

---

**ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE CANALES K2P EN ENTORNOS  
LIPÍDICOS EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.****PEDRO JORGE DOMÍNGUEZ CANALES  
INGENIERO EN BIOINFORMÁTICA****RESUMEN**

Los canales de potasio (K<sup>+</sup>) forman parte de una de las familias más abundantes de proteínas de transmembrana. Estas proteínas, y en particular los canales de K<sup>+</sup> de dos dominios de poros (K2P), permiten el flujo de iones K<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática controlando de esta forma la excitabilidad en las células neuronales. En mamíferos se han identificado 15 canales de tipo K2P, también conocidos como canales de tipo leak, los que son agrupados en 6 subfamilias basados en sus propiedades estructurales y funcionales. Cada subunidad K2P está formada por cuatro segmentos de transmembrana (4STM) y dos dominios formadores de poro (2P), debiendo dimerizar para la formación de un poro selectivo y funcional. Estudios realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que la alteración de los niveles de colesterol presentes en la membrana plasmática, generan una disminución de la corriente de tipo leak en neuronas granulares de cerebelo (NGC). Sin embargo, la asociación entre los dominios ricos en colesterol y los canales K2P no había sido estudiada. En esta tesis evaluamos la expresión de los canales K2P en células NGC y su colocalización con marcadores de balsas lipídicas, mediante técnicas bioquímicas y de biología celular.

Nuestros resultados confirmaron la presencia de los canales K2P1, -3, -9 y -18 en NGC de rata mediante estudios de Western Blot e Inmunofluorescencia. Además se evaluó su colocalización con marcadores de balsas lipídicas. Se encontró una colocalización con caveolina, marcador de balsas lipídicas asociadas a caveolas, del ~56% para K2P1, ~33% para K2P3, ~41% para K2P9 y ~27% para K2P18. Por otro lado, con flotilina que es un marcador de balsas lipídicas no asociados a caveolas se encontró una colocalización del ~21% en el caso de K2P1, un ~27% para K2P3, ~54% para K2P9 y ~46% para el canal K2P18. También se identificó una fracción de canales expresados en la membrana que no están asociados a balsas lipídicas, lo que fue evaluado mediante la colocalización con el marcador  $\beta$ -adaptina, presentando un rango de ~26% a ~53% de colocalización.

## ABSTRACT

Potassium (K<sup>+</sup>) channels form part of one of the most abundant transmembrane proteins super-families. These proteins, particularly the two-pore domain potassium (K2P) channels, allow the flow of K<sup>+</sup> ions through the plasma membrane thereby modulating the excitability of neuronal cells. In mammals, K2P channels family is formed by 15 members, also known as potassium leak channels, which are divided in 6 subfamilies based on the structural and functional properties. Each K2P subunit contains four transmembrane domains (4STM) and two pore forming domains in tandem (2P), and must dimerize to form a selective and functional pore. Studies in our laboratory have shown that cholesterol disruption of the plasma membrane generates a decrease of leak potassium current in cerebellar granule neurons (CGN). However, the association between cholesterol-rich domains and K2P channels had not been studied. In this thesis, we evaluated the expression of K2P channels in CGN cells and the colocalization with lipid rafts markers, using molecular biology and immunological approaches. Our results confirmed the presence of K2P1, -3, -9, and -18 channels in CGN using Western blotting and immunofluorescence studies. Moreover, its colocalization with lipid rafts markers was assessed. Colocalization with caveolin, a marker of lipid rafts associated with caveolae, was found of ~56% for K2P1, ~33% for K2P3, ~41% for K2P9 and ~27% for K2P18. Furthermore, with flotillin, a lipid rafts not associated with caveolae marker, was found a colocalization of ~21% for K2P1, ~27% for K2P3, ~54% for K2P9 and ~46% for K2P18. Finally, a fraction of channels that are not associated with lipid rafts was identified, which was assessed by colocalization with  $\beta$ -adaplin marker, presenting a range of ~26% to ~53% of colocalization.