



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Receptores Monoaminérgicos en Corteza Prefrontal: Mecanismo de Acción de Fármacos Antipsicóticos

Tesis Doctoral presentada por

Noemí Santana Ramos

Barcelona, julio de 2007

III. METODOS

1. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS

Los cerebros usados en las preparaciones son de rata Wistar adulta macho (250-300g), compradas en Iffa Credo (Lyon, France). Desde su llegada al centro, los animales se estabularon en grupos de un máximo de 4 ratas por jaula, en un ambiente controlado con un ciclo de 12h de luz-oscuridad y una temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, con administración de comida y agua *ad libitum*. Todos los procesos de manipulación de animales se realizaron respetando la legislación española de “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos”, de acuerdo con las normas de la Unión Europea (O.J. de E.C. L358/1 18/12/1986).

1.1. Tratamiento farmacológico de los animales

Parte del trabajo de esta tesis se realizó utilizando secciones de cerebro de ratas tratadas con fenciclidina (PCP) y/o clozapina (CLZ). El efecto de estos fármacos se evaluó posteriormente mediante la detección en esos tejidos del gen de expresión temprana c-fos, utilizado en este caso como marcador de actividad neuronal. Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con una dosis de 10 mg/kg de fenciclidina (PCP) (RBI (Natick, MA) disuelta en solución salina, y/o una dosis de clozapina (CLZ) (RBI) 5mg/kg, pH 6.0, en la misma solución. Se inyectaron cuatro grupos de tres ratas cada uno. Los protocolos de administración de los distintos tratamientos están esquematizados en la figura 1. El tiempo de tratamiento con la fenciclidina se eligió en base al tiempo estimado de máxima expresión del ARNm del c-fos. Este tiempo óptimo varía en función del gen de expresión temprana y, en el caso del c-fos, su transcripción puede detectarse típicamente a partir los 5 minutos post-estimulación, alcanzándose el pico de máxima expresión de ARNm a los 30-45 minutos (Morgan and Curran, 1991). El mensajero del c-fos es inestable y después de este tiempo, su persistencia es menor de 2h (Greenberg and Ziff, 1984; Muller et al., 1984).

1.2. Preparación del tejido

Los cerebros de los animales, tratados y no tratados, fueron rápidamente extraídos después de la decapitación, congelados en hielo seco y guardados a -20°C hasta su uso. Los cerebros congelados se cortaron en secciones de $14 \mu\text{m}$ de grosor en un criostato-microtomo (HM500-OM, Microm, Walldorf, Germany), y se montaron en portaobjetos de vidrio por congelación y descongelación. Los portaobjetos habían sido previamente tratados con APTS (3-aminopropiltriethoxisilano; Sigma, St. Louis, MO) al 2% en acetona para evitar que las secciones se desprendiesen durante los tratamientos posteriores. Las secciones se guardaron congeladas a -20°C hasta su uso.

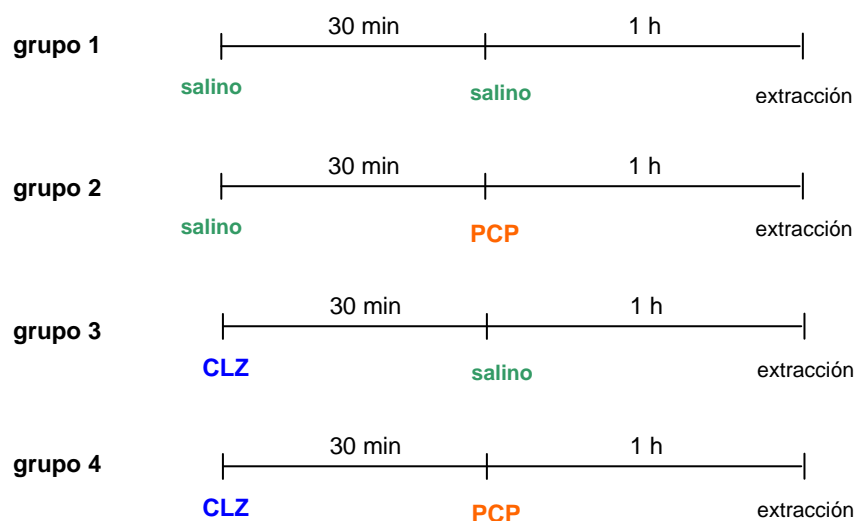


Figura 1. Esquema de los tratamientos farmacológicos utilizados para evaluar la inducción de c-fos por fenciclidina y su reversión con clozapina

2. HIBRIDACION *IN SITU*

La técnica de la hibridación *in situ* permite detectar el ARN mensajero (ARNm) del gen de interés en secciones de tejido y visualizar la distribución anatómica de los cuerpos celulares de las células que lo expresan. En el presente trabajo se han realizado experimentos de hibridación *in situ* simple, utilizando sondas marcadas radiactivamente o bien sondas no radiactivas, así como experimentos de doble hibridación *in situ*, combinando ambos tipos de sondas simultáneamente en un mismo ensayo de hibridación. En este último caso, la técnica permite distinguir en el mismo tejido cuerpos celulares que expresan dos ARNm distintos.

2.1. Sondas de hibridación

Para la detección de los distintos ARNm estudiados se usaron como sondas oligonucleótidos de DNA de 45-50 bases (tabla 1). Estos oligonucleótidos fueron diseñados teniendo en cuenta el contenido en nucleótidos de citosina y guanina y la selectividad por el ARNm de la especie animal de interés. Para ello las secuencias de todos los oligonucleótidos se evaluaron previo a su síntesis por medio de un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparándolas con las bases de datos del EMBL y el GenBank. Algunas sondas fueron sintetizadas en un sintetizador de DNA 380 de Applied Biosystem (Foster City Biosystem, Foster City, CA, EEUU) y purificadas en un gel de secuenciación al 20% poliacrilamida / 8 M urea. El resto de las sondas se sintetizaron y purificaron mediante HPLC por Isogen Bioscience BV (Maarsden, The Netherlands).

Tabla 1. Oligonucleótidos de DNA utilizados como sondas de hibridación

| ARNm | Oligonucleótido | Bases complementarias | Nº de acceso del GenBank |
|--------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 5-HT_{1A} | r1A/NH | 1-48 | NM_012585 |
| | r1A/C | 1219-1266 | |
| | r1A/CL | 763-810 | |
| 5-HT_{2A} | rs2/N | 128-170 | NM_017254 |
| | rs2/C | 1380 - 1427 | |
| | rs2/CL | 939 - 987 | |
| | rs2/N2 | 180-224 | |
| | rs2/C2 | 836-880 | |
| | rs2/CL2 | 1301-1345 | |
| 5-HT₃ | rS3A/1 | 409-453 | U59672 |
| | rS3A/2 | 1001-1045 | |
| | rS3A/3 | 946-990 | |
| | rS3A/4 | 728-772 | |
| GAD65 | rmGAD65/1 | 159-213 | NM_012563 |
| | rmGAD65/2 | 514-558 | |
| GAD67 | GAD2 | 1600-1653 | NM_017007 |
| | GAD67/5 | 191-235 | |
| vGluT1 | rvGluT1/1 | 127-172 | U07609 |
| | rvGluT1/2 | 1756-1800 | |
| c-fos | rFos | 131-178 | NM_022197 |
| D₁ | rD1/1 | 752-796 | NM_012546 |
| | rD1/2 | 1805-1852 | |
| | rD1/3 | 1996-2040 | |
| | rD1/4 | 797-841 | |
| D₂ | rDA2 | 347-388 | NM_012547 |
| | rDA2/4 | 1211-1258 | |
| | rDA2/5 | 1070-1117 | |
| | rDA2/8 | 389-433 | |
| | rDA2/9 | 436-480 | |
| α_{1A} | rADRA1A/1 | 2-46 | NM_017191 |
| | rADRA1A/2 | 1395-1439 | |
| α_{1B} | rADRA1B/4 | 365-409 | X51585 |
| | rADRA1B/5 | 2216-2260 | |
| α_{1D} | rADRA1D/1 | 1167-1212 | NM_024483 |
| | rADRA1D/2 | 242-286 | |

2.2. Protocolo de hibridación

2.2.1 Marcaje de las sondas radiactivas

Los oligonucleótidos se marcaron en el extremo 3' con la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) y [³³P]α-dATP ([³³P]α-deoxiadenosina trifosfato, >2500 Ci/mmol; DuPont-NEN, Boston, MA, USA). La reacción de marcaje se llevó a cabo incubando 2 pmol de oligonucleótido, 17 pmol de [³³P]α-dATP y 5 unidades de TdT en un tampón que contenía cacodilato sódico (50 mM) y cloruro de cobalto (1.5 mM) a pH 7.2, durante 1h a 37°C. La reacción se paró por calentamiento a 65°C durante 5 minutos.

2.2.2 Marcaje de las sondas no radiactivas

Los oligonucleótidos se marcaron en el extremo 3' con la enzima TdT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y digoxigenina (Dig)-11-dUTP (Boehringer Mannheim). La reacción de marcaje se llevó a cabo incubando 100 pmol de oligonucleótido, 1nmol de Dig-11-dUTP y 400 unidades de TdT en un tampón que contenía cacodilato sódico (50 mM) y cloruro de cobalto (2.5 mM) a pH 7.2, durante 1h a 37°C. La reacción se paró añadiendo 1 μl de EDTA 200 mM, pH 8.0.

2.2.3 Purificación de las sondas marcadas

Para eliminar los nucleótidos no incorporados en el ADN de la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columnas comerciales QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) o bien en ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.4 Fijación del tejido

El tratamiento de los tejidos antes de la hibridación se hizo siguiendo el protocolo descrito por Vilaró y colaboradores (Vilaro et al., 1992), basado en métodos ya publicados (Hafen et al., 1983; Young, 1986). Las secciones de tejido congeladas fueron secadas con aire, fijadas durante 20 min en paraformaldehído al 4% en PBS (8 mM NaH₂PO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl) a 4°C. Se lavaron una vez en 3x PBS y dos veces en 1x PBS, 5 minutos cada lavado. Posteriormente, las secciones se incubaron 2 minutos en una solución de pronasa predigerida (Calbiochem, La Jolla, CA) a una concentración final de 24 U/ml en 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, y 5 mM EDTA. El tratamiento con pronasa permite una mayor accesibilidad de la sonda al interior celular. La actividad proteolítica se paró por inmersión de las secciones durante 30 segundos en una solución de 2 mg/ml de glicina en 1x PBS. Finalmente se lavaron los tejidos dos veces durante 30 segundos con 1x PBS y se deshidrataron con etanol al 70 y 100% sucesivamente, durante 2 minutos cada uno.

2.2.5 Hibridación del tejido

Las sondas marcadas se diluyeron hasta una concentración final de 1.5-3.0x10⁷ cpm/ml para las sondas radiactivas y de 2 nM para las no radiactivas, en una solución que contenía 50% de formamida, 4x SSC (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico), 1x solución

Denhart (0.02% ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 0.02% albúmina de suero bovino (BSA), 10% sulfato de dextrano, 1% sarkosyl, 20 mM tampón fosfato pH 7.0, 250 µg/ml de ARNt de levadura y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado por calor. En el caso de la hibridación in situ doble se añadieron simultáneamente las sondas radiactivas (en general correspondientes a los receptores de neurotransmisores) y las no radiactivas (normalmente para identificar poblaciones de células glutamatérgicas y GABAérgicas). Para la hibridación las secciones de tejido se incubaron con aproximadamente 80 µl de esta solución y se recubrieron con Nescofilm (Bando Chemical Ind., Kobe, Japón) para evitar la evaporación. Estas preparaciones se incubaron durante 16-20h a 42°C en ambiente húmedo.

2.2.6 Lavado

Para eliminar el exceso de sonda no hibridada o unida inespecíficamente al tejido, después de la etapa de hibridación se lavaron las secciones a 60°C, 4 veces durante 45 minutos cada una, en tampón de alta astringencia (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5).

En el caso de los experimentos de hibridación in situ simple con sondas radiactivas, los tejidos se deshidrataron con una serie de etanoles (70 y 100%) durante 5 minutos cada uno y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para los experimentos de doble hibridación in situ y de hibridación simple con sondas no radiactivas, se incubaron los tejidos 10 min en tampón de alta astringencia a temperatura ambiente.

2.2.7 Obtención de la señal

a) Hibridación in situ simple con sondas radiactivas:

Para visualizar las sondas marcadas con ³³P las secciones fueron expuestas a película fotográfica Biomax MR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) a -80°C durante un periodo variable de tiempo (4-30 días), dependiendo de la abundancia del ARNm a estudiar. Después de este periodo, la película fotográfica se reveló durante 5 min a 20°C en LX24 (Kodak), y se fijó durante 5 min en AL4 (Kodak). Finalmente se lavó en agua corriente durante 10 minutos y con agua desionizada. Este método permite la visualización macroscópica de las regiones enriquecidas en el ARNm de interés.

b) Doble hibridación in situ e hibridación in situ simple no radiactiva

Los tejidos hibridados únicamente con sondas no radiactivas así como los hibridados con ambos tipos de sondas se sometieron a un proceso inmunohistoquímico para detectar la digoxigenina incorporada descrito a continuación:

- Bloqueo de la unión inespecífica del anticuerpo por incubación del tejido durante 30 minutos a temperatura ambiente en un tampón que contiene 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM MgCl₂·6H₂O, 0.5% BSA.

- Incubación durante 14 -16 horas a 4°C con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics GmbH), diluída 1:5.000 en tampón de bloqueo.
- Lavado del exceso de anticuerpo 3 veces durante 10 minutos cada una en tampón de bloqueo y 2 veces durante 10 minutos cada una en tampón alcalino que contiene 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂·6H₂O.
- Visualización de la actividad enzimática: se incubaron los tejidos con 3.3 mg de nitroblue tetrazolio (NBT) y 3.3 mg de fosfato de bromocloroindolil (BCIP) (Gibco BRL, Gaithersburg, EEUU) diluídos en 10 ml de tampón alcalino, durante 14-16 horas en condiciones de oscuridad.
- Lavado con tampón alcalino con 1mM EDTA, 3 veces durante 10 minutos, seguido de 10 minutos en PBS. Finalmente se procedió a una deshidratación rápida en una serie de etanoles (70% y 100%) para permitir un secado rápido de las secciones bajo corriente de aire.

A partir de este punto, los tejidos hibridados únicamente con sondas marcadas con digoxigenina, se montaron con solución Mowiol (Calbiochem). La señal de hibridación así obtenida se observa en campo claro en el microscopio como un precipitado de color azul-violeta sobre las células del tejido que expresan el ARNm de interés.

Los tejidos hibridados con sondas radiactivas, fueron sumergidos (*dipping*) en emulsión fotográfica líquida de sales de plata (emulsión nuclear K5, Ilford, Mobberly, UK) previamente diluída 1:1 en agua destilada y calentada a 42°C. La exposición se hizo durante un periodo variable de tiempo, entre 2 y 8 semanas, en la oscuridad, a 4°C. Pasado este tiempo, las preparaciones se revelaron con D-19 (Kodak) y se fijaron con Hypam (Ilford). Finalmente se procedió al montaje de los tejidos con Mowiol. Las secciones así tratadas se pueden visualizar, tanto en campo claro como en campo oscuro, en forma de precipitado de granos de plata.

2.2.8 Controles de especificidad

Para asegurar que la señal observada en los autorradiogramas era específica del ARNm de interés se aplicaron los siguientes controles:

1. Análisis con diferentes oligonucleótidos complementarios a un mismo ARNm como sondas independientes en secciones consecutivas de tejido. Para cada receptor o marcador celular se usaron dos o más sondas diferentes, que en todos los casos proporcionaban el mismo patrón de hibridación. Con objeto de aumentar la sensibilidad de la técnica las diferentes sondas se utilizaron conjuntamente en la mayoría de los casos.

2. La hibridación de la sonda marcada en presencia de un exceso de 50-100 veces el mismo oligonucleótido sin marcar provocaba el desplazamiento completo de la sonda marcada de sus sitios de hibridación. El resultado obtenido nos mostraba también el ruido de fondo.

3. Análisis de la estabilidad térmica de los híbridos formados, examinada mediante lavados de secciones consecutivas a temperaturas crecientes: 50, 60, 70 y 80 °C. Cuando la

hibridación es específica se observa un descenso brusco de la intensidad de la señal de hibridación a temperaturas cercanas a la T_m (temperatura en la que se encuentran disociados el 50% de los híbridos). En la mayoría de los casos la temperatura óptima de lavado era de 60°C, mientras por debajo de esa temperatura se observaba gran cantidad de señal inespecífica en la película autorradiográfica y a temperaturas mayores la señal específica disminuía considerablemente.

4. Verificación de que la señal obtenida proviene de cuerpos celulares mediante la técnica de *dipping*.

5. Comparación de la señal obtenida mediante la técnica no-isotópica con la obtenida con la técnica isotópica. En todos los casos el patrón de señal obtenida era coincidente, aunque cabe señalar la menor sensibilidad que tiene la hibridación in situ no radiactiva.

2.3. Análisis de resultados

Las secciones de tejido se examinaron en campo claro y oscuro en un una lupa Wild 420 (Leica, Heerbrugg, Germany), así como en los microscopios Zeiss Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Germany) y Nikon Eclipse E1000 microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Las imágenes fueron tomadas con cámara digital DXM1200F (Nikon) con la ayuda del programa analySIS (Soft Imaging System GmbH, Germany). Las imágenes en campo oscuro fueron tomadas con un iluminador Darklite (Micro Video Instruments, Avon, MA, USA)

2.3.1 Cuantificación de la colocalización de receptores y c-fos con células glutamatérgicas y GABAérgicas

Los contajes celulares se realizaron en algunos casos manualmente en un microscopio Nikon Eclipse E1000 con la ayuda del programa analySIS. En otros casos se utilizó un microscopio de análisis estereológico Olympus AX70 Stereo Microscope, usando el programa CAST. Sólo los perfiles celulares que mostraban gran abundancia de señal isotópica o de digoxigenina fueron considerados positivos.

2.3.2 Determinación de las densidades ópticas relativas de los autorradiogramas

La densidad óptica relativa de la señal de autorradiografía de las películas fotográficas se analizó semicuantitativamente con la ayuda del sistema de análisis de imágenes AIS^R (Imaging Research Inc, St Catharines, Ontario, Canada). La medida de cada área cerebral analizada se hizo en 2 ó 3 secciones adyacentes de 3 ratas por grupo de tratamiento.

2.3.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de colocalización y de medida de densidad óptica relativa se realizó con la ayuda del paquete estadístico GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

2.3.4 Preparación de las imágenes

Las imágenes fueron preparadas para su publicación utilizando Adobe Photoshop CS (Adobe Software, Mountain View, CA, USA).

3. TINCIONES HISTOLÓGICAS

Para reconocer las diferentes estructuras evaluadas en la hibridación in situ, se utilizaron secciones de tejido adyacentes teñidas mediante el método de Nissl. Este método utiliza colorantes básicos como la tionina o el violeta de cresilo, que al interactuar con los ácidos nucleicos de la célula tiñen el núcleo y el retículo endoplasmático rugoso (inicialmente conocido como la sustancia de Nissl), localizado tanto en somas celulares como en dendritas.

En el presente trabajo se utilizó una solución de violeta de cresilo (Sigma) al 0.25% en agua desionizada. Brevemente, las secciones de tejido se sumergieron durante 10-15 min en violeta de cresilo, se lavaron en agua desionizada y posteriormente se deshidrataron en el siguiente gradiente de etanoles: 70% - 95% - 100%. El contraste se realizó sumergiendo los portas en 100 ml etanol al 95% con 2 gotas de ácido acético. Después de deshidratar, los portas se sumergieron en Histoclear (National Diagnostics, Atlanta, USA) y se montaron con Entellan (Merk, Darmstadt, Germany).

4. CONSTRUCCION DE PLASMIDOS PARA LA TRANSFECCION

El protocolo para la generación y subclonaje de los diferentes constructos se ha descrito anteriormente (Carrillo et al., 2004). Brevemente, los epítomos "etiqueta" (*tag*) se añadieron al término amino de los receptores por PCR utilizando *primers* que contenían la secuencia de la etiqueta que iba a ser insertada. Las secuencias de aminoácidos para las diferentes etiquetas son las siguientes: EQKLISEEDL para c-myc y YTDLEMNRLGK para VSV. Las proteínas de fusión, compuestas por un receptor (serotoninérgico 5-HT_{2A} o adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} o α_{1D}) y una proteína fluorescente (*cyan fluorescent protein* (CFP) o *yellow fluorescent protein* (YFP)) se construyeron amplificando por PCR la secuencia correspondiente al receptor y eliminando el codón de terminación. Este producto de PCR se ligó a la secuencia de la proteína fluorescente amplificada por PCR que contenía el mismo sitio de restricción. El producto final de esta ligación corresponde a un único *open reading frame* que codifica para una proteína de fusión receptor-proteína fluorescente. Todos los constructos fueron subclonados en un plásmido pCDNA3 (Invitrogen).

5. CULTIVOS CELULARES

Todos los materiales para cultivo celular fueron comprados a Invitrogen (Paisley, Reino Unido). Las células HEK293 se crecieron en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma), suplementado con 0.292 g/l L-glutamina y 10% (v/v) de suero bovino de recién nacido, a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se dejaban crecer entre el 60-80% de confluencia en placas de petri de 63 cm² antes de realizar la transfección transitoria con Lipofectamine Transfection Reagent (Invitrogen) para los experimentos de co-inmunoprecipitación (Co-IP), o Effectene® transfection reagent (Qiagen, Germany) para los experimentos de FRET, ambos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se

transfectaron 4 µg de cada DNA en los experimentos de Co-IP y 0.2 µg en los experimentos de FRET.

6. CO-INMUNOPRECIPITACION

La técnica de la inmunoprecipitación (IP) permite aislar un antígeno de un extracto celular utilizando un anticuerpo específico contra ese antígeno. La co-inmunoprecipitación es una variación de la IP que sirve para identificar proteínas que interactúan entre sí, como por ejemplo formando dímeros. Al inmunoprecipitar una de las proteínas que forman el dímero, éste arrastra a la otra proteína que está formando parte de él. Este dímero, una vez unido al anticuerpo específico, se separa mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína G (que se une específicamente a los anticuerpos) acoplada a resina de sefarosa, por centrifugación. Para ello la sefarosa se lava varias veces para eliminar proteínas unidas al anticuerpo de forma no específica. Seguidamente, las proteínas precipitadas se solubilizan incubando con el tampón de Laemmli con SDS, se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y se transfieren a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) por *western blotting*. Por lo tanto, la Co-IP es un método estándar para evaluar interacciones proteína-proteína.

6.1. Preparación de la muestra

Las células fueron recogidas 24 h después de la transfección, lavadas con PBS frío, resuspendidas en 1 ml de tampón RIPA (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 5 mM EDTA, 0.1 mM NaPO₄, 5% etilenglicol) por cada placa petri e incubadas 1h a 4°C en una rueda giratoria. Las muestras fueron centrifugadas durante 1h a 100.000 x g a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo que contenía 50 µl de proteína G unida a esferas de agarosa (Sigma) para el preaclaramiento de las muestras. Después de la incubación en noria durante 1h a 4°C, las muestras se centrifugaron a 20.800 x g a 4°C durante 1 min y se determinó la concentración de proteína del sobrenadante. Se incubaron las muestras con concentraciones iguales de proteína total durante toda la noche con 40 µl de proteína G-agarosa, 30 U/ml de endoglicosidasa F (Sigma) y el correspondiente anticuerpo para inmunoprecipitar (ver trabajo 5) a 4°C en rueda giratoria y se reservó una fracción de los lisados celulares como control de la expresión de los genes transfectados. Las muestras se centrifugaron a 20.800 x g durante 1 min a 4°C y se lavó el exceso de proteína G tres veces con tampón RIPA.

6.2. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) y *Western Blotting*

Después de añadir tampón reductor 1x Laemmli y calentar a 65°C durante 10 min, ambas muestras (inmunoprecipitados y lisados celulares) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS utilizando geles Novex Bis-Tris de acrilamida al 4-12% (Invitrogen BV). Seguidamente las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF, que fueron después incubadas en una solución de leche desnatada en polvo al 5% (w/v), 0.1% Tween 20 (v/v) en TBS (Tris/HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM) a temperatura ambiente en un

agitador orbital durante 2h. La membrana se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en la misma solución anterior a 4°C y se lavó tres veces en 0.1% Tween 20 / TBS antes de la adición del anticuerpo secundario. Los diferentes anticuerpos utilizados están detallados en el trabajo 5. Después de subsecuentes lavados, la membrana se reveló usando solución ECL (Pierce Chemical, Cramlington, Northumberland, UK) y se expuso a una película autorradiográfica Biomax MR durante varios minutos.

7. FRET

La transferencia de energía por resonancia (FRET, Förster Resonance Energy Transfer) describe un mecanismo de transferencia de energía entre dos cromóforos, y debe su nombre al científico alemán Theodor Förster. Cuando ambos cromóforos son moléculas fluorescentes, se suele utilizar el término “fluorescence resonance energy transfer”, aunque la energía en realidad no se transfiere por fluorescencia. Durante este fenómeno, una molécula fluorescente donadora es externamente excitada a su longitud de onda de excitación específica. Por un mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo, el estado excitado de esta molécula es transferido, sin que exista radiación de energía, a una segunda molécula, el aceptor. El donador vuelve así a su estado electrónico fundamental. En el presente trabajo, se utilizó esta técnica para evaluar la dimerización de dos receptores de membrana celular. Para ello, uno de los dos receptores se marcó con un cromóforo donante (CFP) y el otro receptor con el cromóforo aceptor (YFP). Estos dos constructos se co-transfectaron en células HEK293, tal y como se ha descrito en el apartado 5 y se dejaron crecer durante una noche para posteriormente cuantificar al microscopio la posible dimerización de ambos receptores. La distancia mínima a la que deben estar las dos moléculas para que se dé transferencia de energía es del orden de 1-10nm, lo que asegura que si existe señal de FRET, ambas moléculas están interaccionando. Cuando los dos receptores están disociados, al excitar a la longitud de onda de excitación del donante, se detecta la emisión del donante. Sin embargo, cuando ambos fluoróforos están lo suficientemente cerca uno del otro, lo que se observa predominantemente es la emisión del aceptor debido al FRET intermolecular desde el donante al aceptor (figura 2).

El protocolo de la técnica de FRET está detallado en el trabajo 5. Brevemente, las células HEK293 se crecieron en cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina y se transfectaron con los constructos apropiados CFP o YFP. Los cubreobjetos se colocaron en una cámara de microscopio que contenía solución salina fisiológica (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 1 mM D-glucose, pH 7.4). Para tomar imágenes secuenciales de FRET en células vivas se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia Eclipse TE2000-E (Nikon, Melville, NY) equipado con un dispositivo de filtro de emisión de fluorescencia (Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK) y con un monocromador Optoscan (Cairn Research) controlado por ordenador, que permitió la excitación secuencial de los fluoróforos CFP y YFP. Se establecieron tres combinaciones de canales de filtro: CFP: Ex=425/10nm, Em=470/30nm; YFP: Ex=495/9nm, Em=535/30nm; CFP/YFP/FRET: Ex=425/10nm, Em=535/30nm, lo que permitió la adquisición de imágenes de los dos

fluoróforos individuales así como la imagen de FRET inicial (FRET^R). Estas imágenes se utilizaron para calcular el FRET corregido y normalizado (FRET^N) (ver más adelante).



Figura 2. Esquema del mecanismo FRET. **A)** Cuando CFP y YFP están a más de 10nm de distancia, la emisión de fluorescencia observada corresponde al donante (CFP). **B)** Cuando las dos proteínas están adyacentes, la transferencia de energía es significativa y una gran proporción de energía de CFP es transferida al aceptor (YFP) generándose emisión de fluorescencia por parte éste

7.1. Análisis de los resultados

En el análisis de los resultados se utilizó el programa MetaMorph Imaging (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) para cuantificar las imágenes FRET y para aplicar los algoritmos necesarios, basados en una metodología píxel-a-píxel, para obtener una imagen final correspondiente al FRET corregido y normalizado (ver más adelante).

7.2. Determinación de los coeficientes de bleedthrough

En ocasiones, y debido a un solapamiento excesivo de los espectros del donante y del aceptor, la señal de FRET está contaminada por la emisión del donante en el canal de emisión del aceptor (DSBT) y por la excitación de moléculas aceptoras a la longitud de onda de excitación del donante (ASBT) (figura 3). El resultado es una señal de ruido de fondo que debe ser extraída de la emisión de fluorescencia del aceptor. Este fenómeno se conoce con el nombre de *spectral bleedthrough* y en este caso correspondería a la contaminación de la señal dentro del canal de FRET. Para corregir esta contaminación, se utilizan los coeficientes de *bleedthrough*, que se definen como la relación entre la cantidad de fluorescencia detectada en el filtro FRET y la fluorescencia detectada para cada proteína fluorescente individual en su propio filtro (CFP o YFP). Para obtener estos coeficientes, las células se transfectaron con cada proteína fluorescente individualmente y las medidas de fluorescencia dieron como resultado los siguientes parámetros: $F_{\text{CFP-YFP/CFP}} = 0.68$, $F_{\text{CFP-YFP/YFP}} = 0.16$.

7.3. Corrección y normalización de la señal de FRET

Dado que la fluorescencia detectada en el canal de FRET (FRET^R) comprende no sólo el valor real de FRET sino también el *bleedthrough* debido a las proteínas fluorescentes expresadas, esta señal fue corregida usando los coeficientes de *bleedthrough* determinados

previamente. Además, este FRET corregido fue también normalizado para generar un valor final independiente del nivel de expresión de la proteína. Para ello se utilizó la ecuación

$$\text{FRET}^N = \text{FRET}^R / \sum(\text{FP} * B_x)$$

donde FP es la intensidad de cada proteína fluorescente implicada en el FRET final, y B_x es su correspondiente coeficiente de *bleedthrough* (es decir, la intensidad de fluorescencia de la imagen con el fondo sustraído obtenida en el canal de FRET, dividido por el excedente total debido a los fluoróforos correspondientes). Por lo tanto, en ausencia de transferencia de energía, FRET^N tiene un valor de 1, mientras que valores mayores que 1 reflejarían la ocurrencia de FRET.

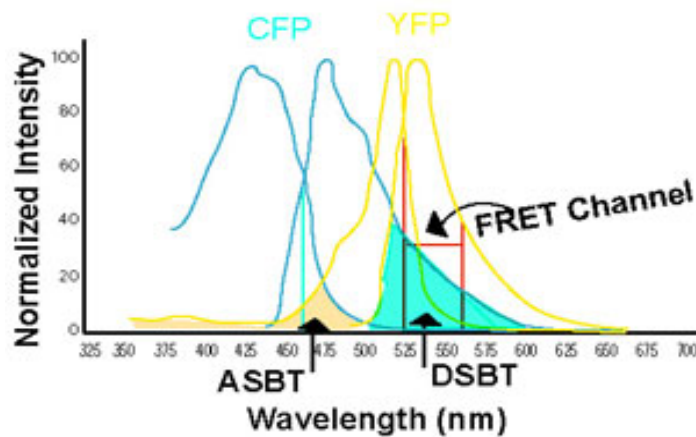


Figura 3. Solapamiento de los espectros de absorción y emisión de las proteínas fluorescentes CFP y YFP. ASBT: contaminación de la señal fluorescente en el canal de FRET por absorción del aceptor a la longitud de onda de excitación del donante; DSBT: emisión del donante a la longitud de onda de emisión del aceptor. Modificado de la página WEB del W.M. Keck Center for Cellular Imaging, Universidad de Virginia (www.kcci.virginia.edu)

7.4. Controles

Para validar la técnica se usaron células que co-expresaban ambas proteínas fluorescentes, CFP y YFP, como control negativo y células que expresaban la proteína tándem fluorescente CFP-YFP, como control positivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Carrillo JJ, Lopez-Gimenez JF, Milligan G (2004) Multiple interactions between transmembrane helices generate the oligomeric alpha(1b)-adrenoceptor. *Molecular Pharmacology* 66: 1123-1137.

2. Greenberg ME, Ziff EB (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311: 433-438.
3. Hafen E, Levine M, Garber RL, Gehring WJ (1983) An improved in situ hybridization method for the detection of cellular RNAs in *Drosophila* tissue sections and its application for localizing transcripts of the homeotic *Antennapedia* gene complex. *EMBO J* 2: 617-623.
4. Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451.
5. Muller R, Bravo R, Burckhardt J, Curran T (1984) Induction of C-Fos Gene and Protein by Growth-Factors Precedes Activation of C-Myc. *Nature* 312: 716-720.
6. Vilaro MT, Wiederhold KH, Palacios JM, Mengod G (1992) Muscarinic M2 receptor mRNA expression and receptor binding in cholinergic and non-cholinergic cells in the rat brain: a correlative study using in situ hybridization histochemistry and receptor autoradiography. *Neuroscience* 47: 367-393.
7. Young WS (1986) *In situ* Hybridization Histochemistry and the Study of the Nervous-System. *Trends in Neurosciences* 9: 549-551.