

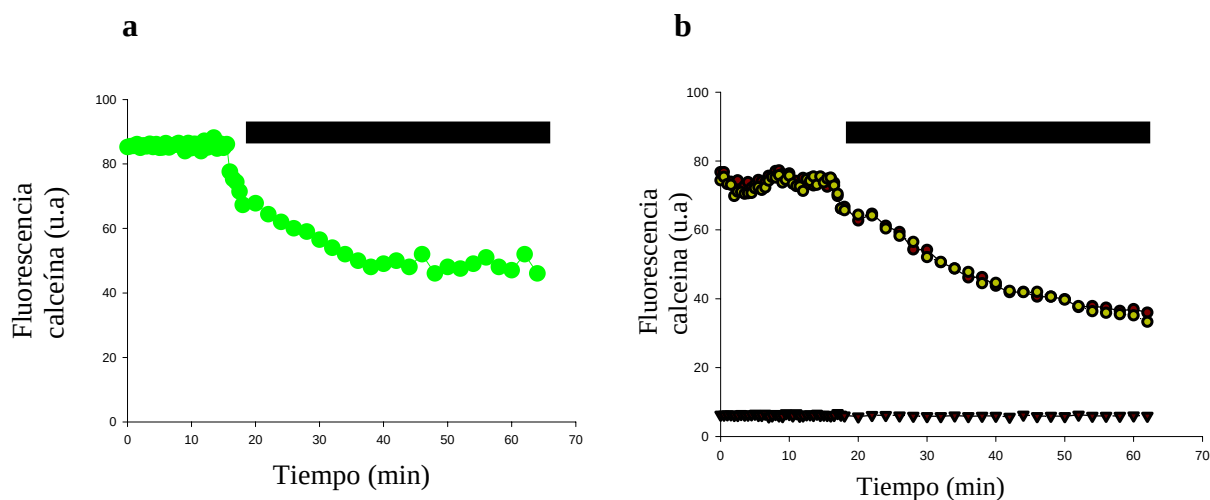


Figura 24. No es posible medir la AVD inducida por H_2O_2 a través de los cambios de intensidad de fluorescencia de la calceína. **a**, curso temporal representativo de fluorescencia de células HeLa cargadas con 5 μ M de calceína-AM en KRH-normal excitadas con láser de 488 nm y 5% de intensidad cada 2 minutos y sometidas a 200 μ M de peróxido de hidrógeno pH 7,4. En **b**, se ilustra el curso temporal del mismo experimento realizado en **a**, pero con la diferencia que el sodio fue sustituido por NMDG, los círculos verdes y burdeos corresponden al comportamiento de 2 células y los triángulos a la señal de fondo (*background*), respectivamente. Medición representativa de tres experimentos independientes. La barra negra indica la exposición a 200 μ M peróxido.

El siguiente paso entonces fue ver si podíamos evaluar AVD con el método de la calceína pero induciendo la muerte con estaurosporina. En la figura 25 se tiene un curso temporal representativo de 2 experimentos realizados en células HeLa cargadas con calceína-AM, en donde se utilizaron 2 μM de estaurosporina (inductor de la vía intrínseca); podemos observar que la sonda también disminuye su intensidad. Estos resultados llevaron finalmente a descartar este método para evaluar disminución apoptótica de volumen. Además, una vez terminado los experimentos y al ver las células al microscopio pudimos observar que éstas se veían con un tamaño mucho más pequeño que el previo a la realización de los estudios, tanto para aquellos experimentos hechos en Krebs-Ringer-Hepes (KRH-normal), Krebs-Ringer-Hepes –tipo N-metil-D-glucamina (KRH-tipo-NMDG), en donde se utilizó peróxido, como para aquellos efectuados en presencia de estaurosporina 2 μM . Todo lo anterior refuerza la noción que señala que a pesar que las células disminuyen de volumen, este parámetro no se puede evaluar por el método de la calceína, debido al apagamiento artefactual sufrido por la sonda.

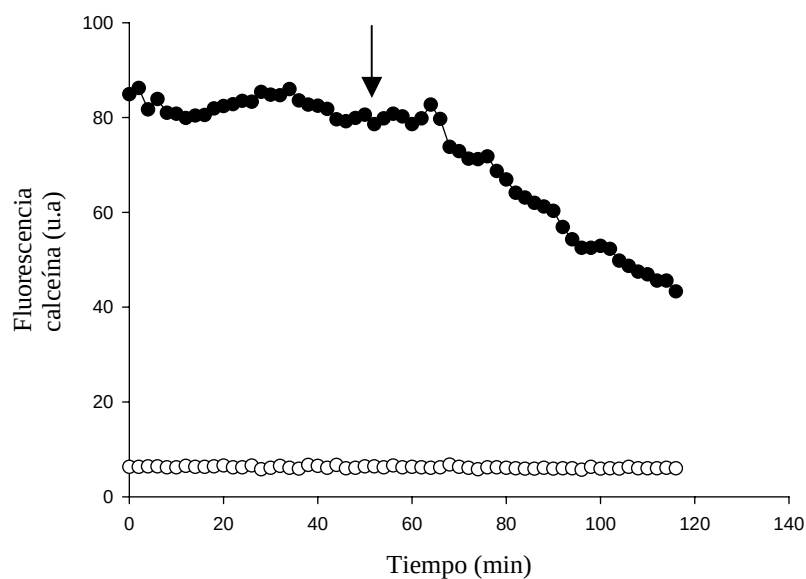


Figura 25. La medición de AVD inducida con 2 μ M estaurosporina no se puede cuantificar por el método de la calceína.

Curso temporal representativo de 2 experimentos independientes de células HeLa cargadas con 5 μ M de calceína-AM excitadas cada 2 minutos con láser de 488 nm y 5% de intensidad, en presencia de 2 μ M de estaurosporina. Los círculos negros muestran el comportamiento de las células y los círculos blancos corresponden a la señal de fondo (*background*). La flecha negra indica el momento en el cual se agregó la estaurosporina.

4.3.1 Es posible medir volumen celular mediante la reconstrucción de imágenes.

El paso siguiente fue verificar si los programas para la deconvolución y reconstrucción de imágenes podían ser utilizados para nuestros fines. Por lo tanto hicimos un experimento preliminar en donde se cargaron células HeLa 2H18 con 5 μ M de calceína, las cuales fueron expuestas a cambios de medio hipotónico a 37°C. Cada 30 segundos las células fueron excitadas con láser de 5% intensidad en el plano x-y. Las imágenes fueron captadas utilizando un corte óptico de 2 μ m (experimento realizado de la misma forma que los estudios de RVD, sólo que a 37°C). Una vez terminado el estudio las imágenes fueron “deconvolucionadas,” (requisito previo para la posterior realización de la reconstrucción de las imágenes) con el fin de recuperar la información dentro de la imagen que se ha perdido durante el proceso de adquisición de las fotografías. Para la reconstrucción de objetos una vez terminado el proceso de deconvolución, cada imagen es sometida a una etapa llamada de segmentación, la cual consiste en que las imágenes se hacen pasar por una serie de filtros para lograr una aproximación más real al objeto inicial. En la figura 26 tenemos dos imágenes de células HeLa cargadas con 5 μ M calceína. En **a** se ilustra una fotografía de las células previo al proceso de segmentación (lado izquierdo) y una vez terminado este paso (lado derecho). En **b** se tiene un curso temporal de los cambios de volumen experimentados por las células al ser sometidas a cambios de medio hipotónico (216 mOsm), indicados por las flechas negras. Una vez que las células realizaron RVD se les volvió a colocar en medio isotónico (316 mOsm), lo cual se indica con las flechas rojas. Los datos se ilustran como valores normalizados para el tamaño de las células y la intensidad de fluorescencia de la sonda en el tiempo, obtenidos después de la realización de la reconstrucción. Los resultados arrojados por este experimento reflejan que a través de este programa de reconstrucción de estructuras, se puede llegar a cuantificar los cambios de volumen reales experimentados por las

células cuando son sometidas a condiciones anisotónicas. Por lo tanto concluimos que este será nuestro sistema para la evaluación de AVD.

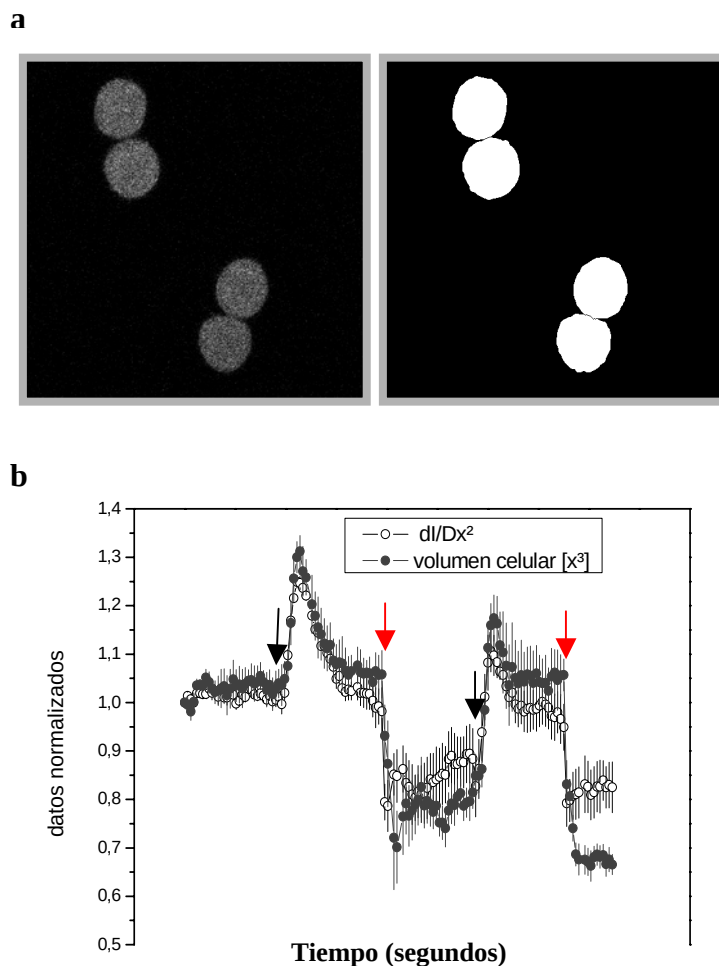


Figura 26. Es posible medir volumen celular mediante la reconstrucción de imágenes. a, ilustra 2 imágenes de células HeLa cargadas con calceína-AM y excitadas con láser de 5% de intensidad previo a la segmentación (lado izquierdo) y posterior a este proceso (lado derecho). En **b,** se ilustra el curso temporal de los cambios de volumen experimentados por estas células, al ser sometidas a cambios de soluciones hipotónicas (flechas negras) y cambios de medios isotónicos (flechas rojas). Los datos se muestran como valores normalizados y fueron analizados después de la reconstrucción de las imágenes. dl/Dx^2 = intensidad de fluorescencia por área.

4.3.2 Con cortes de 1 μm en el plano Z (Z-slices) se logran representaciones más fieles del volumen de una célula.

Una de las primeras interrogantes a responder, fue el número de cortes en el plano Z que debíamos hacer para poder lograr representaciones más fieles del volumen y estructura originales de las células. Para responder nuestra pregunta sometimos a una célula muerta (cuya morfología es invariable) a múltiples cortes en el plano Z (Z-stacks ó *slices*) con diferentes distancias entre cada corte. Las imágenes fueron deconvolucionadas y reconstruidas para posterior análisis de los datos. En la figura 27 se tiene en la parte superior la reconstrucción del volumen de una célula cuando fue sometida a cortes de 0,3 μm de espesor; 0,8, 1,0, 1,3 y 1,6 μm para las filas 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente. En el gráfico inferior de la figura 27 se representan los volúmenes obtenidos a las distintas distancias de corte en Z. De los resultados obtenidos podemos deducir que el grosor de la distancia de los cortes en Z que reflejan de manera más cercana a la estructura inicial son aquellos que se efectuaron con grosores que variaron entre 0,8 μm y 1,2 μm con volúmenes aproximados de 1,75 pl y 1,71 pl, respectivamente y con desviaciones estándares muy pequeñas. Para los cortes realizados con 1,3 μm de grosor se obtuvo un volumen aproximado de 1,76 pl. Este valor también es muy cercano al real, pero con una desviación estándar de los valores mayor que cuando se compara con los obtenidos en los cortes anteriormente mencionados. Finalmente para los cortes de 1,6 μm de espesor se calculó un volumen de 2,22 pl, valor bastante alejado del real y con una variación mucho mayor que en los otros valores obtenidos. El hecho que con cortes en Z de un mayor espesor se comiencen a visualizar estructuras más distorsionadas y con volúmenes más inexactos, se debe a que al usar cortes con distancias mayores en el eje Z se necesita un menor número de cortes para abarcar todo el plano ocupado por la célula, por lo que se tiene menor información en Z para reconstruir el objeto y por

ende pérdida en la resolución final. Finalmente decidimos que los experimentos se realizarían con grosores de corte en el plano Z de 1 μm . Es importante decir que no ocupamos un espesor de corte en el plano Z de 0,3 μm , debido a que con este valor el número de cortes que deben realizarse aumenta en forma considerable y eso dañaría a una célula normal, llevándonos a análisis erróneos de los datos.

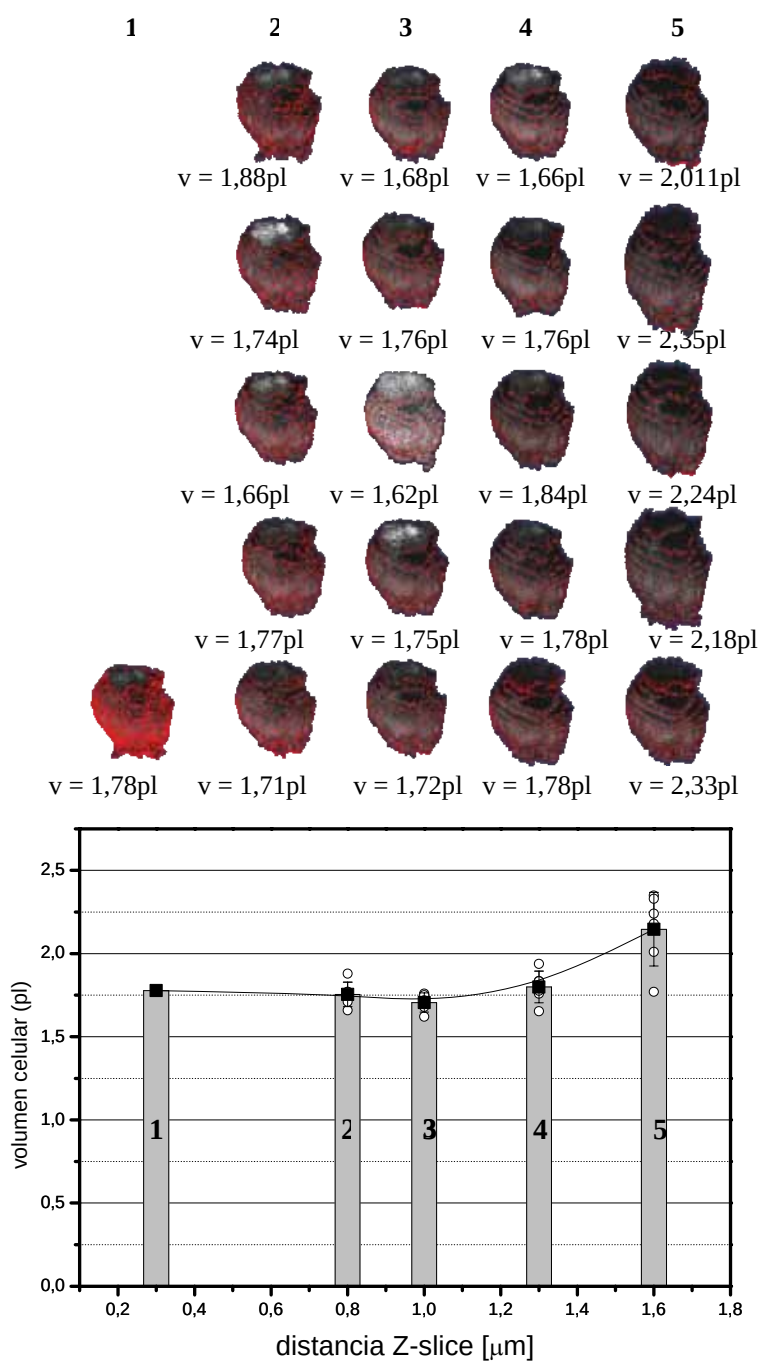


Figura 27. Con cortes de 1 μm de espesor en el plano Z se logran representaciones más fieles del volumen de una célula. En la parte superior de la figura 26 se ilustran las reconstrucciones de volumen para una célula HeLa sometida a cortes en el plano Z de diámetro 0,3, 0,8, 1,0, 1,3 y 1,6 μm , respectivamente. En el gráfico inferior se ilustran los volúmenes obtenidos mediante la reconstrucción de las imágenes en Z tomadas con cortes de diferentes diámetros.

4.3.3 Estaurosporina induce disminución de volumen apoptótica (AVD) en células HeLa.

Una vez que se hubo estandarizado el método para la cuantificación de volumen celular, las células HeLa nativas sembradas en las cámaras y mantenidas en solución KRH suplementada con 25 mM de glucosa a una temperatura de 37⁰C se cargaron con 5 μ M de la sonda DiIC₁₈. Posteriormente las células fueron sometidas a cortes en el plano Z de 1,0 μ m de espesor entre cada corte, utilizando para ello el láser de 543 nm y intensidad de 1%. Después de lograr una línea base estable, las células fueron tratadas con 2 μ M de estaurosporina. Las imágenes obtenidas fueron deconvolucionadas, para la subsecuente reconstrucción del objeto en 3-D. En la figura 28a se ilustra el curso temporal de la variación de volumen de las células en el tiempo cuando son sometidas a 2 μ M de estaurosporina. De este gráfico podemos deducir que después de 15 minutos de tratamiento con la droga, las células comienzan a realizar AVD en forma rápida, la cual persiste por aproximadamente 25-30 minutos, llegando a disminuir finalmente el tamaño de éstas en un 30% con respecto a su valor original. Después de esto no se detectaron cambios de volumen a medida que transcurría el experimento. En el panel inferior se tienen 3 gráficos de barras, en **b** se muestran los valores de volumen normalizados para las células control (barras blancas) y para las tratadas con estaurosporina (barras grises) expresados en μ m³. Las células que fueron expuestas al tratamiento muestran una disminución de volumen de alrededor de un 30% con respecto a las células control. En **c** se ilustra la intensidad de la densidad de la fluorescencia por μ m² emitida por las células, pudiéndose visualizar que este parámetro aumenta en aproximadamente un 13% debido a la presencia de la droga, lo cual es concordante con una disminución de volumen. En **d** se muestra la reducción de un 25% del área de las células apoptóticas.

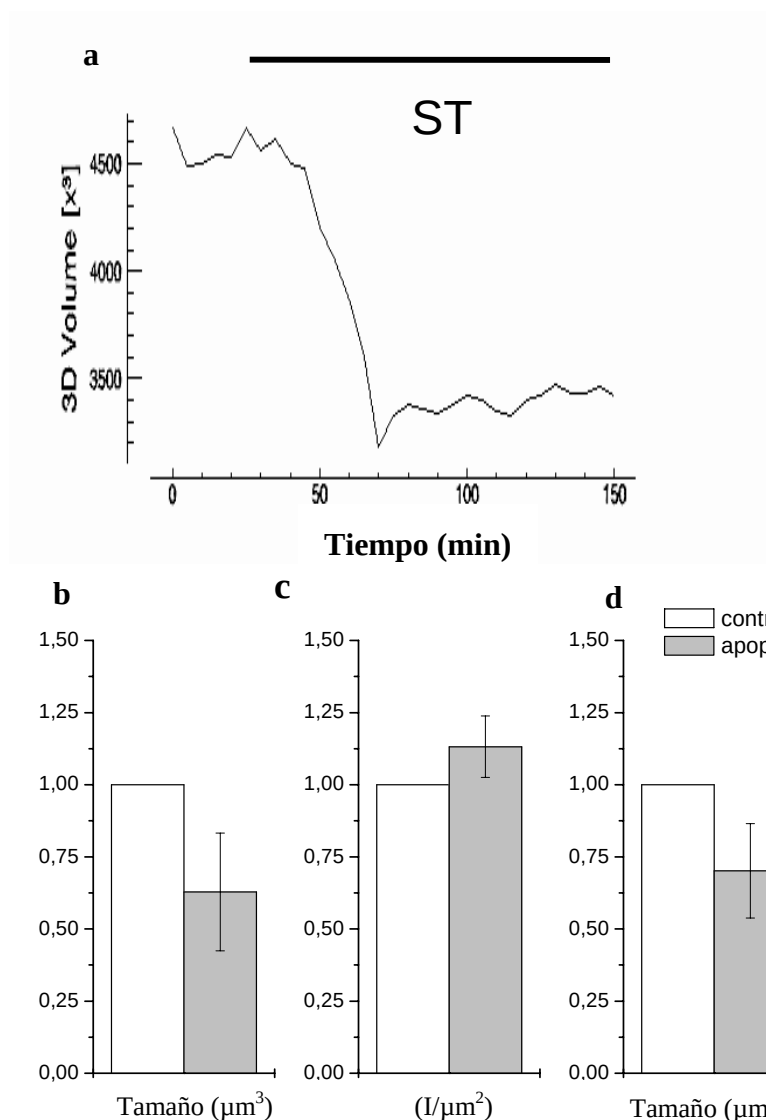


Figura 28. Estaurosporina induce disminución apoptótica de volumen (AVD) en células HeLa. En a, se tiene un curso temporal de la variación de volumen en el tiempo de las células tratadas con 2 μM de estaurosporina (ST). **b, c y d** corresponden a gráficos de barra del volumen, densidad y área, respectivamente, de células controles (blancas) y tratadas con estaurosporina (grises). Experimento representativo de n=3. I/μm² = representa la intensidad de densidad de la fluorescencia por área. La línea negra corresponde a la adición de estaurosporina (ST).

Las reducciones rápidas de volumen ocurrieron en forma paralela con los cambios morfológicos como se ilustra en la figura 29. La reconstrucción de la imagen superior en esta figura corresponde a un grupo de células antes de agregarle la estaurosporina, mientras que, la reconstrucción del panel inferior corresponde al mismo grupo celular pero una vez terminado el experimento. Como podemos ver, debido al tratamiento realizado, las células comienzan a achicarse emitiendo una especie de prolongaciones. Como conclusión de estos experimentos podemos decir, que a través de este método los valores obtenidos para los distintos parámetros nos permiten hacer un estudio más acucioso de los eventos producidos en apoptosis y, por ende, éste será el protocolo que se utilizará en los futuros experimentos de AVD con las células que sean transfectadas en forma aguda con el canal de potasio TASK-2, para poder evaluar si este canal de potasio tiene una participación directa en este evento.

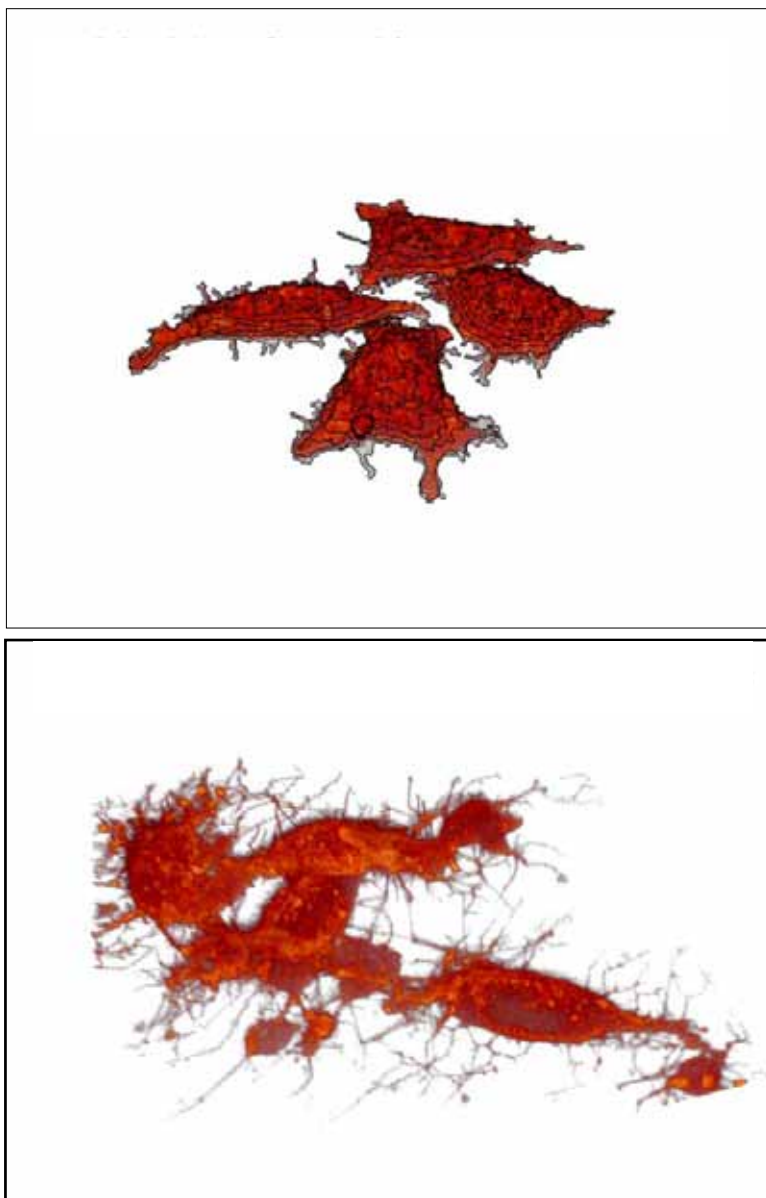


Figura 29. Las células HeLa expuestas a 2 μM de estaurosporina experimentan cambios **morfológicos**. En el panel superior se tiene la reconstrucción de células HeLa previo a la inducción de apoptosis, en el panel inferior se muestra la reconstrucción de las mismas células pero después de 3 horas de exposición a estaurosporina (ST).

4.3.4 La liberación de citocromo-c inducida por estaurosporina es lenta y varía de una célula a otra.

Otro de nuestros intentos por estudiar los eventos preliminares que ocurren en la apoptosis, fue monitorear la liberación de citocromo-c desde la mitocondria al citosol, debido a la inducción de apoptosis con estaurosporina (inductor de la vía intrínseca). Reportes previos señalaban que la traslocación de citocromo-c al citosol activaba una corriente de potasio dependiente de voltaje en células musculares lisas de arteria pulmonar de rata (PASMC), causando así salida del ión K^+ con la consecuente disminución del volumen celular, siendo este efecto anterior a la condensación y fragmentación nuclear (Platoshyn *et al*, 2002). Además, estudios sobre liberación de citocromo-c en células HeLa que expresan en forma estable el gen que codifica para esta proteína, indicaban que la liberación de ésta bajo estimulación con agentes apoptóticos, tales como UV, estaurosporina y actinomicina es un proceso temprano, que precede a la activación de caspasa-9, externalización de fosfatidilserina y pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Goldstein *et al*, 2000). Como contábamos en el laboratorio con una línea de células HeLa 2H18 que poseen la transfección estable de citocromo-c-GFP quisimos realizar este estudio. En el caso que el método resultara positivo y reproducible íbamos a transfectar en forma aguda estas células con el canal de potasio TASK2-WT y las mutantes de este canal, con el objetivo de ver si la transfección aguda con TASK-2 acelera la liberación de citocromo-c-GFP inducida por 2 μ M de estaurosporina en aquellas células que expresan el canal. En el caso que TASK-2 posea alguna participación en los eventos tempranos que ocurren en la muerte apoptótica, debería adelantarse la liberación de citocromo-c-GFP, inducida por estaurosporina.

Al ser la apoptosis un proceso lento, para nuestro caso sólo algunas células después de un curso temporal de 5 horas en presencia de 2 μ M de estaurosporina mostraron la liberación de

citocromo-c; otras lo hicieron a las 6, 8, 12 horas y así sucesivamente. Estos resultados son concordantes con reportes previos en donde se señala, que el tratamiento de células HeLa con estaurosporina produce una liberación de citocromo-c desde las mitocondrias entre 4 y 20 horas después del tratamiento con la droga, pero una vez que se produce, la proteína se demora 5 minutos en abandonar completamente las mitocondrias de una célula individual (Goldstein *et al*, 2000). Además para estos estudios se debía obtener una imagen del campo celular ampliada (zoom de 2,5 veces) para poder visualizar de mejor manera la distribución punteada de la GFP, lo cual hacía que por cada experimento sólo se pudiera perseguir el comportamiento de dos ó tres células en el tiempo. Teniendo en cuenta que la realización de estudios con un número pequeño de células es perjudicial para el análisis estadístico de los datos, sumado al hecho de utilizar demasiado tiempo en estudiar un número tan reducido de células nos hizo desistir de estos experimentos. En la figura 30 se muestra una serie de 4 fotografías de microscopía confocal, tomadas a las 0, 2, 4 y 6 horas después de haber agregado 2 μ M de estaurosporina, de un campo de 4 células. La flecha blanca indica una célula a la cual se le pudo seguir en el tiempo la liberación de citocromo-c. Como podemos observar de las imágenes, del campo celular elegido sólo una célula mostró el patrón deseado. Una posible explicación a la diferencia en el comportamiento visto entre célula y célula puede deberse a las distintas concentraciones de la proteína proapoptótica Bcl-2, la cual promueve la liberación de citocromo-c desde la mitocondria. Otra hipótesis sería que la liberación de citocromo-c induce activación de caspasas y que éstas a su vez promueven la liberación de una mayor cantidad de la proteína (Goldstein *et al*, 2000). En la figura 30e se tiene un curso temporal de la variación de la intensidad de fluorescencia emitida por la GFP, medida como porcentaje (%) de la distribución punteada/difusa (sd) durante el tiempo. Como se ilustra en el gráfico a partir de las 4 horas de tratamiento con

estaurosporina las células comienzan a mostrar un patrón de distribución más difuso de GFP, lo que se refleja en una disminución de la desviación estándar medida; este curso temporal es representativo del comportamiento de tres células.

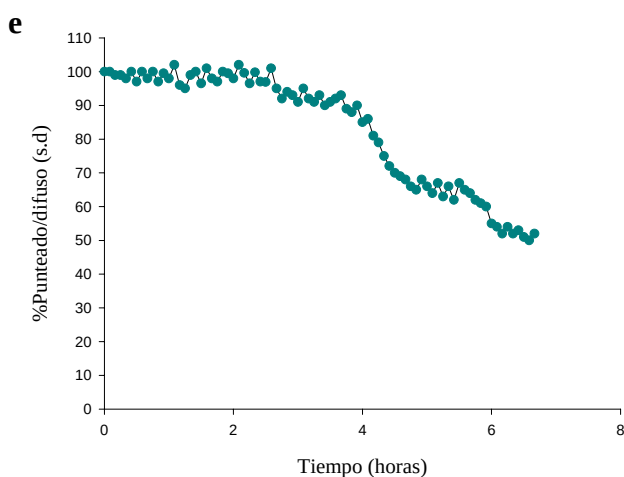
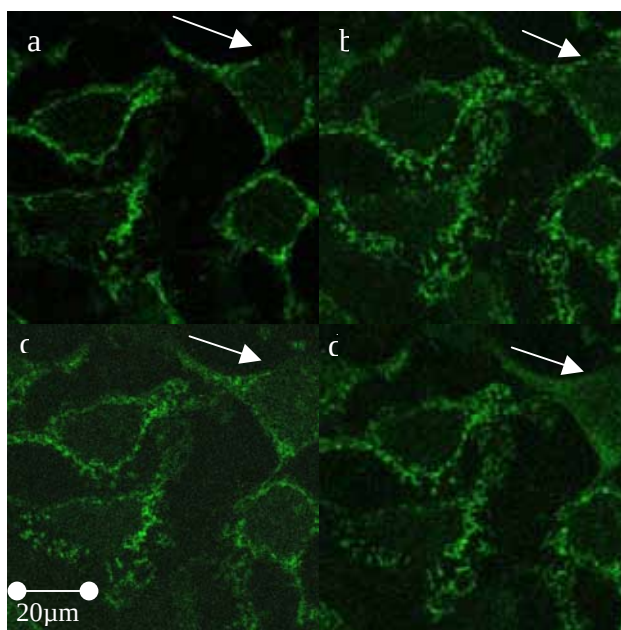


Figura 30. La liberación de citocromo-c inducida por estaurosporina es lenta y varía de una célula a otra. a, b, c y d corresponden a imágenes de células HeLa expuestas a una excitación con láser de 488 nm y 90% de intensidad en presencia de 2 μ M de estaurosporina, tomadas a las 0, 2, 4 y 6 horas, respectivamente. La flecha blanca señala a la única célula que mostró liberación de citocromo-c. En **e** se ilustra el curso temporal de la liberación de citocromo-c de una célula medido como porcentaje (%) de la disminución de la sd en el tiempo. Los intervalos entre cada toma fueron de 5 minutos. La barra blanca corresponde a 20 μ m.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se estudió la RVD llevada a cabo por células HeLa nativas y transfectadas con mTASK-2, cuando son sometidas a cambios de medio hipotónico a distintos pHs y en presencia de clofilio, inhibidor de TASK-2. Paralelo a esto se evaluó, a través de la cuantificación de la corriente emitida por este canal, si los residuos de tirosina extracelulares Y190, Y219 y Y225 le confieren a TASK-2 su sensibilidad a pH extracelular.

El método empleado para medir RVD permite evaluar cambios de volumen celular, los que son directamente proporcionales a la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda (Alvarez-Leefmans *et al*, 1995). La intensidad de la fluorescencia de la calceína no se vió afectada por la excitación constante, descartándose un posible *photobleaching*. Además no se observó compartimentalización de la sonda, lo que nos permitió medir las variaciones de volumen en tiempos prolongados.

En un principio la línea celular elegida para nuestros estudios fueron las células HEK-293 debido a la ausencia de corrientes endógenas para TASK-2, lo cual nos iba a permitir seguir los cambios deseados sin interferencia del canal endógeno. Sin embargo, la presencia de uniones en hendidura, determinadas por FRAP, permitió que las células nativas mostraran un mismo comportamiento que las transfectadas con mTASK-2 frente a estímulos hipotónicos, debido al paso de la sonda desde una célula a otra. Como esto nos impedía involucrar al canal en la aceleración de RVD llevada a cabo por las células transfectadas, utilizamos finalmente a las células HeLa por ser una línea celular carente de este tipo de uniones.

La regulación de volumen llevada a cabo por células HeLa nativas al ser sometidas a medios hipoosmóticos a distintos pHs y en presencia de 100 μ M clofilio pH 7,5 resultó ser independiente de pH extracelular e insensible a clofilio (figura 20). El hecho que la respuesta no

fuera inhibida por pH extracelular ácido (6,0) ni por la presencia de 100 μ M clofilio pH 7,5, concentración que bloquea en un 100% la corriente mediada por TASK-2 (Niemeyer *et al*, 2001) y que fuera muy similar para cada caso en particular, nos demostró que la RVD de células HeLa nativas es mediada por canales de potasio distintos de TASK-2. En cuanto a la naturaleza de estos canales, estos parecieran corresponder a los canales de baja conductancia dependientes de calcio intracelular (Díaz *et al*, 1995), además de la posible contribución de los canales de cloruro, como por ejemplo el canal CLC3 sensible a volumen presente en este tipo celular (Hermoso *et al*, 2002).

Sin embargo, el estudio de la RVD de células HeLa transfectadas en forma aguda con mTASK2-WT-GFP, realizado a las 12 horas de postransfección, frente a cambios de medio hipotónico en presencia de 100 μ M clofilio pH 7,5 y a diferentes pHs, mostró una respuesta acelerada a pH 7,5, sensible al inhibidor y dependiente de pH extracelular, siendo acelerada a pH 8,5 e inhibida a pH 6,0 (figura 23 y tabla II). La comparación entre el tiempo en el cual las células nativas y las transfectadas recuperaron el 50% de su volumen original, después de haber sido expuestas a cambios de medio hipotónico (tabla II), indicó que las células nativas en las distintas condiciones recuperaron el 50% de su volumen a los 7 minutos, en cambio, para el caso de las células transfectadas y estudiadas a pH 7,5 a los 3 minutos recuperaron el 56% de su volumen. La recuperación de volumen a los 3 minutos fue aún más rápida a pH 8,5 (75%), en cambio, para el caso de pH 6,0 y 100 μ M clofilio pH 7,5 no se observó regulación de volumen a ningún tiempo, siendo estos valores estadísticamente significativos comparados con las células control. Estos resultados concuerdan con los estudios electrofisiológicos, en donde se demuestra la dependencia de pH externo que posee la corriente de TASK-2 (Reyes *et al*, 1998; Niemeyer *et al*, 2000; Barriere *et al*, 2003) y con valores obtenidos para células de Ehrlich en donde se ha

demostrado la presencia de TASK-2 y RVD robusta (Hougaard *et al*, 2001; Niemeyer *et al*, 2001). La ausencia de RVD de las células transfectadas a pH 6,0 y en presencia de clofilio sugiere que la sobreexpresión de TASK-2 bloquea o enmascara a los canales de potasio endógenos presentes en estas células, de otro modo las células transfectadas hubiesen regulado su volumen de la misma manera que las células nativas en estas condiciones. Además, es importante señalar que clofilio a la concentración utilizada no bloquea las corrientes de Cl^- sensibles a volumen (Niemeyer *et al*, 2000), por lo tanto podemos afirmar que la RVD acelerada mostrada por las células transfectadas se debe a la presencia del canal de potasio TASK-2.

Otro de los objetivos de esta tesis consistió en encontrar él o los posibles residuos aminoacídicos que le confieren a TASK-2 su sensibilidad a pH extracelular. Para lograr este objetivo mediante técnicas de biología molecular como mutagénesis-sitio dirigida se construyeron tres mutantes de TASK2-WT en las cuales los residuos extracelulares de tirosina ubicados en posición Y190, Y219 e Y225 fueron reemplazados por el aminoácido no cargado fenilalanina. Cabe destacar que estudios previos realizados en nuestro laboratorio, mediante el uso de reactivos que atacan residuos sensibles a pH tales como DEPC, TNBS y MTS (datos no mostrados) y otras mutaciones puntuales, ya habían descartado a los residuos de lisinas, argininas y cisteínas extracelulares como posibles aminoácidos implicados en participar en esta función. La corriente mediada por este canal se midió mediante la técnica de *patch clamp* en su modalidad de célula entera en células HEK-293 transfectadas en forma aguda con TASK2-WT y con las mutantes. La corriente del canal WT muestra un comportamiento tipo Goldman-Hodking-Katz con una marcada dependencia de pH extracelular en el rango fisiológico, la cual es independiente del voltaje (Niemeyer *et al*, 2001). La sensibilidad a disminuciones de pH externo y/o interno ha sido descrita para canales de K^+ como ROMK1 (Schulte *et al*, 1998), Kir 2.3 (Zhu *et al*, 1999),

TASK-1 (Hougaard *et al*, 2001), TASK-3 (Kim *et al*, 2000). El $pK_{1/2}$ medido a concentraciones de potasio fisiológicas del canal WT fue de $8,34 \pm 0,14$ y de $7,6 \pm 0,05$ a K^+ 140 mM con un coeficiente de Hill cercano a 1 para cada caso en particular, sugiriendo que como mínimo debe unirse un protón por canal para bloquearlo (datos no mostrados). Las mediciones de las corrientes de células HEK-293 transfectadas con las mutantes de tirosina antes mencionadas, arrojaron tener las mismas características que TASK2-WT en cuanto a rectificación y sensibilidad a pH externo. Sólo la mutante Y219F mostró una diferencia estadísticamente significativa comparada con el WT en cuanto a su pKa y coeficiente de Hill. La curva de dependencia de pH para esta mutante se desplazó levemente hacia la derecha, sugiriendo que es un poco más sensible a los cambios de pH en el medio alcalino. Esto demuestra que este residuo pudiera probablemente estar involucrado en esta función, pero al igual que en el caso de TASK-1 (Morton *et al*, 2003) pareciera ser que otros aminoácidos jugarían un papel de mayor importancia. Estudios anteriores a este trabajo habían demostrado que el residuo H174 también podría ejercer un efecto importante, ya que su mutación por asparragina cambió el pKa y el coeficiente de Hill de una manera significativa comparada con el WT.

Otro de los objetivos de este trabajo fue evaluar la posible participación de TASK-2 como mediador de la disminución apoptótica de volumen (AVD), para lo cual nos planteamos como meta principal desarrollar y estandarizar un método para el estudio de este evento. En primera instancia tratamos de medir la AVD de células HeLa nativas inducidas con 200 μ M peróxido de hidrógeno, sin embargo concluimos que no podíamos medir la AVD inducida por peróxido con el método de la calceína, debido a que H_2O_2 interacciona con ella produciendo su apagamiento o extrusión en el tiempo (figura 24a). La disminución de la intensidad de fluorescencia de la sonda no se debió a una estimulación de la entrada de sodio con el consecuente aumento de volumen, ya

que su reemplazo por el catión no permeante NMDG mostró el mismo comportamiento (figura 24b). El método de la calceína tampoco se pudo utilizar para la medición de AVD inducida por 2 μ M de estaurosporina, debido al *bleaching* artefactual sufrido por la sonda en el tiempo.

Finalmente para poder evaluar la AVD de células HeLa nativas inducidas con 2 μ M de estaurosporina, ocupamos un programa para la deconvolución y reconstrucción de imágenes en 3D, logrando mediante este software la representación real de las estructuras estudiadas (figuras 26 y 29). Esto concuerda con reportes previos que señalan que el uso de programas de deconvolucion y creación de modelos en 3D , permite corregir o recuperar la información dentro de la imagen que se ha perdido durante el proceso de adquisición de las fotografías, llegando finalmente a la obtención de objetos con estructura muy similar a la real (Fink *et al*, 1998).

Una representación fiel del volumen y estructura de las células, se logró realizando los cortes en el plano Z de 1 μ m de espesor (figura 27), asegurándonos además que con este grosor el número de cortes que se realizaron no dañaron la morfología de las células. La AVD de células HeLa nativas tratadas con 2 μ M de estaurosporina comenzó después de 15 minutos de incubación con la droga, la cual persistió por aproximadamente 25-30 minutos, llegando finalmente a disminuir al cabo de dos horas en un 30% con respecto a su tamaño original (figura 28). Estos resultados son concordantes con trabajos previos en donde se señala que la inducción de apoptosis con 4 μ M de estaurosporina produce al cabo de 2 horas una reducción de tamaño de células HeLa del 25-30%, con respecto a su valor original (Maeno *et al*, 2000). Reportes recientes señalan que la inducción de apoptosis en células HeLa con 4 μ M de estaurosporina produce después de 5-15 minutos de exposición a la droga una AVD rápida, que al cabo de 30 minutos lleva a las células a una disminución final del 30% en relación a su volumen original. Este efecto se explica por la activación de canales de cloruro sensibles a volumen y la

consecuente activación de canales de potasio, lo que finalmente lleva a AVD, efecto que se revierte en presencia de bloqueadores de canales de Cl^- (Shimizu *et al*, 2004). Esto refuerza la evidencia anterior que señala que al inhibir los canales de potasio y cloruro se inhibe la AVD (Maeno *et al*, 2000). Es importante resaltar que las concentraciones de estaurosporina utilizadas por nosotros en células HeLa son menores a las usadas por otros autores, por lo tanto el hecho de ocupar mayores concentraciones modifica el tiempo en el cual las células muestran una respuesta, pues al haber más droga en el medio las concentraciones de potasio intracelulares disminuyen más rápidamente llevando por lo tanto a una disminución más rápida de volumen en el tiempo. Respuestas similares a la inducción de AVD con 1 μM de estaurosporina se han reportado para células COS-7 y PASM, las cuales al cabo de 30 minutos de inducción con la droga muestran una disminución de volumen de un 20% comparado con el valor original (Brevnova *et al*, 2004). En células U937 se ha visto que la AVD debido a la presencia de 1 μM de estaurosporina comienza a la hora de tratamiento (Maeno *et al*, 2000); en cambio, para células ECV304 la AVD es rápida y comienza después de 30 minutos de exposición a 1 μM de estaurosporina (Porcelli *et al*, 2003). Esto también confirma que los eventos y la progresión de la apoptosis, en este caso específico la AVD, es dependiente del tipo celular (Hortelano *et al*, 2002) y de la concentración de inductor utilizada. Al cabo de las 3 horas de tratamiento con estaurosporina las células exhibieron cambios morfológicos, los cuales pudieron ser verificados claramente una vez realizada la reconstrucción en 3D. Estos cambios son posteriores a la AVD junto con la liberación de citocromo-c y activación de caspasas (Yu *et al*, 2000). El hecho que la AVD inducida por estaurosporina sea un evento preliminar de apoptosis, puede deberse a que esta droga actúe directamente sobre los canales de cloruro sensibles a volumen (Schimizu *et al*, 2004) o sobre los canales de potasio (Brevnova *et al*, 2004), llevando por lo tanto a un aumento en el

eflujo de estos iones con la consecuente salida de agua, disminución de volumen celular, activación de caspasas (por la disminución del potasio interno) y apoptosis.

Ahora que se cuenta con un método para la cuantificación de la AVD, se podrán realizar los experimentos destinados a evaluar el posible rol del canal de potasio TASK-2 en la apoptosis y ver si la AVD de células HeLa transfectadas con el canal debido al efecto de estaurosporina, es dependiente de pH y sensible a clofilio. Si los resultados indican una aceleración en la AVD en presencia del canal y que tal respuesta es inhibida a pH ácido y en presencia de clofilio pH 7,5, siendo más rápida a pH básico se podrá concluir finalmente la participación directa de TASK-2 en este evento. Este resultado sería concordante con reportes recientes que señalan la participación de los canales de potasio de 2P/4TM en la AVD inducida por 200 μM de H_2O_2 en embriones de ratón unicelulares (Trimarchi *et al*, 2002) y con los estudios de muerte apoptótica realizados en neuronas granulares cerebelares de rata, en donde se involucra a los canales TASK-1 y 3 en ser los mediadores de la apoptosis en este tipo celular (Lauritzen *et al*, 2003).

En base a los resultados expuestos es posible formular las siguientes conclusiones:

- TASK-2 es mediador de la RVD inducida por estrés hipoosmótico en células epiteliales.
- Se logró la construcción de las mutantes del canal TASK2 Y190, Y219 e Y225, las cuales fueron evaluadas mediante análisis electrofisiológicos como los posibles sensores de pH externo de este canal.
- Mediante la reconstrucción de imágenes en 3D se puede cuantificar fielmente la AVD de células epiteliales inducida por estaurosporina.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Leefmans F, Altamirano J & Crowne W (1995). Use of ion-selective microelectrodes and fluorescent probes to measure cell volume. *Methods in Neurosciences* 27, 361-391.

Amstrong C (2003). The Na/K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 6257-6262.

Bayliss DA, Talley EM, Sirois JE & Lei Q (2001). TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive “leak” channel expressed in brainstem respiratory neurons (2001). *Respire Physiology* 129, 159-174.

Brevnova E, Platoshyn O, Zhang S & Yuan XJ (2004). Overexpression of human *KCNA5* increases $I_{K(V)}$ and enhances apoptosis. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 287, C715-C722.

Bortner CD, Hughes FM Jr & Cidlowski JA (1997). A Primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32436-32442.

Cid LP, Niemeyer MI, Ramírez A & Sepúlveda FV (2000). Splice variants of a ClC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 279, C1198-C1210.

Coulter K, Périer F, Radeke C & Vandenberg C (1995) .Identification and molecular localization of a pH-sensing domain for the inward rectifier potassium channel HIR. *Neuron* 15, 1157-1168.

Chapman CG, Meadows HJ, Godden RJ, Campbell DA, Duckworth M, Kelsell RE, Murdock PR, Randall AD, Rennie GI & Gloger IS (2000). Cloning, localisation and functional expression of a novel human, cerebellum, specific, two pore-domain potassium channel. *Molecular Brain Research* 82, 74-83.

Díaz M & Sepúlveda F (1995). Characterisation of Ca^{2+} -dependent inwardly rectifying K^+ currents in HeLa cells. *Pflügers Arch* 430, 168-180.

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, KUO a, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT & Mackinnon (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of the K^+ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.

DüssmannH, Kögel D, Rehm M & Prehn J (2003). Mitochondrial membrane permeabilization and superoxide production during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 12645-12649.

Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C & Lazdunski M (1997). TASK, a human background K^+ channel to sense external pH variations near physiological pH. *Embo Journal*, 16, 5464-5471.

Fink C, Morgan F & Loew L (1998). Intracellular fluorescent probe concentrations by confocal microscopy. *Biophysical Journal* 75, 1648-1658.

Goldstein S.A.N, Price LA, Rosenthal D.N & Pausch MH (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 13256-13261.

Goldstein J, Waterhouse N, Juin P, Evans G & Green R (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology* 2, 156-162.

Goldstein S, Bockenhauer D, O'Kelly I & Zilberberg N (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of Two-P-domain subunits. *Nature Neuroscience* 2, 175-184.

Gray AT, Zhao BB, Kindler CH, Winegar BD, Mazurek MJ, Xu J, Chavez RA, Forsayeth JR & Yost CS (2000). Volatile anesthetics activate the human tandem pore domain baseline K⁺ channel KCNK5. *Anesthesiology* 92, 1722-1730.

Gurney AM, Osipenko ON, Macmillan D & Kempson FEJ (2002). Potassium channels underlying the resting potential of pulmonary artery smooth muscle cells. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology* 29, 330-333.

Han J, Truell J, Gnatenco C & Kim D (2002). Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *Journal of Physiology (London)* 542, 431-444.

Hartness ME, Lewis A, Searle GJ, O'Kelly I, Peers C & Kemp PJ (2001). Combined antisense and pharmacological approaches implicate hTASK as an airway O₂ sensing K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry* 276, 26499-26508.

Hermoso M, Satterwhite C, Andrade Y, Hidalgo J, Wilson S, Horowitz B & Hume J (2002). ClC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 40066-40074.

Hougaard C, Jorgensen F & Hoffmann E. K (2001). Modulation of the volume-sensitive K⁺ current in Ehrlich ascites tumour cells by pH. *Pflügers Arch* 442, 622-633.

Hortelano S, Zeini M, Castrillo A, Alvarez AM & Bosca L (2002). Induction of apoptosis by nitric oxide in macrophages is independent of apoptotic volume decrease. *Cell Death and Differentiation* 9, 643-650.

Kim D, Fujita A, Horio Y & Kurachi Y (1998). Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K⁺ channel (cTABK-1). *Circular Research* 82, 513-518.

Kim Y, Bang H & Kim D (2000). TASK-3 a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *Journal of Biological Chemistry* 275, 9340-9347.

Kindler C, Paul M, Zou H, Liiu C, Winegar B, Gray A & Yost S (2003). Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K⁺ channel TASK-2 (KCNK5). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306, 84-92.

Lambert I, Hoffmann E & Christensen P (1987). Role of prostaglandins and leukotrienes in volume regulation by Ehrlich ascites tumor cells. *Journal of Membrane Biology* 98, 247-256.

Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E & Haussinger D (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Review* 78, 247-306.

Lauritzen I, Zaonzouri M, Honoré E, Duprat F, Ehrengruber M, Lazdunski M & Patel A (2003). K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 32068-32076.

Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DM, Chavez RA, Forsayeth JR & Yost CS (1998). An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *Journal of Neuroscience* 18, 868-877.

Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E & Lazdunski M (1996). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO Journal* 15, 6400-6407.

Lock H & Valverde M (2000). Contribution of the IsK (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 34849-34852.

Lopes C M, Gallagher PG, Buck ME, Butler MH & Goldstein S.A (2000). Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16969-16978.

Lopes C M, Zilbergberg N & Goldstein S (2001). Block of Kcnk3 by protons. *Journal of Biological Chemistry* 27, 24449-24452.

Luetjens C, Kögel D, Reimertz C, Dübmann H, Renz A, Schulze-Osthoff K, Nieminen A, Poppe M & Prehn J (2001). Multiple kinetics of mitochondrial cytochrome-c release in drug-induced apoptosis. *Molecular Pharmacology* 60, 1008-1019.

Lauritzen I, Zanzouri M, Honoré E, Duprat F, Ehrengruber M, Lazdunski M & Patel A(2003). K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 32068-32076.

Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A & Okada Y (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 9487-9492.

Mingret F, Patel AJ, Lazdunski M & Honore (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K^+ channel TASK-1. *Embo Journal* 20, 47-54.

Mingen O, Le Gall C, Harvey B & Thomas S (1999). Volume regulation following hypotonic shock in isolated crypts of mouse distal colon. *Journal of Physiology* 512.2, 501-510.

Morton M, O'Connell A, Sivaprasadarao A & Hunter M (2003). Determinants of pH sensing in the two-pore domain K^+ channels TASK-1 y 2. *Pflügers Arch-European Journal of Physiology* 445, 577-583.

Niemeyer MI, Hougaard C, Hoffmann EK, Jorgensen F, Stutzin A, & Sepúlveda FV (2000). Characterisation of a cell swelling-activated K^+ selective conductance of Ehrlich mouse ascites tumour cells. *Journal of Phisiology* (London). 524, 757-767.

Niemeyer MI, Cid LP, Barros F & Sepúlveda FV (2001). Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K^+ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43166-43174.

Niemeyer MI, Cid LP, Valenzuela X, Paeile V & Sepúlveda FV (2003). Extracellular conserved cysteine forms an intersubunit disulphide bridge in the KCNK5 (TASK-2) K⁺ channel without having an essential effect upon activity. *Molecular Membrane Biology* 2, 185-191.

North, RA (2000). Potassium-channel closure taken to TASK *Trends in Neuroscience* 23, 234-235.

Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J & Morishima S (2001). Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volumen decrease(AVD). *Journal of Phisiology* 532.1, 3-16.

Patel A J & Honoré E (2001). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends in Neurosciences* 24, 339-346.

Patel A & Lazdunski M (2004). The 2P-domain K⁺channels: role in apoptosis and tumorigenesis, *Pflugers Arch-European Journal of Physiology* 448, 261-273.

Perry M, Groot M, Helliwell R, Leishman D, Tristani-Firouzi M, Sanguinetti M & Mitcheson J(2004). Structural determinants of HERG channel block by clofilium and ibutilide. *Molecular Pharmacology* 66, 240-249.

Ping Yu S, Canzoniero L & Choi D (2001). Ion homeostasis and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 405-411.

Platoshyn O, Zhang S, McDaniel S & Yuan J (2002). Cytochrome c activates K^+ channels before inducing apoptosis. *American Journal of Physiology* 283, C1298-C1305.

Porcelli AM, Ghelli A, Zanna C, Valente P, Ferroni S & Rugolo M (2003). Staurosporine induces apoptotic volume decrease in ECV304 cells. *ANNALS of the New York Academy of Sciences* 1010, 342-346.

Rajan S, Wischmeyer E, Xin Liu G, Preising- Muller R, Daut J, Karschins A & Derst C (2000). TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K^+ channel. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16650-16651.

Reyes R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N & Lazdunski M (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K^+ channel from human kidney. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 30863-30869.

Schimizu T, Numata T & Okada Y (2004). A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl^- channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 6770-6773.

Schulte U, Hahn H, Konrad M, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppertsberg J, Fakler B & Ludwig J (1999). PH gating of ROMK (Kir1.1) channels: Control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 15298-15303.

Sirois JE , Lei Q, Talley EM, Lynch C 3rd & Bayliss DA (2000). The Task-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *Journal of Neuroscience* 20, 6347-6354.

Talley E, Lei Q, Sirois J & Bayliss D (2000). TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25, 399-410.

Talley EM & Bayliss DA (2002). Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (kcnk3) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *Journal of Biological Chemistry* 277, 17733-17742.

Talley EM, Sirois JE, Lei Q & Bayliss DA (2003). Two pore domain (KCNK) potassium channels : dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist* 9, 46-56.

Trimarchi J, Liu L , Smith P & Keefe D (2002). Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation. *American Journal Physiology Cell Physiology* 282, C588-C594.

Van Kempen, G (1999). Image restauration in fluorescence microscopy. *Tudelft*.1-15.

Warth R, Barrière H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P & Barhanin J (2004). .Proximal renal

tubular acidosis in TASK2 K^+ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 8215-8220.

Washburn CO, Sirios JE, Talley EM, Guyenet PG & Bayliss DA (2002). Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K^+ . *Journal of Neuroscience* 22, 1256-1265.

Yu SP & Choi DW (2000). Ions, cell volume, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 9360-9362.