

Caracterización de modelos genéticos de sobreexpresión de canales KCa 3.1



Manuel Sáez Delgado

Master de Biología Molecular y Celular

Contenido

Caracterización de modelos genéticos de sobreexpresión de canales KCa 3.1.....	1
Resumen.....	3
Abstract	3
Antecedentes:	4
Importancia de los canales iónicos	4
KCa3.1.....	4
Modelos genéticos	8
Diseño de cruzamientos.....	11
Hipótesis y objetivo del estudio	14
Metodología	14
Tratamientos con doxiciclina	14
Extracción del ARN	15
Kit de purificación de ARN por columnas.....	15
Tratamiento con Kit de DNaseI Ambion.	16
Test de degradación de ARN.	17
Retrotranscripción.....	17
Real Time-PCR	18
Diseño de primers:	19
Resultados y discusión	25
Conclusiones	43
Conclusions	43
Bibliografía	45

Resumen

En este trabajo se ha caracterizado un modelo de sobreexpresión de un canal de potasio activado por calcio (KCa3.1), para ello se han empleado una serie de técnicas de biología molecular y celular como son la extracción de ácidos nucleicos, electroforesis de geles de ADN o ARN, RT-PCR convencionales, así como RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). Se muestra que el modelo de ratón para KCa3.1 inducible por doxicilina funciona en algunos tejidos que expresan KCa3.1 como el intestino y pulmón, pero no en bazo. Aquí un tratamiento con doxiciclina durante dos semanas provoca un aumento estadísticamente significativo en la expresión de KCa3.1, en pulmón un aumento de 2.6 veces y en intestino de unas 26.7 veces. También se muestra una falta de expresión y de inducción en tejidos como cerebro e hígado que son conocidos por expresar muy pequeñas cantidades de este canal.

En otros experimentos sobre un modelo de knock-out inducible para KCa3.1 que se encuentra todavía en desarrollo, una primera tanda de experimentos de qRT-PCR en bazo, confirman unos niveles de expresión normal de este canal debido a la ausencia de expresión del transactivador reverso. Estos resultados forman la base para futuros experimentos que permitan investigar la funcionalidad de este modelo knock-out.

Abstract

In this work, I investigated an overexpression model for Calcium activated potassium channels (KCa3.1) employing a variety of molecular biology techniques, such as nucleic acid extraction, gel electrophoresis of DNA/RNA, conventional RT-PCR, and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). I could show that the doxycycline inducible overexpressing mice model for KCa3.1 works in some KCa3.1-expressing tissues such as intestine and lungs but not in spleen. Here 2-weeks doxycycline treatment causes a statistically significant a rise in the expression of KCa3.1, in lung 2.6-fold and in intestine 26.7-fold. I showed lack of KCa3.1 expression and lack of KCa3.1-induction in brain or liver that are known to not express considerable amounts of this channel.

In another experiments on inducible knockout model for KCa3.1 currently under development, a first series of q-PCR experiments on spleen confirmed normal expression of the channel in the absence of reverse transactivator expression. This results form basis for future experiments for verification of functionality of this knock-out model.

Antecedentes:

Importancia de los canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que forman poros en la membrana celular o en las membranas de los orgánulos. Permiten el paso de iones específicos a través de ellos mediante la difusión pasiva. Los canales pueden encontrarse en un estado abierto o cerrado y este estado es controlado a su vez de distintas maneras como por ejemplo vía voltaje sobre la membrana, por unión de un ligando o por una modificación postraduccional como una fosforilación.

Los canales iónicos están relacionados con funciones muy importantes para el organismo como por ejemplo el transporte en el epitelio, el control de la excitabilidad neuronal y muscular o el control de la respuesta inmune.

KCa3.1

En este trabajo se estudia el canal de potasio activado por calcio KCa3.1. KCa3.1 pertenece a la familia de genes que codifican canales de potasio activados por calcio y dentro de estos a la subfamilia "small conductance" (SK o KCNN) (Adelman, Maylie, & Sah, 2012). Por presentar una conductancia más elevada que cualquiera de los miembros de esta subfamilia "SK" (KCa2.1 o SK1, KCa2.2 o SK2, KCa2.3 o SK3, KCa3.1 SK4), a KCa3.1 se le suele denominar como IK (conductancia intermedia). También es conocido como canal de Gardos en eritrocitos.

Los canales SK son distintos de los canales de potasio activados por voltaje porque les falta el sensor de voltaje consistentes en residuos cargados positivamente en el cuarto dominio transmembrana que los convierte en independientes de voltaje.

Los canales SK poseen una conductancia relativa baja alrededor de los 10-30pS y se abren con concentraciones intracelulares $<1\mu\text{M}$ de Calcio. En el caso de KCa3.1 tiene una $K = 0.3\ \mu\text{M}$ de calcio (Francisco & Francisco, 1997).

KCa3.1 se activa por calcio que proviene del exterior celular o de una liberación desde el retículo endoplasmático.

El canal KCa3.1 está constituido por cuatro subunidades que forman un homotetrámero (Ishii et al. 1997; Köhler 2010). Cada subunidad está formada por 6 segmentos α -hélice transmembrana, con el lazo que forma el poro localizado entre los dominios 5 y 6. (Ver figura 1B). Este lazo contiene el filtro de selectividad, que para los canales de potasio viene determinado por el motivo GYG (Glicina – Tirosina – Glicina).

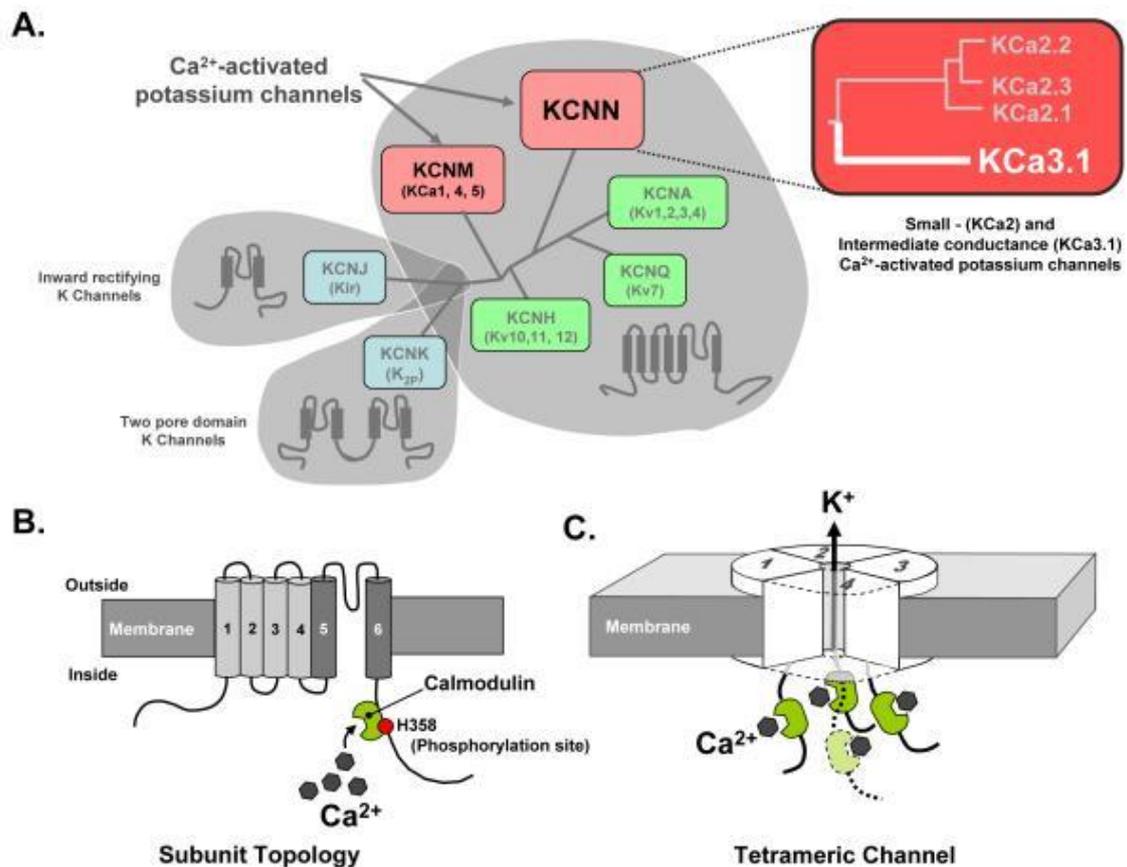


Figura 1. Adaptado de (Wulff & Castle, 2010). **A.** Árbol filogenético para las subunidades de canales de potasio en humano, en rojo las dos familias que comprenden los canales de potasio activados por calcio y la familia KCNN que contiene el gen para KCa3.1 (gen KCNN4). **B.** Ilustración de la topología de una subunidad donde se muestran los seis dominios transmembrana característicos junto con la calmodulina unida al dominio de unión a calmodulina. También se muestra H358 que es una histidina cuya fosforilación afecta a la activación del canal (Srivastava et al., 2008) . **C.** Modelo homotetramérico del canal KCa3.1.

Esta codificado por el gen KCNN4 en el cromosoma 19 q13.2 para humano y en ratón (Kcnn4) en el cromosoma 7 A3 y presenta 5 transcritos distintos como se muestra en la figura 2.

Show/hide columns (1 hidden)		Filter						
Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq	Flags
Kcnn4-001	ENSMUST00000171904	1990	425aa	Protein coding	CCDS20948	O89109	NM_001163510 NP_001156982	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1
Kcnn4-003	ENSMUST00000205428	1945	425aa	Protein coding	CCDS20948	-	NM_008433 NP_032459	GENCODE basic APPRIS P1
Kcnn4-004	ENSMUST00000205626	461	104aa	Protein coding	-	-	-	GENCODE basic
Kcnn4-002	ENSMUST00000206910	3637	No protein	Retained intron	-	-	-	
Kcnn4-006	ENSMUST00000205881	614	No protein	Retained intron	-	-	-	

Figura 2. Adaptado de BLAST: Lista de transcritos donde sólo tres codifican para la proteína, la proteína completa está compuesta por 425 aminoácidos en ratón y 427 en humano.

El canal está regulado por calcio a través de la unión de calcio a calmodulina, que se encuentra constitutivamente unida al C-terminal de cada subunidad (4 a 4). La unión de Calcio a calmodulina produce un cambio conformacional de calmodulina y del C-terminal, resultando en la apertura del canal (Channel et al., 1999)(Luca et al., 2013)(Schumacher, Rivard, Bächinger, & Adelman, 2001). Esta apertura del canal provocará la salida de potasio al exterior celular, con el consiguiente efecto de que la membrana se hiperpolarice.

Esa hiperpolarización es importante para la regulación de las funciones celulares porque la hiperpolarización facilita la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, como por ejemplo por el canal de calcio ORAI. Mientras este calcio entra se consigue una actividad permanente de KCa3.1 por una retroalimentación positiva, esto supone un tipo de señalización que indica a la célula la elevada presencia de calcio que influye en la regulación de importantes actividades como control del ciclo celular, la proliferación celular o la activación de células T CD4.

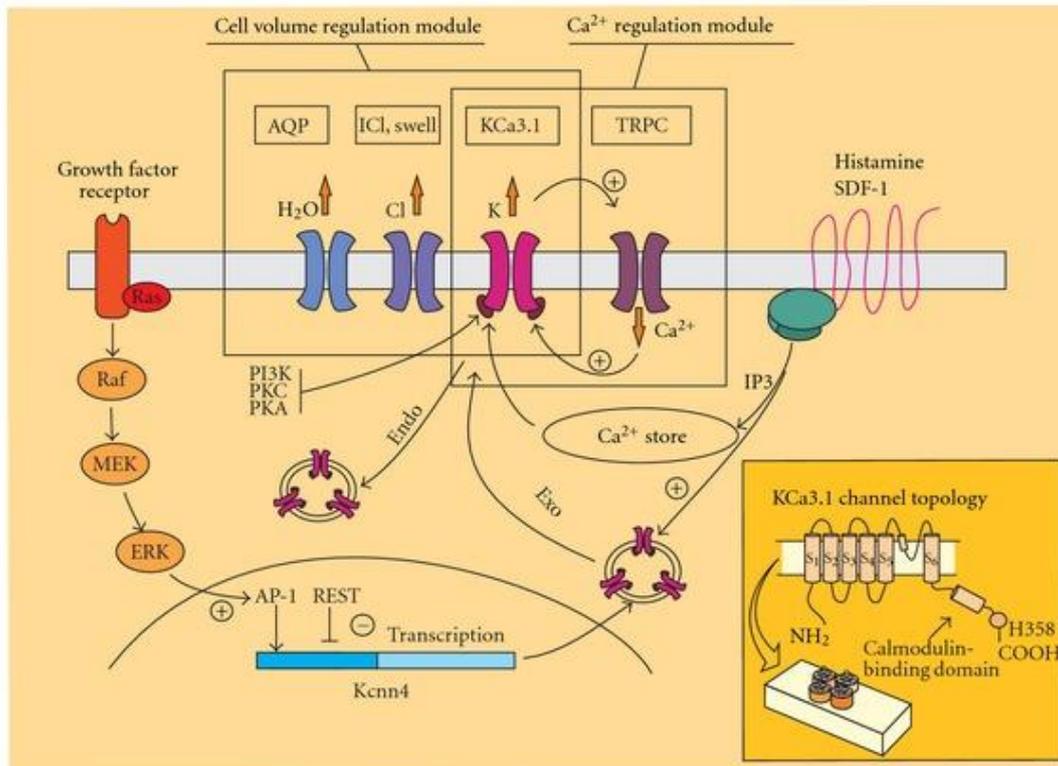


Figura 3. Adaptado de (Catacuzzeno, Fioretti, & Franciolini, 2012). En esta figura se observa que KCa3.1 puede ser activado por las subidas en los niveles de Ca²⁺ provenientes de liberaciones de almacenes intracelulares que están controladas por PLC o IP₃ o calcio que provenga del exterior al entrar a través de los canales TRPC. Además la expresión de KCa3.1 está regulada por distintas kinasas como RTK, ERK, MAPK así como factores de transcripción REST que actúan sobre el propio gen KCNN4. Además se muestran los papeles de regulación del volumen celular junto con los canales de cloro y aquoporinas ya que KCa3.1 modifica la osmolaridad intracelular y el contenido de agua moviendo K⁺ al exterior celular y por consiguiente el agua que le sigue.

En cuanto a la distribución en tejidos, los canales KCa3.1 se expresan en eritrocitos (Grgic, Kaistha, Hoyer, & Köhler, 2009) linfocitos T y B, glándula salivar, placenta, pulmón, epitelio intestinal, páncreas, endotelio vascular, colon, estómago, próstata, timo, bazo, medula ósea, sangre periférica y se encuentran ausentes en cerebro, corazón y musculo esquelético (Logsdon, Kang, Christian, & Aiyar, 1997).

Además estos canales se encuentran implicados en cáncer aumentando la proliferación anormal de distintos tipos celulares como células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3, leucemia y glioma (Abdullaev, Rudkouskaya, Mongin, & Kuo, 2010), cáncer de mama, páncreas, endometrio y también en modulación de la respuesta inmune (Grgic et al., 2005).

Modelos genéticos

Los modelos de ratón genéticamente manipulados son considerados hoy en día imprescindibles para estudiar las funciones de genes en condiciones fisiológicas. El Knock-out del gen en un ratón representa un modelo de pérdida de función, pero también se suele trabajar con transgénicos de sobreexpresión y así ganancia de función. Esta aproximación también puede ser utilizada para analizar la expresión de genes específicos de tejido o genes del desarrollo mediante la introducción de genes reporteros bajo el control de un promotor específico para un gen. Generalmente los ratones transgénicos son generados por microinyección o mediante el uso de retrovirus para introducir el constructo transgénico dentro de un oocito o cigoto.

Otro método consiste en el uso de células ES inyectando estas células previamente transfectadas en los blastocistos de ratón. Este método permite obtener un bajo número de copias del transgen en el ratón. Las quimeras generadas mediante este método, permiten transmitir el transgen a los embriones y después analizar los embriones transgénicos que se encuentran en las hembras apareadas con los ratones quimera. Para el diseño de los constructos es necesario considerar:

Codificación de la proteína y sitio de inicio de la transcripción

La secuencia codificante de una proteína es generalmente un cDNA completo derivado del RNA del gen de interés, esta secuencia generalmente contiene un codón de inicio de la transcripción (ATG) y uno de parada, también contiene una secuencia Kozac *upstream* del codón de inicio para que el ribosoma lo reconozca y encuentre los codones de inicio y parada de la transcripción apropiados.

Funciones de los intrones y secuencia de parada, poly (a) y enhancer

La inclusión de un intron en el constructo del transgen aumenta la expresión del transgen de manera significativa estabilizando el mRNA y una mejor translocación de núcleo a citoplasma, un intron muy usado es el de SV40. Las señales de parada típicas en eucariotas son la secuencia poli A incluida al final de la secuencia codificante para la proteína diana.

En este trabajo se caracterizan los ratones transgénicos de sobreexpresión generados por el método de microinyección en la universidad de Nevada para estudiar en el futuro las consecuencias de la sobreexpresión.

Para ello se diseñan unos ratones transgénicos para que sobreexpresen o no expresen el gen KCNN4 de una manera controlada en el tiempo mediante la inducción con doxiciclina. En la figura 4 se muestra uno de los plásmidos utilizados en el diseño de los ratones transgénicos.

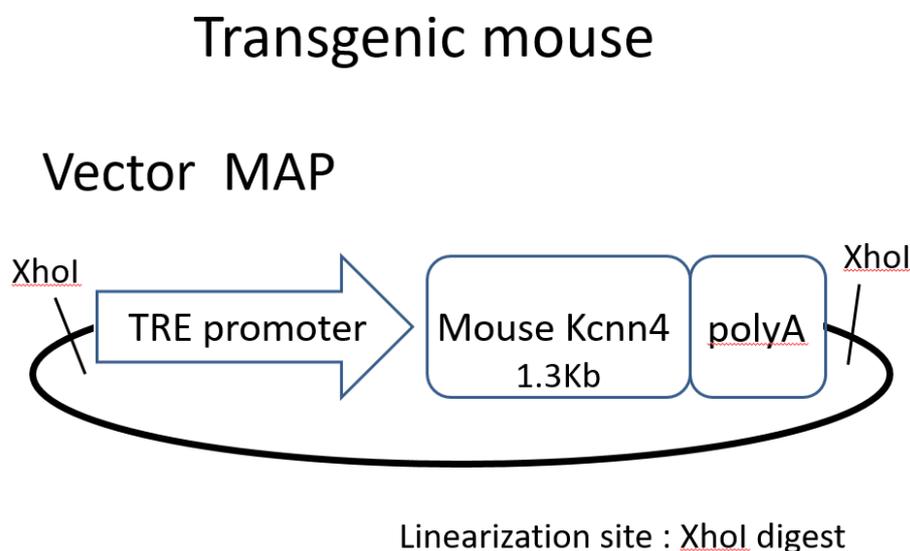


Figura 4. Plásmido vs001 que contiene el promotor TRE, un cDNA del canal KCA3.1 y termina con una secuencia poliA (adaptado de un esquema proporcionado por el grupo del Dr. Miura, University of Nevada).

Para ello, se necesita un promotor para regular la expresión del transgen en tiempo y lugar. Las secuencias que constituyen el promotor son aisladas de regiones *upstream* del promotor endógeno de genes de mamífero, un promotor contiene la señal de inicio de la transcripción y también secuencias reguladoras de la transcripción. La mejor manera de conseguir promotores consiste en estudiar artículos que examinen los patrones de expresión endógenos. En cuanto a los promotores inducibles los regulados por tetraciclina son los usados más frecuentemente y el usado para este trabajo, en este sistema se expresa una proteína de fusión que contiene un dominio de transactivación viral junto con el dominio del represor de tetraciclina de procariontes controlado de manera tejido -específica ya que la proteína de fusión se va a unir a tetraciclina y a la vez a secuencias del operador tet que controla el transgen diana. Este sistema puede funcionar de dos maneras, en la primera (sistema tet-off) el transactivador controlado por tetraciclina(TA) no se puede unir a DNA si hay tetraciclina presente y en la segunda(tet-on) hay un transactivador reverso (rTA) como el usado en este trabajo que sólo se unirá a DNA si hay tetraciclina presente.

Identificación de posibles fundadores, genotipado

Para la realización de los cruzamientos es necesario identificar las parejas fundadoras que se van a utilizar para la generación de las líneas analizadas en este estudio por lo que voy a explicar algunos de los pasos principales necesarios para la identificación de estas parejas fundadoras: Tras la inyección del cigoto, al cabo de 3 semanas se puede extraer DNA genómico para el genotipado a partir de un punch en la oreja del ratón o un pequeño trozo de cola según los protocolos de manejo del animal. Se debe de hacer un "screening" de los fundadores comprobando la presencia del transgen para establecer distintas líneas de transgénicos los fundadores tendrán distinto número de copias.

Tanto PCR como *southern blot* permiten detectar la presencia del transgen y se recomienda *southern blotting* debido al menor número de falsos positivos y ambos métodos deben de ser suficientemente sensibles como para detectar una sola copia del transgen.

En cuanto a la PCR, debido a la alta sensibilidad de la PCR la contaminación cruzada entre muestras y la baja sensibilidad de los *primers* tiene que ser eliminada antes de realizar el genotipado.

Los mejores pares de *primers* pueden ser diseñados para las secuencias que flanquean la unión entre dos elementos que solo pueden estar presentes a la vez en el transgen, este par de primer puede distinguir por tanto entre el transgen y el gen endógeno. Por otro lado, si el transgen contiene secuencias que no se encuentran en el animal de manera natural como secuencias de otras especies, los *primers* amplificarán un producto único.

El esquema de apareamiento para conseguir obtener los ratones sobreexpresores es el siguiente:

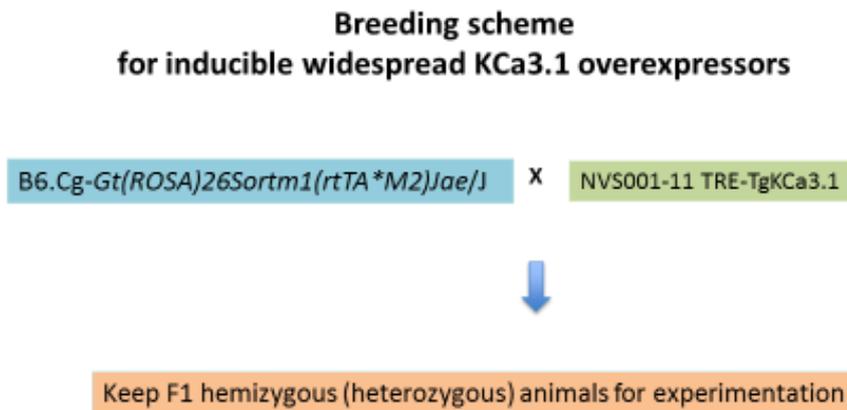


Figura 5. Esquema de apareamiento de los ratones sobreexpresores.

Para crear los ratones sobreexpresores, se ha usado un Knock-in R26-M2rtTA que permite la expresión constitutiva de una forma optimizada del transactivador reverso controlado por tetraciclina (proteína rtTA-M2), este transactivador reverso se encuentra presente en hígado, médula ósea, estómago, intestino, piel, y en niveles más bajos en corazón, pulmones, riñón bazo y timo, en cambio no se detecta expresión en testículos ni cerebro. <https://www.jax.org/strain/006965>

La cepa del laboratorio Jaxon aporta el gen “Gt(ROSA)26Sor gene trap ROSA 26, Philippe Soriano” este es un gen que produce un ARN largo no codificante bajo el control de un promotor constitutivo y es usado ampliamente en ratones transgénicos como sitio para la integración de transgenes, por otro lado, es fundamental que el ratón transgénico contenga “reverse tetracycline controlled transactivator” (rtTA-M2) que es una forma optimizada del rtTA con 5 sustituciones de aminoácidos en el motivo tetR de tTA (S12G, E19G, A56P, D148E y H179R) y tiene una mayor afinidad por la doxiclina.

Por ellos, esta cepa por las características comentadas anteriormente y gracias a la presencia del transactivador reverso permite trabajar con modelos que contengan el operon TRE.

Por otro lado tenemos ratones de la cepa TRE-TgKCa3.1 que contienen el transgen de KCa3.1 integrado en el operon TRE, de manera que al cruzarse con los anteriores, puedan generar ratones que produzcan mayor cantidad de KCa3.1 al administrarles doxiciclina.

Para los ratones que knock-out usamos este sistema:

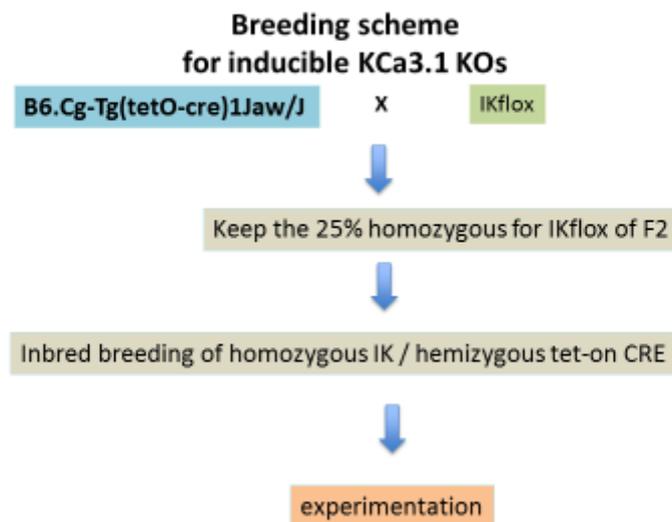


Figura 6. Esquema de apareamiento de los ratones IK-flox con una línea que expresa Cre de manera inducible. Nota: este esquema de cruzamiento para la generación de ratones IK con expresión inducible se encuentra incompleto, ver la explicación en el texto más abajo.

Los ratones del Jackson laboratory son hemizigotos diseñados para que expresen la recombinase Cre bajo el control del promotor del elemento de respuesta a tetraciclina (TRE; tetO). Cuando los hemizigotos se cruzan con ratones que expresen el transactivador reverso “reverse tetracycline-controlled transactivator protein” (rtTA) bajo el control de promotores específicos de tejido, crearan descendencia que permita expresar la recombinase Cre y producir la recombinación en tejidos específicos de manera controlada en el tiempo mediante la administración de doxiciclina (análogo de tetraciclina). <https://www.jax.org/strain/006234>

Por otro lado, el gen KCa3.1 se encuentra floxeado con sitios loxP flanqueando el gen de KCa3.1 de esta manera la descendencia al ser inducida con doxiciclina producirá Cre recombinasa y por consiguiente no se producirá RNAm de KCa3.1.

Desafortunadamente la cepa "IK flox" no contiene el transactivador reverso por lo que la descendencia no va a producir Cre recombinasa y por lo tanto se espera que esta descendencia se comporte igual que ratones no modificados genéticamente en cuanto a los niveles de expresión de KCa3.1 si la doxiciclina por si misma no tiene ningún efecto. Actualmente se están realizando cruzamientos de ratones homocigotos con una línea ROSA-rTA para producir Knock-outs inducibles mediante doxiciclina. The homozygous mice are currently interbred with a ROSA-rTA line to produce Dox-inducible Knock-out.

Hipótesis y objetivo del estudio

El objetivo del estudio era comprobar la funcionalidad del modelo, es decir, la sobreexpresión de canal KCa3.1 en distintos tejidos dependiente de doxiciclina y de esta manera caracterizar el modelo de ratón transgénico para que pueda ser usado en distintos estudios como la comprobación de la eficacia de distintos fármacos.

Metodología

Tratamientos con doxiciclina.

Los ratones tratados beben 1 mg/mL de Doxiciclina junto con 1% sacarosa durante 2 semanas y a los ratones control se administra la sacarosa solo. Se usa sacarosa en la bebida para endulzar y contrarrestar el sabor amargo de la doxiciclina y asegurar así que esos ratones beben por igual y posibles diferencias que se puedan observar posteriormente no sean debidas a una cantidad menor de agua que beben. Finalmente, resulto que todos los ratones usados en este estudio beben unos 5 al día

sin diferencias entre los grupos control y tratamiento. Los ratones son sacrificados al terminar el tratamiento.

Extracción del ARN.

Los ratones son sacrificados y sus órganos son extraídos de acuerdo al protocolo seguido en los servicios técnicos del CIBA.

Los órganos son congelados usando hielo seco y se guardan en un ultracongelador a -80°C hasta el momento de la extracción.

Para la extracción, se descongelan los órganos en hielo y se cortan en trozos de 100 mg, inmediatamente después son colocados en reactivo TRI a 4°C y son homogeneizados usando un homogeneizador hasta que no son visibles los grumos evitando que se calienten las muestras durante este proceso, entre cada muestra se limpia el homogeneizador usando agua destilada y alcohol para evitar posibles contaminaciones entre muestras.

En una sala de trabajo reservada únicamente para trabajo con RNA se dejan las muestras 5 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C).

Se centrifugan a 12000 g durante 10 minutos a 4°C .

Se añaden 100 μL de 1-Bromo-3-cloropropano. Vortex durante 15 segundos e incubar a T° ambiente durante 10 minutos.

Centrifugar a 12000 g y 4°C durante 15 minutos.

La mezcla queda separada en una fase inferior de color rojo fenol y una superior incolora que contiene el ARN.

Colocar la fase acuosa en un nuevo tubo y se añade etanol 70% 1:1 volumen.

Kit de purificación de ARN por columnas.

Montar la columna en un tubo de limpieza y añadir 500 μL de Column Activation Solution. Centrifugar a 14000 g y T^o Ambiente durante 1 minuto.

Eliminar el líquido eluido. Añadir la muestra junto con el etanol al 70 % adecuado y centrifugar a 14000 g durante 1 minuto.

Eliminar el líquido eluido.

Lavar la columna con 400 μL de "Wash Solution" y centrifugar 1 minuto a 14000 g (Este paso se repite 3 veces).

Centrifugar la columna a 14000 g durante 2 minutos.

Descartar el tubo de limpieza y sustituir por el tubo de almacenamiento, añadir 21.5 μL de Elution Solution A la columna y centrifugar a 200 g durante 2 minutos y a 14000 g durante 1 minuto.

Se realizan medidas espectrofotométricas con Nanodrop para comprobar la cantidad y pureza del ARN extraído.

Tratamiento con Kit de DNaseI Ambion.

Para asegurar que el único ácido nucleico presente en las muestras es ARN y evitar que haya DNA genómico presente para tratamiento posteriores se realiza una digestión con DNaseI:

Diluir las muestras basándose en la medida obtenida con Nanodrop hasta una concentración de 200 ng/ μL .

Añadir 0.1 Volúmenes de DNaseI Buffer 10x y 1 Unidad de rDNase, mezclar suavemente e incubar a 37^oC durante 30 minutos.

Resuspender el reactivo de inactivación de DNaseI mediante *vortex* y añadir 0.1 Volúmenes a la mezcla. Incubar 2 minutos a T^o ambiente mientras se agita suavemente.

Centrifugar a 10000 g durante 1.5 minutos.

Test de degradación de ARN.

Preparar un gel al 1.5 % de agarosa teñido con GelRed y cargar 300-400 ng de muestra de ARN antes y después del tratamiento con DNaseI para comprobar si el tratamiento ha funcionado.

Retrotranscripción.

Usando Thermo Scientific RevertAidH Minus first strand cDNA Synthesis Kit.

Permite sintetizar cDNA a partir del RNA extraído:

Descongelar, resuspender y centrifugar los componentes del kit.

Preparar tubos con 200 ng de ARN, 1 μ L de Random Hexamer primer y completar con agua hasta 12 μ L.

Añadir 4 μ L de 5x Reaction Buffer, 1 μ L de Ribolock RNase Inhibitor, 2 μ L de 10 nM dNTP Mix y finalmente 1 μ L de RevertAidH.

Mezclar suavemente y dar un spin. En el termociclador, incubar 5 minutos a 25°C y 60 minutos a 42°C.

Una vez hemos transcrito el RNA de las muestras, el cDNA puede ser almacenado a 20°C para uso a largo plazo.



Figura 6. Kit de retrotranscripción utilizado.

Real Time-PCR

Permite amplificar el cDNA de las muestras y seguir este aumento en el número de copias a lo largo del tiempo mediante la detección de la acumulación de fluorescencia generada por un intercalante de DNA, en este caso SYBR Green.



Figura 7. Hardware utilizado StepOne Plus con placas de 96 pocillos.

El aparato realiza ciclos de PCR mientras detecta para cada pocillo la fluorescencia que está a su vez relacionada con el número de copias presentes.

Para el análisis de datos, en la fase exponencial durante la amplificación, se establece un valor umbral o “treshold” de fluorescencia a partir del cual se anota el ciclo. Cuanto mayor sea el número de copias de cDNA inicial, antes se alcanzará esta fluorescencia umbral y menor será el número de ciclos de PCR necesarios para llegar hasta esos niveles de fluorescencia.

Para el análisis de los resultados se ha usado el programa LinRegPCR que informa para cada pocillo de posibles errores durante la PCR e informa del número de ciclo “Ct” a partir del cual se alcanza el valor de fluorescencia definido. Posteriormente se comparan los valores de Ct obtenidos mediante el método comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001) .

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf

Diseño de primers:

Los *primers* han sido diseñados según las recomendaciones y contenidos de Guanina/Citosina adecuados, se ha comprobado la especificidad de los *primers* usando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI.

Se han diseñado 4 sets de *primers* distintos, 3 que reconocen secuencias del gen de estudio KCNN4 y uno para el gen de la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa GAPDH y se trata de un gen “housekeeping” cuya expresión permanece constante y no se va a ver afectada por el tratamiento, de esta manera la realización de una q-PCR, permitirá comparar los cambios en niveles de expresión del gen diana respecto del “housekeeping” en respuesta a un tratamiento (en este caso administración de doxiciclina)

Set 1 de primers(1mKCa3.1):

KCa3.1 Forward 1: 5' GTGGCCAAGCTGTACATGA 3'

KCa3.1 Reverse 1: 5' GCCACAGTGTGTCTGTGAGG 3'

Amplicon 1. Diseñados para amplificar un producto de 145 pares de bases entre los

>NM_008433.4 Mus musculus potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4 (Kcnn4), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 145
Forward primer 1   GTGGCCAAGCTGTACATGA 19
Template       751 ..... 769

Reverse primer 1   GCCACAGTGTGTCTGTGAGG 20
Template       895 ..... 876
```

exones 3-4

Esta es la secuencia amplificada:

751 GTGGCCAAGC TGTACATGAA CACGCACCCGGGTCGCCTGC TGCTGGGCCT CACGCTGGGT
CTCTGGCTCA CCACAGCTTG GGTGCTGTCTGTGGCTGAGA GGCAGGCTGT CAATGCCACG
GGGCACCTCA CAGACACACT GTGGC 895

También se ha realizado una predicción usando uMelt para calcular aproximadamente la temperatura de melting que debería presentar el amplicon anterior asumiendo 20nM de Mg libre y 20nM de cationes monovalentes y el ser termodinámicos usado es Unified-SantaLucia (Natl Acad. Sci., 1998).

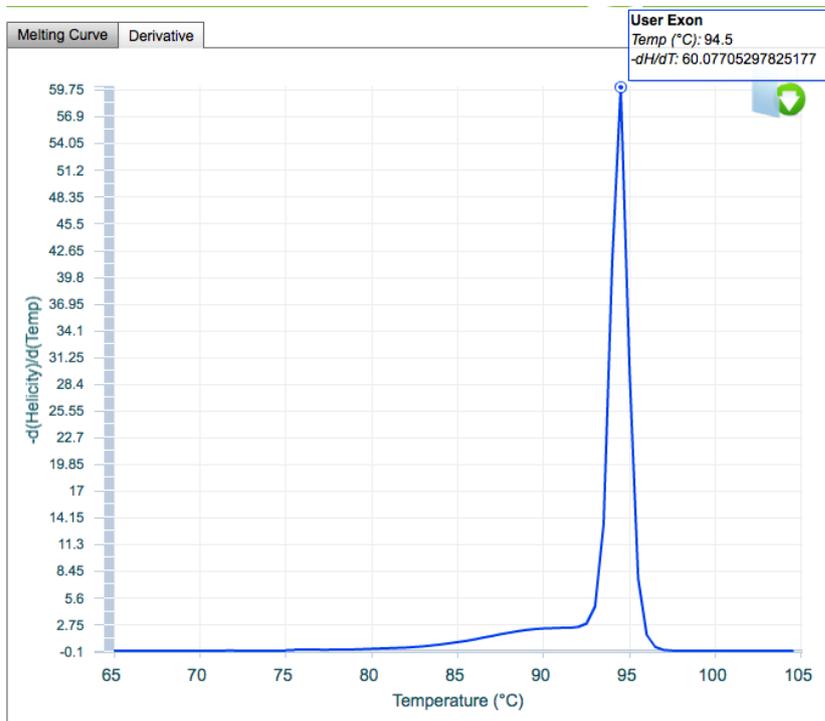


Figura 8. Temperatura de melting predicha para el set de primers 1mKCa3.1

Set de 2 de primers (2mKCa3.1):

KCa3.1 Forward 2: 5' GTCTGCTGCACAGCTCTCCT 3'

KCa3.1 Reverse 2: 5' TCCTTCCTTCGAGTGTGCTT 3'

Amplicon 2: Par de primers diseñados para amplificar un producto de 145 pares de bases entre los exones 5-6

>[NM_008433.4](#) Mus musculus potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4 (Kcnn4), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 176
Forward primer 1   GTCTGCTGCACAGCTCTCCT 20
Template        991 ..... 1010

Reverse primer 1   TCCTTCCTTCGAGTGTGCTT 20
Template       1166 ..... 1147
```

Esta es la secuencia amplificada:

903 GTCTGCTGCA CAGCTCTCCT GGTGGCTGTGGTGGCTCGGA AGCTGGAGTT CAACAAGGCG
GAGAAACACG TGCACAACCT CATGATGGACATCCATTATG CCAAAGAGAT GAAGGAGTCA
GCGGCGCGGC TGCTGCAGGA AGCCTGGATGTACTACAAGC AACTCGAAG GAAGGA 1098

También se ha realizado una predicción usando uMelt para calcular aproximadamente la temperatura de melting que debería presentar el amplicon anterior asumiendo 20nM de Mg libre y 20nM de cationes monovalentes y el ser termodinámicos usado es Unified-SantaLucia (Natl Acad. Sci., 1998).

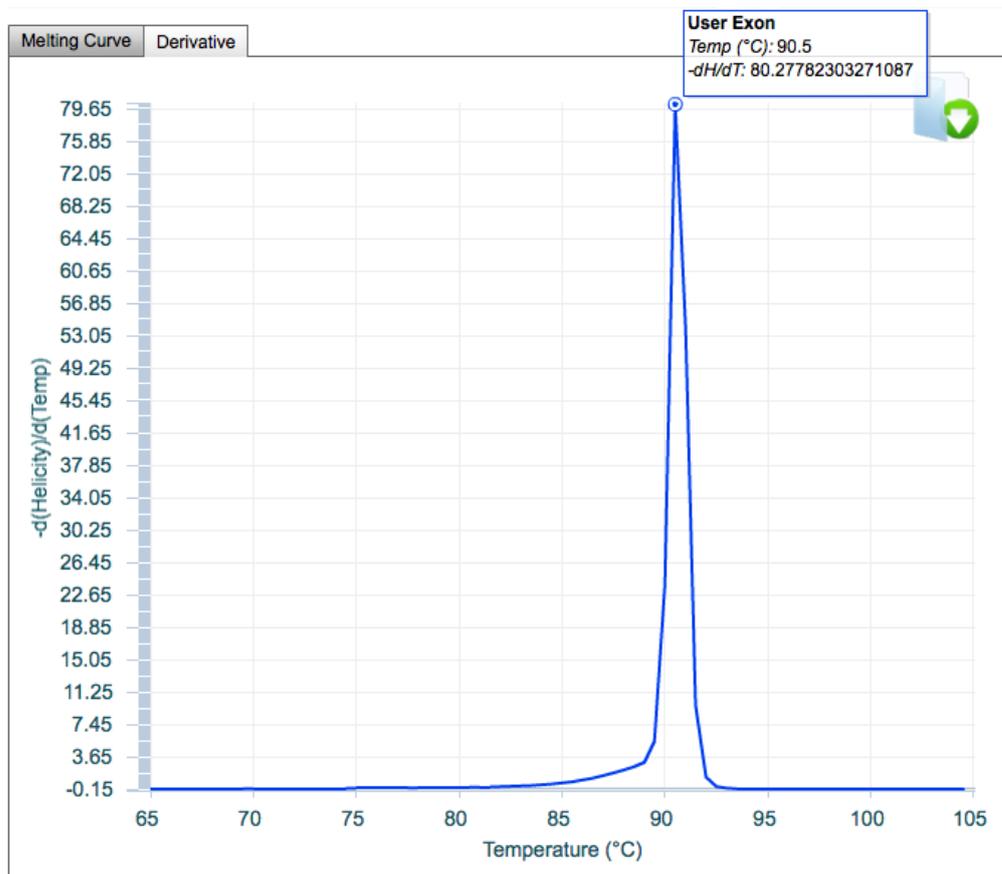


Figura 8. Temperatura de melting predicha para el set de *primers* 2mKCa3.1

Set 3 de *primers* (3mKCa3.1):

KCa3.1 Forward 3: 5' GATCACATTCCTGACCATTG 3'

KCa3.1 Reverse 3: 5' CTCTTTGGCATAATGGATGTC 3'

Amplicon 3: Par de *primers* diseñados para amplificar un producto de 196 pares de bases entre los exones 4-5.

Amplicon 3: Exon 4-5

>[NM_008433.4](#) Mus musculus potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4 (Kcnn4), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 196
Forward primer 1   GATCACATTCCTGACCATTG 20
Template       903 ..... 922

Reverse primer 1   CTCTTTGGCATAATGGATGTC 21
Template      1098 ..... 1078
```

Secuencia amplificada:

```
991 GATCACAT TCCTGACCAT TGGCTATGGG GACGTGGTAC CTGGCACCAT
GTGGGGCAAGATTGTCTGCC TGTGCACCGG AGTCATGGGG GTCTGCTGCA CAGCTCTCCT
GGTGGCTGTGGTGGCTCGGA AGCTGGAGTT CAACAAGGCG GAGAAACACG TGCACAACCT
CATGATGGACATCCATTATG CCAAAGAG 1166
```

También se ha realizado una predicción usando uMelt para calcular aproximadamente la temperatura de melting que debería presentar el amplicon anterior asumiendo 20nM de Mg libre y 20nM de cationes monovalentes y el ser termodinámicos usado es Unified-SantaLucia (Natl Acad. Sci., 1998).

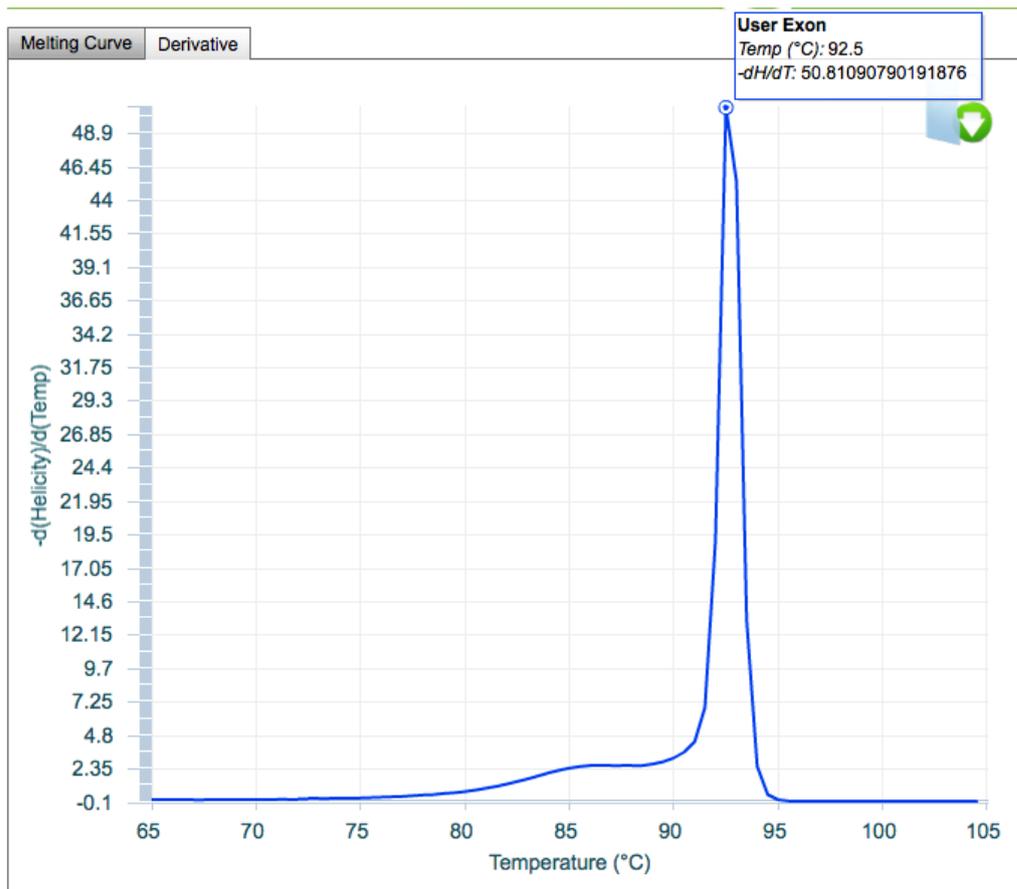


Figura 9. Temperatura de *melting* predicha para el set de *primers* 3mKCa3.1

Aquí se muestra la secuencia de cDNA que codifica para KCa3.1; Cada exón está representado de un color distinto:

1 ctgctgcagt taccactccc cagagggcac agggctagcg tgtgcctcc agcaaaagtc

61 ccagagtgag cagaacaggc cgctggcctg gaagccaagc tggctgcat ttgcgtactg

121 agaggtgggg gaccctgggc aggaagctgg ctgagccca agacctcagg ggccatgggc EXON 1

181 ggggagctgg tgactggcct gggggccctg agacggagaa agcgctgct ggagcaggag

241 aagaggttg cggctgggc gttggtgctg gcgggaactg gcatcggact catggttctg

301 cacgtgaga tttgtggtt cctgggctgc aagtgggtgc tgtacctgct cctggttaag EXON 2

361 tgtttgatca cctgtccac tgccttctc ctttctcta ttgtgtctt ccatgccaag

421 gaggtcagc tttcatgac tgacaacggg ctccgggact ggcgctggc gctgaccgg

481 cggcaggtg cgcagatcct gctggagctg ttggtgtcgc gggcgaccc ggtgcccta

541 cggagccgc actgcacct ggcgggggag gccaccgacg cgcagccctg gccgggttc EXON 3

601 ctgggcgaag gcgaggcgtt gctgtccctg gccatgctcc tgcgtctcta cctggtgcc

661 cgcggtgctg tgctgcag cgggtcctg ctcaacgct cctaccgag catcggggcg

721 ctcaaccaag tccgcttccg cactggttc gtggccaagc tgtacatgaa cacgacccg
781 ggtcgcctgc tgctggcct cagctgggt ctctggctca ccacagcttg ggtgctgtct
841 gtggctgaga ggcaggctgt caatgccacg gggcacctca cagacacact gtggctgatt
901 ccgatcacat tctgacat tggctatggg gacgtggtac ctggcaccat gtggggcaag EXON 4
961 attgtctgcc tgtgcaccg agtcatggg gtctgctgca cagctctct ggtggctgtg
1021 gtggctcgga agctggagtt caacaaggcg gagaacacg tgcacaactt catgatggac EXON 5
1081 atccattatg ccaagagat gaaggagtca gcggcggc tgctgcagga agcctggatg
1141 tactacaagc aactcgaag gaaggactcc cgggctgcc gcagacatca gcgcaagatg EXON 6
1201 ctggccgcca tccacacgtt ccgcccagta cggctgaaac accggaagct ccggaacaa EXON 7
1261 gtgaattcca tggtagcat ctccaagatg cacatgatcc tgtgcacct gcagctgggt
1321 ctgagctct cgcacctgc cctggagaag agaatcgacg gtctggcagg aaagctggat EXON 8
1381 gccctgacag agctgctcg cactgctctg cagcaacagc agctaccaga acccagtcag
1441 gaggccacat agctccacat gaactcacag aagaaccagg ctaagtacc aaggaccgag
1501 ctcaaggaca tgctccctgc caattccgac caagcccccac gataaatcac ctcaagatgc
1561 caggaccaa gtggatccac gttgaggtgc atggactctg gtggtggcag ccatgagtg
1621 aactgaatt ggacctcca cgtcaatggg aacatggcca ccactacaca tatgccctca EXON 9
1681 tcagaagccc tttctgtgt gctgctgttc aggaccctt aatctctgtt ggaggaggag
1741 gtgcctgggg tctaggatgc taggaagctt cagtaaccg cggcgggtc tcgctgaagg
1801 aaccaggctc gagcgacggg aggtgctgcc cctggtgga cacctgggaa gatgccgtt
1861 cctcctgatt gcagagactg tgccagaaga ggttacaggg tgctgctcac caatccacc
1921 tcatacttg taataatgg taaacgaaga caaaaa

Set de Primers GADPH (mGAPDH):

Forward 5' AGGGAGATGCTCAGTGTGG 3'

Reverse 5' CAATGAATACGGCTACAGCAAC 3'

>[NM_008084.3](#) Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), transcript variant 2, mRNA

product length =	149		
Forward primer	1	AGGGAGATGCTCAGTGTGG	20
Template	1327	1308
Reverse primer	1	CAATGAATACGGCTACAGCAAC	22
Template	1179	1200

Secuencia amplificada de 149 pares de bases

1179- CA ATGAATACGG CTACAGCAAC
AGGGTGGTGG ACCTCATGGC CTACATGGCC TCCAAGGAGT AAGAAACCCT GGACCACCCA
CCCCAGCAAG GACTGAGC AAGAGAGGCC CTATCCCAAC TCGGCCCCA AACTGAGCA
TCTCCCT- 1327

También se ha realizado una predicción usando uMelt para calcular aproximadamente la temperatura de melting que debería presentar el amplicon anterior asumiendo 20nM de Mg libre y 20nM de cationes monovalentes y el ser termodinámicos usado es Unified-SantaLucia (Natl Acad. Sci., 1998).

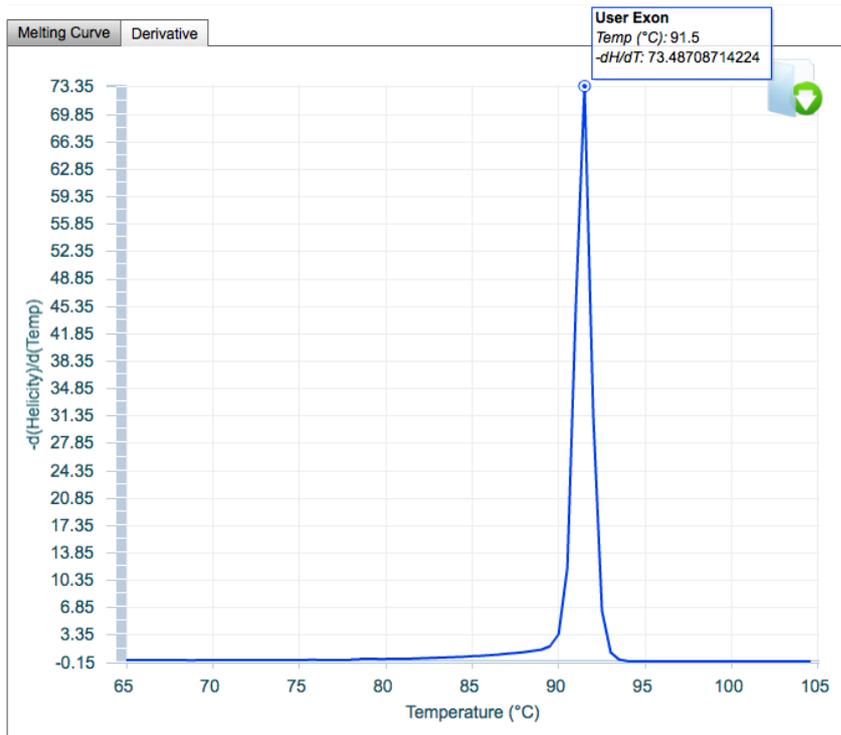


Figura 9. Temperatura de *melting* predicha para el set de primers GAPDH

Resultados y discusión

En primer lugar, se realizó una validación de la qRT-PCR comprobando la eficiencia de los *primers* m1KCa3.1, m2KCa3.1, m3KCa3.1 y mGAPDH frente a distintas concentraciones de RNAm proveniente de un ratón salvaje, los datos fueron analizados usando el programa LinRegPCR.

Para ello, se diseñó una placa con los distintos *primers* y diluciones del cDNA inicial proveniente de bazo de ratón salvaje (50, 10, 2, 0.4, 0.08 ng de cDNA) ver **figura 10**. Tras comprobar que no se detectaba amplificación en los blancos y que la

concentración de cDNA con menos variación entre los triplicados era la de 10 ng ver **figura 11 y 12** así como la comprobación de que la eficiencia de los primer se encontraba entre 1.9-2 (90-100% de eficiencia) se decidió usar el primer 3 para posteriores experimentos a una concentración de 10 ng de cDNA muestra.

Nota: LinReg expresa la eficiencia de la PCR como un valor entre 1 y 2. Un 2 implica que la cantidad de amplicon se duplica cada ciclo. Esta eficiencia es calculada a partir de la pendiente de la curva de amplificación durante la fase exponencial.

Plate Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	gDNA (N/A)	mKCa3.1 Primer 1	mKCa3.1 Primer 1	mKCa3.1 Primer 1	mKCa3.1 Primer 2	mKCa3.1 Primer 2	mKCa3.1 Primer 2	mKCa3.1 Primer 3				
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
B	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
C	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
D	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
E	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
F	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
G	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
H	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng

Figura 10. Placa de PCR para comprobación de la eficiencia de *primers* y rango de linealidad para *primers* 1mKCa3.1, 2mKCa3.1, 3mKCa3.1 y GAPDH

User

Experiment20150407_mKCa3_1

Experiment Results Report

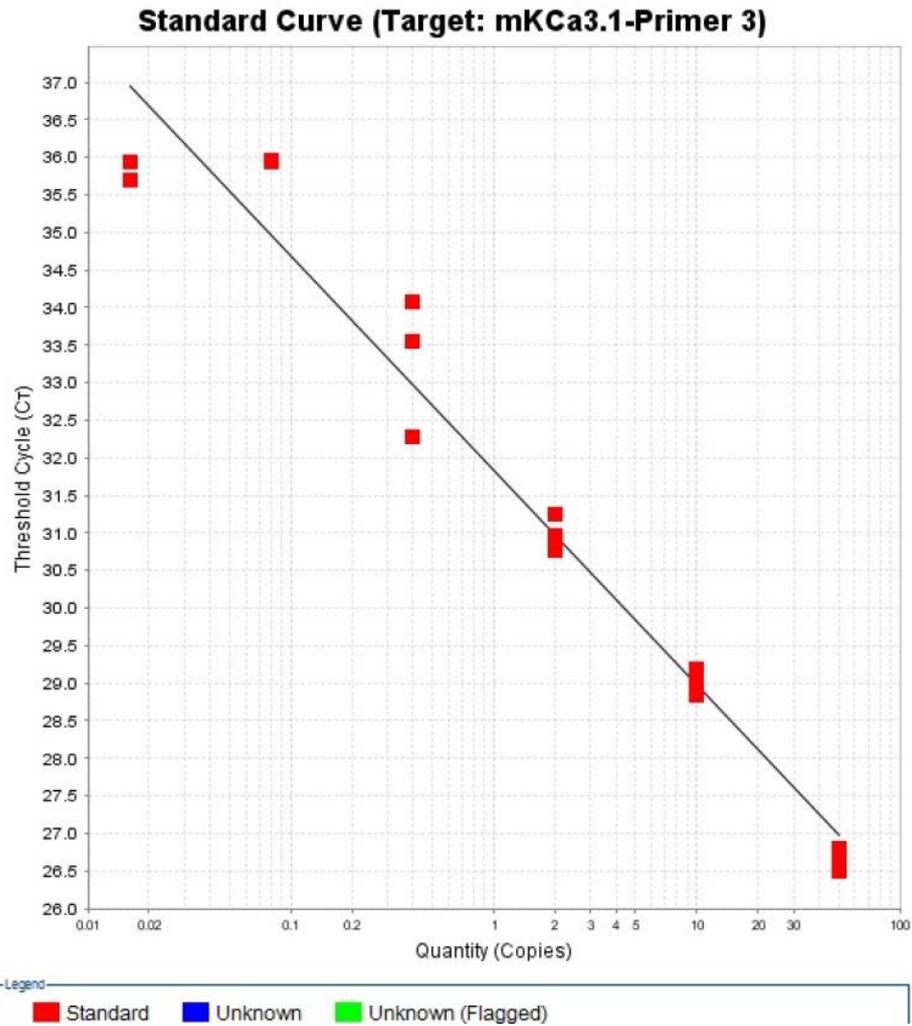


Figura 11. Curva *standard* para m3KCa3.1, entre los 2-50ng de cDNA iniciales hay menos variación en las medidas de fluorescencia por lo que se elige este rango de cantidad de cDNA para experimentos posteriores.

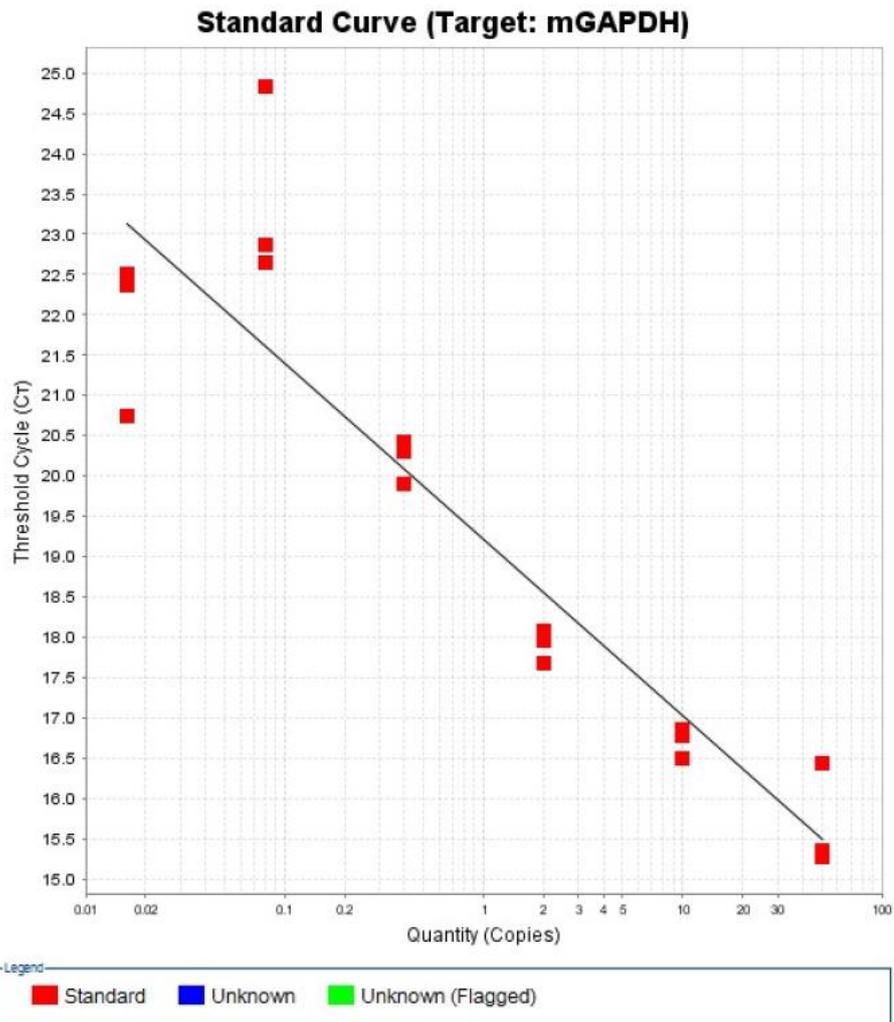


Figura 12. Curva *standard* para mGAPDH, la zona que mejor se ajusta a la recta corresponde a cantidades entre los 0.8-10 ng de cDNA inicial.

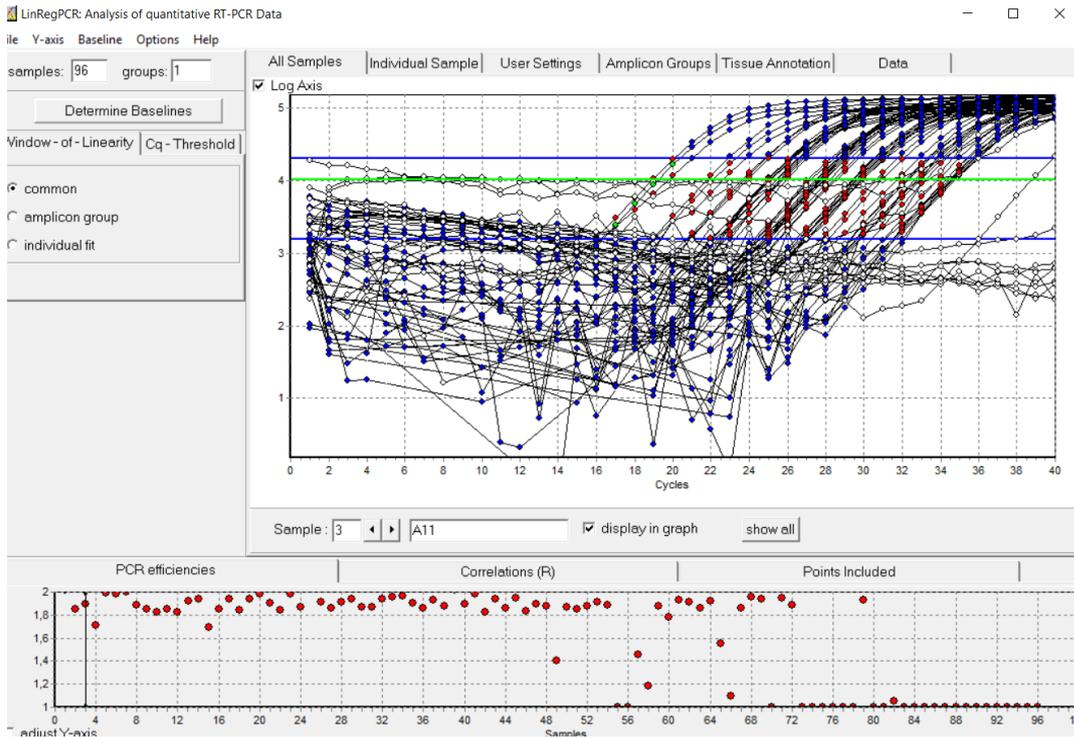


Figura 13. Interfaz de LinRegPCR que nos permite realizar el análisis de los productos de PCR usando los datos brutos de fluorescencia.

Para los siguientes experimentos de PCR a tiempo real se usan controles internos para comprobar la eficacia de la extracción de RNA y si quedan o no restos de DNA genómico, por ello se usan dos tipos de controles, el primer control es el NTC1 y corresponde a muestras de un tejido antes de recibir el tratamiento con DNaseI y sin retrotranscripción y NTC2 es la muestra una vez tratada con DNaseI pero sin retrotranscripción, por último estarían las muestras que queremos analizar que son las que han pasado el tratamiento con DNaseI y la retrotranscripción son de las que se espera una amplificación del cDNA.

qRT-PCR Bazo

Se realizó este experimento con duplicados de NTC1 para todas las extracciones así como triplicados de NTC2 y triplicados de las muestras.

Aquí se representan las variaciones en la expresión analizando los datos con LinReg:

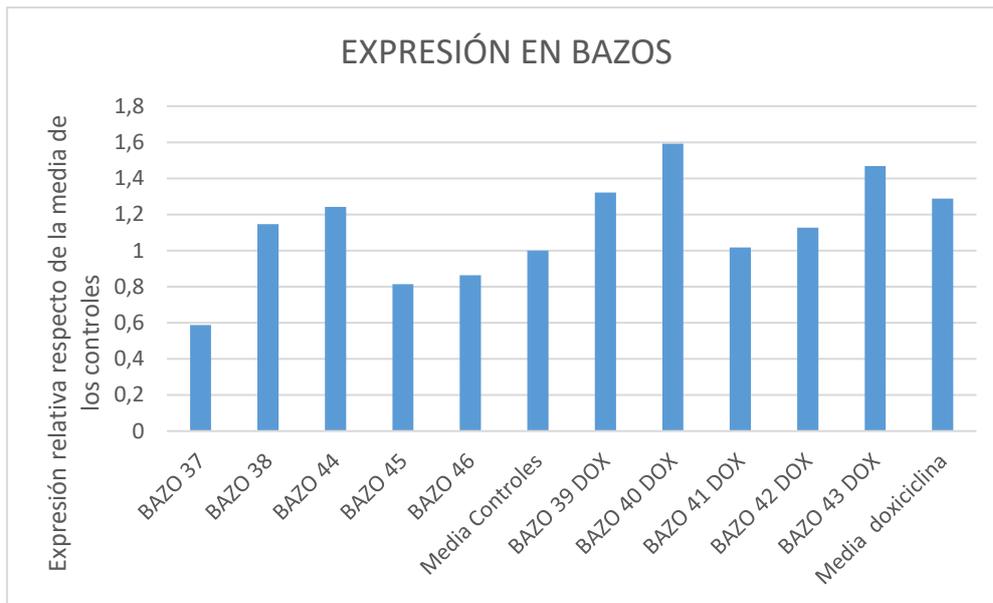


Figura 14. Se puede observar que existe un pequeño aumento en la expresión de el gen Kca3.1 respecto del gen GAPDH (usado como gen Housekeeping), entre los bazos de los ratones sin tratar con doxiciclina, y los inducidos (DOX). Realizando una prueba t de doble cola, vemos que esta diferencia no es estadísticamente significativa en bazo con un p valor de 0,094.

La siguiente q-RT PCR fue realizada con intestino de los ratones anteriores

qRT-PCR Intestino

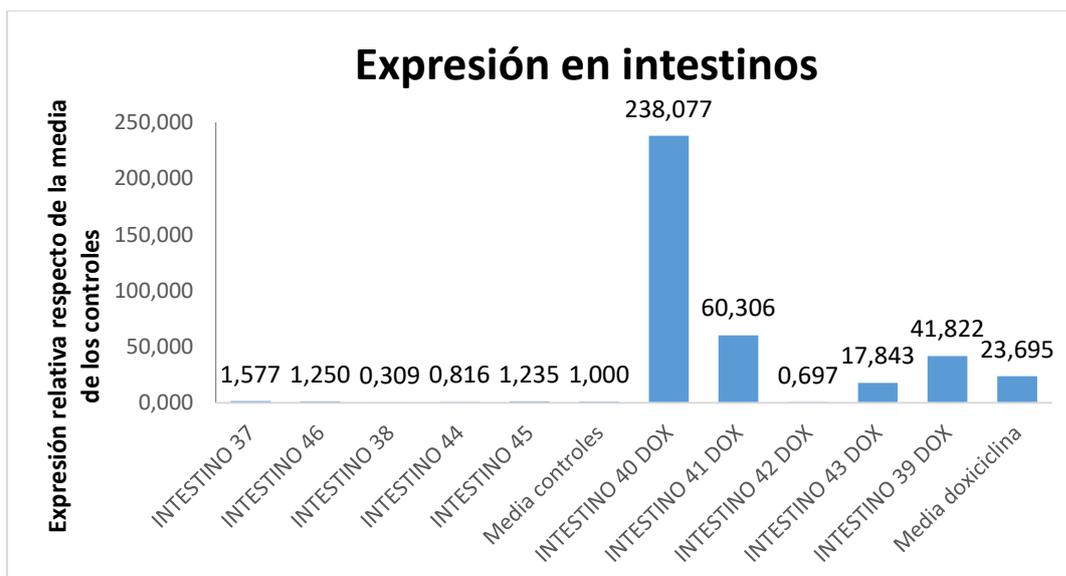


Figura 15. Se puede observar muy claramente unas diferencias en la expresión de los intestinos de ratones control y los tratados con doxiciclina, la sobreexpresión es clara. Con un p valor de 0,007.

qRT-PCR Pulmón

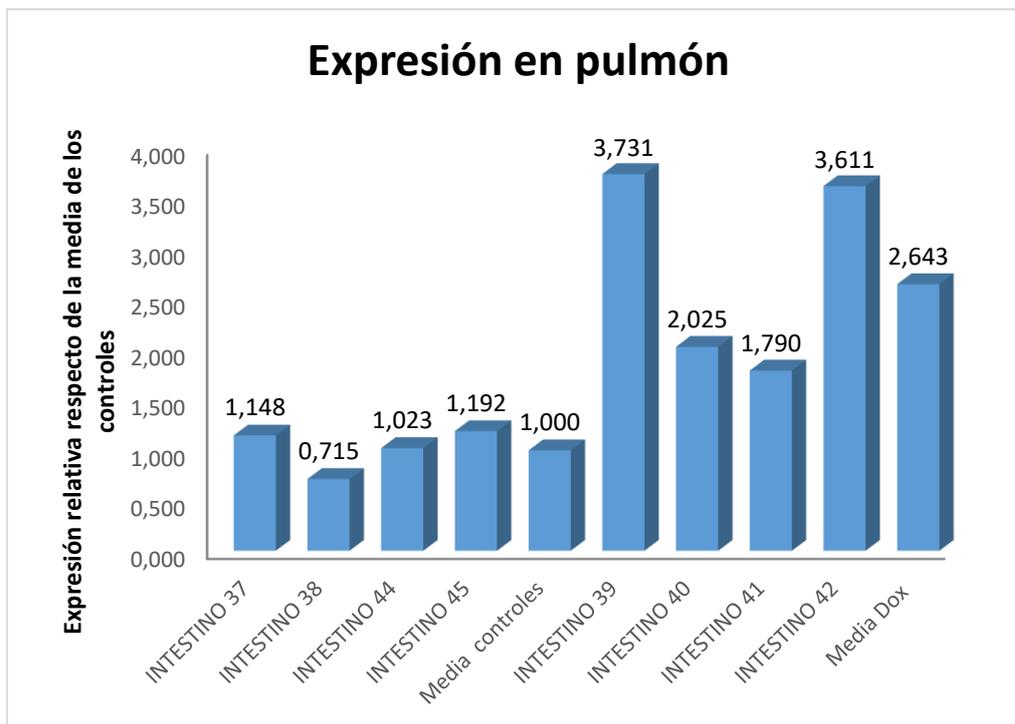


Figura 16. Se aprecia que la expresión relativa de KCa3.1 es mayor en los ratones inducidos con doxiciclina respecto de los controles (p valor= 0,005).

Gracias a la q-RT-PCR hemos podido determinar los niveles de expresión en bazo, intestino y pulmón pero no los hemos podido determinar en cerebro o hígado.

Se han corrido geles tras amplificación por RT-PCR convencional, para comprobar los resultados obtenidos de q-RT-PCR y también para muestras donde se espera muy poca o nula expresión basado en la literatura (como cerebro) se han corrido geles con los productos de RT-PCR.

Nota: recordar que el producto esperado de PCR del canal KCa3.1 para el set de primers 3mKCa3.1 es de 196 pb y para GAPDH es de 150 pb.

Se han realizado experimentos con 30 ciclos de PCR y luego se hizo geles al 1.5% de agarosa corridos durante 44 y 41 minutos a 90 V para detectar los productos correctamente amplificados.

Los ratones 37, 38, 44, 45 y 46 no han sido tratados con DOX (doxiciclina), el resto (39, 40, 41, 42 y 43) sí.



Figura 17 (Intestinos *primer m3KCa3.1*). Con este gel comprobamos los productos de amplificación de los intestinos 45 y 41 usando tanto el primer 3mKCa3.1 con mGAPDH. Hay formación de dímeros de *primers* más evidentes en el canal y no se ve producto de amplificación específico en el intestino 45 sin DOX (sólo dímeros de *primers*) y si en intestino 41 con DOX (dímeros de *primers* y una banda de aproximadamente 200 pb), lo he confirmado volviendo a correr el gel (azul).

La banda de GAPDH ha corrido más que la del canal como se esperaría porque tiene menor peso molecular. En los blancos solo vemos dímeros de *primers*.

Curiosamente sólo se observa la banda del canal en el tratado con doxiciclina puede ser casualidad, lo cual se vuelve a repetir en el siguiente experimento con un mayor número de muestras.



Figura 18 (Intestinos *primer* m3KCa3.1). En este gel son todo intestinos con *primers* 3mKCa3.1 menos en los pocillos 3 y 4 (A2 y B2) que contienen primer de GAPDH para tener un control dentro del gel. Se observa bastante bien el aumento de expresión en los ratones tratados con DOX excepto en el ratón 43.

Basado en el experimento anterior, esperaríamos ver una banda correspondiente a la amplificación del canal sólo en los intestinos de ratones tratados con DOX.

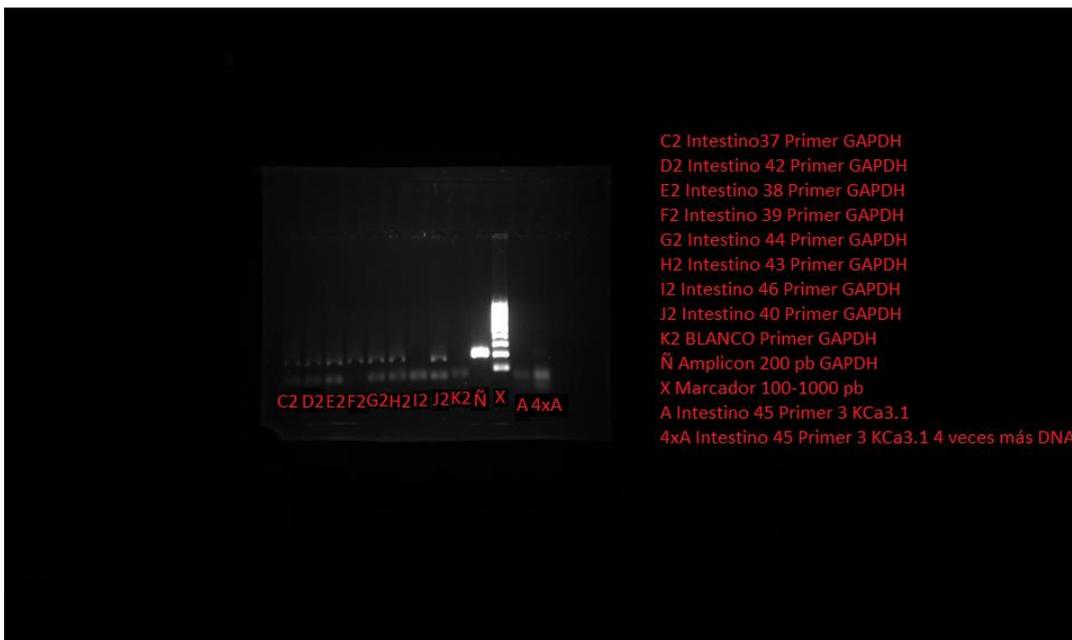


Figura 19 (Intestinos *primer* mGAPDH). Se aprecia una banda correspondiente a la amplificación del amplicon correspondiente a GAPDH en todas las muestras.

Repetimos el mismo proceso para las muestras de bazos:

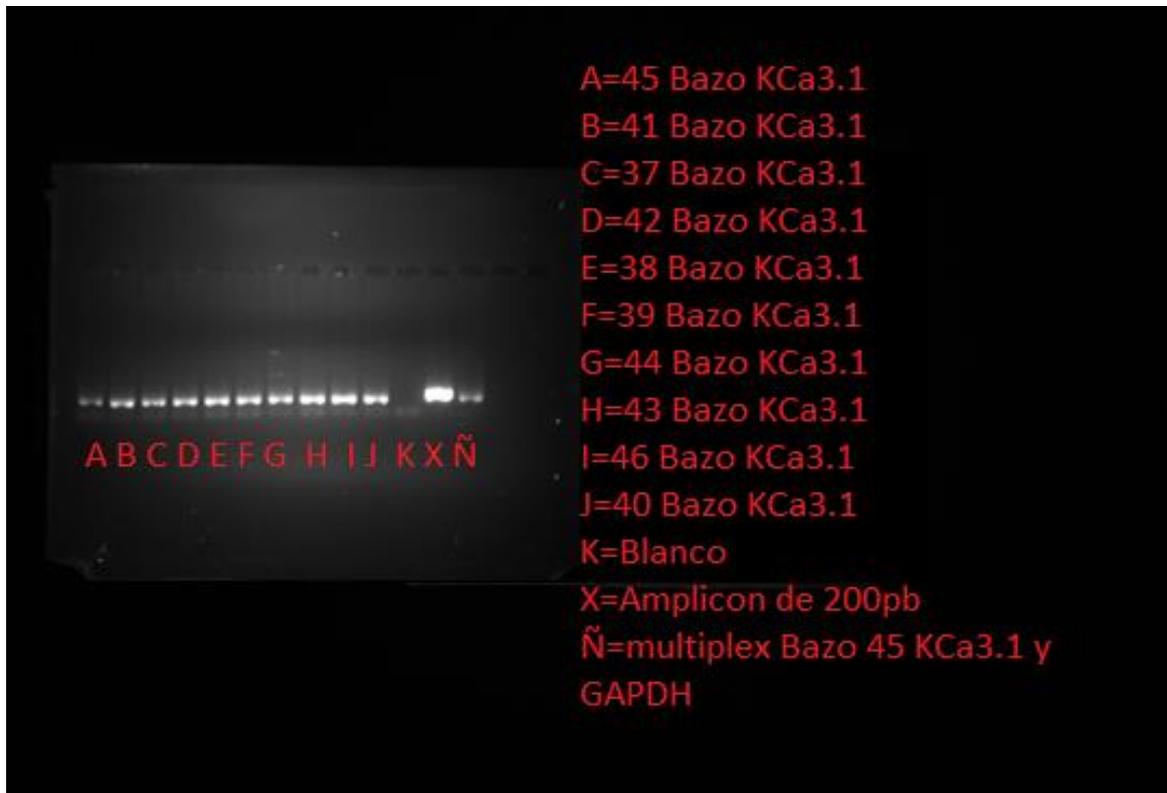


Figura 20 (Bazos primer m3KCa3.1). En este caso vemos una banda muy bien definida de amplicon para todas las muestras independientemente de la inducción por DOX, en este caso, la diferencia en los niveles de expresión de KCa3.1 entre DOX y control no es lo suficientemente grande como para verla en un gel lo que concuerda con los resultados de qRT-PCR para bazo donde ya veíamos una mayor expresión de KCa3.1 en los ratones tratados con DOX sin llegar a ser suficiente como para resultar estadísticamente significativa.

Hígado primer m3 KCa 3.1



Figura 21 (Hígados primer m3KCa3.1). Las bandas correspondientes al amplicon se ven muy débiles y muy poco definidas en todas las muestras, en cambio se ven las bandas formadas por el exceso de primers.

Hígado primer mGAPDH

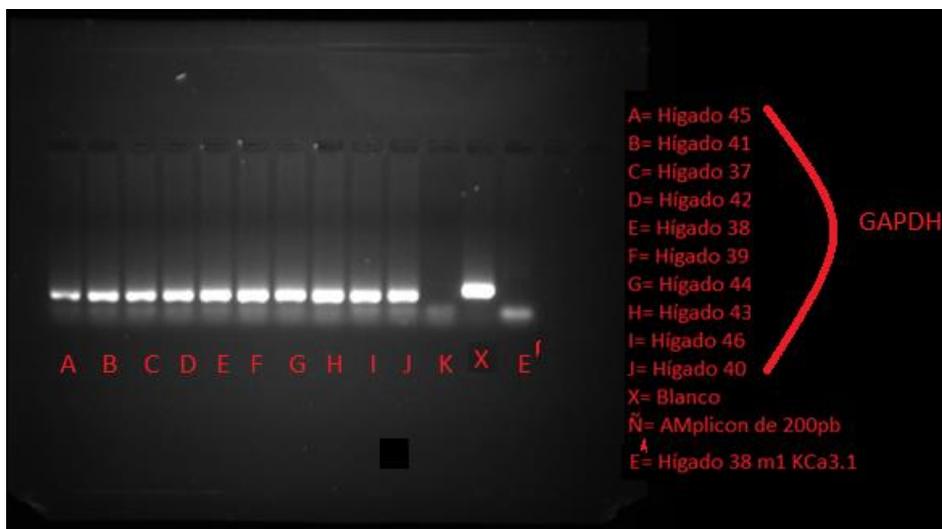


Figura 22 (Hígados primer GAPDH). Las bandas correspondientes al amplicon de mGAPDH se ven intensamente en todas las muestras, también se ven las bandas formadas por el exceso de primers.

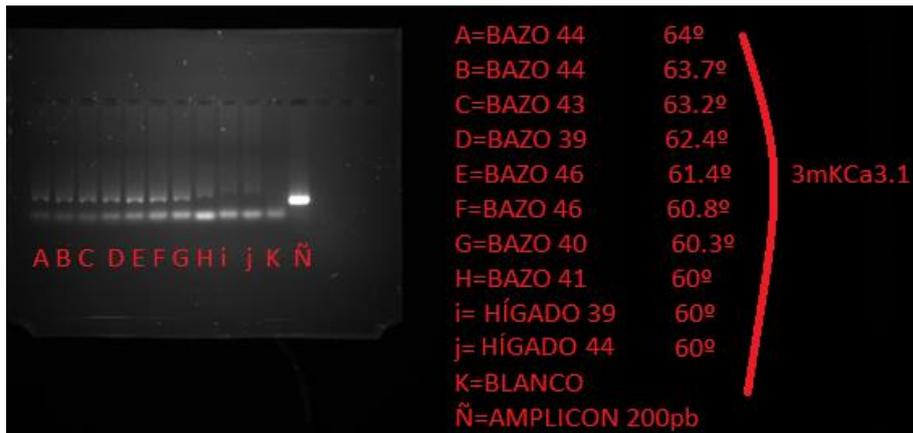


Figura 23 (Gradiente de Tª). Con el fin de disminuir los dímeros de *primers* en futuros experimentos, se ha realizado una PCR con gradiente de temperatura y se ha disminuido la concentración de *primers* usados de 0.6µM a 0.4µM.

Se puede observar que el rango de temperatura donde se ve más definido la banda de amplicon es la de 62.4° a 60.3°. También se sigue observando una importante banda de dímeros de *primers*.

También observamos que al aumentar la temperatura, disminuye la intensidad de la banda de *primers*.

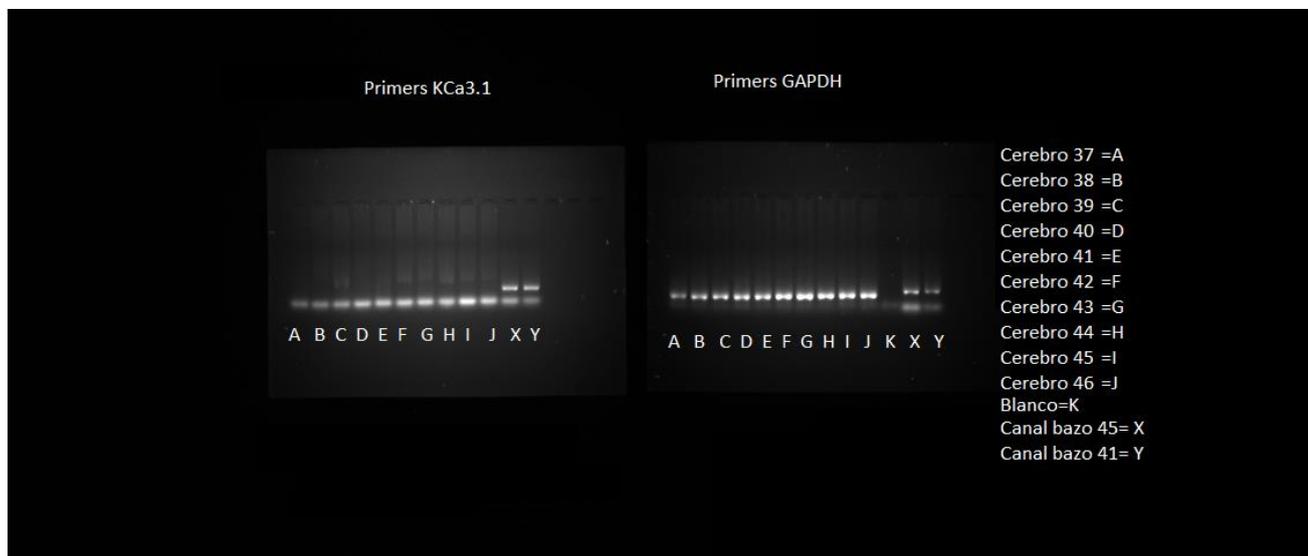


Figura 24 (Cerebro primer m3KCa3.1). En cerebro nos ocurre lo mismo que para hígado, no vemos la amplificación para el amplicon del canal y en cambio vemos claramente la amplificación de GAPDH.

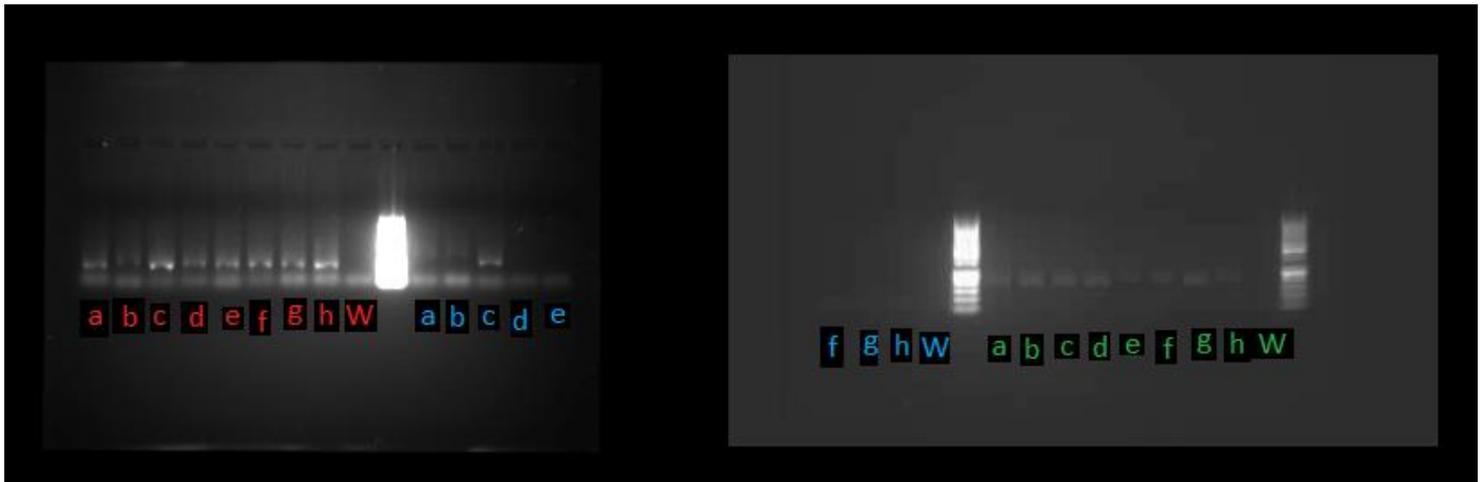


Figura 25 (Pulmón primer m3KCa3.1 y m2KCa3.1). A diferencia de los geles anteriores se ha probado con un mayor número de *primers* en este tejido para comprobar si había diferencias visibles en gel al usar los distintos *primers* (Rojo primer m2KCa3.1, Azul m3KCa3.1, verde mGAPDH). Se observan que las bandas son más definidas al usar primer 2 en comparación con el primer 3 para mKCa3.1

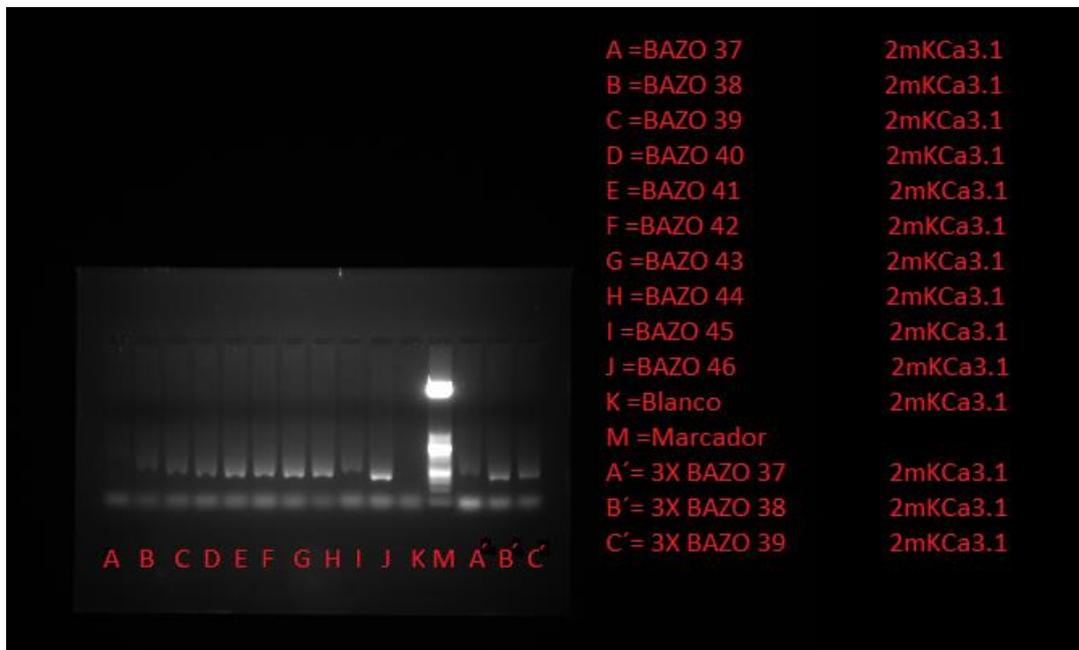


Figura 26. (Bazo primer m2 KCa3.1). Se utilizan muestras de bazo cuyas bandas se habían visto bien definidas previamente en gel para comprobar en gel la amplificación usando primer 2 y así usarlo para amplificar las muestras de cerebro e hígado cuya amplificación no se había podido identificar mediante qRT-PCR ni mediante la visualización de bandas en gel usando el primer 3mKCa3.1.



Figura 27. (Hígado *primer m2* KCa3.1).

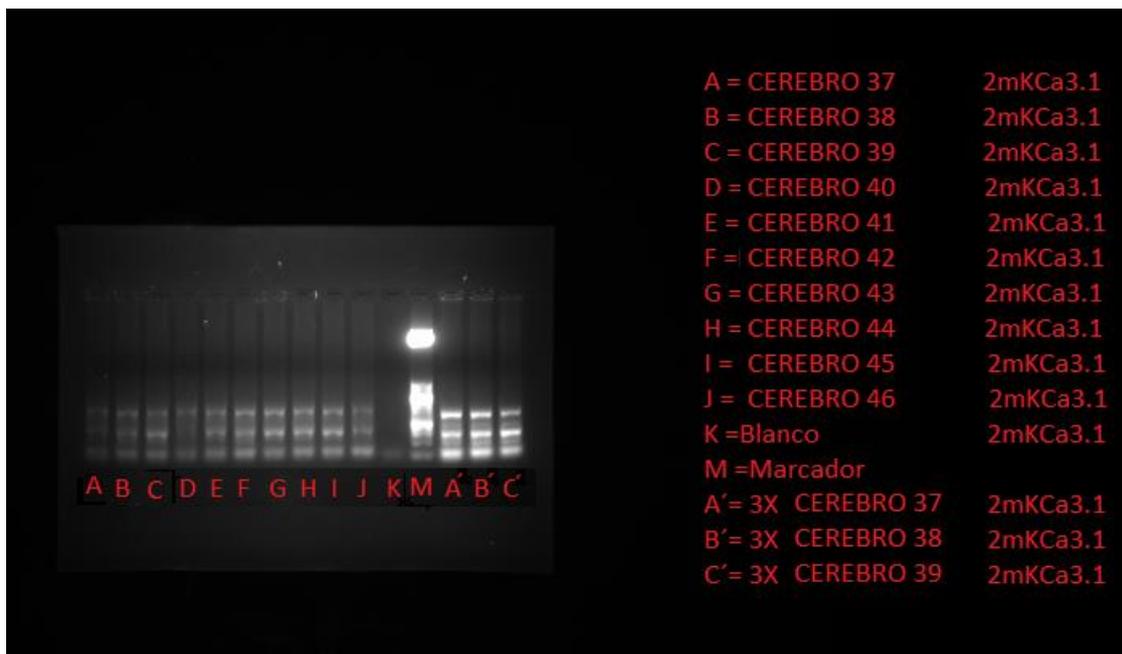


Figura 28. (Cerebro *primer m2* KCa3.1).

En las figuras 27 y 28 vemos la aparición de 3 bandas bien definidas para las muestras tanto de cerebro usando el primer 2mKCa3.1.

En la figura 27, vemos una banda de dímeros de *primers* entorno a las 50 pb y de manera muy difusa la banda del amplicon de 2mKCa3.1 esperada de 176pb, en cambio en las tres últimas muestras donde se han cargado 3 veces nanogramos de DNA, se observan 3 bandas, siendo la de mayor peso molecular más difusa. Una repetición de la electroforesis modificando la concentración de agarosa y el tiempo y voltaje de electroforesis permitirá diferenciar mejor las bandas.

En la figura 28 Nos ocurre como en el gel de hígado mostrado anteriormente, pero a diferencia del anterior, se ven muy claramente las 3 bandas bien definidas.

La primera banda correspondería según el marcador de peso molecular utilizado a aproximadamente 50 pb que entraría dentro del rango esperable de los dímeros de *primers*. También vemos otra banda entre los 150- 250 pb, esto concuerda con el amplicon predicho de 176 pb para este set de *primers*.

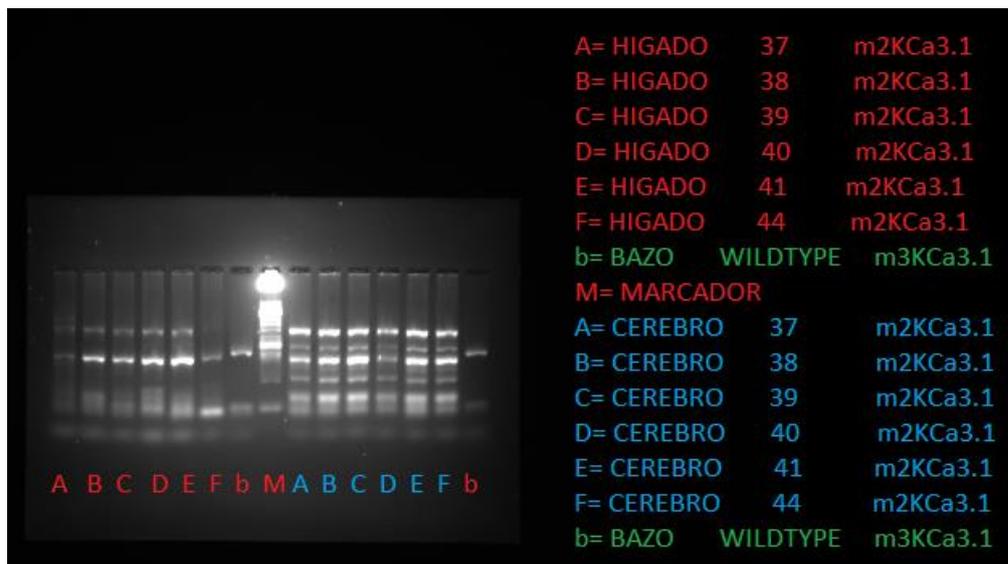


Figura 29. (Hígado y Cerebro *primer* m2 KCa3.1 condiciones de electroforesis modificadas).

Aquí hemos modificado las condiciones de electroforesis con una agarosa al 3.17% en vez de al 1.5%

Sorprendentemente para el set de *primer* 2mKCa3.1, vemos todavía más de 3 bandas y se encuentran bien definidas. Las bandas mal definidas de entorno a los 50pb corresponden probablemente a dímeros de *primers* y luego vemos las bandas a 100pb (sólo presente en cerebro), 176 pb (la esperada que aparece tanto en hígado como en cerebro), una a 250 pb (sólo presente en cerebro) y una última de aproximadamente 400pb que aparece tanto en hígado como en cerebro.

Esta aparición de bandas inesperadas, hace pensar que pueden ser producto de una contaminación.

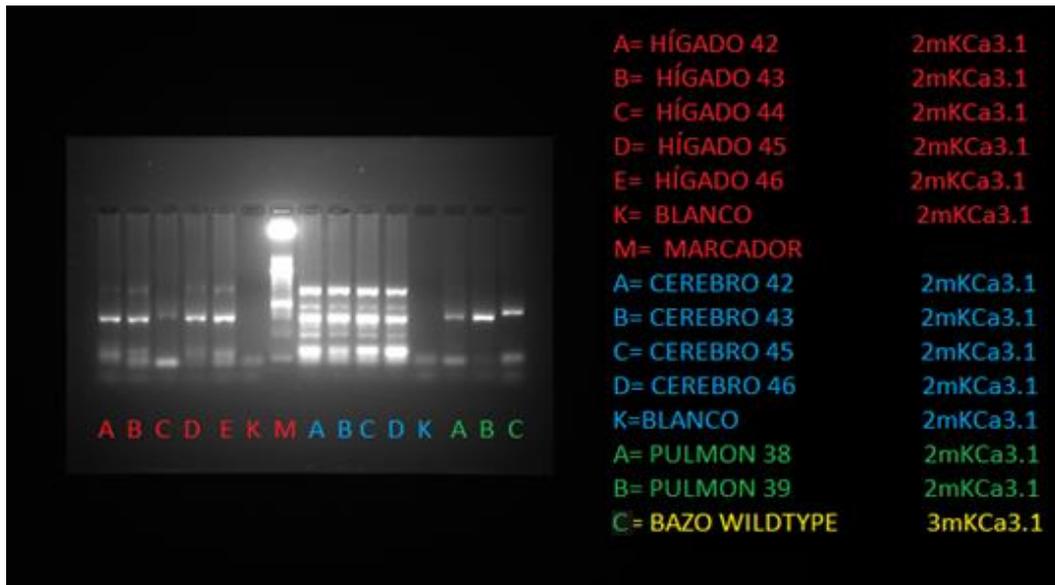


Figura 30 (Hígado, Cerebro y Pulmón primer m2 KCa3.1 condiciones de electroforesis modificadas).

En esta electroforesis realizada con el resto de muestras de hígado y cerebro podemos observar el mismo patrón que en el gel anterior: tres bandas que aparecen en hígado y 5 bandas definidas para cerebro. Por otro lado, mediante la introducción de los blancos hemos descartado que las bandas que aparecen sean producto de una contaminación en los propios reactivos.

Tras comprobar la calidad del RNA de cerebro usado en estas RT-PCR otra vez partiendo esta vez del RNA que ha permanecido almacenado a -80°C hasta el momento.

En la siguiente tabla se muestran las medidas de nanodrop antes y tras el paso de un mes para las muestras de cerebro:

Pretratamiento con DNaseI				Pretratamiento con DNaseI			
Antes				Ahora			
	Número	ng/ μL	Ratio 260/280		Número	ng/ μL	Ratio 260/280
Cerebro	37	1893	2	Cerebro	37	899	2
	38	2269	2		38	852,5	2
	39	2890	2		39	958	2
	40	2021	2		40	1033	2
	41	2158	2		41	1139	2
	42	2364	2		42	1104,5	1,9
	43	2012	2		43	960	2
	44	1980	2		44	870	2
	45	2644	2		45	803	2
	46	2526	2		46	864	2

Tabla1. Comparación entre la cantidad de RNA de las mismas 10 muestras de RNA extraído de cerebro tras un mes a -80°C, se observa una disminución general en todas las muestras de mas de un 50% respecto de la cantidad inicial.

Tras el tratamiento del RNA de cerebro con DNaseI Ambion realizamos una electrofresis para comprobar la calidad del RNA.

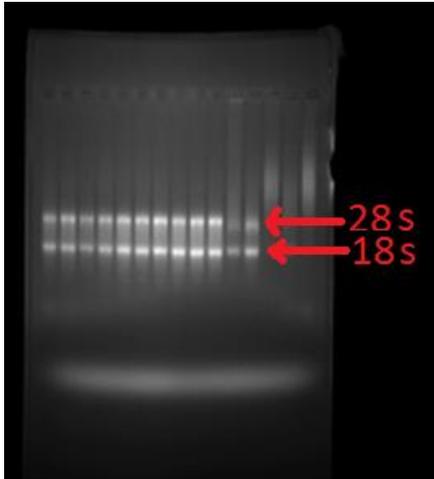


Figura 31. Podemos observar que se observan las bandas correspondientes al RNA ribosomal que son indicadoras de integridad del RNA y también se observa la ausencia de DNA genómico.

En las siguientes tablas se muestran los rendimientos de RNA obtenidos para los distintos tejidos antes y después de someter a las muestras a un tratamiento con DNaseI, los valores normales de concentración corresponden a unos 1000 ng/ μ L antes del tratamiento y en torno a 100 ng/ μ L tras el tratamiento.

Pretratamiento con DNaseI		
Rendimiento extracción		
	Número	ng/ μ L
Bazo	37	40,5
	38	1070
	39	826
	40	1555
	41	615
	42	2140
	43	146
	44	784
	45	2179
	46	768

Tras tratamiento con DNaseI		
	Número	ng/ μ L
Bazo	37	35
	38	119
	39	102
	40	62,5
	41	108
	42	46,5
	43	112
	44	95
	45	81
	46	110

Pretratamiento con DNaseI		
	Número	ng/ μ L
Intestino	37	1130
	38	665
	39	296
	40	2864
	41	2103
	42	385,3
	43	374,2
	44	334
	45	638,5
	46	1509

Tras tratamiento con DNaseI		
	Número	ng/ μ L
Intestino	37	103
	38	112
	39	100,5
	40	89
	41	69,5
	42	104,5
	43	123
	44	95
	45	107
	46	130,8

Pretratamiento con DNaseI		
	Número	ng/ μ L
Hígado	37	662
	38	127
	39	360
	40	541
	41	416
	42	466
	43	490
	44	559
	45	291
	46	293

Tras tratamiento con DNaseI		
	Número	ng/ μ L
Hígado	37	88,9
	38	93,2
	39	101,2
	40	100,5
	41	99
	42	95
	43	99
	44	99,4
	45	92
	46	98

Pretratamiento con DNaseI		
	Número	ng/μL
Cerebro	37	1893
	38	2269
	39	2890
	40	2021
	41	2158
	42	2364
	43	2012
	44	1980
	45	2644
	46	2526

Tras tratamiento con DNaseI		
	Número	ng/μL
Cerebro	37	112
	38	90
	39	54,5
	40	66
	41	94
	42	70
	43	96,5
	44	97
	45	82
	46	91

Conclusiones

Se han obtenido buenas extracciones de RNA de los distintos órganos con material suficiente para trabajar y se ha comprobado la calidad del RNA posteriormente.

Se ha demostrado que el modelo de ratones transgénicos funciona al ser inducidos por doxiciclina provocando un aumento en la expresión de KCa3.1 de manera estadísticamente significativa en los tejidos, intestino y pulmón y no se han encontrado diferencias significativas en bazo. Por otro lado, no se ha conseguido amplificar el gen para este canal en cerebro lo que concuerda con la bibliografía ni tampoco en hígado donde si esperábamos poder detectar esta amplificación.

Al realizar un q-PCR de bazo con los ratones del modelo knockout ha resultado obvio que este modelo no puede funcionar debido que no contenían el transactivador reverso en esta fase del desarrollo del modelo.

Conclusions

The RNA extraction occurred without incident and always enough material and yield extraction was obtained, the RNA quality of each sample has also always been checked.

It has been successfully proved that the overexpressing mice model for KCa3.1 works under doxycycline induction and that it causes a statistically significant rise in the

expression of KCa3.1 in Intestine and lungs but not in spleen. On the other hand, it has been impossible to determine expression levels in brain or liver.

After performing a q-PCR for spleen in an early of the development of an inducible knockout model for KCa3.1 (missing reverse transactivator so far) it has been shown that the Dox treatment itself does not change expression levels. This model is currently further developed by interbreeding with an inducible rtTA-expressing strain.

Bibliografia

- Abdullaev, I. F., Rudkouskaya, A., Mongin, A. A., & Kuo, Y. (2010). Calcium-Activated Potassium Channels BK and IK1 Are Functionally Expressed in Human Gliomas but Do Not Regulate Cell Proliferation, 5(8).
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012304>
- Adelman, J. P., Maylie, J., & Sah, P. (2012). Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels : Form and Function. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153336>
- Catacuzzeno, L., Fioretti, B., & Franciolini, F. (2012). Expression and Role of the Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 in Glioblastoma. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 421564.
<http://doi.org/10.1155/2012/421564>
- Channel, C. K. C., Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J., Rauer, H., Zhou, J., ... Aiyar, J. (1999). CELL BIOLOGY AND METABOLISM : Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance K Ca Channel , IKCa1 *, 274(9), 5746–5754. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5746>
- Francisco, S., & Francisco, S. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated, 94(October), 11651–11656.
- Grgic, I., Eichler, I., Heinau, P., Si, H., Brakemeier, S., Hoyer, J., & Ko, R. (2005). Selective Blockade of the Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Suppresses Proliferation of Microvascular and Macrovascular Endothelial Cells and Angiogenesis In Vivo. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000156399.12787.5c>
- Grgic, I., Kaistha, B. P., Hoyer, J., & Köhler, R. (2009). THEMED SECTION : ENDOTHELIUM IN PHARMACOLOGY REVIEW Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF – dilator responses – relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery, (November 2008), 509–526.
<http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, 25, 402–408.

<http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Logsdon, N. J., Kang, J., Christian, E. P., & Aiyar, J. (1997). Communication A Novel Gene , hKCa4 , Encodes the Calcium-activated Potassium Channel in Human T Lymphocytes * , 32723–32727.

Luca, A. C., Mersch, S., Deenen, R., Schmidt, S., Messner, I., Schäfer, K.-L., ... Stoecklein, N. H. (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS One*, 8(3), e59689.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059689>

Schumacher, M. a, Rivard, a F., Bächinger, H. P., & Adelman, J. P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature*, 410(6832), 1120–1124.

<http://doi.org/10.1038/35074145>

Srivastava, S., Zhdanova, O., Di, L., Li, Z., Albaqumi, M., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2008). Protein histidine phosphatase 1 negatively regulates CD4 T cells by inhibiting the K⁺ channel KCa3.1, 105(38).

Wulff, H., & Castle, N. (2010). Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 3(3), 385–396. <http://doi.org/10.1586/ecp.10.11.Therapeutic>