

3 Metodología

3. METODOLOGÍA

En este apartado se pretende describir y ampliar de forma detallada la metodología específica que se ha empleado durante el desarrollo de la tesis doctoral. A su vez, en cada una de las contribuciones, se encuentra una sección de metodología en la cual se hace referencia a las técnicas básicas utilizadas.

Por otra parte, se adjunta al final de esta sección, en forma de trabajo publicado, la puesta a punto y validación del análisis de la expresión génica que se ha utilizado en las distintas contribuciones que se presentan.

3.1. Animales y modelos experimentales “in vivo”

En el estudio de la regulación de los canales de potasio por citoquinas se han utilizado diversos modelos experimentales. Para cada uno de ellos existe un grupo de animales control con el que se ha procedido de igual forma pero empleando suero salino en lugar del tratamiento. En todos los casos la alimentación ha sido *ad libitum* con libre acceso al agua.

Todos los procedimientos que se recogen en esta memoria han sido aprobados por el comité ético de la Universidad de Barcelona.

3.1.1. Caquexia cancerosa

La caquexia cancerosa es un estado patológico asociado al cáncer en el que el paciente sufre una alteración del metabolismo muscular incrementándose la proteólisis y provocando así el desgaste de este tejido. Se ha descrito que la presencia de altos niveles del factor de necrosis tumoral \sim (TNF \sim) en sangre es la causa de este proceso degenerativo (García-Martínez y cols., 1997). Con el fin de estudiar la posible regulación de los canales iónicos durante este estado, se utilizó el hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en ratas hembra Wistar (\sim 200g). El tumor se introdujo por inyección intraperitoneal de células en suspensión ($\sim 10^8$ células). En este modelo, siete días después del implante del tumor, los animales ya se encuentran en un estado caquético y se sacrifican para la obtención de tejidos y sangre (Tessitore y cols., 1987).

3.1.2. Tratamiento con el factor de necrosis tumoral \sim (TNF \sim)

En estos experimentos se ha empleado TNF \sim recombinante humano cuyo efecto en estos modelos experimentales ha sido previamente demostrado (Carbò y cols., 1998; Llovera y cols., 2002).

3.1.2.1. Crónico

Se utilizaron ratas hembra Wistar de unos 200g de peso. La dosis diaria de

citoquina era de 100µg/kg mediante dos administraciones diarias por inyección intraperitoneal. A los cuatro días las ratas fueron sacrificadas.

3.1.2.2. Agudo

Se utilizaron ratones de entre 6 y 10 semanas de las cepas BALB/c y C57/BL6. Esta última es la utilizada en el caso del modelo deficiente genéticamente para los receptores I y II de la citoquina TNF~. Este modelo fue caracterizado en el laboratorio Hoffmann-LaRoche (Bruce y cols., 1996; Xaus y cols., 2000). Se empleó una dosis única de 100µg TNF~/kg administrada por inyección intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados a las 24h.

3.1.3. Administración de lipopolisacárido (LPS)

En el tratamiento agudo con LPS se utilizaron ratones de entre 6 y 10 semanas de la cepa BALB/c y C57/BL6 en el caso del modelo deficiente genéticamente. Se empleó una dosis única de 2.5mg de LPS/kg. El lipopolisacárido se administró por inyección intraperitoneal. A las 24h los ratones presentaban hipertermia y fueron sacrificados.

3.1.4. Animales utilizados para el aislamiento de macrófagos

En la obtención de precursores monocíticos para su posterior diferenciación a macrófagos en cultivos

primarios, se utilizaron ratones de entre 6 y 10 semanas de las cepas BALB/c y C57/BL6. Esta última es la utilizada en el caso del modelo deficiente genéticamente para el receptor de TNF~.

3.2. Líneas y cultivos celulares

Los modelos celulares utilizados durante esta investigación han sido: la línea celular humana HEK 293, la línea murina Raw 264, y el cultivo primario de macrófagos derivados de médula ósea de ratón.

Las células HEK (CRL-1573) tienen morfología epitelial y provienen de células embrionarias de riñón. Esta línea celular es de uso común en el estudio de canales iónicos, principalmente en estudios electrofisiológicos. Este tipo celular, al no expresar subunidades Kv^x auxiliares (Uebele y cols., 1996), es idóneo para el estudio de interacciones Kv con subunidades Kv^x, o bien para el estudio de la actividad de los Kv en ausencia de sus subunidades auxiliares.

Las células Raw (CRL-2278) provienen de una línea monocítica murina obtenida a partir de un tumor ascítico y presentan un fenotipo similar a los macrófagos.

Las condiciones de cultivo y los medios utilizados en el caso de las líneas celulares están detallados en el apartado de materiales y métodos de las contribuciones que se adjuntan. En el caso del aislamiento y cultivo primario de macrófagos, se

describirá de forma más extensa el proceso de obtención.

3.2.1. Aislamiento de macrófagos derivados de médula ósea

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical e introducidos en un vaso de precipitados con alcohol. Una vez dentro de la campana de cultivo y con el material de cirugía previamente esterilizado, se extraían los dos fémures y las tibias del ratón. Para la obtención de la médula ósea se cortaban los huesos por ambos extremos y se pasaban 2ml de medio de cultivo a través del hueso, utilizando una aguja 25G. Los agregados de médula obtenidos se disgregaban a través de la aguja y, una vez realizada la operación con los cuatro huesos, se llevaba a un volumen adecuado para llenar cuatro placas de Petri de 150mm.

La composición del medio empleado es DMEM con 20% de suero bovino fetal y un 30% de sobrenadante de cultivo de fibroblastos de la línea L-929. El sobrenadante de esta línea celular fibroblástica contiene el factor de crecimiento para macrófagos (M-CSF) necesario para que estas células puedan sobrevivir y diferenciarse (Meerpohl y cols., 1976). Las células se cultivaban durante siete días a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, los macrófagos son el único tipo celular que consigue adherirse y proliferar ya que el material donde crecen no está

tratado para cultivo celular. Al séptimo día cada placa se rascaba y se pasaba a otras cuatro. A partir de un ratón se obtenían 16 placas de macrófagos en estado proliferante para trabajar.

Los experimentos se realizaron partiendo de células quiescentes. Esta situación se conseguía con una incubación de unas 18h en medio DMEM sin MCSF y con un 10% de suero bovino (Soler y cols., 2001). Las células retenidas en G0 volvían a entrar en ciclo mediante la incubación con 1200U/ml de MCSF. A diferencia de lo que ocurre en linfocitos, la proliferación y la activación en macrófagos son fenómenos excluyentes, de tal forma que, si a este medio de proliferación se le añade LPS (100 ng/ml) o la citoquina TNF \times (100ng/ml), las células dejan de proliferar y pasan a un estado activo en el que expresan distintos marcadores de activación (Soler y cols., 2001).

3.3. Anticuerpos

Los diferentes anticuerpos primarios utilizados para la detección proteica en este estudio, tanto para análisis western blot como para inmunocitoquímica, se resumen en la tabla 1.

Los anticuerpos secundarios que permiten la inmunodetección en los estudios western blot provienen de la casa BioRad. Los secundarios utilizados en inmunocitoquímica se detallarán más adelante (Apartado 2.10.2).

Proteína	Procedencia	Tipo	Localización del epítipo	Dilución	
				W	IC
Kv1.3	comercial (Alomone)	policlonal	C- terminal, interno	1:200	1:100
Kv1.3	comercial (Alomone)	policlonal	bucle S1-S2, externo	-	1:200
Kv1.5	suero conejo	policlonal	C- terminal, interno	1:1000	1:1000
Kv1.5	suero conejo	policlonal	bucle S1-S2, externo	-	1:1000
Kir2.1	comercial (Alomone)	policlonal	C-terminal, interno	1:200	-
Caveolina	comercial (Molecular Probes)	policlonal		1:2500	1:250
Caveolina 1	comercial (Molecular Probes)	monoclonal		-	1:100
Transferrina	comercial (Molecular Probes)	monoclonal		1:1000	-
Kvâ2.1	hibridoma	monoclonal	N-terminal	-	-
Panbeta	suero conejo	policlonal	C-terminal, común	-	-
â-actina	comercial (Sigma)	monoclonal		1:50000	-

Tabla 1. Anticuerpos primarios. Procedencia, tipo, localización del epítipo, dilución utilizada. W, western, IC, inmunocitoquímica.

3.4. ADNc y sondas específicas.

Los ADNc correspondientes a la secuencia completa de los canales utilizados en la presente memoria han sido cedidos por diferentes laboratorios. El ADNc de rata de Kv1.3 fue cedido por T.C. Holmes de la Universidad de Nueva York. Kv1.3 está insertado en el vector de expresión de mamíferos pCMV entre dianas HindIII. Los ADNc de Kv1.5, Kvbeta1.1 y Kvbeta2.1 fueron proporcionados por M.M. Tamkun de la Universidad Estatal de Colorado. Kv1.5 humano se encuentra entre las dianas Xba I y Kpn I del vector pBK. Kvbeta2.1 murina está insertado en el mismo vector de expresión de mamíferos pero entre dianas Sma I. Por último, el ADNc de rata de Kvbeta1.1 está insertado entre dianas EcoRI del vector de expresión pBlueScript.

Los ADNc empleados en los análisis southern blot provienen de las amplificaciones realizadas sobre ARN de cerebro de ratón, utilizando para ello los cebadores que se muestran en la tabla 2. Estos productos de amplificación se subclonaron en el vector pSTBlue-1 utilizando el kit *pSTBlue-1 acceptor vector* (Novagen). La verificación del producto amplificado se realizó mediante análisis de restricción y confirmado con el kit de secuenciación Big Dye Terminator Cycle y un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystem).

3.5. Proteínas fluorescentes

Con el fin de estudiar el tráfico y la interacción de las subunidades que conforman los canales de potasio, se han generado quimeras con proteínas fluorescentes de la familia GFP. Para ello se han utilizado los vectores de expresión

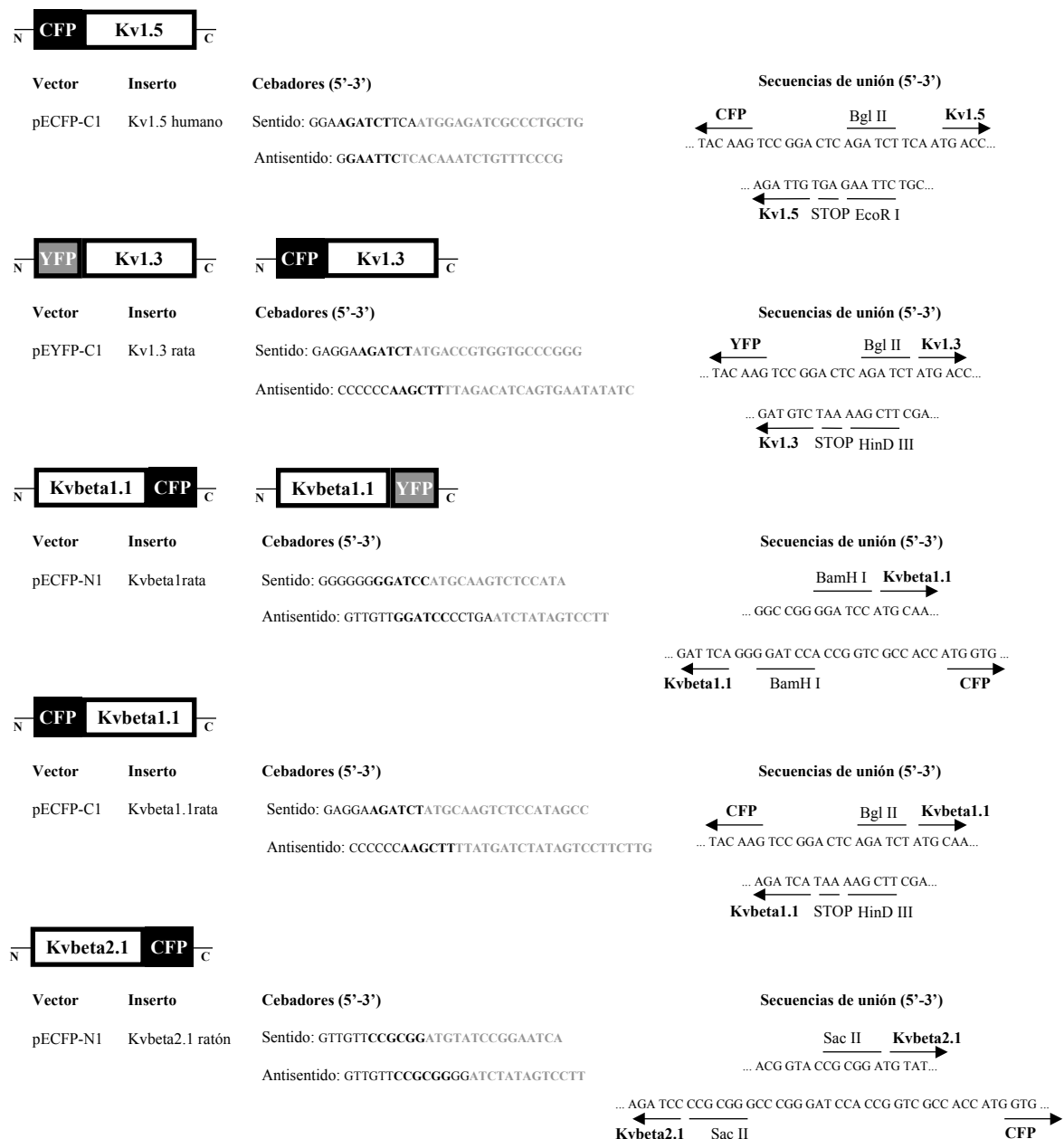


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas quiméricas. Gráfico resumen, vector de inserción, inserto, cebadores y enzimas utilizados

en mamíferos pFPs (Clontech). Estos vectores contienen una gran cantidad de dianas para enzimas de restricción que permiten insertar el ADNc en la posición que interese respecto a la proteína fluorescente. La estrategia utilizada en todos los casos ha sido amplificar la secuencia completa de la proteína de interés

mediante PCR. Las directrices seguidas en este proceso son:

- Utilizar una polimerasa de alta fidelidad.
- Los cebadores para esta amplificación contenían la secuencia de las dianas de los enzimas de restricción necesarios para insertar el ADNc en los vectores de expresión. Estas secuencias diana se

flanqueaban con nucleótidos adicionales que favoreciesen el corte del enzima de restricción.

- La inserción de nucleótidos adicionales en los cebadores permitía mantener la pauta de lectura entre la proteína fluorescente y el inserto.

- En el caso de que la proteína fluorescente quedase en el extremo C-terminal del inserto, el codón de terminación de este último se mutaba para que la traducción continuase.

Para obtener mayor eficiencia de ligación se parte de cuatro reacciones de amplificación de 50µl para cada inserto. Estas amplificaciones se hacen a un máximo de 25 ciclos para evitar

mutaciones. Este volumen se limpia y concentra mediante una columna de purificación de ADN y se digiere con los enzimas correspondientes. Por último se vuelve a limpiar mediante extracción en gel teniendo cuidado con el tiempo de exposición a rayos UV a la hora de extraer la banda. Por otro lado se digiere el vector en presencia de fosfatasa alcalina (CIP). La CIP defosforila los extremos fosfato de manera que evita la recircularización. Finalmente el fragmento se purifica en gel de agarosa eliminando así la fosfatasa.

Las reacciones de ligación se han realizado con la T4 ADN (Invitrogen) En la figura 1 se muestran esquemáticamente las distintas construcciones químicas realizadas. En el caso de las subunidades

	Nº de acceso	Secuencia (5'-3')	Pares de bases	Tamaño (pb)
Kv1.3	M30441	SENTIDO: CTCATCTCCATTGTCATCTTCTGA ANTISENTIDO: TTGAATTGGAAACAATCAC	741-765 1459-1440	718
Kv1.5	AF302768	SENTIDO: GGATCACTCCATCACCAG ANTISENTIDO: GGCTTCCTCCTTCTTG	3003-3020 3337-3320	334
Kir2.1	AF021136	SENTIDO: TGGCTGTGTGTTTTGGTTGATAGC ANTISENTIDO: CTTTGCCATCTTCGCCATGACTGC	297-320 555-532	235
Kvβ1.1	X70662	SENTIDO: ATGCAAGTCTCCATAGCCTGCACA ANTISENTIDO: CTATATTCATGCCAGTCTGCTTT	332-356 552-528	220
Kvβ1.2	L39833	SENTIDO: ATGCATCTGTATAAACCTGCCTGT ANTISENTIDO: CTGTATTCATGCCAGTCTGCTTT	89-113 330-306	241
Kvβ1.3	L47665	SENTIDO: ATGCTGGCAGCCCGACAGGGCA ANTISENTIDO: CTGTGCGCATGCCTGTGGTGCAG	54-78 328-304	274
Kvβ2.1	L48983	SENTIDO: CAGGATCCCCCTGTGAAAAGG ANTISENTIDO: CTGTAAAAGTGGAGCTGCTTTTG	138-162 317-292	179
Kvβ4	U65593	SENTIDO: ATGCAAGAGGGTATGGTCTGATA ANTISENTIDO: TAGGTCATGGCTCTCACAATCTCC	1-24 182-159	182
18S	X00686	SENTIDO: CGCAGAATCCCACTCCCGACCC ANTISENTIDO: CCAAGCTCCAACCTACGAGC	482-498 694-675	212

Tabla 2. Genes, número de acceso del *Gen Bank*, secuencia de los cebadores utilizados, pares de bases correspondientes a los cebadores y longitud de la banda amplificada.

que están unidas a fluoróforos distintos, la estrategia ha sido idéntica solo que el vector de destino se diferencia en el fluoróforo.

3.6. Análisis de la expresión génica

Los estudios de expresión y regulación génica de canales iónicos que se presentan en este trabajo se han realizado mediante RT-PCR semicuantitativa. La sensibilidad de esta técnica permite trabajar con pequeñas cantidades de ARN y a su vez valorar la expresión de transcritos de pequeña abundancia como es el caso de los canales iónicos en el sistema inmunitario.

La puesta a punto de este método se describe en la contribución que se adjunta y que sirvió de base para realizar los estudios de expresión en macrófagos y cerebro (Apartado 3.12). En la tabla 2 se resume la secuencia de los cebadores utilizados, así como su procedencia y la longitud del fragmento amplificado.

Utilizando el reactivo Tripure (Roche) se aísla ARN total a partir de los distintos tejidos y cultivos celulares. Este ARN se trata con DNasa para evitar contaminación de ADN genómico. Utilizando el kit de la casa *Ready to go RT-PCR* (Amersham), que permite la amplificación en un paso a partir de ARN total, se pone a punto las condiciones de reacción, es decir, la cantidad de ARN de partida y el número de ciclos de amplificación adecuados para no saturar la reacción. De esta forma, al encontrarnos en la fase exponencial de amplificación

podemos detectar pequeñas variaciones debidas a cambios en la expresión génica. Con este fin, se ha utilizado como control de expresión génica relativa el ARNr 18S.

El producto de amplificación se carga en un gel de agarosa con bromuro de etidio y se valora utilizando el programa Phoretix (*Nonlinear Dynamics*) sobre imágenes de los geles captadas por cámaras adaptadas a un transiluminador de UV directamente, o bien sobre los análisis southern blot realizados con sondas específicas para los productos génicos.

En la tabla 3 se muestra un resumen de las condiciones de amplificación para cada producto génico.

	ARN molde (μg)	T ^a de hibridación (C°)	N° de ciclos
Kv1.3	0,25	55	30
Kv1.5	1	55	40
Kir2.1	0,25	60	30
Kv β 1.1	1	60	40
Kv β 1.2	1	60	40
Kv β 1.3	0,25	60	40
Kv β 2.1	1	60	40
Kv β 4	1	60	40
ARNr 18S	0,1	55	10

Tabla 3. Genes, cantidad de ARN molde empleado, temperatura de hibridación y ciclos de amplificación utilizados para la reacción de amplificación en macrófagos y cerebro.

3.7. Extracción de proteína e inmunoprecipitación

Las células se lavan con PBS frío y se rascan en un volumen de 1ml de tampón de extracción por cada tres placas de

100mm de células. De esta forma se consigue concentrar la proteína para poder cargar grandes cantidades en los geles de acrilamida. El tampón de extracción se compone de 320mM sacarosa, 5mM Na₂HPO₄ (pH 7,4) y 1mM EDTA, al que se le añade inhibidores de proteasas: 1 µg/ml aprotinina, 1µg/ml leupeptina, 86µg/ml yodoacetamida y 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF). Las células se lisan en un homogenizador de vidrio y se centrifuga 10min a 3000rpm. El sobrenadante recupera y se centrifuga a 15.000rpm durante 1h. Si el objetivo es obtener membranas totales, como lo ha sido en el caso de las inmunoprecipitaciones, esta segunda centrifugación se realiza a 150.000g durante 1h 30min. Seguidamente se resuspende el pellet en tampón Hepes 30mM o en el tampón de inmunoprecipitación. Todo este proceso se realiza en frío. La valoración de la cantidad de proteína extraída se realiza utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad).

La inmunoprecipitación se realiza a partir de un mínimo de 200µg de extracto de proteína. El tampón de inmunoprecipitación está compuesto de 1% Tritón, 10% glicerol, 50mM Hepes (pH7,2) y 150mM NaCl, al que se le añade los inhibidores de proteasas. El volumen mínimo de inmunoprecipitación es de 150µl. Se realiza un prelavado con proteína A sefarosa (10µl) incubándose durante 2h a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifuga la muestra para bajar la proteína A (200G) y se descarta el pellet, descartando así las

uniones inespecíficas a la proteína A. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo y se añade el anticuerpo en proporción de 4ng/µg de proteína y se deja en agitación toda la noche. Posteriormente se añade proteína A sefarosa (20µl) y se incuba durante 2h. Por último se lavan los inmunoprecipitados con tampón de lavado 0,1% Tritón, 10% glicerol, 50mM Hepes (pH7.2) y 150mM NaCl, se resuspenden en 70µl de tampón de carga de proteínas Laemmli (1x) y se hierve 5min.

Las muestras se separan en geles SDS-PAGE al porcentaje de acrilamida-bisacrilamida adecuado para separar la proteína de interés. Seguidamente se transfieren a membranas de nitrocelulosa para realizar los análisis western blot.

3.8. Sistemas de expresión heteróloga

3.8.1. Células HEK 293

La expresión transitoria de proteínas en este tipo celular se ha realizado utilizando el kit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) con alguna modificación en las cantidades de ADN y el tiempo de incubación con el medio de transfección. La cantidad de ADN y el tamaño de las placas depende del propósito de la transfección. Esquemáticamente se resumen los parámetros a tener en cuenta en el caso de transfecciones para visualizar en microscopio:

- Las células se crecen sobre cubres de 22 por 22mm recubiertos de gelatina en placas de 35mm. Los cubres con gelatina se esterilizan previamente exponiéndolos 20min a luz UV.
- La confluencia adecuada para la transfección en el caso de las células HEK es de 70-80%.
- En cada placa se transfecta un máximo de 1µg de ADN de la subunidad a analizar. En el caso de las cotransfecciones con distintos ADNc la cantidad de ADN total no superaba 1µg. Sin embargo, los estudios de colocalización con distintos marcadores no tiene limite de cantidad de ADN. La cantidad depende así de la expresión adecuada para visualizar el marcador en el microscopio. También señalar en este apartado que, en las transfecciones con subunidades beta, las cantidades no son mayores de 0,05µg. Esta reducción es necesaria para no saturar las muestras con señal citoplasmática y poder visualizar las interacciones alfa-beta en membrana.
- El tiempo de incubación de las células con el medio de transfección es menor al que indica el protocolo del kit y varía entre 3 y 6h. Tiempos de incubación mayores provocan cambios en la morfología y viabilidad celular. Después de esta incubación se cambia a medio de crecimiento normal y se procede a tratar las muestras 24h después de la transfección.

En el caso de la transfecciones para registros electrofisiológicos se reduce el tiempo de incubación con el medio de transfección y se empiezan a registrar corrientes horas después del cambio de medio de transfección a medio normal de crecimiento.

Cuando el objetivo de la transfección es obtener grandes cantidades de proteína para analizar interacciones por métodos bioquímicos, se utilizan mayores cantidades de ADN según el protocolo del kit y se aumentan los tiempos de transfección.

3.8.2. Ovocitos de *Xenopus*

Los ADNc correspondientes a Kv1.3 y Kv1.5 se subclonaron en el vector de expresión pCDNA3. La generación de los ARNc de estos canales se realizó mediante la T7 ARN polimerasa utilizando el kit mMESSAGE mMACHINE (Ambion). El ARNc se inyectó con un *Variable Nanoject (Drummond Scientific Company)*. La cantidad de ARNc total que se inyecta en el ovocito es de 10ng independientemente del ratio entre canales utilizado. Pasadas 24h, se retira parcialmente la capa folicular mediante una incubación de 30min con colagenasa tipo 1A 0.25mg/ml (Sigma). A continuación se mantuvieron los ovocitos a 15-16°C en solución de Barth estéril durante tres días (88mM NaCl, 1mM KCl, 0,33mM Ca(NO₃)₂, 0,41mM CaCl₂, 0,82 mM MgSO₄, 2,40mM NaHCO₃ y 20mM

HEPES a pH 7,5, suplementado con antibióticos), pasados los cuales se realizaron los registros.

3.9. Extracción e inmunoprecipitación de *lipid rafts*

Los *lipid rafts* están compuestos de gran cantidad de colesterol y esfingolípidos, lo que les confiere resistencia a detergentes no iónicos. Esta característica es el fundamento de las técnicas que permiten extraer estos microdominios del resto de la membrana plasmática. En concreto, el protocolo que se ha utilizado se puso a punto a principio de los noventa en el laboratorio de M.P. Lisanti (Sargiacomo y cols., 1993). Este grupo estaba interesado en el papel de la caveolina como molécula adaptadora entre proteínas, y siguiendo sus estudios, se han realizado extracciones de *lipid raft* e inmunoprecipitaciones de estos complejos insolubles.

El material de partida mínimo son 5 placas de 100mm de células HEK confluentes que han sido transfectadas durante la noche con los canales de interés, Kv1.3 y Kv1.5. Se lavan con tampón PBS frío, se rascan en 2ml de PBS por placa y se depositan en un tubo de 50ml. Para arrastrar todas las células de las placas se pasan 4ml de PBS por las placas ya rascadas y también se depositan en el tubo. Se centrifuga durante 8min a 4500rpm y se descarta el sobrenadante. El pellet se resuspende en 0.5 ml de tampón MBS (25mM Mes, 150mM NaCl, a pH 6.5) con

0.5% de Tritón e inhibidores de proteasas (Apartado 2.7). La cantidad de detergente se ha de ajustar para cada tipo celular. La resuspensión se pasa a un homogenizador suave de 1ml. Con células HEK se homogeniza 18 veces y del material resultante se introducen 500µl en un tubo de ultracentrífuga de 12.5ml. Se añaden 1.5ml de sacarosa al 53.28 %, quedando así la muestra a una concentración final del 40% de sacarosa. Seguidamente se añade un gradiente de densidad de sacarosa sobre la muestra desde 30% al 5% en la parte superior del tubo y este se equilibra para la centrifugación. Se utiliza un rotor basculante y se centrifuga a 39000rpm alrededor de 22 horas a 4°C. Si la extracción ha sido correcta se ha de poder visualizar una fracción más turbia a la mitad del tubo (10-20% de sacarosa) correspondiente a parte de la fracción resistente a la solubilización. La fracción soluble queda en el fondo del tubo (40% de sacarosa). A continuación se extraen cuidadosamente alícuotas de 1ml desde la superficie del tubo evitando mezclar el gradiente. El pellet se resuspende por sonicación en 100µl de tampón de carga de proteínas. Para visualizar la proteína se realiza un western blot con 25µl de cada alícuota. Para comprobar que las condiciones de extracción son adecuadas se utiliza como control positivo la caveolina y como negativo el receptor de la transferrina. Este último no ha de aparecer en las alícuotas correspondientes a la fracción

flotante, es decir, la fracción resistente al detergente.

La inmunoprecipitación de los complejos resistentes a tritón se realiza a partir de las fracciones flotantes. Al material de partida se le añade el mismo volumen de tampón MBS 2X con 0,1% de tritón e inhibidores de proteasas, siendo la concentración final de 0,05% de tritón, y manteniendo así los complejos insolubles. Se incuba 45 minutos a 4°C en este tampón. Posteriormente se añade proteína A sefarosa y se incuba durante 2h a 4°C; pasado este tiempo, se centrifuga para bajar la proteína A (200G) y se descarta el pellet. Los *lipid rafts* suelen unirse inespecíficamente a la proteína A, de ahí que se haga esta incubación y además se utilice un control que es la inmunoprecipitación sin anticuerpo. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo y se añade el anticuerpo anticaveolina (5ng/ml) y se deja en agitación toda la noche. Posteriormente se añade proteína A sefarosa y se incuba durante 2h. Por último se lavan los inmunoprecipitados con tampón PBS, se resuspenden en 70µl de tampón de carga de proteínas y se hierve 5min. El material resultante se centrifuga, encontrándose en el sobrenadante las proteínas inmunoprecipitadas.

3.10. Técnicas de microscopia

3.10.1. Microscopia electrónica

La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico posee una mayor potencia amplificadora que el óptico ya que utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4Å. La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0,5 Å.

Los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico ya que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite la observación de muestra en cortes ultrafinos. Para utilizar un TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms.

En la presente memoria se muestran imágenes de microscopía electrónica realizadas con un microscopio Hitachi 600AB. Para la obtención de las muestras las células se criofijaron a alta presión utilizando un EMPact de la casa Leica.

3.10.2. Inmunocitoquímica

Se ha trabajado con varios protocolos de inmunocitoquímica en función de los anticuerpos utilizados y del tipo de marcaje que se pretendía. Sin embargo, los pasos fundamentales estos estudios son comunes:

- Lavado previo de las células con tampón PBS a 37°C para no provocar un choque térmico a las células. Por lo general son 3 lavados de 3min de duración. Si las células están expresando alguna proteína fluorescente se comienza a proteger de la luz las preparaciones en este punto.

- Fijación: Por lo general la fijación se ha realizado en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS a 37°C. Esta fijación respeta todas las estructuras. Sin embargo, para determinados anticuerpos como la caveolina 1, los epítomos no quedan expuestos con el paraformaldehído y se necesita la fijación por metanol. El metanol ha de estar a -20°C. Esta fijación es más

agresiva y también afecta a la fluorescencia de las proteínas GFPs.

- Permeabilización: Se han realizado dos tipos de permeabilización sin observarse cambios cualitativos, una con tres incubaciones de 5min de PBS, CHAPS 0.5% (p/v), y otra permeabilización de 10min con PBS Tritón 0.1%(v/v). Sin embargo, siendo la permeabilización con CHAPS reversible, se ha añadido este componente a todas las soluciones del protocolo de inmunocitoquímica. En el caso de la fijación por metanol este paso no es necesario.

- Bloqueo: La solución de bloqueo que se ha empleado es PBS, 10% (v/v) suero de cabra y 5% (p/v) de leche en polvo desnatada. Esta solución es eficaz siempre que el anticuerpo primario no sea originario de cabra. La incubación dura entre 20min y 1h.

- Incubación con el anticuerpo primario: La solución está compuesta de PBS con 10% suero de cabra. La incubación dura entre 1 y 2h. La concentración de los anticuerpos es siempre mayor que la utilizada para los análisis western blot y viene detallada en la tabla 1.

- Incubación con el anticuerpo secundario: La solución está compuesta de PBS con 1% de albúmina. La incubación es de 45min. La concentración de los secundarios es 1:500 para los Alexa (Molecular Probes).

- Entre cada uno de los pasos descritos a partir del bloqueo se realizan tres lavados con PBS de 5min de duración.

Una técnica que permite visualizar de forma clara las interacciones entre proteínas de membrana es la denominada “parchado inducido por anticuerpo” (*antibody induced patching*). Ésta consiste en una inmunocitoquímica en la que la unión de los anticuerpos primario y secundario a proteínas de membrana de células vivas provoca la formación de agregados. Si estas proteínas están interaccionando con otras de su alrededor, estas otras han de seguir el nuevo patrón de distribución. Para este propósito se ha de disponer de un anticuerpo que reconozca un epítipo expuesto al exterior de la célula. En nuestro caso se ha utilizado con anticuerpos que reconocen el bucle entre S1 y S2 de los canales Kv1.3 y Kv1.5.

El protocolo consiste en:

- Dos lavados de las células con PBS a 37°C de 3min de duración.
- Incubación en medio de cultivo HEPES con el anticuerpo contra el epítipo externo a concentración 1:1000.
- Tres lavados con PBS a 37°C de 3min de duración.
- Incubación en medio de cultivo HEPES con el anticuerpo secundario a concentración 1:500.
- Fijación con paraformaldehído 4% en PBS.
- A partir de aquí se sigue el protocolo normal de inmunocitoquímica para marcar la otra proteína de interés.

3.10.3. Microscopia de fluorescencia

A diferencia de la microscopia óptica convencional, en la microscopia de fluorescencia la luz incidente, que proviene de una fuente potente, atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar la muestra fluorescente. La luz emitida por la muestra, reflejada y fluorescente, atraviesa a su vez un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente. Estos microscopios actualmente son de epifluorescencia, donde un espejo dicróico permite reflejar determinadas longitudes de onda y separa así la luz de excitación de la emitida por la muestra, incrementando la capacidad para filtrar la luz del microscopio.

El tipo de fuente de luz, el juego de filtros utilizado, los espejos dicróicos y los objetivos determinan la resolución del microscopio. Actualmente, en los microscopios mejor equipados, el equipo de captación y análisis de imágenes permite manejar todos los componentes del microscopio.

En la presente memoria se presentan imágenes y análisis realizados con un microscopio invertido de fluorescencia de la casa Nikon, equipado con un objetivo de inmersión 100x. El microscopio se maneja con el programa SlideBook 3.0.

3.10.4. Microscopia confocal

En la microscopia confocal se consigue discriminar la luz que proviene del plano de foco de la que no mediante un juego de diafragmas. La profundidad del plano de foco viene determinada por la apertura numérica del objetivo y el diámetro del diafragma. En este caso, no se ilumina toda la muestra, sino que en cada momento sólo se ilumina un pequeño punto a una determinada profundidad. Para ello se utilizan fuentes de luz de gran potencia, generalmente haces de láser. El diafragma

colocado antes del detector permite que sólo la fluorescencia emitida por el punto excitado se registre. La muestra es barrida por el láser formándose la imagen general en el monitor del ordenador acoplado al microscopio.

Se han utilizado dos microscopios confocales para la realización de diversos experimentos recogidos en esta memoria, un microscopio LSM510 de la casa ZEISS y un microscopio de la casa Leica TCS SL. Los objetivos de inmersión utilizados han sido 63X y 100X.

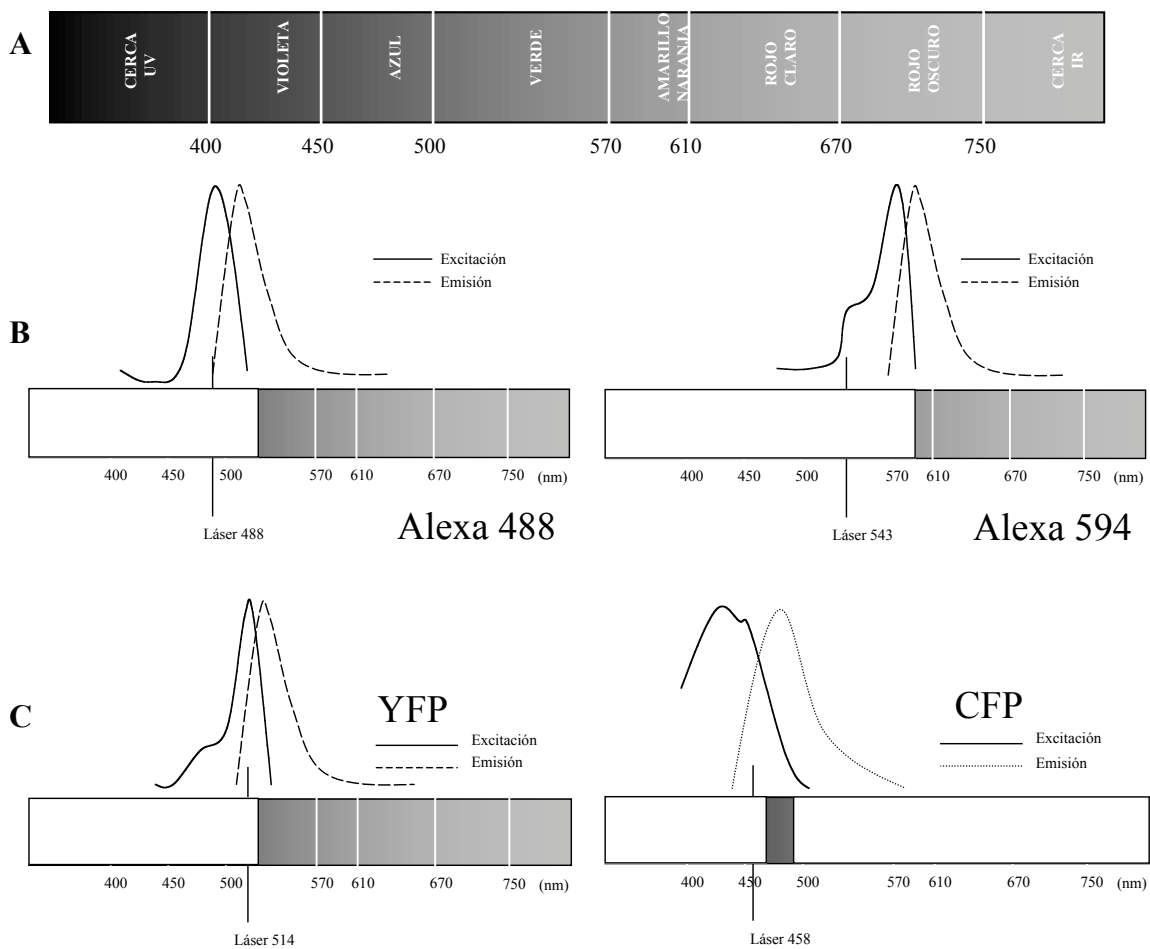


Figura 2. Fluoróforos utilizados. A, colores del espectro de luz. B, fluorocromos asociados a anticuerpos secundarios. C, fluoróforos utilizados en las construcciones químicas.

3.10.4.1. Fluoróforos

La fluorescencia es un fenómeno molecular en el que una sustancia absorbe luz de determinado color y casi instantáneamente irradia luz de otro color, de menor energía, es decir, de mayor longitud de onda. En los primeros tiempos de la microscopia de fluorescencia, los investigadores miraban esta fluorescencia primaria o también llamada autofluorescencia. Hoy en día se han desarrollado muchas tinciones que poseen alta fluorescencia y que específicamente tiñen partes de la muestra. Este método se llama fluorescencia indirecta y estos tintes se llaman fluorocromos. Cuando los fluorocromos están conjugados con otras sustancias orgánicamente activas, como anticuerpos o ácidos nucleicos, son llamados fluoróforos.

En la figura 2 se muestra un esquema de los fluoróforos utilizados y la configuración utilizada en el microscopio confocal para su visualización.

3.10.4.2. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Los experimentos de FRAP consisten en la quema irreversible de moléculas fluorescentes de un área concreto mediante un láser a máxima potencia. Seguidamente se monitoriza la recuperación de la fluorescencia en ese área debida a la difusión de moléculas fluorescentes no quemadas que existen en

los alrededores. Esta técnica tiene su origen en los años setenta utilizando fluoróforos de naturaleza lipofílica o hidrofílica, como es el caso de la fluoresceína, que se acoplaban a proteínas y lípidos. La movilidad de las moléculas se evaluaba tras la microinyección de éstas en células vivas (Edidin y cols., 1976). El descubrimiento de la proteína GFP y su uso como marcador de proteínas en estudios de localización, han permitido el desarrollo de la técnica del FRAP para visualizar y cuantificar procesos dinámicos en células vivas.

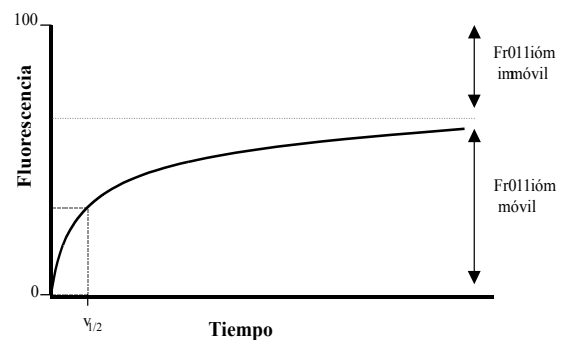


Figura 3. Representación de un análisis FRAP.

Los programas de análisis de imágenes que acompañan los microscopios confocales permiten cuantificar la recuperación de fluorescencia en el tiempo. Los valores que se obtienen se ajustan a una regresión no lineal. A partir de un análisis FRAP se obtienen dos parámetros generales: el tiempo de difusión y la fracción móvil.

-Tiempo de difusión: es el tiempo en el que se ha recuperado la mitad de la fluorescencia que se alcanza en el estado estacionario. Esta variable es indicativa de la capacidad de difusión de la molécula fluorescente, o en el caso de una molécula

en membrana, de la movilidad lateral. A partir de ella se puede calcular el coeficiente de difusión propio de cada molécula en un medio determinado.

-Fracción móvil: es el porcentaje de fluorescencia recuperada una vez alcanzado el estado estacionario. Esta variable suele estar alejada del 100% cuando se trabaja con moléculas de membrana indicando que la membrana plasmática está estructurada lateralmente. A partir de ella se calcula la fracción inmóvil que es simplemente el porcentaje restante. Esta fracción inmóvil refleja la compartimentación en microdominios pero también se relaciona con una difusión translacional anómala.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio comparativo de la movilidad en membrana entre dos poblaciones de células que expresaban proteínas quiméricas: Kv1.3-YFP y Kv1.3-YFP + Kv1.5-CFP. El objetivo del experimento ha sido investigar la posible asociación diferencial a *lipid rafts* del canal Kv1.3 por sí solo y cuando forma complejos con Kv1.5. La fracción inmóvil se ha tomado como el grado de asociación a *rafts*, ya que estos tienen una movilidad reducida y el tiempo de difusión se ha considerado indicador de la movilidad lateral en membrana que tiene el canal.

Los experimentos, como se indica en el apartado de materiales y métodos del artículo, se han realizado *in vivo*, a temperatura ambiente, sobre cubres incluidos en placas de cultivo de 35mm. De esta forma, las células permanecen en su

medio de cultivo DMEM mientras se realiza el experimento. Las placas a su vez, eran reemplazadas cada dos horas para evitar variabilidad debida a largas exposiciones a temperatura ambiente y alteraciones en el medio.

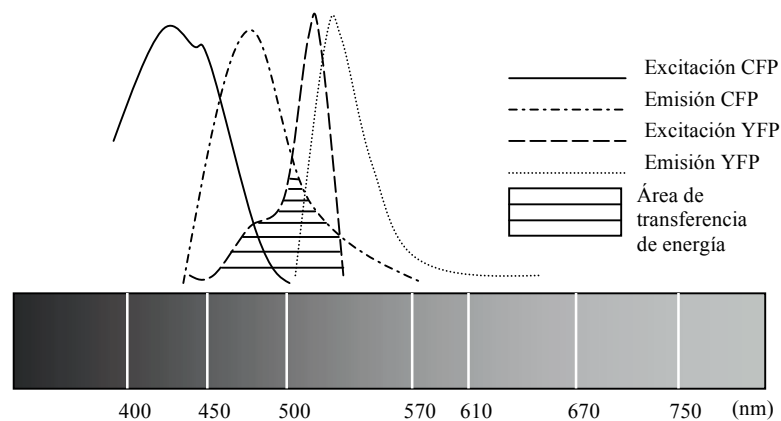
De cada célula analizada se escogían tres regiones de quema del mismo tamaño con el fin de disminuir variaciones locales de la membrana. Además, dos correcciones se tuvieron en cuenta, la pérdida de fluorescencia a lo largo del tiempo por la sucesiva captación de imágenes, y los cambios de intensidad debidos a fluctuaciones en la potencia del láser. Para ello se ha utilizado un factor de corrección en cada tiempo en el que se ha tenido en cuenta las variaciones de fluorescencia de las regiones no quemadas.

3.10.4.3. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Esta técnica de transferencia de energía se utiliza para detectar proximidad entre fluoróforos separados por distancias menores a 10nm. El par de fluoróforos se compone de un donador y un aceptor. Este par se caracteriza porque el espectro de emisión del fluoróforo donador se superpone con el espectro de excitación de la molécula aceptora (Figura 4).

La eficiencia de transferencia de energía (E) está relacionada con la distancia entre donador y aceptor (r) por la siguiente fórmula: $E = 1/[1 + (r/R_0)^6]$

Figura 4. Representación de los espectros de excitación y emisión de un par de fluoróforos en los que se produce transferencia de energía. CFP, donador; YFP, aceptor.



La R_0 para un par de fluoróforos determinado está en función del grado de superposición de espectros, del rendimiento cuántico del donador (ratio entre energía absorbida y fluorescencia emitida) y de la orientación de ambas moléculas. Así, la resolución de FRET viene definida por R_0 , que tiene valores menores a 70 Å.

Como el fenómeno FRET se da en distancias similares al tamaño de proteínas, es una herramienta de trabajo en el estudio de interacción de éstas, muy potente también al acoplarse a la microscopía confocal.

La transmisión de energía se pone de manifiesto por la sensibilización de la fluorescencia del aceptor, el enmascaramiento (*quenching*) de la fluorescencia del donador, y la disminución del tiempo de emisión del donador. En la presente memoria se utilizan dos métodos para evaluar este fenómeno, uno que detecta el enmascaramiento y otro la sensibilización:

- Quema del aceptor (*Acceptor Photobleaching*)

Esta aproximación para medir FRET se fundamenta en el enmascaramiento de la fluorescencia del donador en presencia de la molécula aceptor. Para ello se compara la intensidad del donador antes y después de quemar el aceptor en una región de la célula. Si existe FRET la fluorescencia del donador tiene que aumentar una vez se destruye al aceptor. Así, la transferencia de energía se cuantifica simplemente con la siguiente fórmula: $E = (F_d - F_a) / F_d$

Donde F_d es la intensidad de fluorescencia del donador después de quemar el aceptor y F_a es la fluorescencia del donador inicial.

Este método permite un sencillo análisis cuantitativo de FRET. Sin embargo, al basarse en la destrucción del fluoróforo aceptor, no es adecuado para monitorizar FRET a lo largo del tiempo, sino que se debe utilizar en muestras fijadas o en medidas puntuales de una determinada región celular.

En esta memoria se muestran análisis FRET para demostrar la interacción

de Kv1.3-YFP y Kv1.5-CFP en células HEK transfectadas. Los experimentos se realizaron sobre muestras fijadas en paraformaldehído al 4%. Se han utilizado el microscopios confocales de la casa ZEISS y Leica. El objetivo utilizado en ambos casos es de inmersión 63X. Las proteínas fluorescentes se excitaron a 458 (CFP) y 514 (YFP) nm utilizando baja potencia y se captaba la fluorescencia con los filtros 475 a 495 para CFP y longitudes mayores de 530 para YFP.

Seguidamente se quemaba YFP con el láser a máxima potencia obteniendo un reducción de un 80% de intensidad. A continuación se volvía a captar la fluorescencia de ambos fluoróforos. Los aumentos de fluorescencia del donador (CFP) que se recogían tras la quema del fluoróforo aceptor (YFP), se corregían teniendo en cuenta los cambios de fluorescencia que presentaban las zonas de la célula no quemadas.

- Sensibilización de fluorescencia del aceptor

Éste es un método extendido en el análisis de interacciones *in vivo*. En él se determina la fluorescencia del aceptor que se produce al excitar la molécula donadora. Para ello se establecen un juego de filtros, uno para la excitación del donador y otro que permita capturar la emisión de la molécula aceptor. La cuantificación de FRET por esta técnica debe tener en cuenta factores de corrección adecuados para

minimizar la superposición que pueda existir entre los canales del donador y aceptor, entendiéndose por canales el rango del espectro que se delimita para cada fluoróforo.

$$FRET_{real} = FRET - (a * F_{CFP}) - (b * F_{YFP})$$

Donde **a** es la fracción de fluorescencia de CFP que pasa por el canal FRET en ausencia de aceptor y **b** es la fracción de fluorescencia de YFP que pasa por el canal de FRET en ausencia de donador. F_{CFP} y F_{YFP} son las intensidades de fluorescencia para cada fluoróforo.

En esta memoria se presentan experimentos de interacción entre la subunidad alfa Kv1.3-YFP y las subunidades beta reguladoras Kvbeta1.1-CFP y Kvbeta2.1-CFP. Para este análisis se mantenían las células vivas en cubres redondos montados sobre una cámara que mantenía las células en medio DMEM. Los filtros utilizados fueron YFP (excitación 500/20; emisión 535/30), CFP (excitación 436/10; emisión 470/30) y FRET (excitación 436/10; emisión 535/30).

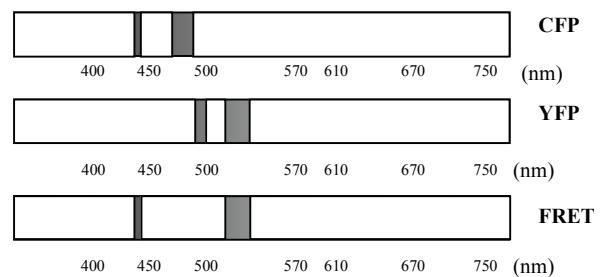


Figura 5. Representación de la configuración de los distintos canales utilizados para el análisis FRET con el microscopio de fluorescencia

Se muestra la imagen del fluoróforo donador, del fluoróforo aceptor. Después se procede a excitar la molécula donadora y a capturar la emisión de la aceptor. El canal FRET cuantifica en escala de color (rojo = alta, azul = baja) la emisión por transferencia de energía después de las correcciones ($\mathbf{a} = 0.5$, $\mathbf{b} = 0.02$). En las imágenes se ha sustraído el ruido de fondo.

3.11. Electrofisiología

Con el fin de registrar las corrientes de potasio de estudio en este trabajo se ha utilizado la técnica *patch-clamp* en su configuración *whole cell*. Esta técnica desarrollada a principios de los ochenta (Hamill y cols., 1981), permite fijar el potencial de membrana de una célula o parte de su membrana y registrar las corrientes iónicas que aparecen al aplicar potenciales hiperpolarizantes y despolarizantes. El fundamento de esta técnica consiste en formar un sello de alta resistencia entre una micropipeta de vidrio con un microelectrodo en su interior y la membrana de la célula. La micropipeta se llena con la solución interna cuya composición varía dependiendo de la corriente a estudiar. Al poner la pipeta sobre la superficie de la célula se aplica una presión negativa mediante una ligera succión de tal forma que la porción de la membrana localizada en la luz de la pipeta se invagina formando un sello de alta resistencia. A partir de este punto, para conseguir la configuración *whole cell* se

aplica una succión adicional rompiendo la porción de la membrana invaginada. Tras la rotura del parche de la membrana entran en contacto la solución interna y el citoplasma celular cambiando inmediatamente la composición de este último. En estas condiciones se fija el potencial de membrana al potencial deseado y mediante distintos protocolos se registra la corriente deseada. La corriente resultante es la suma de todos los canales presentes en la membrana activables con las condiciones determinadas o también llamada corriente macroscópica.

El equipo utilizado, las soluciones empleadas y los protocolos realizados para los distintos registros vienen detallados en cada una de las contribuciones que se adjuntan. Sin embargo, a continuación se muestra una breve descripción de los análisis realizados para estudiar la actividad del complejo generador de la corriente de salida de potasio dependiente de voltaje.

En la figura 6A se muestra un registro característico de una corriente de potasio de salida al aplicar una serie de pulsos despolarizantes desde -60mV a $+50\text{mV}$. A partir de estos registros y mediante la ecuación de Boltzmann que relaciona la conductancia (G) con el voltaje (V) se obtienen dos parámetros característicos del *gating* del canal a estudiar:

$$G/G_{\text{max}} = 1/(1 + \exp(V_{1/2} - V/k))$$

Donde $V_{1/2}$ es el potencial al cual la mitad de los canales están abiertos o lo que lo mismo, al que se alcanza la mitad de la conductancia máxima. La k refleja la rapidez con la que se alcanza el máximo de conductancia, o también el grado de sensibilidad al voltaje. En la figura 6B se muestra la curva conductancia-voltaje a la que se ajusta la ecuación de Boltzmann. En esta gráfica la $V_{1/2}$ es el punto de inflexión de la curva y k es la pendiente.

La figura 6C representa la apertura de los canales de potasio de una célula al aplicar un único pulso despolarizante. En ella se han remarcado tres regiones que corresponden a las zonas en las que se estudia la activación (I), la inactivación (II)

y la deactivación del canal (III). A partir de un protocolo de pulsos similar al de la figura 6A se calcula la constante de tiempo de activación para cada voltaje a partir de la función:

$$I(t) = A(1 - \exp(-t/\tau))$$

Donde τ es la constante de tiempo de activación de tal forma que a mayor valor más lentamente se activa el canal.

Con el mismo protocolo de pulsos se calculan las constantes de inactivación y deactivación pero ajustando a otra función exponencial:

$$I(t) = A \times \exp(-t/\tau)$$

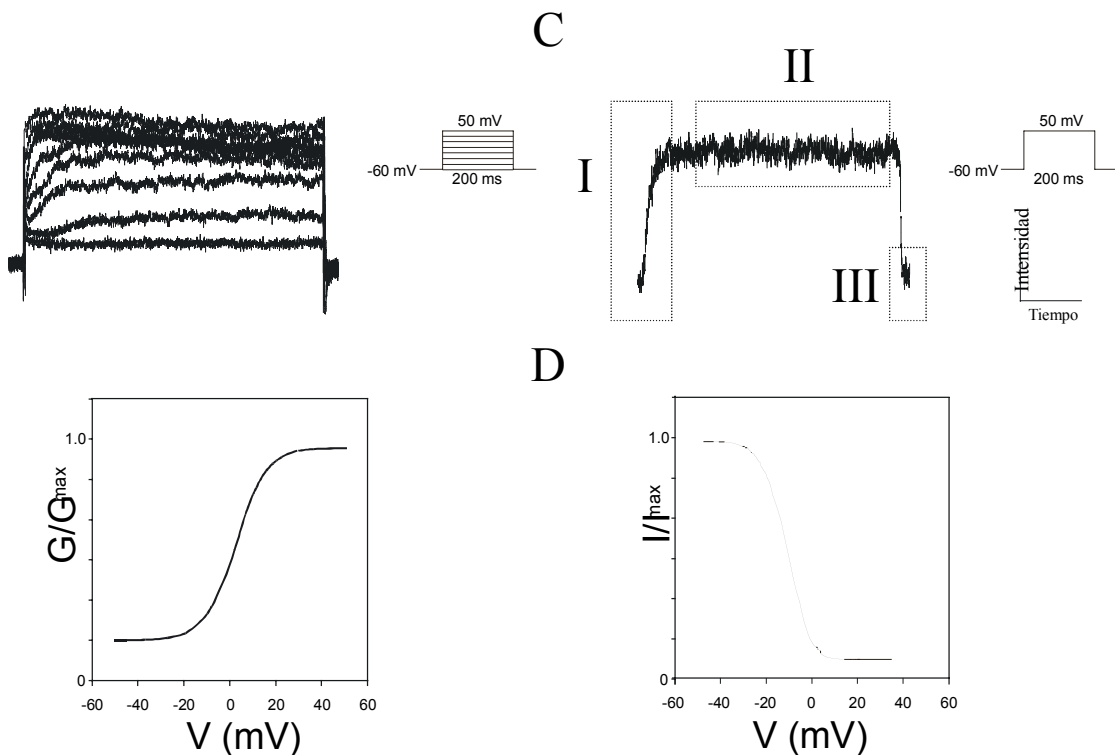


Figura 6. Estudio electrofisiológico de las corrientes de potasio dependientes de voltaje. A, registro representativo de corrientes de salida en configuración *whole cell* mediante un protocolo básico. B, Gráfica del ajuste conductancia –voltaje representativa que se obtiene a partir de este registro. C, Registro de un pulso único en el que se definen las regiones de estudio de la activación, la inactivación y la deactivación. D, gráfica representativa de los estudios de inactivación respecto al la dependencia del voltaje

Donde τ es la constante de inactivación o deactivación. Cuanto mayor es el valor de τ , más lentamente inactiva o deactiva el canal.

El grado de inactivación del canal según el voltaje se estudia utilizando un protocolo de pulsos diferente al descrito anteriormente. En este caso se aplica un potencial durante un tiempo largo pasando a continuación un pulso despolarizante fijo. El potencial al que se mantiene la célula antes de despolarizarla es cada vez más positivo, de tal forma que cada vez hay más canales inactivos que no se abren. En la figura 6D se muestra una gráfica representativa de la inactivación llamada *steady-state inactivation curve*. La pendiente de esta curva define la sensibilidad de la inactivación a pequeñas variaciones del voltaje.

One-Step Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for Semiquantitative Analysis of mRNA Expression

G. Fuster, R. Vicente, M. Coma, M. Grande and A. Felipe

Membrane Protein Molecular Physiology Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

SUMMARY

Analysis of mRNA expression is one of the main targets of scientific research. However, its quantification can be difficult, especially when dealing with low-expression mRNAs (ionic channels, carriers, receptors, etc.) or when only small samples are available (human biopsies). Here we suggest an easy, rapid and reliable method to assess semiquantitative changes in mRNA that combines several technical improvements: i) one-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from total RNA; ii) addition of ethidium bromide to the gel, which provides a more homogeneous binding to DNA; iii) direct capture of the gel image using a charged-coupled device camera and then saving the image on computer before quantification, which increases resolution and thus improves and shortens the analysis; and iv) the use of 18S rRNA as a control, which is especially useful when samples from activation, differentiation and proliferation models are used. The technique was validated by checking the system conditions of image capturing and quantification. This was corroborated by a study of Kv1.3 ion channel expression in the brain. In these conditions, the wide range of PCR cycles and total RNA allows us to correlate relative gene expression and direct input of the target gene. © 2002 Prous Science. All rights reserved.

Key words: Gene expression - Kv1.3 - Potassium channel - RT-PCR

INTRODUCTION

The study of the variation in mRNA levels is one of the most important issues in a number of disciplines. Among others, some of the methods currently used include Northern blot, *in situ* hybridization, RNase protection assays and reverse transcription polymerase chain reaction assays (RT-PCR) (1). RT-PCR is very sensitive and powerful, especially when studying rare mRNAs (ion channels, neurotransmitter receptors, etc.) and when only a small amount of sample is available (human biopsies). Competitive PCR has been used to evaluate the total number of copies for a specific mRNA. The lack of a suitable competitor cDNA pair and the exact PCR conditions for all sets of primers hinders the interpretation of results (2). Recent advances in RT-PCR have led to real-time PCR (3), which detects the PCR product after each cycle of the reaction. However, this method is far beyond the scope of most studies.

In all PCR approaches, the amount of amplified target is only directly proportional to the initial amount of sample during the linear range of amplification (2). For this reason, the purpose of many biological studies is to assess relative gene expression rather than the absolute quantity of mRNA molecules in various types of cells or

tissues under different stimuli and physiological or pathological situations. In the classical endpoint of the RT-PCR approach, the linear range is determined empirically by amplification of various amounts of cDNA in the same number of cycles. Relative gene expression can be estimated using a "housekeeping" gene such as β -actin or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The final PCR product is detected by incorporation of a radiolabel (4), by Southern blotting with labeled target cDNAs (5) or by staining an agarose gel with ethidium bromide (6, 7). The duration of the analysis and the number of possible variations increase with the number of steps the assay requires between the target RNA and the final product.

Here we suggest a simple and rapid protocol for semiquantitative evaluation of ion channel mRNA abundance by one-step RT-PCR directly from total RNA. Our method required fewer manual steps than standard procedures, which increased the reliability of the results. It was validated by analyzing the voltage-gated potassium channel Kv1.3, a low-abundance mRNA target gene in the brain, and using 18S rRNA as a reference gene, which is especially helpful in studies dealing with proliferation, activation and differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Hardware, software, basic equipment and general procedure

We used a new generation of RT-PCR beads that improve efficiency and involve less manipulating steps, making the RT-PCR results more reliable. The only manual step required was the addition of the desired amount of RNA and the primer set in the initial part of the reaction. The program set in the thermocycler led to one-step RT-PCR reaction with no manipulations. No aliquots between cDNA synthesis and PCR were necessary. The final step was the gel loading, with no further manipulations, as ethidium bromide was supplemented before pouring. According to our PCR product size, a 30-min electrophoresis was sufficient. Gels were placed in a UV transilluminator at a 312 nm wavelength and recorded through a UV-filtered charged-coupled device camera connected to the video port of a personal computer (minimal needs for the system: Pentium 100 MHz, 64 Mb RAM). For the densitometric analysis, we used Phoretix software (Phoretix International, Newcastle, England, UK). The total estimated time from RNA to the densitometric analysis was less than 120 min, although it may vary according to the target gene.

RNA isolation and RT-PCR reaction

Young adult Swiss mice were lightly anesthetized with diethylether and sacrificed. The brain was then removed and immediately homogenized using a politron (IKA, Ultra Turrax T25 basic). Total RNA was extracted using the Tripure reagent from Roche (Roche Diagnostics IKA Labor Technik GmbH, Mannheim, Germany) following the method described by Chomczynski and Sacchi (8).

Ready-to-Go RT-PCR Beads from Amersham Pharmacia Biotech, Inc. (Piscataway, NJ, USA) were used in the one-step RT-PCR reaction. Individual 50 μ l of RT-PCR reactions contained 2 units of Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 60 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) reverse transcriptase, RNAGuard Ribonuclease inhibitor (porcine) and stabilizers, including RNase/DNase-free BSA. Selected primers at 1 μ M and the murine brain total RNA at various concentrations were added to the single tube reaction. An optional 50 μ l of mineral oil top layer was added, depending on the thermocycler used. No differences were found between the two procedures.

The RT reaction was initiated by incubating the mixture at 42 °C for 30 min in a thermocycler apparatus (MiniCycler PTC-150, MJ Research). Once the first-strand cDNA was synthesized, the conditions were set for further PCR: 92 °C for 30 sec, 55 °C for 1 min and 72 °C for 2 min. These settings were applied during 40 cycles. Every 10 cycles, 10 μ l of the total reaction was

collected in a separate tube for further electrophoresis and analysis.

The nucleotide sequences, the anticipated RT-PCR product sizes, the thermodynamic approach of the melting point and the percentage of G-C content of the oligonucleotide primer set for both Kvl.3 and 18S are shown in Table 1. The primer set for the 18S rRNA and the Kvl.3 from mouse were derived from reported sequences (9, 10). The full sequence for 18S and Kvl.3 can be found in the GenBank with accession numbers X00686 and M30441, respectively. The 18S PCR fragment was designed to contain internal Eco RI/Pst I sites and thus facilitate subcloning in a vector cloning site. All oligonucleotide primers were custom-synthesized by Roche.

Quantification of PCR products

After the RT-PCR reaction, 10 μ l of the total PCR product from each condition was electrophoresed in an agarose 0.5 x TBE (50 mM Tris, 50 mM Boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) gel. The percentage of agarose was modified according to the expected PCR product size. Thus, a 2% agarose gel was used for the 18S RT-PCR and a 1% gel for the Kvl.3 potassium channel expression analysis. Once the agarose was melted, ethidium bromide was added to a final concentration of 0.5 μ g/ml before pouring the gel. The samples were run at 100V DC for 30 min using a SubCell GT electrophoresis system (Bio Rad laboratories, Madrid, Spain). Gels were immediately placed in a UV transilluminator, and the resulting image was saved onto a hard drive or onto an electronic support (3.5" HD disk) using a charged-coupled device camera with Scion software (Scion corporation, Frederick, MD USA). The picture was saved in TIFF 5.0 format, which is one of the most common and compatible formats. The image was further analyzed by densitometry with Phoretix software. The background was subtracted.

RESULTS

Evaluation of the detection system

In order to check the reliability of our image and quantification system, we made several dilutions of the commercial molecular weight marker III (MWM III) from Roche. This marker allowed us to quantify DNA on the basis of band intensities following the manufacturer's instructions (there are 12 bands ranging from 0.56 to 21.2 kb). The stock concentration of DNA is 250 μ g/ml, which means it is easy to make serial dilutions of all sizes of DNA.

The loading from 0.125 to 2 μ g of total DNA of the nonsaturated DNA bands from 564 to 2027 bp is shown in Figure 1. We obtained a wide range of linearity from 1.5 ng to 84 ng of DNA, not only by analyzing one band throughout the various DNA charges (same size,

TABLE 1. Primer sequences, product sizes, melting point (thermodynamic approach) and GC content of the primer set used for the various target RNA.

Target RNA	Primer sequence	Base pairs	Product size (bp)	TM (°C)	G/C content (%)
Kvl.3	F:5'-CTCATCTCC ATTGTCATCTTC TGC-3'	741-765	718	56.9	50
	R:5'-TTGAAGTTG GAAACAATCAC-3'	1459-1440			
18S	F:5'-CGCAGAATT CCCACTCCCGAC CC-3'	482-498	212	66.2	55
	R:5'-CCCAAGCTC CAACTACGAGC-3'	694-675			

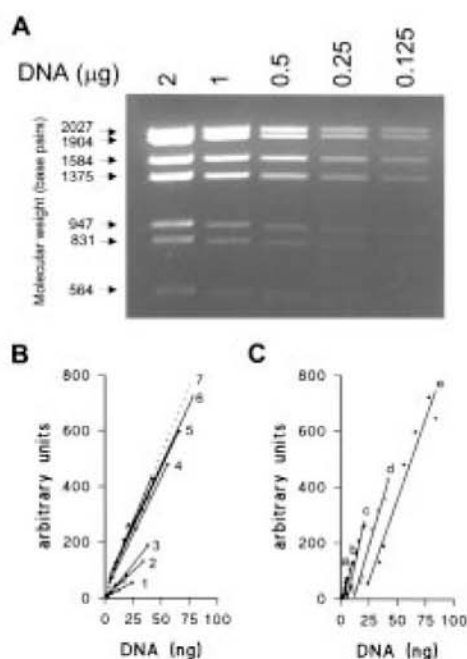


FIG. 1. Validation of the capture and quantification system. The linearity of the detection system was measured by using the DNA size marker III from Roche as indicated in Materials and Methods. Serial aliquots of the DNA marker were run in a 1% agarose gel electrophoresis and the image was exposed to a transilluminator and captured through a charged-coupled device UV filtered camera (A). The correlation between the DNA concentration and the densitometric values analyzed on each independent DNA band size is shown in panel B. Correlation coefficients for each band were as follows: 1: 564 bp, $r = 0.999$; 2: 831 bp, $r = 0.999$; 3: 947 bp, $r = 0.997$; 4: 1375 bp, $r = 0.997$; 5: 1584 bp, $r = 0.997$; 6: 1904 bp, $r = 0.995$; 7: 2027 bp, $r = 0.993$. In the 2027 bp DNA band linear regression analysis, the last point (84 ng) was omitted, as it was clearly out of the linear range. Panel C represents the linear regression analysis for each lane. The amount of DNA was calculated following the manufacturer molecular weight marker III instructions. The correlation coefficients are as follows: a: 0.125 µg, $r = 0.988$; b: 0.25 µg, $r = 0.989$; c: 0.5 µg, $r = 0.986$; d: 1 µg, $r = 0.992$; e: 2 µg, $r = 0.976$.

different amount) but also by comparing one band to another within the same loading (different amounts and sizes). After electronic incorporation of the data to a hard drive and further densitometric quantitation, we obtained a correlation coefficient of more than 0.99 for each band and an increasing regression slope as a result of DNA size (Fig. 1B). When the loaded lanes were analyzed, the resulting linear regressions were almost parallel, which shows that the differences due to increasing amounts of DNA were not significant (Fig. 1C). The correlation between DNA size and slope (arbitrary units/amount of DNA) is not casual (Fig. 2). Its coefficient was > 0.98 , indicating that for the same amount of DNA, the incorporation of ethidium bromide is higher in larger DNA.

Analysis of the reference 18S rRNA

Once the gel treatment, image caption and quantification methods were validated, we performed a study on brain-total RNA in order to establish the RT-PCR conditions for 18S rRNA. We suggested the use of 18S rRNA as a control, as it barely modified in a variety of conditions, including proliferation and activation (11-13).

Serial dilutions of total RNA from 0.1 to 2 µg were used and an 18S PCR product of 212 bp was specifically obtained in all of the reactions (Fig. 3). The intensity of the bands was only linear when the 10-cycle samples were analyzed, indicating saturation of the PCR reaction. Note that the quantification had a linear correlation between 0.1 and 1 µg of total RNA, only showing signs of saturation at the 2 µg lane. Analysis of the linear regression of the 18S PCR product between 0.1 and 1 µg gave an r value of 0.998. However, with the last RNA concentration (2 µg), the r value dropped to 0.94.

Study of the voltage-gated potassium channel Kvl.3 from mouse brain

We analyzed the Kvl.3 mRNA between 0.1 and 2 µg of total RNA, using a method similar to the 18S rRNA assay analysis. We also checked the PCR product through several cycles from the same reaction, reaching

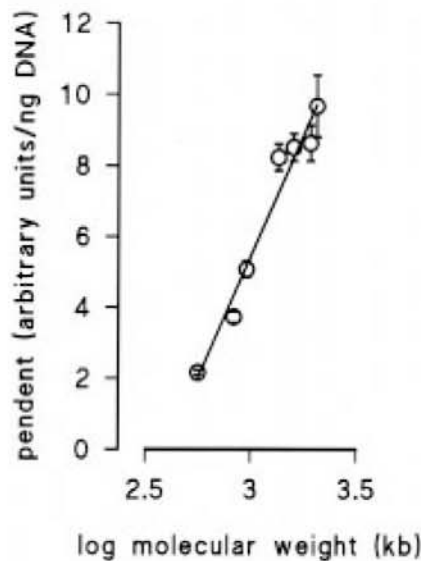


FIG. 2. Direct correlation between the linear regression slope analysis of the DNA amounts and the molecular weight for each band. The slope values were obtained in the regression analysis performed in Figure 1B. The DNA band sizes are those indicated in base pairs in Figure 1A.

a direct result from a known input of a target gene. The densitometric analysis and the electronic images obtained by the charged-coupled device camera are shown in Figure 4. Linearity was obtained only after 10 cycles, when there was hardly any PCR product in the gel. When the linear regression was analyzed for all the conditions, the correlation coefficient was always more than 0.994. Only when 40 cycles and 2 μg of total RNA were processed was the reaction saturated, indicating that large numbers of cycles and a large amount of RNA yield unsatisfactory results.

Relative gene expression

The ratio between the target gene and the reference control is needed to analyze gene expression. It has no meaning as an absolute value, but it is useful when the same target gene is compared in various situations. The differences in relative gene expression between Kvl.3 and 18S at various cycles and RNA amounts are shown in Table 2. Only the data with the 18S at 10 cycles were calculated, as the results obtained at 20, 30 and 40 cycles have no indicative value (data not shown). The expression of Kvl.3 and 18S were related by the ratio between the densitometric arbitrary units of the PCR products of the target gene and the reference control using the

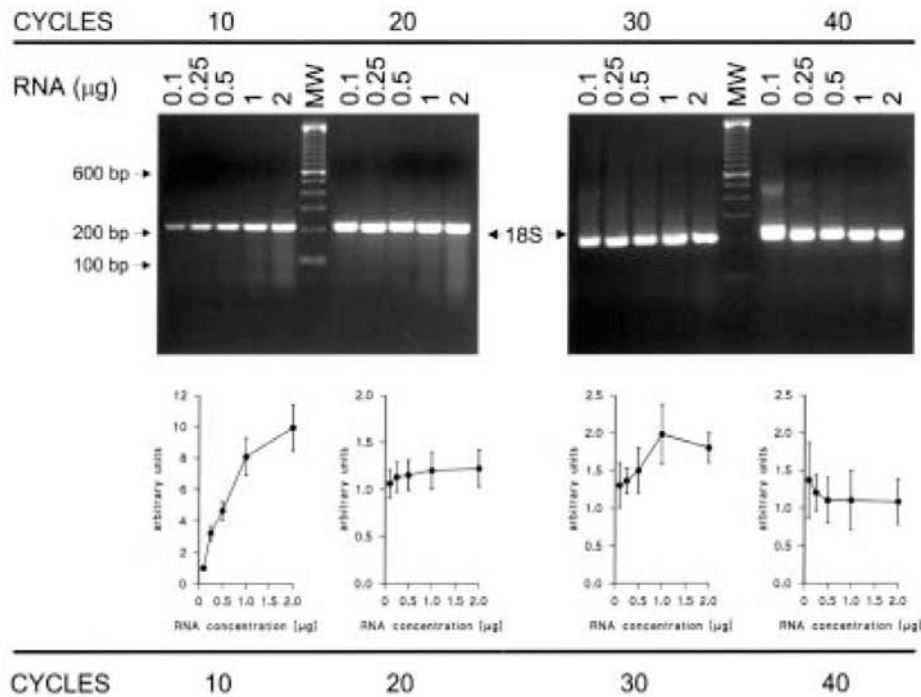


FIG. 3. Analysis of the 18S rRNA RT-PCR results. Total RNA amounts were analyzed through various cycles as described in Materials and Methods. Upper picture panels represent some electronic images from 0.1 μg to 2 μg of total RNA during 10 to 40 PCR cycles. Lower panels represent the quantification analysis of at least three independent experiments. Values are the mean \pm SEM.

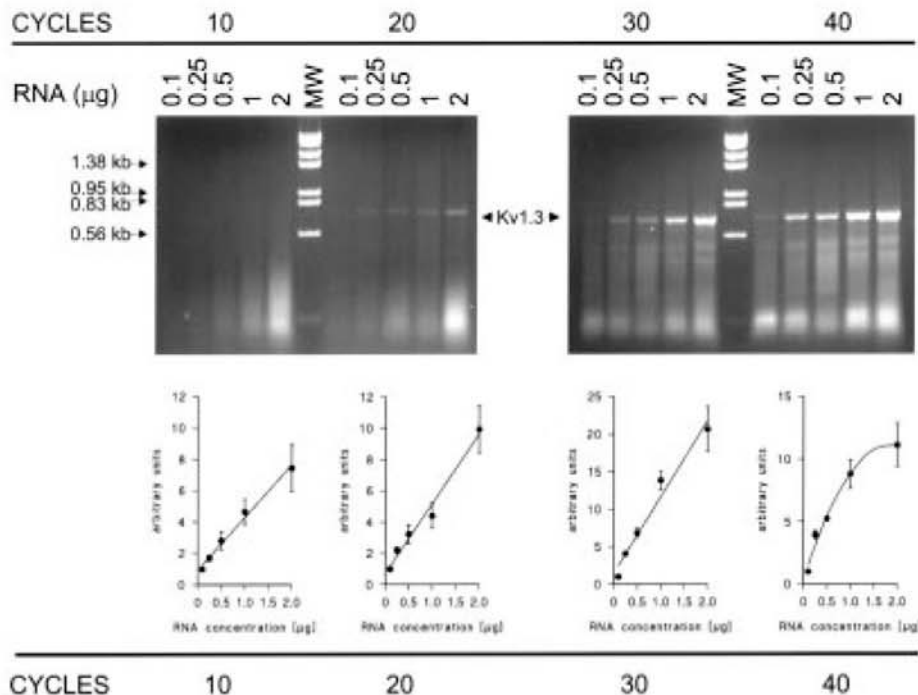


FIG. 4. Analysis of the Kv1.3 gene RT-PCR results. Total RNA amounts were analyzed through various cycles as described in the Materials and Methods section. Upper picture panels represent some electronic images from 0.1 µg to 2 µg of total RNA during 10 to 40 PCR cycles. Lower panels represent the quantification analysis of at least three independent experiments. Values are the mean ± SEM.

following equation: ratio = arbitrary units of Kv1.3 (various cycles)/arbitrary units of 18S (10 cycles). The ratio between 18S and Kv1.3 was maintained in all points except at 2 µg and 30 cycles of the Kv1.3 set of results. A reliable core for a stable ratio can be derived from the results in Table 2. Thus, all the data from 0.1 µg of total RNA and 20 cycles, to 1 µg and 40 cycles, are within the range of confidence.

DISCUSSION

The levels of mRNA expression vary according to regulation by hormones, exposure to cytokines, cell cycle progression and other stimuli (14-16). The analysis of gene expression requires sensitive, precise and reproducible measurement of specific mRNA sequences. Among the methods used, RT-PCR is highly sensitive and consistent with more traditional hybridization methods (17, 18). One important feature of this technique is the ability to measure the gene target within the linear range of the amplification reaction. In this context, relative gene expression is one of the main parameters used to show changes in gene regulation (19, 20). Several studies have shown that mRNA expression can be determined by comparing the ratio of the PCR products gen-

TABLE 2. Relative Kv1.3 gene expression in all the conditions tested.

Total RNA (µg)	0.1	0.25	0.5	1	2
Cycles					
10	1.00	0.73	0.90	0.93	1.22
20	1.00	0.95	1.04	0.95	1.12
30	1.00	1.00	1.11	1.24	2.08
40	1.00	1.02	0.85	1.09	1.12

Values are the mean of three RT-PCR independent experiments. The mean standard error never exceeded the 20% of the mean value. The confidence limit to semiquantitative assessment of the relative gene expression is indicated in the box.

erated by amplification of the target RNA with an endogenous reference RNA in separate reactions (19-21). In some of these studies, a transcription step after PCR amplification and radioactive labeling has been performed to increase the sensitivity (22). Others have improved the method by avoiding the use of radioisotopes and by using a photographic image to perform a densitometric analysis (4, 21). In all these studies, RNA is transcribed to cDNA, a volume of cDNA is used as a template for the PCR reaction, and the gel is loaded, run, stained with ethidium bromide and washed. The

result is photographed and the picture is scanned for further analysis. As the number of steps increases, variations in the real relative gene expression may also increase. Our method requires only two manipulation steps: i) the addition of RNA and the primers to the beads; and ii) gel loading. Although direct input of RNA controlled by the parallel analysis of the same amount of the reference target does not rule out other sources of error, it does improve the approach.

In the conditions assayed, band intensity is linear over a wide range of DNA amount and with various DNA sizes (from 564 to 2027 bp). The latter feature is of special interest as in a given mRNA expression experiment, not all target cDNAs will have a similar molecular size. Therefore, the validation of the method in a wide range of PCR product sizes is of considerable help. It is hardly surprising that the former semiquantitative RT-PCR methods showed a lack of correlation between band intensity and DNA size. This may be attributed to the narrow range of molecular sizes analyzed (21). Furthermore, we show direct correlation between DNA size and amount with band intensity. This is consistent with the fact that the intensity of ethidium bromide incorporation is not only a function of the amount of DNA, but also of DNA size (1).

The 18S RNA was selected because in a number of cases the "housekeeping" genes are not good controls. Thus, not only β -actin but also glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase are regulated genes, especially in certain differentiation, proliferation and even activation studies (23-25). In these situations, the interpretation of gene expression results could be misunderstood. For instance, even in pathophysiological situations such as genetic obesity, the pattern of expression of β -actin varies according to the tissue (23). In these cases, the use of a constitutively expressed target gene is of great value. We suggest the use of 18S rRNA as a reference control as it remains constant even in proliferation studies where others genes undergo modulation (11-13). The small amount of total RNA needed and the velocity of the protocol (< 2 h) are also relevant features. Furthermore, the 18S results are not expected to vary according to the RNA source. For other "housekeeping" genes, the conditions should be set for every RNA source.

It is difficult to analyze the differences in mRNA abundance for an increasing number of genes, as the classical Northern blot approaches are hindered by low gene expression and limited samples. This is the case of nucleoside transporters, ion channels and several genes (13, 19, 26). In order to validate our method, we analyzed the voltage-gated potassium channel Kvl.3 from mouse brain. This is a delayed rectifier potassium channel from the Shaker family that was first cloned from T-lymphocytes (10) and it is also present in the brain at very low levels (27), making it a suitable target gene for analysis.

We obtained reliable results in almost all of the conditions tested. However, the use of 10 cycles may lead to misleading results owing to the low amount of PCR product. This was not a problem in the present protocol, as it was possible to monitor the amount of product through several cycles. Thus, with our method the linearity and the stability of the gene relative expression can be easily checked.

The duration of the assay and the source of RNA are relevant issues. We suggest that the use of the lowest amount of total RNA possible does not significantly alter the result with this procedure. This offers great potential for sample collection, which can be expensive, time consuming and difficult (*i.e.*, human biopsies).

In conclusion, we propose a rapid and reliable method for evaluating semiquantitative changes in relative gene expression. The method is based on a one-step RT-PCR reaction with 18S rRNA as a reference. This may be especially useful for proliferation, activation and differentiation studies, and could also be helpful in the study of ion channels, carriers, receptors and other low-abundant mRNA genes, and when limited sample is available.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Spanish government's Plan Nacional I+D+I and the University of Barcelona. We thank Dr. Octavi Vihars for revising the manuscript. The technical assistance of Ramón Martínez and Héctor Ruiz is gratefully acknowledged. We also thank the linguistic bureau (SAL, University of Barcelona) for editorial assistance.

REFERENCES

1. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc: New York 1998.
2. Orlando, C., Pinzani, P., Pazzagli, M. *Developments in quantitative PCR*. *Clin Chem Lab Med* 1998, 36: 255-69.
3. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.L., Williams, P.M. *Real time quantitative PCR*. *Genome Res* 1996, 6: 986-94.
4. Horikoshi, T., Danenberg, K.D., Stadlbauer, T.H. et al. *Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diphosphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction*. *Cancer Res* 1992, 52: 108-16.
5. Guenther, P.C., Hart, C.E. *Quantitative, competitive PCR assay for HIV-1 using a microplate-based detection system*. *Biotechniques* 1998, 24: 810-6.
6. Nakayama, H., Yokoi, H., Fujita, J. *Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and charged-coupled device imaging system*. *Nucleic Acid Res* 1992, 20: 4939.
7. Dozois, C.M., Oswald, E., Gautier, N., Serthelon, J.P., Fairbrother, J.M., Oswald, I.P. *A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression*. *Vet Immunol Immunopathol* 1997, 58: 287-300.
8. Chomczynski, P., Sacchi, N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem* 1987, 162: 156-9.
9. Raynal, F., Michot, B., Bachelier, J.P. *Complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA gene: Comparison with other available homologs*. *FEBS Lett* 1984, 167: 263-8.

10. Attaii, B., Romey, G., Honoré, E. et al. *Cloning, functional expression, and regulation of two K⁺ channels in human T lymphocytes*. *J Biol Chem* 1992, 267: 8650-7.
11. Soler, C., Felipe, A., Mata, J.F., Casado, F.J., Celada, A., Pastor-Anglada, M. *Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters, and tumor necrosis factor- α in human B-lymphocytes*. *J Biol Chem* 1998, 273: 26939-45.
12. Soler, C., Felipe, A., Casado, F.J., Celada, A., Pastor-Anglada, M. *Nitric oxide regulates nucleoside transport in activated B lymphocytes*. *J Leukoc Biol* 2000, 67: 345-9.
13. Soler, C., Garcia-Manteiga, J., Valdés, R. et al. *Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation*. *FASEB J* 2001, 15: 1979-88.
14. Benveniste, E.N. *Cytokines: Influence on glial cell gene expression and function*. *Chem Immunol* 1997, 69: 31-75.
15. Zwicker, J., Muller, R. *Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression*. *Trends Genet* 1997, 13: 3-6.
16. Farr, S., Dunn, R.T. *Concise review: Gene expression applied to toxicology*. *Toxicol Sci* 1999, 50: 1-9.
17. Murphy, L.D., Herzog, C.E., Rudick, J.B., Fojo, A.T., Bates, S.E. *Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression*. *Biochemistry* 1990, 29: 10351-6.
18. Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A. et al. *Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 7160-4.
19. Xavier, A.M., Isowa, N., Cai, L. et al. *Tumor necrosis factor- α mediates lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-2 release from alveolar epithelial cells. Autoregulation in host defense*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, 21: 510-20.
20. Morgeon, E., Isowa, N., Keshavjee, S.H., Zhang, X., Slutsky, A.S., Liu, M. *Mechanical stretch stimulates macrophage inflammatory protein-2 secretion from fetal rat lung cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279: L699-706.
21. Horikoshi, T., Sakakibara, M. *Quantification of relative mRNA expression in the rat brain using simple RT-PCR and ethidium bromide staining*. *J Neurosci Methods* 2000, 99: 45-51.
22. Toné, S., Kubo, T., Ohyama, T., Kusakabe, T., Minatogawa, Y. *Quantitation of mRNA using in vitro RNA amplification and northern hybridization*. *Anal Biochem* 2000, 284: 420-2.
23. Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M. *Differential regulation of Na⁺-K⁺-ATPase in the obese Zucker rat*. *Am J Physiol* 1996, 271: R1123-9.
24. Chang, T., Juan, C., Ying, P., Chi, C., Tsay, H. *Up-regulation of β -actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma*. *Oncol Rep* 1998, 5: 469-71.
25. Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gom, V., Singer, M.J., Reed, M.W. *Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: Comparison of endpoint and real-time methods*. *Anal Biochem* 2000, 285: 194-204.
26. Schilling, T., Quandt, F.N., Cherny, V.V. et al. *Upregulation of kv1.3 K⁺ channels in microglia deactivated by TGF- β* . *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 279: C1123-34.
27. Schmidt, K., Eulitz, D., Veh, R.W., Kettenmann, H., Kirchhoff, F. *Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the shaker family (Kvl) in oligodendrocyte progenitors*. *Brain Res* 1999, 843: 145-60.

Address for correspondence: Antonio Felipe, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: afelipe@porthos.bio.ub.es
