



**ZTF-FCT**  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología

**GRADO EN BIOLOGÍA**

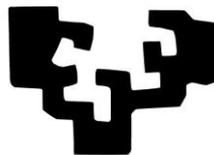
**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**PAPEL DE LAS GTPasas DE LA FAMILIA  
RHO EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA  
POR EL RECEPTOR P2X<sub>7</sub>**

Nerea Iturrioz Rodríguez

Leioa, Julio 2013

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# ÍNDICE

- Resumen.....	2
- Introducción.....	3-5
- Objetivo.....	5
- Materiales y métodos	
Cultivo de células.....	6-7
Contaje del número de células.....	7-8
Congelación de células.....	8
Plásmidos utilizados.....	8-10
Clonaje.....	10-11
Transformación de bacterias.....	11-12
Purificación de plásmido.....	12-14
Cuantificación de DNA.....	14
Transfección de células.....	15
Lisado de células.....	15
Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida...	15-16
Western blot.....	16-17
Revelado.....	17
Medida de la concentración de calcio intracelular.....	17-18
- Resultados y discusión.....	19-21
Conclusiones.....	22
Bibliografía.....	23

## **RESUMEN**

El objetivo de este proyecto es estudiar la señalización del receptor P2X<sub>7</sub> en respuesta a ATP en macrófagos J774A.1 y en células CHO K1. Para ello, se subclonó el gen que codifica para la proteína P2X<sub>7</sub> en el vector PMT2 HA AA. Éste plásmido fue transfectado a células CHO K1, J774.A1 y HEK 293T para distintas pruebas como la movilización de calcio intracelular para comprobar si ambos tipos celulares muestran la misma señal, y además se miró la expresión de este receptor y si su activación mediada por ATP se traduce en la activación de proteínas de la familia Rho. Se ha visto que las J774A.1 expresan funcionalmente el receptor P2X<sub>7</sub>, mientras que las CHO K1 muestran una respuesta funcional diferente que no se corresponde con la clásica señalización del P2X<sub>7</sub> asociado a la apertura del canal y posterior poro. Además, al expresar el receptor en células HEK 293T, se ha visto de una manera indirecta, midiendo la fosforilación de PAK, que la ruta de rac se regula de forma positiva cuando se activa el receptor P2X<sub>7</sub> en macrófagos.

## **ABSTRACT**

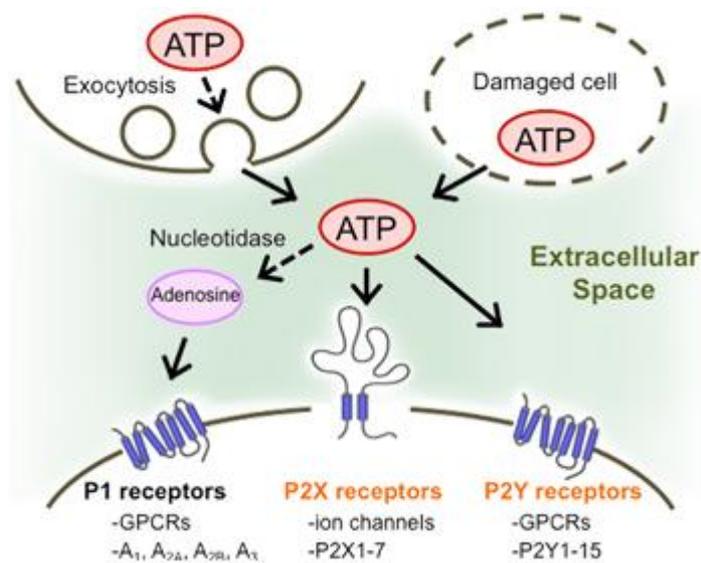
The aim of this project is on the one hand to study the sign posts of the P2X<sub>7</sub> receptor in response of ATP in J774A.1 and CHO K1 cells. For that this gene was subclonated in the PMT2 HA AA vector. This vector was transfectated to those cells to view the intracellular movement of Ca<sup>2+</sup>, proving that the response of these cells is not the same. On the other hand the aim is to see the expression of this receptor and if its activation results in the activation of proteins of the Rho family. For that, it was also subclonated in the same vector. It was seen, measuring the fosforilation of PAK, that the Rac's path is regulated positively when the P2X<sub>7</sub> is activated.

# INTRODUCCIÓN

Los receptores purinérgicos se engloban en una familia de moléculas insertadas en la membrana plasmática, envueltas en diversas funciones como la reactividad vascular, apoptosis, secreción de citoquinas y crecimiento celular entre otras (A.solini et. All 2000), aunque todavía existen funciones desconocidas.

El término “receptor purinérgico” se introdujo para clasificar una clase específica de receptores de membrana que medían la relajación del músculo liso intestinal como una respuesta a la liberación de ATP o adenosina.

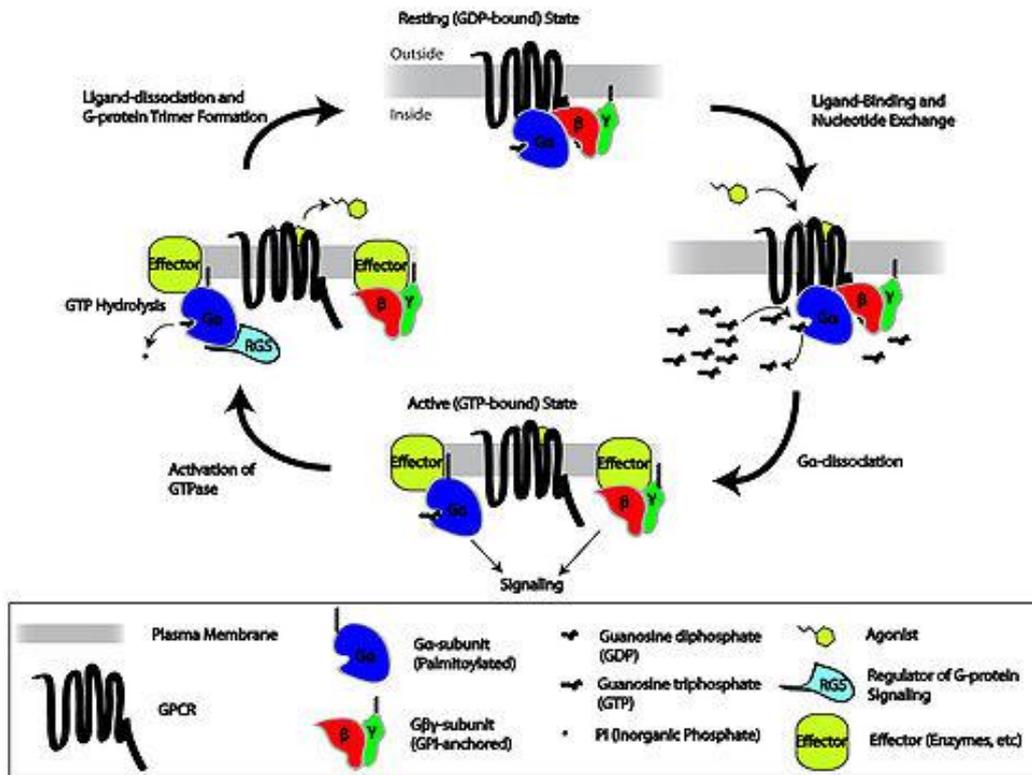
Hay dos tipos de familias dentro de los receptores purinérgicos: la familia P1 y la P2 la cual se divide a su vez en receptores P2X y P2Y



**Imagen 1: Imagen de los tres tipos de receptores purinérgicos**

Los receptores P1 y P2Y son receptores metabotrópicos que son característicos por estar acoplados a proteínas G. Los receptores P1 se activan preferentemente por la unión de adenosina y los P2Y por ATP.

Las proteínas G heteroméricas son GTPasas que se encuentran en la membrana plasmática ligada por sus subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  (hay una tercera acoplada a la  $\gamma$ :  $\beta$ ). Cuando el receptor de proteínas G recibe un estímulo, la subunidad  $\alpha$  adquiere cambios conformacionales y pierde así afinidad por el GDP (estado inactivo de la Proteína G) y permite la entrada de GTP. Este cambio conformacional y la unión de GTP hace que la subunidad  $\alpha$  se disocie del complejo. Dicha subunidad activa cascadas de señalización como la generación de AMP cíclico, entre otras, mientras que las subunidades  $\gamma$  y  $\beta$  pueden ejercer funciones biológicas como la apertura de canales.



**Imagen 2: Mecanismo de activación de una Proteína G**

Otro tipo de GTPasas son las que constituyen la familia Rho, cuyos miembros mejor caracterizados incluyen a RhoA, Rac1 y Cdc42, son actores clave en las complejas redes de señalización que controlan la actividad fisiológica en todos los tipos de células. Las GTPasas Rho y por extensión las de la superfamilia Ras funcionan como interruptores moleculares ciclando entre el estado inactivo (cargadas con GDP) y el activo (cargadas con GTP). La transición entre las formas inactivas y activas está regulada por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs). Las señales que emanan de una amplia variedad de receptores de membrana regulan positivamente la actividad de las GTPasas Rho. Como por ejemplo los receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (TK), EGFR y PDGFR, o de otros tipos, como los receptores acoplados a proteínas G. En su configuración activa, las GTPasas interactúan con moléculas efectoras para promover una variedad de respuestas biológicas. Las GTPasas de la familia Rho se sabe controlan la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a señales extracelulares, aunque además participan en procesos biológicos como la regulación de expresión génica, la polaridad celular y la migración celular.

Los receptores P2X, sin embargo, son canales iónicos de membrana regulados por ligando (ATP extracelular). La apertura del canal permite la permeabilidad de iones como el sodio, potasio, protones o calcio. Se puede decir que la activación de estos receptores puede provocar un aumento de los niveles intracelulares de calcio y una disminución del pH celular, así como la despolarización de la membrana plasmática. Estos receptores se diferencian del

resto de receptores iónicos por la presencia de sólo dos dominios transmembrana dentro de los canales.

Dentro de esta familia se han identificado siete miembros, desde el P2X<sub>1</sub> al P2X<sub>7</sub>, que muestran gran afinidad por el ATP, excepto el P2X<sub>7</sub>, que tiene una afinidad menor. Se encuentran distribuidos en variedad de tejidos, y en el caso del P2X<sub>7</sub> existen en células del sistema inmune (North RA. 2002).

El receptor P2X<sub>7</sub> fue identificado por primera vez por Surprenant y colaboradores (1996) en macrófagos y cerebro de rata, habiendo sido denominado durante mucho tiempo por el nombre de P2Z. El canal del receptor presenta un alta permeabilidad para el calcio, sodio y potasio, aunque requiere altas concentraciones de ATP (>100 µM) para ser estimulado, ya que éste tiene una afinidad baja por éste.

Se ha visto que la estimulación prolongada con ATP conduce a la formación de poros en la membrana plasmática para moléculas de hasta 990 Da, que además induce *Blebbing* (proceso por el cual la membrana se vuelve inestable), que más tarde produce fragmentación del DNA y por último apoptosis (Chow et al., 1997; Schulze-Lohoff et al., 1998).

Este receptor tiene motivos en regiones conservadas del extremo C-terminal que le permiten participar en variedad de cascadas de señalización, presenta además, regiones de unión a proteínas y sitios de fosforilación (Kim et al., 2001).

Conocer la caracterización de este receptor es importante porque hay polimorfismos que provocan el cambio puntual de un aminoácido en el extremo C-terminal que provoca ciertos tipos de leucemia, pérdida de capacidad para evitar los procesos de muerte y pérdida de la capacidad para inducir la liberación de Interleuquina 18 y 1β en monocitos. Se ha descrito que en ratones Knock-Out para P2X<sub>7</sub> la ivermectina, potenciador del receptor P2X<sub>4</sub>, era capaz de estimular la liberación de Interleuquina 1β en respuesta al ATP (Seil M. et al., 2010).

Además se ha visto que el residuo Tyr343 se defosforila mediante h-RTPTβ cuando se da la activación del receptor (Kim M. et al., 2001) por ATP.

## OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es estudiar la señalización del receptor P2X<sub>7</sub> en respuesta a ATP en macrófagos J774A.1 y en células CHO K1. Para ello, se medirá la movilización de calcio intracelular y se comprobará si ambos tipos celulares muestran la misma señal. Por otra parte, proponemos averiguar si la activación del receptor P2X<sub>7</sub> mediada por ATP se traduce en la activación de proteínas de la familia Rho.

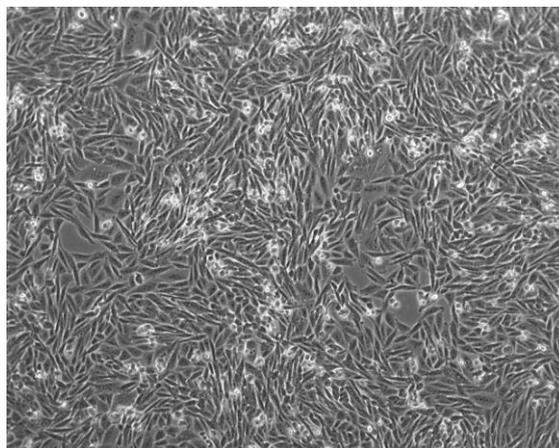
# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cultivo de células

### - Líneas celulares:

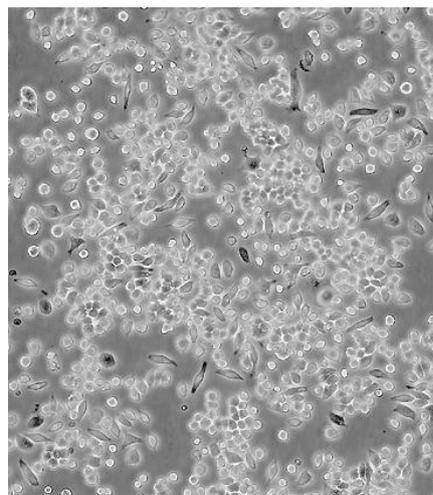
Las células que se han utilizado en este proyecto han sido:

- CHO K1: se obtuvieron como un subclon de la línea celular CHO parental iniciada a partir de una biopsia de un ovario de un hámster chino adulto (T.T. Puck et al., 1958). Se trata de células hipodiploides adherentes cuya morfología es epitelial. Además carecen de la forma activa del gen necesario para la síntesis de la prolina. Se utilizaron diluciones de 1:5 y 1:4 para su mantenimiento.

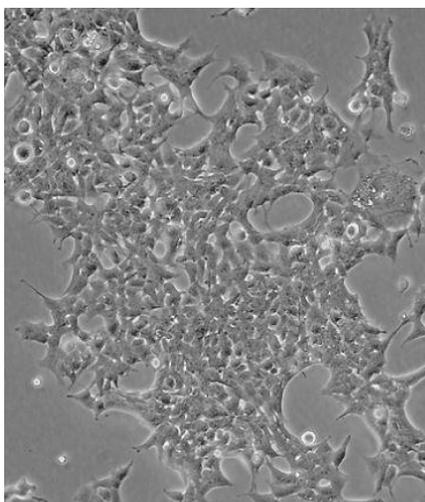


**Imagen 3: Cultivo de células CHO K1 en medio DMEM**

- J774.A1: macrófagos provenientes de sangre de ratón que se adhieren al sustrato y que producen el factor de activación de linfocitos llamado IL-1 y además presentan anticuerpos independientes de fagocitosis. Se utilizaron diluciones de 1:5 y 1:4 para su mantenimiento. (BIOINFORMATICS)



**Imagen4: cultivo de células J774.A1 en medio DMEM**



**Imagen 5: cultivo celular de HEK 293T en medio DMEM**

- HEK 293T: células que provienen del riñón de un feto humano, con morfología epitelial y adherentes. Además expresan el antígeno T para el virus de simio 40 (SV40). Se utilizaron diluciones de 1:20 y 1:15 para su mantenimiento.

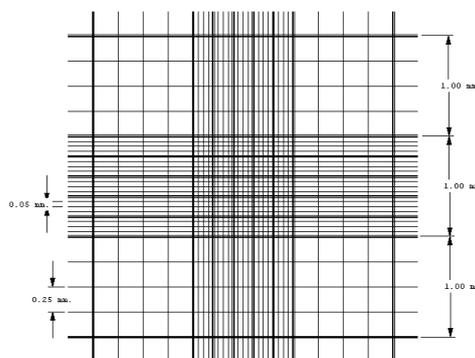
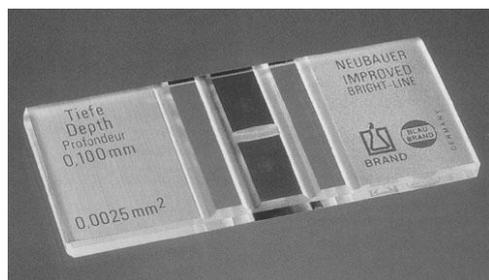
Los tres tipos celulares se mantuvieron y subcultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) suplementado con Glutamina (0.292mg/mL), Estreptomicina (100µg/mL)/Penicilina (100u/mL) y Suero Bovino desactivado (FBS) al 10% a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>.

#### - Subcultivos:

A la hora de subcultivar, es decir, transferir un número pequeño de células a un recipiente para el crecimiento favorable de éstas, primero se retiró el medio de cultivo del recipiente y se lavó con 10 mL de PBS (1X) dos veces. Después se echaron 2-3 mL de la solución Tripsina (enzima peptidasa que rompe los enlaces de proteínas mediante hidrólisis) con EDTA (agente quelante) y se dejó incubando durante 5 minutos a 37°C para que ésta actuase, haciendo que las células se despeguen del sustrato. Una vez hecho esto, se echó medio de cultivo suplementado con antibióticos (Estreptomicina/Penicilina) y FBS (10%) para homogeneizar allí las células totales. Dependiendo de la dilución en la que se mantuvieron las distintas líneas se echaron distintos mL de ese homogeneizado a placas petri, añadiendo después medio de cultivo completo hasta los 10 mL.

#### - Contaje del número de células y viabilidad:

Para el contaje de células se utilizó la *Cámara de Neubauer* o hematocitómetro. Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En este caso se utilizó una cámara doble, donde existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara. La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado que está subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1 mm de lado cada uno (9 mm<sup>2</sup>).



**Imagen 6:** a la izquierda se encuentra una fotografía de la Cámara Neubauer y a la derecha se encuentra una fotografía de la retícula

Para efectuar el conteo de los tres tipos celulares se usaron los cuatro cuadrados grandes de cada esquina, que a su vez están divididos en 16 cuadrados. Además del hematocitómetro se utilizó un cubre objetos, siendo la superficie que queda regulada bajo éste de 0'1 mm. El volumen, por tanto, de cada cuadrado es de  $1 \times 1 \times 0'1 = 0'1 \text{ mm}^3$  ( $0'1 \mu\text{m}$ ).

Para la preparación de la muestra se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cultivo celular y 90  $\mu\text{L}$  de Azul de tripano, colorante vital que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas), siendo de 10 el factor de dilución que más tarde se aplicó para calcular el número de células viables por mililitro mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Células viables/mL} = (\text{n}^\circ \text{ células/mm}^2) \times 10.000 \times \text{Factor de dilución}$$

#### **- Congelación de células:**

Para la congelación de células primero se recogieron las células con la misma técnica que al hacer subcultivos, con la diferencia de que ahora se resuspendieron en 10 mL de medio de congelación (10% DMSO en FBS) para evitar la rotura de las células. La cantidad de células a congelar debería ser de un millón de células por criotubo, pero como en el proceso hay células que mueren, se añade alguna más.

En cada criotubo se añadió 1 mL de medio de congelación con las células y se marcaron (nombre de las células, fecha y nombre del manipulador). Se introdujeron a un contenedor que contiene isopropanol y se almacenaron en un congelador a  $-80^\circ\text{C}$ .

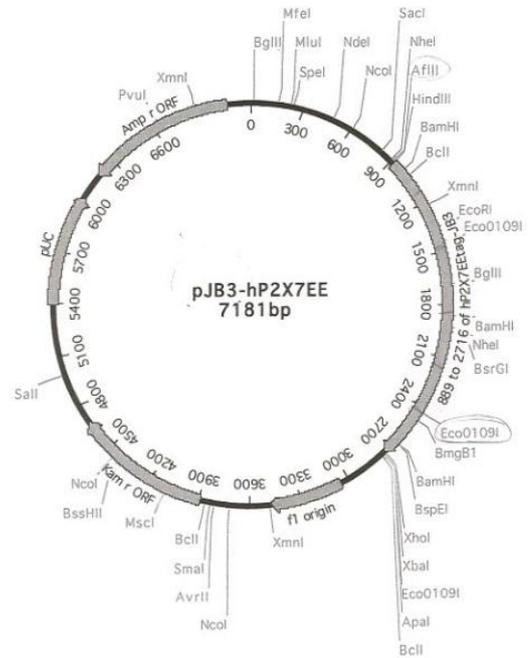
### **Plásmidos utilizados**

Para poder ver la relación de la activación de P2X<sub>7</sub> ligada a proteínas de la familia Rho fue necesario subclonar el gen de P2X<sub>7</sub> en un vector nuevo, cuyo Tag fuese adecuado para después verlo mediante WesternBlot.

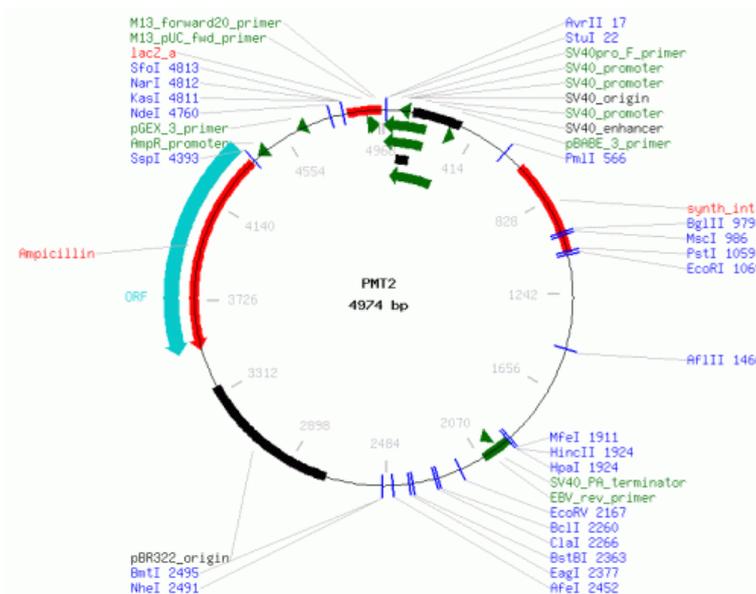
Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

· pJB3-hP2X7EE:

Este vector consta de un gen resistente a la ampicilina y kanamicina, un origen de replicación para bacterias (pUC) y para eucariotas (f1 origin).



**Imagen 7:** mapa del vector pJB3 EE con en el inserto del gen P2X7



**Imagen 8:** mapa del vector pPMT2 HA. AA

Para poder subclonar el gen P2X<sub>7</sub> primero se debió saber cómo estaba subclonado el vector pJB3-EE. Para ello se sintetizaron dos oligos:

- Forward: GCTCTAGAATGCCGGCCTGCTGCAGCTGC
- Reverse: GGTCTAGAGCTATTCCATTGGCATGTA

Se secuenció la amplificación:

- P2X<sub>7</sub> F

GGCGGACCGCCAGCTATCCGTATGAGACGACAAGTCACTCGGATCCAGAG  
CATGAATTATGGCACCATTAAGTGGTTCTTCCACGTGATCATCTTTTCCT  
ACGTTTGCTTTGCTCTGGTGAGTGACAAGCTGTACCAGCGGAAAGAGCCT  
GTCATCAGTTCTGTGCACACCAAGGTGAAGGGGATAGCAGAGGTGAAAGA  
GGAGATCGTGGAGAATGG

- P2X<sub>7</sub> R

ATAGGAAAAAATGAGCCACCACATAATACCCAGCCAAAATTTGTATTGGC  
CGCGTATAGTTTTTCAGTTGAGCGCCAGTCACTCGGATCCAGAGCATGAAT  
TATGGCACCATTAAGTGGTTCTTCCACGTGATCATCTTTTCCTACGTTTG  
CTTTCTCTGGTGAGTGACAAGCTGTACCAGCGAAAGAGCCTGTCATCAGT  
TCTGTGCACACCAAGGTGAAGGGGATAGCAGAGGTGAAAGAGGAGATCGT  
GGAGAATGGAGTGAAGAAGTTGGTGACAGTGTCTTTGACACCCGCAGACT  
ACACCTTCCCTTTGCAGGGGAACTCTTTCTTCGTGATGACAACTTTCTC  
AAAACAGAAGGCCAAGAGCAGCGGTTGTGTCCCGAGTATCCCACCCGCAG  
ACGCTCTGTTCCCTCTGACCGAGGTTGTAAAAAGGGATGGATGGACCCGCA  
GACAAAGGAATTCAGACCGGAAGTGTGTAGTGCATGAAGGGAACCAGAAG  
ACCTGTGAAGTCTCTGCCTGGTGCCCCATCGAGGCAGTGGAAAGAGGCCCC  
CCGGCTGCTCTCTTGAACAGTGCCGAAAACCTTCACTGTGCTCATCA

Una vez secuenciado, se comparó con la secuencia del gen comprobó qué enzimas de restricción estaban más próximos a comienzo de transducción y se vio que se trataba de la enzima XbaI.

## Clonaje

### - Digestión:

Las digestiones se realizaron a 37°C durante una hora con una mezcla de digestión que contaba con la cantidad de plásmido correspondiente a 1 µg/µl, 2 µg (ya que está a una concentración de 10X y el volumen total es de 20 µL), 1µL de enzima XbaI y el resto de agua.

### - Defosforilación

Cuando un plásmido se digiere o se abre, es lógico pensar que si ambos extremos son romos, éste podría volver a circularizarse. Para evitar eso, se defosforiló añadiendo 2 µL de enzima fosfatasa alcalina. Esto se incubó a 37°C durante una hora.

### **- Ligación**

Para que la ligación sea óptima se realizó la ligación con distintas proporciones de vector e inserto; 1:1, 1:3 y 3:1 respectivamente. Para ello se calcularon los  $\mu\text{L}$  necesarios de DNA plasmídico (PMT2) e inserto (P2X7 purificado) a través de la siguiente fórmula:

$$[(\text{ng vector} \times \text{kB inserto}) / \text{kB vector}] \times I/V = \text{ng inserto}$$

Para que la ligación se dé, se requirió de la enzima T4 ligasa (1  $\mu\text{L}$ ) y el tampón ligasa (2  $\mu\text{L}$ ).

Se guardaron las ligaciones a 4°C hasta su posterior uso.

### **-Electroforesis en gel de agarosa**

Para la formación de un gel de agarosa al 8% se utilizaron 50 mL de tampón TAE, donde se disolvieron 0,4 g de agarosa. Para una mejor disolución se calentó en el microondas la mezcla. Una vez enfriada la mezcla homogénea se echaron 5  $\mu\text{L}$  de Bromuro de Etidio y se colocó todo ello en una cámara de electroforesis con peines para la posterior formación de pocillos.

Se dejó enfriar y al retirar los peines se formaron los pocillos donde se cargaran las muestras.

Se enchufó todo ello a una fuente de alimentación (100V) y se dejó migrar.

### **Transformación de bacterias:**

Las bacterias que se transformaron fueron de la especie *Escherichia coli* la cepa DH5 $\alpha$ .

Se incubaron 50  $\mu\text{L}$  de dichas bacterias con 2'5  $\mu\text{L}$  de DNA (el plásmido PMT2 HA. AA con el gen que codifica para la proteína P2X<sub>7</sub>) en hielo durante unos 30 minutos, conteniendo el medio CaCl<sub>2</sub>, un catión divalente que prepara las membranas para ser permeables al DNA que se va a transformar.

Después se aplicó choque térmico de 45 segundos a 42°C para que el DNA plasmídico circular entre en *E. coli* por medio de poros transitorios.

Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de medio SOC y se dejó incubando en agitación durante una hora a 37°C.

Al finalizar la incubación, se rotuló una placa con medio LB-Agar y ampicilina (para que las bacterias que sobrevivan sean las que contengan el plásmido) y se sembraron 60  $\mu\text{L}$  de bacterias transformadas mediante un asa de Digradski. Se incubó dicha placa en una estufa a 37°C durante toda la noche.

A la mañana siguiente se comprobó si había habido crecimiento de colonias, y si por tanto la transformación había sido satisfactoria. Una vez visto el crecimiento de colonias, se picaron varias de ella con una punta de una pipeta y se metieron cada una en un Falcon que contiene 5 mL de medio LB y ampicilina (5µL). Se incubaron los tubos Falcon en agitación a 37°C durante toda la noche.

## **Purificación de plásmido**

Para la purificación del plásmido se hicieron tanto MAXIPREPs como MINIPREPs dependiendo de la cantidad de DNA que lleve la muestra, utilizándose la MAXIPREP para cantidad de DNA grande y la MINIPREP para cantidad de DNA menor.

El fundamento básico para la purificación de DNA plasmídico es añadir iones caotrópicos a los ácidos nucleicos para que eliminen la capa hidratante por la que se encuentran recubiertas en condiciones normales y así crear un entorno hidrofóbico alrededor del DNA. Así los ácidos nucleicos pueden unirse a la membrana de sílica de las columnas empleadas en los protocolos, mientras que las proteínas, metabolitos y otros contaminantes son eliminados en varios procesos de lavado. Después se eluyen los ácidos nucleicos de la membrana.

Para la MINIPREP: se utilizó el kit NucleoSpin Plasmid (Plasmid Isolation of high copy plasmid DNA from *E. coli*). Para ello se siguieron los pasos dictados en dicho protocolo:

- Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 15 minutos (a 4°C) los tubos que contengan las bacterias transformadas. Así se obtuvieron las células en el pellet, siendo el sobrenadante el medio de cultivo.
- Resuspender el pellet en 250 µL de Buffer A1 con una pipeta.
- Pasar cada tubo a un eppendorf de 1'5 mL.
- Añadir 250 µL del Buffer A2 y darles la vuelta con la mano 8 veces.
- Incubar los eppendorf durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 300 µL de Buffer A3 a cada eppendorf y darles la vuelta con la mano 8 veces.
- Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 11.000 r.p.m. para que el pellet sea las células rotas y el sobrenadante el DNA. Se repite este proceso si hace falta.
- Preparar tantas columnas como muestras se estén purificando.
- Verter el sobrenadante de cada eppendorf a una columna y centrifugar a la máxima velocidad durante un minuto para después descartar lo diluido.
- Añadir 500 µL de Buffer AW (previamente calentado) a la columna y centrifugar a la máxima velocidad durante un minuto para después descartar lo eluido.

- Añadir 600 µL de Buffer A4, centrifugar a la máxima velocidad y descartar lo eluido.
- Volver a centrifugar durante dos minutos para que todo se eluya por completo.
- Cambiar la columna a un eppendorf nuevo y añadir 50 µL de Buffer de Elusión (AE).
- Incubar el eppendorf durante un minuto a temperatura ambiente y centrifugarlo a 11.000 r.p.m. durante un minuto.
- Guardar el eppendorf con el DNA plasmídico a 4°C para su conservación.

Para la MAXIPREP se utilizó el kit GenElute HP Plasmid MaxiPrep kit:

- Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet con 12 mL de Solución de resuspensión/RNasa usando una pipeta de 10mL.
- Añadir 12 mL de Solución de Lisis y mezclarlo invirtiendo el Falcon 6-8 veces (NO VORTEAR).
- Esperar 3-5 minutos (no más de 5 minutos)
- Añadir 12 mL de solución de neutralización, invertir el tubo 4-6 veces, formándose así un agregado blanco.
- Echar el contenido del Falcon a una jeringa que contiene un filtro y que está unida a un Falcon de 50 mL estéril por debajo de la jeringa y esperar 5 minutos.
- Introducir un émbolo y presionar para que caiga el líquido excepto el agregado blanco.
- Añadir 9 mL de Solución de Unión al Falcon colocado debajo de la jeringa e invertir 1-2 veces.
- Colocar una columna de unión y añadir 12 mL de Solución de Preparación.
- Cuando se haya filtrado la Solución de Preparación y justo entonces añadir el lisado (contenido en el Falcon).
- Añadir 12 mL de Solución de Lavado justo cuando se haya filtrado lo anterior.
- Añadir 12 mL de Solución de Lavado 2 (antes verificar que contenga etanol).

- Secar la columna aplicando vacío durante 10-20 minutos.
- Colocar la columna a un Falcon de 50 mL y añadir 3 mL de la Solución de Elución (previamente calentada)
- Centrifugar durante 5 minutos a 4.000 r.p.m. y así se obtendrá DNA plasmídico en el Falcon.

## Cuantificación de DNA

Para la cuantificación del DNA se utilizó por un lado el aparato ND-1000 (NanoDrop) y por otro lado un método más rústico en el que se emplean diluciones de marcador y DNA en un gel de agarosa.

### ND-1000: (NanoDrop)

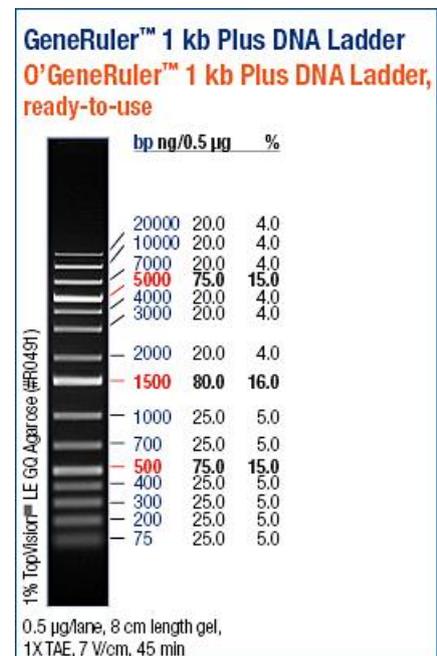
- Comprobar que el aparato de medida esté seco pasando un trozo de papel.
- Coger 2  $\mu$ L de medio de elución y colocarlos en el punto del aparato para que se analice. Pinchar en BLANK para que éste lo detecte como blanco. Secar con un papel. Repetir el proceso una vez más.
- Añadir 2  $\mu$ L del cDNA y pinchar en la tecla MEASURE para que el programa dé la concentración de la muestra.



**Imagen 9:** aparato denominado NanoDrop para la cuantificación de DNA

### Diluciones:

Se utilizó un gel de agarosa al 8%. Se cargaron las muestras con tampón de carga en distintas diluciones y se diluyó también varias veces el marcador (1Kb plus) como referencia.



**Imagen 10:** imagen de un marcador de hasta 20 kb de GeneRuler

## **Transfección de células**

Se utilizaron las células HEK 293K, una línea celular altamente transfectable. Para que la transfección sea óptima las células, al ser adherentes, deben estar con una confluencia del 50-70%, por tanto el día antes de la transfección se sembraron 750.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. La transfección se realizó siguiendo el protocolo Xfect Transfection Reagent Protocol-At-A-Glance (PT5003-2):

- Vortear el Xfect Polymer
- Diluir 5 µg del DNA plasmídico en 100 µL de Xfect Reaction Buffer
- Vortear durante 5 segundos.
- Añadir 1'5 µL (0'3 por cada µg de DNA) de Xfect Polymer.
- Vortear durante 10 segundos.
- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Darle un “spindown”
- Añadirlo a las placas y mover éstas delante y detrás.
- Incubarlo a 37°C durante 4h-toda la noche.
- Transcurridas 24 horas cambiar el medio de cultivo (2mL) a las placas.
- Transcurridas otras 24 horas lisar las células.

## **Lisado de células**

Para el lisado de las células primero se lavaron con PBS 1X dos veces cada pocillo y después se añadieron 100 µL del tampón de lisis RIPA (20mM TrisHCl (pH=7.4), 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaF, 1mM OrtovanadatoNa y 0.5% IPGAL). Se levantaron las células con un Scrapely y se introdujo la mezcla en distintos tubos eppendorfs.

Se incubaron durante 20 minutos a 4°C en la noria y después se centrifugaron a 13.500 r.p.m. durante 10 minutos (a 4°C).

Las proteínas se encuentran en el sobrenadante por lo que éste se separó en otro eppendorf estéril.

## **Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida**

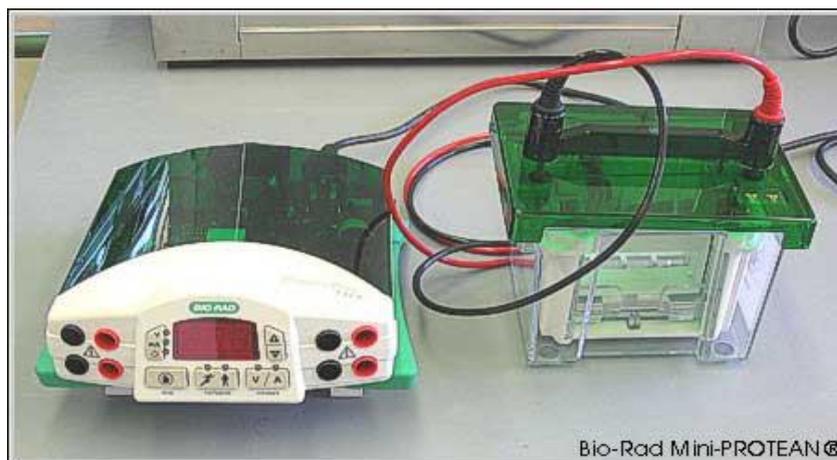
Antes de nada se montó el soporte de polimerización de los geles limpiando los cristales con etanol para evitar así cualquier tipo de contaminación. Dependiendo del peso molecular de la proteína se preparó un gel de poliacrilamida con distintas concentraciones. En primer lugar se preparó el “resolving gel” siguiendo el orden y las cantidades concretas de cada componente: 3.23 ml de H<sub>2</sub>O, 3.90 ml de 1M Tris pH 8.8, 100 µL de SDS 10%, 2.667 mL de Acrilamida 30%, 4 µL de TEMED y 100 µL de APS 10%. Cuando éste polimerizó, se añadió el “stacking

gel” con las siguientes cantidades: 3.09 ml de H<sub>2</sub>O, 980 µl de 1M Tris pH 6.8, 50 µL de SDS 10%, 830 mL de Acrilamida 30%, 5 µL de TEMED y 50 µL de APS 10%.

Se cargaron las muestras con tampón de carga LB 6X y se calentaron al baño maría durante 10 minutos para conseguir la desnaturalización de las proteínas.

Se montó la cubeta con el sistema de migración en la que se introduce el gel y se cargaron los pocillos.

Se migró el gel conectándolo a una fuente de alimentación.



**Imagen 11: Electroforesis: soporte donde se encuentra un gel de poliacrilamida unido a una fuente de alimentación.**

## Western blot

Una vez separadas las proteínas según su tamaño se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para eso, primero se preparó el soporte que incluye la membrana y el gel migrado con dos esponjas y cuatro papel watman todo ello humedecido antes en tampón de transferencia. Se mete en la cubeta con una placa de hielo y se le añadió dicho tampón. Se conectó la cubeta a una corriente eléctrica a 25V durante dos horas y 30 minutos.

Una vez terminada la transferencia se añadió Poseau (colorante rojo) para la comprobación de bandas.

Se retiró el Poseau limpiando la membrana con agua y más tarde se lavó con TBST al 1%.

Después se añadió leche (una mezcla de 50 mL de TBST al 1% y 2'5g de leche en polvo) y se dejó incubando en agitación a temperatura ambiente durante una hora.

Transcurrida esa hora se retiró la leche y se lavó la membrana con TBST. Se añadió a continuación el anticuerpo primario Glu-Glu (1:1000), ya que en el vector se encontraba ese Tag. Este anticuerpo una vez incubado durante una hora a 37°C o durante toda la noche a 4°C, se guarda para su posterior uso. Se hicieron tres lavados TBST de 15 minutos uno y dos de 5 minutos en agitación. Una vez hecho eso, se añadió anticuerpo secundario Anti-ratón (1:5000).

El anticuerpo secundario se incubó a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se realizaron los tres lavados mencionados anteriormente.

### **Revelado:**

Para el revelado se colocó la membrana en un papel transparente y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la solución B y otros 200  $\mu\text{L}$  de A (previamente homogeneizados). Se tapó la membrana con otro papel transparente y se llevó al ordenador para que fuera fotografiada.

### **Medida de la concentración de calcio intracelular**

El día anterior a la medida de calcio se sembraron 75.000 células por pocillo en una placa de cuatro pocillos, con un volumen total de 500  $\mu\text{L}$  por pocillo. En cada pocillo se colocó, previo al sembrado, un cubreobjetos redondo (lavado anteriormente con etanol y PBS:  $\text{NaHPO}_4$  80mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20mM y  $\text{NaCl}$  100mM a pH 7.5) sobre el cual se pegaron las células.

La medida de calcio intracelular se realizó mediante el método de Grynkiewicz G. et al., 1985, utilizando la sonda fluorescente FURA-2 AM. El FURA-2 AM es la forma acetometilester del FURA-2, que es permeable a la membrana y una vez en el citosol es procesado por las esterasas inespecíficas, quedando el FURA-2 AM atrapado en el citosol.

Para realizar la medida se debieron cargar las células con la sonda, por lo que se siguieron los siguientes pasos:

- Eliminar el medio de cultivo de las células, añadir 300 $\mu\text{l}$  de medio DMEM, 1  $\mu\text{l}$  de FURA-2 AM (1,67mM FURA-2 AM final) e incubar a 37°C durante 45 minutos.

- Quitar el medio con FURA2 de las células y lavar los pocillos dos veces con 500 $\mu\text{l}$  de HBS (Hepes buffered saline: 10 mM HEPES, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5,4 mM  $\text{KCl}$ , 150 mM  $\text{NaCl}$  y 5 mM glucosa). Así se eliminó la sonda no incorporada, y se añadió HBS a las células para evitar que se resequen mientras se procedió a medir el calcio.

La medida de la concentración de calcio intracelular se monitoriza mediante un sistema de captura rápida de imagen acoplado a un microscopio óptico Nikon eclipse TE300. El sistema consiste en un monocromador DeltaRAM acoplado a una cámara enfriada Cool-Snap, todo ello controlado por un software Image Master (Photon Technology Internacional). La fluorescencia del FURA-2 AM se monitoriza constantemente a las longitudes de onda de excitación de 340 nm y 380 nm y de emisión 510 nm con tiempos de exposición dependientes de la muestra.

Se cogió con una pinza el cubreobjetos que llevaba las células, se pegó con grasa de silicona el cubreobjetos a la cámara, se fijó la cámara a la pletina de manera que el cubreobjetos con las células quedó en la parte central, se añadió HBS a las células para que no se secasen en la cámara y se llevó la pletina al microscopio. Se enfocó las células con los objetivos 20X, 40X. Se acopló la cámara a un flujo de entrada que conecta con distintos medios: HBS, HBS

complementado con 1mM MgCl<sub>2</sub> y ATP (HBS y 1mM ATP); y a un flujo de salida. Se puso en marcha el flujo.

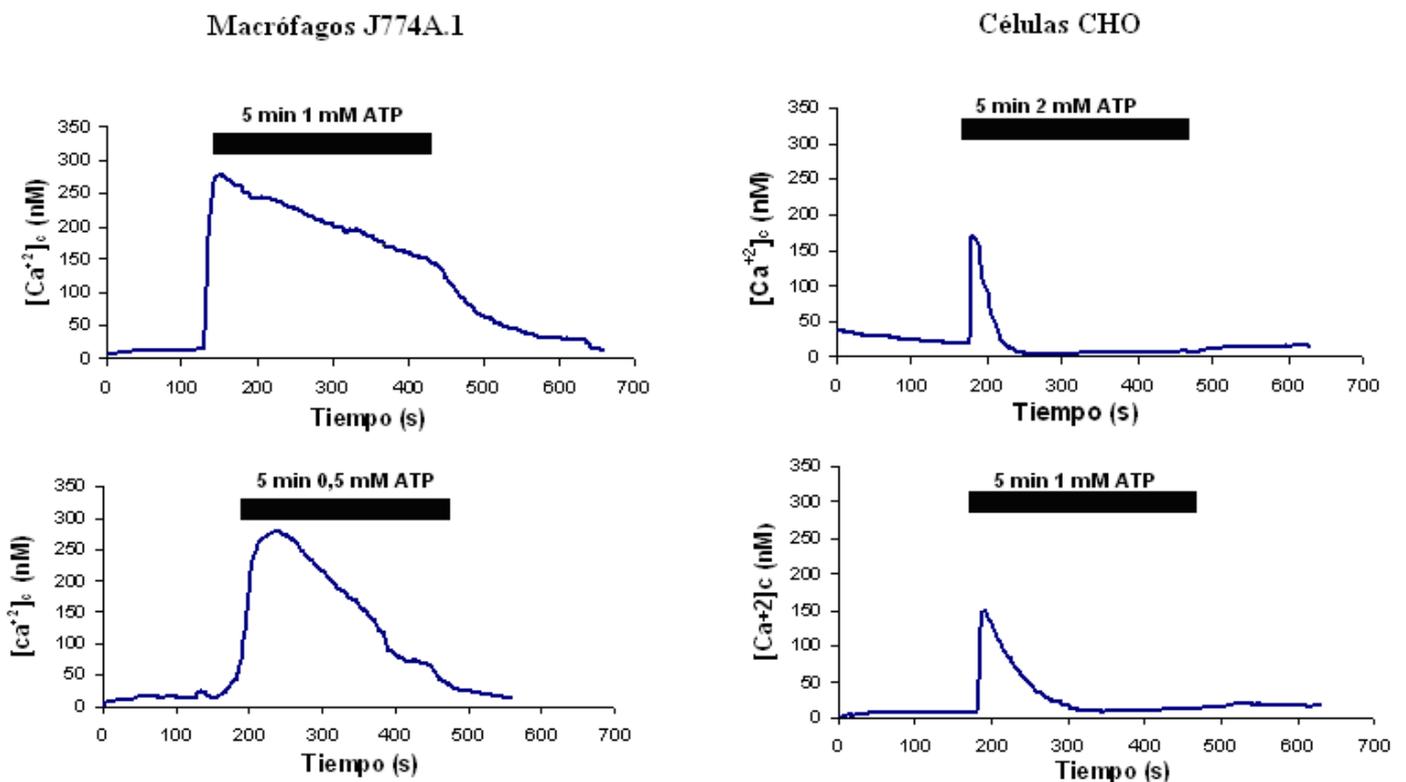
Con el software Image Master se observaron las células tras su exposición a los distintos medios. Durante los tres primeros minutos se sometió a las células a flujo de HBS, luego durante cinco minutos se expusieron a flujo de ATP y se volvieron a someter a flujo de HBS. Se guardaron los datos obtenidos y se exportaron para determinar la concentración de calcio intracelular mediante una hoja de cálculo creada en el programa Microsoft Excel.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Medida de calcio en células J774A.1 y CHO K1

Se estudió la respuesta al ATP en términos de concentración citosólica de calcio. Para ello, las células CHO y J774A.1 fueron cargadas con la sonda fluorescente Fura 2 sensible a calcio. Luego, las células fueron estimuladas con 0,5 mM, 1 mM. y 2 mM de ATP.

Cuando se estimulan células J774A.1 con ATP se observa un rápido incremento del calcio intracelular debido a la apertura de un canal iónico ( $\sim +260$  nM), seguido de la apertura de un poro que es dependiente de la presencia de ATP, sin embargo cuando se estimulan células CHO el incremento de calcio es de ( $\sim +170$  nM) a 1 y 2mM de ATP. La respuesta en células CHO es distinta de la de los macrófagos ya que se recuperan rápidamente los niveles basales de calcio citosólico incluso en presencia de ATP. Este comportamiento es debido a la presencia de un canal iónico que no parece estar asociado a la apertura de un poro, diferenciándose de la señalización mediada por ATP en macrófagos. Se sabe que la respuesta al ATP del receptor P2X<sub>7</sub> es inhibida por la presencia de magnesio en el medio debido a la formación de complejo ATP-Mg. De hecho, se han realizado estudios en presencia de magnesio en glándula submandibular de rata con una notable reducción de la respuesta al ATP y consiguiente reducción de la concentración de calcio ATP<sup>4</sup>. El magnesio bloquea las cargas negativas del ATP, necesarias para la estimulación del receptor y así como para la del poro asociado.



**Figura 1: Efecto del ATP en la respuesta al calcio en células J774A.1 y CHO K1. Las células fueron incubadas a 37°C durante 45 minutos con 300 µl de medio DMEM y 1,7 mM Fura-2/AM. Transcurrido este tiempo las células fueron lavadas con medio HBS, se montaron en el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE300 dentro de una cámara de perfusión con 150 µl de HBS y perfundidas constantemente (1 ml/min) con HBS en presencia 5 mM de glucosa y 2 mM calcio. Las células fueron expuestas a un estímulo de ATP durante cinco minutos, la reacción se realizó a 37°C.**

Cuando se estimula macrófagos J774A.1 con 0,5 mM de ATP durante cinco minutos (aprox. 180 a 480 segundos) se observa un máximo de concentración de calcio a +276 nM. Seguidamente se produce un descenso de la concentración de calcio. Después de la apertura del canal, se observa la apertura de un poro que depende de la presencia de ATP y decae rápidamente con el cese de la señal ATP. Cuando se estimula con 1 mM de ATP el máximo de concentración de calcio se alcanza a +268 nM, se produce una mayor apertura del poro que a 0,5 mM ATP, y al retirar el ATP este también decae rápidamente a niveles basales. El descenso de calcio a niveles basales se debe a la presencia de un poro que está asociado al receptor P2X<sub>7</sub>. Estas respuestas son características del receptor P2X<sub>7</sub>.

En la estimulación de células CHOK 1 con 2 mM de ATP durante cinco minutos se observa un máximo de concentración de calcio a +172 nM que cae muy rápido en comparación con las células J774A.1 debido a que la célula se recupera rápidamente. Cuando se estimula con 1 mM de ATP, al igual que el caso anterior, se aprecia un máximo de concentración de calcio a +149 nM que desciende rápidamente sin la apertura del poro a niveles basales de calcio estando el agonista purinérgico aún presente en el medio. La concentración máxima de calcio es mayor cuando se estimula con más concentración de ATP. No se observa una respuesta característica del receptor P2X<sub>7</sub>.

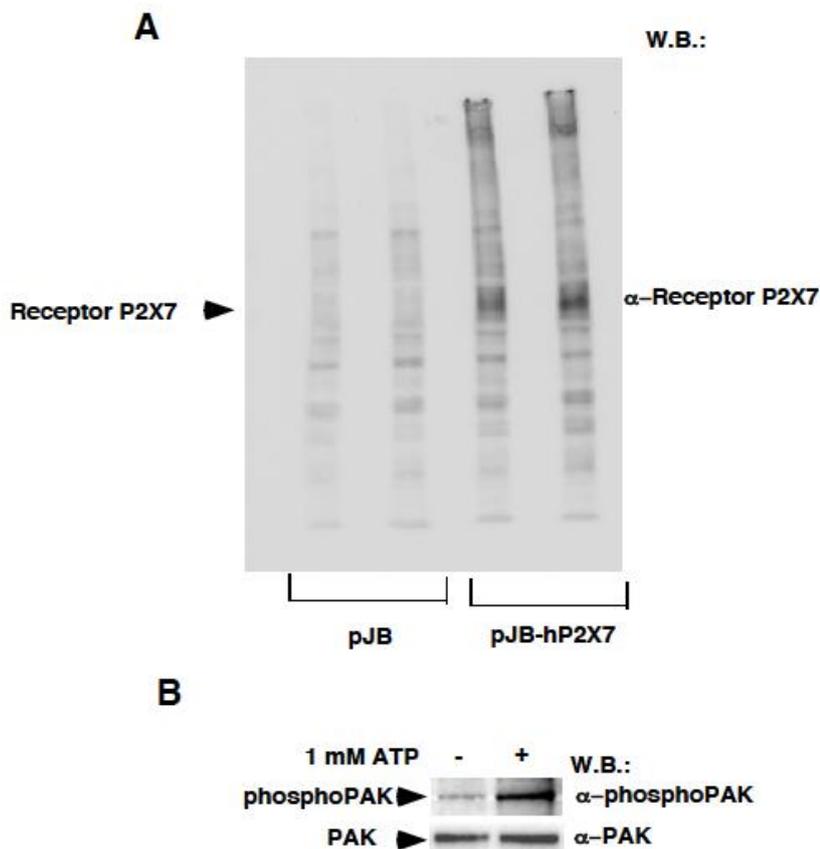
## **Resultados de la expresión del receptor P2X<sub>7</sub> y de la activación de la ruta de Rac midiendo fosforilación de PAK**

Para determinar la expresión del receptor P2X<sub>7</sub>, después de la transfección de células HEK 293 con el cDNA que codifica esta proteína, se hicieron estudios de su expresión en estas células empleando la técnica western blot.

Se utilizó como tag (etiqueta) anticuerpo Glu-Glu. Se desconocía la interacción de este tag con la proteína. Los resultados obtenidos tras varios intentos no fueron exitosos.

Para comprobar que la técnica funcionaba, aunque no fuimos capaces de visualizar la banda inmunorreactiva correspondiente a P2X<sub>7</sub>, utilizamos para el western blot un anticuerpo policlonal que reconocía el receptor P2X<sub>7</sub>. El procedimiento utilizado para detectar esta proteína

es el utilizado para el receptor P2X<sub>7</sub> con excepción del anticuerpo primario, en este caso se utiliza un anti-receptor P2X<sub>7</sub>. Al realizar el revelado con la misma solución quimioluminiscente se pudo observar la presencia del receptor P2X<sub>7</sub> en células HEK 293. Por lo tanto, se puede decir que la técnica utilizada funcionaba y que se detectó la expresión del receptor P2X<sub>7</sub>. Para determinar si el ATP media la activación de Rac por acción del receptor P2X<sub>7</sub>, los macrófagos J774.A1, fueron estimulados o no con un agonista específico del receptor, BzATP y al cabo de 5 minutos se lisaron las células, y las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por Western Blot. Las bandas inmunorreactivas se detectaron con anti fosfo PAK y el PAK. El resultado de la figura 3B muestra que la activación del receptor P2X<sub>7</sub> induce la activación de la serina treonina quinasa PAK y puesto que esta quinasa es una molécula efectora de Rac, podemos concluir que el receptor P2X<sub>7</sub> media en la activación de la ruta de rac1/PAK.



**Imagen 14:** A) Análisis de la expresión del receptor P2X<sub>7</sub> expresada en células CHO por western blot. 40 µl de las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección del receptor se realizó utilizando el anticuerpo específico en dilución 1:1000 y anticuerpo 2° en dilución 1:5000. La reacción se reveló con ECL primer western blotting. B) Análisis del estado de fosforilación de PAK mediada por el receptor P2X<sub>7</sub> en macrófagos. 40 µl de lisados celulares se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección del fosfoPAK y PAK se realizó utilizando los anticuerpos específicos en dilución 1:1000 y anticuerpo 2° en dilución 1:5000. La reacción se reveló con ECL

## CONCLUSIONES

➤ Los macrófagos J774A.1 expresan funcionalmente el receptor P2X<sub>7</sub>. Las células CHO muestran una respuesta funcional diferente a los macrófagos que no se corresponde con la clásica señalización del P2X<sub>7</sub> asociado a la apertura del canal y posterior poro.

➤ Hemos expresado en células HEK 293 el receptor P2X<sub>7</sub> y hemos visto de una manera indirecta, midiendo la fosforilación de PAK, que la ruta de rac se regula de forma positiva cuando se activa el receptor P2X<sub>7</sub> en macrófagos.

## BIBLIOGRAFÍA

- A.SOLINI ET. ALL (2000) *Diabetologia: Volume 43, Issue 10, pp 1248-1256 High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts*
  
- CHOW SC, KASS GE, ORRENIUS S. (1997) *Neuropharmacology. 36(9):1149-56. Purines and their roles in apoptosis.*
  
- KIM M, JIANG LH, WILSON HL, NORTH RA, SURPRENANT A. (2001) *EMBO J. 20(22):6347-58. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex.*
  
- SEIL M., EL OUAALITI M., FONTANILS U., GORROÑO ETXEBARRIA I., POCHET S., DAL MORO G., MARINO A. AND DEHAYE J.P. (2010) *Purinergic Signalling., 6, 405-416. Ivermectina-dependent release of IL-1beta in response to ATP by peritoneal macrophages from P2X7-KO mice.*
  
- NORTH RA. (2002) *Physiol Rev. 82(4):1013-67. Molecular physiology of P2X receptors.*
  
- PUCK TT, CIECIURA SJ, ROBINSON A. *Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects, J Exp Med. 1958Dec1;108(6):945-56.*
  
- SCHULZE-LOHOFF E, HUGO C, ROST S, ARNOLD S, GRUBER A, BRÜNE B, STERZEL RB (1998) *Am J Physiol. 275(6 Pt 2):F962-71. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors.*
  
- MANSILLA BARRADO, SYLVIA. (2005) *Análisis de la expresión génica y de los mecanismos de muerte celular inducidos por la bisantraciclina WP631 en células tumorales humanas*
  
- BIOINFORMATICS: <http://bioinformatics.istge.it/cldb/cl2925.html> (17-06-2013)