



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ESTUDIAR LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA *PATJ* EN NEUTRÓFILOS EN EL CONTEXTO DEL ICTUS ISQUÉMICO

Yaiza Jiménez Marín

Grado de Biología

Facultad de Ciencias

Año Académico 2021-2022

ESTUDIAR LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA *PATJ* EN NEUTRÓFILOS EN EL CONTEXTO DEL ICTUS ISQUÉMICO

Yaiza Jiménez Marín

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2021-2022

Palabras clave del trabajo:

PATJ, neutrófilos, ictus isquémico, pronóstico funcional, migración, adherencia y filtración.

Cristòfol Vives Bauzà

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

El ictus es una enfermedad cerebrovascular que se produce debido a una rotura u obstrucción en los vasos sanguíneos, reduciendo el flujo de sangre al cerebro. En la actualidad, el ictus es la segunda causa de muerte en el mundo y el número continúa creciendo debido al aumento de la población y el envejecimiento. Como consecuencia de la lesión isquémica se induce la respuesta inflamatoria, siendo los neutrófilos los primeros leucocitos infiltrantes. Debido a la elevada prevalencia del ictus isquémico, se han estudiado genes y moléculas implicadas en la recuperación de la lesión isquémica. *PATJ* es uno de los genes identificados en los neutrófilos, cuya infra-expresión se relaciona con un peor pronóstico funcional. Con la finalidad de estudiar la potencial relación entre la proteína PATJ y los procesos de migración, adhesión e infiltración en los neutrófilos, se generaron cultivos celulares de neutrófilos primarios y se manipuló la expresión del gen PATJ mediante transfección de RNA de interferencia anti-PATJ. Los niveles de expresión de *PATJ* se analizaron por RT-PCR y los estudios funcionales de transmigración a través de células endoteliales se realizaron utilizando cámaras de boyden seguido de conteo por citometría de flujo. Los resultados sugieren que los neutrófilos que infra-expresan PATJ presentan mayores tasas de adherencia e infiltración. Además, se estudió la expresión de *PATJ* en respuesta a diferentes estímulos quimioatrayentes como C-GSF o IL-8, medida por WB. Los resultados demostraron PATJ se modula en respuesta a estímulos quimioatrayentes, y que dicha modulación sigue un patrón similar al de proteínas constituyentes del citoesqueleto de actina, tales como β -actina o α -smooth actina. Nuestros resultados sugieren que PATJ en los neutrófilos regula procesos como la migración, adherencia e infiltración, mediante la modulación del citoesqueleto de actina.

Resum

L'ictus és una malaltia cerebrovascular que es produeix a causa d'un trencament o obstrucció dels vasos sanguinis, reduint el flux de sang al cervell. Actualment, l'ictus és la segona causa de mort al món i el nombre continua creixent a causa de l'augment de la població i l'envelliment. Com a conseqüència de la lesió isquèmica s'indueix la resposta inflamatòria, sent els neutròfils els primers leucòcits infiltrants. A causa de l'elevada prevalença de l'ictus isquèmic, s'han estudiat gens i molècules implicades a la recuperació de la lesió isquèmica. *PATJ* és un dels gens identificats en els neutròfils, la infraexpressió dels quals es relaciona amb un pitjor pronòstic funcional. Amb la finalitat d'estudiar la relació potencial entre la proteïna *PATJ* i els processos de migració, adhesió i infiltració als neutròfils, es van generar cultius cel·lulars de neutròfils primaris i es va manipular l'expressió del gen *PATJ* mitjançant transfecció d'RNA d'interferència anti-*PATJ*. Els nivells d'expressió de *PATJ* es van analitzar per RT-PCR i els estudis funcionals de transmigració a través de cèl·lules endotelials es van fer utilitzant càmeres de Boyden seguit de comptatge per citometria de flux. Els resultats suggereixen que els neutròfils que infraexpressen *PATJ* presenten majors taxes d'adherència i infiltració. A més, es va estudiar l'expressió de *PATJ* en resposta a diferents estímuls quimioatrayents com ara C-GSF o IL-8, mesurada per WB. Els resultats van demostrar que *PATJ* es modula en resposta a estímuls quimioatrayents, i que aquesta modulació segueix un patró similar al de proteïnes constituents del citoesquelet d'actina, com ara β -actina o α -smooth actina. Els nostres resultats suggereixen que *PATJ* als neutròfils regula processos com la migració, adherència i infiltració, mitjançant la modulació del citoesquelet d'actina.

Abstract

Stroke is a cerebrovascular disease that occurs due to a rupture or obstruction in the blood vessels, reducing blood flow to the brain. Stroke is currently the second leading cause of death in the world and its incidence keeps increasing due to population growth and aging. Because of the ischemic injury, the inflammatory response is induced, with neutrophils being the first infiltrating leukocytes. Due to the high prevalence of ischemic stroke, genes and molecules involved in recovery from ischemic injury have been studied. *PATJ* is one of the genes identified in neutrophils, whose under-expression is related to a worse functional prognosis. To study the potential relationship between the *PATJ* protein and the processes of migration, adhesion and infiltration in neutrophils, cell cultures of primary neutrophils were generated and the expression of the *PATJ* gene was manipulated by transfection of anti-*PATJ* interfering RNA. *PATJ* expression levels were measured by RT-PCR and functional studies of transmigration through endothelial cells were performed using Boyden chambers followed by flow cytometric counting. The results suggest that neutrophils that under-express *PATJ* have higher rates of adherence and infiltration. In addition, the expression of *PATJ* in response to different chemoattractant stimuli such as C-GSF or IL-8, measured by WB, was also studied. The results showed that *PATJ* is modulated in response to chemoattractant stimuli, and that this modulation follows a pattern similar to that of constituent proteins of the actin cytoskeleton, such as β -actin or α -smooth actin. Our results suggest that *PATJ* in neutrophils regulates processes such as migration, adhesion and infiltration, by modulating the actin cytoskeleton.

Hipótesis: La proteína *PATJ* en los neutrófilos regula procesos de migración, adherencia e infiltración, mediante la modulación del citoesqueleto de actina.

Objetivo 1: Generar cultivos celulares de neutrófilos primarios mediante la manipulación genética de *PATJ*.

Objetivo 2: Estudiar procesos de migración, adherencia e infiltración dependientes de la expresión de *PATJ*.

Objetivo 3: Estudiar la expresión de *PATJ* en respuesta a estímulos quimioatrayente.

Índice

Resumen.....	4
Resum	5
Abstract	6
Introducción	4
Materiales y métodos.....	7
- Extracción y aislamiento de neutrófilos	7
- Crecimiento de plásmidos	8
- Extracción DNA plásmido	8
- Transfección por nucleofección	9
- Extracción RNA	10
- Síntesis de DNA complementario (DNAc)	11
- RT-PCR (Real Time PCR)	12
- Extracción y cuantificación de proteínas	13
- Migración	14
- Ensayo de Adherencia e Infiltración de Neutrófilos a través de una monocapa de células endoteliales.	15
- Transmigración de Leucocitos	16
- Análisis estadístico	17
Resultados.....	18
Discusión	27
Conclusiones.....	30
Referencias Bibliográficas.....	31
ANEXO.....	33

Introducción

El ictus es una enfermedad cerebrovascular, que se produce cuando hay una rotura u obstrucción en un vaso sanguíneo reduciéndose el flujo de sangre que llega al cerebro. Al no llegar la cantidad de sangre necesaria al cerebro, las células nerviosas no reciben oxígeno y su viabilidad se ve afectada, dejando de funcionar. Aunque no es frecuente que ocurra en adultos jóvenes, puede darse el caso, siendo los mismos factores de riesgo tanto para grupos de edad más joven que para grupos de edad más avanzada. Por un lado, la hipertensión, las cardiopatías y la diabetes mellitus son los factores de riesgo más típicos en los de edad más avanzada. Por otro lado, el tabaquismo y la hipertensión son los factores de riesgo más comunes en los adultos jóvenes (Smajlovic, 2015).

En la actualidad, el ictus es la segunda causa de muerte en el mundo, aunque en las últimas dos décadas las tasas de mortalidad han disminuido. Pero el número absoluto de muertes relacionadas con el ictus está aumentando, a causa del crecimiento de la población y del envejecimiento (Vivanco-Hidalgo *et al.*, 2019). Según datos del Grupo de Estudios de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española De Neurología (GEECV-SEM), en Europa mueren 650.000 personas a causa de esta enfermedad, de los cuales alrededor de 40.000 en España.

Existen dos tipos de accidentes cerebrovasculares, ictus isquémico e ictus hemorrágico. El ictus hemorrágico ocurre cuando se da la ruptura de un vaso sanguíneo, representando un 20% de este tipo de accidentes cerebrovasculares, mientras que, el ictus isquémico ocurre cuando una arteria queda obstruida, normalmente por un coágulo de sangre o trombo, representando el 80% de los accidentes (Ojaghihaghghi *et al.*, 2017). Se utiliza el sistema de diagnóstico TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*) para diagnosticar los subtipos de accidente cerebrovascular isquémico (IS), distinguiendo cinco subtipos: 1. ateroscleróticos, provocados por la formación de una placa de ateroma en una arteria grande; 2. Cardioembólicos, debidos a coágulos que se desprenden del corazón y al llegar al cerebro provocan obstrucción de pequeños vasos;

3. Lagunares, asociados a la oclusión de pequeñas arterias, debido a cambios bruscos de presión sanguínea; 4. De etiología indeterminada o criptogénica, de causa desconocida y sin relación con ningún factor de riesgo vascular; 5. De etiología determinada, debido a causas poco habituales, como las vasculopatías no ateroscleróticas, estados de hipercoagulación o trastornos hematológicos (Adams *et al.*, 1993).

El IS al disminuir la irrigación normal del cerebro, conlleva a una discapacidad de las células cerebrales o incluso a la muerte de estas. Como consecuencia de la lesión isquémica, las células no pueden mantener la viabilidad, provocando necrosis y a su vez, la liberación del contenido celular al medio extracelular. Este suceso da lugar a una respuesta inflamatoria que induce activación de las células gliales del entorno e infiltración leucocitaria. Los primeros leucocitos infiltrantes son los neutrófilos, que aparecen en las primeras horas después del inicio de la isquemia y presentan un pico a las 24-48 horas. Cabe destacar que la inflamación contribuye a la progresión de la lesión y exacerba el efecto de la isquemia (Planas *et al.*, 2018).

Debido a la elevada prevalencia de dependencia asociada al IS, hay una urgencia por identificar genes y moléculas reguladoras implicadas en la reparación de la lesión isquémica. Diversas aproximaciones mediante estudios de GWAS (Genome-wide Association Studies) han intentado identificar genes asociados a pronóstico funcional del IS. Un estudio con participación del grupo receptor identificó en el año 2019 una asociación entre variantes genéticas de baja frecuencia en el gen *PATJ* con un peor pronóstico tras sufrir un IS (Mola-Caminal *et al.*, 2019). *PATJ* codifica para la proteína PATJ (PALS1-associated tight junction), la cual forma parte del complejo de polaridad CRUMBS, juntamente con las proteínas CRB 1, 2 y 3 (se trata de proteínas transmembrana con un dominio extracelular más largo que el intracelular presenten en mamíferos) (Herranz, 2013). (PALS1 (protein associated with LIN-7 1), PAR3 (protease activated receptor 3) y otras proteínas (Wang *et al.*, 2021). El complejo CRUMBS participa en procesos como la migración celular, angiogénesis, mantenimiento de la polaridad celular y la construcción de complejos de unión (REF). Además, estudios en células epiteliales sugieren que PATJ y PALS1, dirigen la migración celular, debido a que

se acumulan en el margen de la región apical, dando lugar a una migración polarizada y dirigida, mientras que su deslocalización dará lugar a una migración no dirigida (Bazellières *et al.*, 2018). Por otro lado, un estudio realizado por Shin *et al.*, 2007, demostró que una mala localización de PATJ, inducía a la desorganización de la red de microtúbulos, dificultando la migración celular dirigida.

Esta proteína se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro y en el músculo esquelético, está compartimentada en el VAC (vacuolar apical compartment) en las células no polarizadas, pero en las polarizadas se dirige a la región apical y a las uniones estrechas para participar en los procesos de unión intercelular (Wang *et al.*, 2021).

El grupo receptor ha estudiado la función de la proteína PATJ en endotelio vascular en el contexto del pronóstico funcional del IS. Estos estudios han demostrado que la expresión de PATJ disminuye después del ictus, y dicha depleción provoca transición de célula endotelial a mesenquimal, favoreciendo el fenotipo amebode característico de las células de la punta en el proceso de angiogénesis (Medina-Dols, *et al.*, 2022). Hasta la fecha no hay estudios publicados respecto a la función de PATJ en células no polarizadas como son los neutrófilos. Datos experimentales del grupo receptor demuestran que PATJ se expresa en neutrófilos, estas células infiltrantes tienen un papel relevante en el contexto del pronóstico funcional del IS. Tras un IS se produce una respuesta inflamatoria, siendo los neutrófilos las primeras células leucocitarias en actuar. Activados por citoquinas pro-inflamatorias, sufren cambios conformacionales, y migran a través de la pared del vaso endotelial, siendo atraídos al área isquémica, donde causan una lesión secundaria al liberar factores proinflamatorios, tales como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*), proteasas y metaloproteasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés *Matrix metalloproteinases*), las cuales actúan degradando la membrana de las células endoteliales y permeabilizando la barrera hematoencefálica. Debido a lo comentado, se puede afirmar que la infiltración de los neutrófilos potencia la lesión isquémica (Jayaraj *et al.*, 2019).

Por otro lado, es importante destacar que las células leucocitarias no presentan polaridad apico-basal, ni se encuentran adheridas entre ellas mediante uniones intercelulares, a

diferencia de las células epiteliales y endoteliales, donde se ha estudiado la modulación de PATJ, hasta el momento (Jayaraj *et al.*, 2019). Por todo ello, proponemos en este trabajo de TFG estudiar cómo se expresa PATJ en los neutrófilos y su modulación en respuesta a un ictus. Debido a su implicación en migración celular en células epiteliales, hipotetizamos que PATJ en los neutrófilos participa en procesos como la migración, adherencia y fijación, mediante la modulación del citoesqueleto de actina.

Materiales y métodos

- Extracción y aislamiento de neutrófilos

En primer lugar, se realizó una extracción de muestras de sangre (aprox. 8-10 mL) por venopunción en tubos de sangre con el quelante EDTA. Posteriormente, se añadieron 2 mL de dextrano al 6% (se pusieron 0,605 g en 10 mL de suero fisiológico). El dextrano separa leucocitos de eritrocitos, y lo que se recoge es el plasma. Este tubo se agitó suavemente 2-3 veces. A continuación, se incubó en la estufa durante 45 min 37°C/5% CO₂. Se dejaron ligeramente los tubos desenroscados para que el CO₂ pueda entrar. Se diferencian dos fases: plasma (sobrenadante, rico en neutrófilos) y eritrocitos (precipitado), descartando el precipitado.

Posteriormente, se añadió 12 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, fetal bovine serum) y, antibióticos penicilina/estreptomicina al 1%. Se centrifugó a 1800 rpm, 5 min, temperatura ambiente, aceleración 5 y desaceleración 2 (centrífuga JOUAN BRA4i). Se descartó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con RPMI procediendo tal y cómo se ha descrito.

Se continuó con la lisis de eritrocitos. En primer lugar, se añadió 1 mL de solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%), seguido de 3 mL de H₂O destilada. A continuación, se resuspendió el precipitado con la pipeta y se mezcló con la ayuda de vórtex durante un minuto. Luego, se añadió 1 mL de solución salina al 3,5% (para ello se disuelven 0,35 g

de NaCl en 10 mL de suero fisiológico). Se centrifugó a 1400 rpm, 5 min, temperatura ambiente en la centrífuga JOUAN BRA4i. Se retiró el sobrenadante. Estos pasos, desde la adición de solución salina, se repitieron tres veces, provocando un choque osmótico, para el lisado eritrocitario.

Seguidamente, se resuspendió el precipitado en un volumen final de 8 mL de medio RPMI completo. Se contó el número de células en la cámara de Neubauer, mezclando 10 µl de Trypan blue con 10 µl de la suspensión celular, el Trypan blue es un colorante que permite identificar células viables, ya que entra en las células muertas, que quedan coloradas de color azul y se pusieron en la cámara.

- **Crecimiento de plásmidos**

Se preparó caldo de cultivo en un matraz Erlenmeyer. Para ello se diluieron 20 g de LB Broth (L3022, Sigma-Alduich) en 1L de H₂O destilada. Seguidamente se autoclavó a 121°C durante 25 minutos.

Después de dejar resfriar el caldo de cultivo a unos 40-50°C, se añadió ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL. Posteriormente, con una punta de pipeta fueron raspados los stocks bacterianos que contienen los plásmidos conservados a -80°C y se sembraron liberando directamente la punta dentro del matraz. Las bacterias se crecieron a 37°C en agitación durante toda la noche.

Los plásmidos cultivados fueron los siguientes: pGIPZ-V2 ShRNA PATJ Hs, pGIPZ-V3 ShRNA PATJ Hs, MGC- DNAc PATJ Hs y MGC- DNAc PATJ Mn (iRAK) (ver sus respectivos mapas en anexos, Figura 9 y 10).

- **Extracción DNA plásmido**

Para ello se utilizó QIAGEN Plasmidi Midi Kit, siguiendo las instrucciones del comerciante. Primero, se sedimentaron las bacterias por centrifugación a 6000 g durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante. Seguidamente, se resuspendieron en 4 mL

de Buffer P1 y seguidamente se añadieron 4 mL de Buffer P2 y se agitó de 4-6 veces (si lleva *Lyse Blue* hasta que se ponga azul), seguidamente se dejaron en reposo 15 min a 25°C. A continuación, se añadieron 4 mL de Buffer P3 y se agitó de 4- 6 veces (si lleva *Lyse Blue* hasta que se ponga blanco), y se incubó en reposo 15 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 20000 g, 30 min a 4°C descartando el pellet, y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 20000 g durante 15 min a 4°C. Dicho sobrenadante posteriormente es aplicado sobre una columna que retiene los ácidos nucleicos, a la que previamente activamos habiéndola hidratado con 4 ml de Buffer QBT. Una vez la muestra fue completamente filtrada por flujo gravitacional, se procedió a realizar dos lavados con 10 mL del Buffer QC y se dejó en flujo gravitacional durante 10 min más. Después de los dos lavados, la columna se puso sobre otro tubo Corney nuevo, para proceder a precipitar el ADN, aplicando sobre la columna 5 mL del buffer QF. Al producto filtrado que contiene el ADN, se le añadieron 3,5 mL de Isopropanol y se mezcló vigorosamente. Acto seguido, se realizó una centrifugación a 15000 g durante 30 min a 4°C para sedimentar el ADN. Se descartó el sobrenadante, y el sedimento de ADN se lavó con 2 mL de Etanol al 70%. A continuación, se volvió a centrifugar a 15000 g durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de ADN se dejó secar al aire libre durante 5-10 min con la finalidad de eliminar completamente el etanol. Seguidamente, el ADN se rehidrató en 100 µL de buffer TE (Tris-HCl EDTA) (pH 8) durante toda la noche a temperatura ambiente.

- **Transfección por nucleofección**

En primer lugar, cabe destacar que la transfección supuso un reto debido a la corta vida media de los neutrófilos y a la dificultad del método. Primero se hicieron pruebas con el plásmido control GFP (pmax GFP), para observar la viabilidad y fluorescencia de las células. También se propusieron en las primeras pruebas, incubar los neutrófilos con factores quimioatrayentes con la finalidad de aumentar la supervivencia celular. Dichas condiciones contribuyeron a aumentar la supervivencia celular, pero por el contrario diluían mucho la eficiencia de transfección, con lo que se decidió no utilizar ningún factor quimioatrayente. Una vez establecidas las mejores condiciones de transfección, se utilizaron los plásmidos portadores del shRNA contra PATJ (ver mapa de los plásmidos

y secuencias en anexos). Para transfectar neutrófilos primarios se utilizó el sistema de nucleofección de Amaxa (Lonza), programa EO 100. Para optimizar las condiciones de transfección se utilizaron diferentes cantidades de células por transfección (1×10^6 cel/mL, 2×10^6 cel/mL, 3×10^6 cel/MI y 4×10^6 cel/mL). Dichas células se sedimentaron y se resuspendieron en 20 μ l de buffer de nucleofección que contenía 16,4 μ L de *nucleofector solution P3* y 3,6 μ L de *supplement 1* (Lonza). Seguidamente se añadió 1 μ g de plásmido y la mezcla de células y plásmido en buffer de nucleofección se puso en una cubeta de nucleofección, se depositó en el equipo Amaxa y se aplicó el programa EO100. Seguidamente las células se resuspendieron en 100 μ l de medio RPMI y se transfirieron a un pocillo de placa de cultivo de 24 pozos, que contenía 400 μ l más de medio RPMI. Al día siguiente se determinó la eficiencia de transfección observando las células en el microscopio de fluorescencia Cell Observer (Zeiss), filtro GFP, objetivo 20x, y contando las células GFP positivas respecto al número de células totales. Las muestras fueron guardadas a -80°C para conservar el RNA para su futura extracción.

- Extracción RNA

El protocolo que se llevó a cabo fue basado en miRNA easy mini kit (Qiagen). Los neutrófilos en cultivo se recogieron con una pipeta Pasteur de plástico y se depositaron en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Las células se centrifugaron durante 10 min, a 10000 g a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó con 500 μ L de PBS 1x. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se guardó a -80°C para evitar su degradación.

Posteriormente, se procedió a seguir el protocolo indicado miRNA easy mini kit de Qiagen. En primer lugar, el sedimento celular se resuspendió con 700 μ L de Qiazol. Se incubó durante 5 min a T° ambiente. A continuación, fueron añadidos 140 μ L de cloroformo (dentro de la campana de gases), se agitó durante 15 seg vigorosamente y a continuación se incubó durante 2-3 min a T° ambiente. Seguidamente, se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C , y se recogió el sobrenadante. Seguidamente para conocer la cantidad de Etanol al 100% que se añadió al sobrenadante, este se multiplicó por 1,5, A continuación, fueron añadidos 700 μ L de la muestra dentro de la columna de RNeasy,

se centrifugó a máxima velocidad durante 15 seg y se retiró el sobrenadante. A continuación, se repitió desde la adición de los 700 μ L de Qiazol sobre las muestras hasta, descartar el sobrenadante. Posteriormente, fueron añadidos 700 μ L del buffer RWT a la columna, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 seg y se descartó el sobrenadante. Seguidamente, se añadieron 500 μ L de buffer RPE a la columna, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 seg y se descartó el sobrenadante. Una vez más, fueron añadidos 500 μ L de buffer RPE a la columna, se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min y se descartó el sobreadante. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Seguidamente, se puso el filtro de la columna en un tubo Eppendorf, se añadieron 40 μ L de H₂O libre de RNAses y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Finalmente, las muestras fueron guardadas a -80°C para conservar el RNA para cuantificarlo más adelante.

- Síntesis de DNA complementario (DNAc)

En primer lugar, fue necesario la cuantificación de RNA extraído de cada muestra, como se ha explicado en el apartado anterior. Las muestras que teníamos eran las siguientes: neutrófilos transfectados con ShRNA V3; neutrófilos controles, los cuales fueron transfectados con pmax GFP. Para la cuantificación de RNA se utilizó un nanodrop (*BioTek: Synergy H1 microplate reader*), y el programa informático Gen 209. En primer lugar, se realizó un blanco para calibrar el programa (2 μ L de H₂O libre de RNAsas) y luego se pusieron las muestras. Se obtuvieron las concentraciones de RNA en ng/ μ L, así como, el ratio de A260/A280, el cual indica contaminación de DNA si es inferior a 1,8 y degradación de proteínas si es superior a 2, el ratio óptimo es entre 1,8 y 2.

La cuantificación de RNA fue necesaria, ya que, para la retrotranscripción de RNA a DNAc se necesitaba una cantidad inferior o igual a 1 μ g de RNA, por lo que era importante conocer la cantidad de RNA que había en cada muestra. Posteriormente se realizaron los cálculos pertinentes para conseguir que de cada muestra de RNA tuviese una cantidad menor o igual a 1 μ g de RNA.

En cuanto a la retrotranscripción, en primer lugar, se realizó la mezcla de la reacción de retrotanscripción en mini-eppendorfs, en un volumen final de 20 μ l que contenían: 4 μ L

de buffer de retrotranscripción 5x, 1 µL de Transcriptasa inversa, el volumen de RNA hasta 1 µL, y agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 20 µL. Se agitó la mezcla en el vórtex y se realizó un golpe de centrifuga de 5 segundos para recoger todo el volumen que había quedado en las paredes del tubo (mini Spin plus Eppendorf). A continuación, las muestras se depositaron en el termociclador (Tprofesional Biometra) y la reacción de retrotranscripción se realizó en las siguientes condiciones: 25°C durante 10 min, 42°C durante 15 min, 48°C durante 15 min, 85°C durante 5 min y finalmente las muestras se conservan 4°C. Una vez terminada la retrotranscripción, se extrajeron los tubos Eppendorf con las muestras que contenían DNAc, y se guardaron a -20°C para conservar el ADN.

- RT-PCR (Real Time PCR)

Para ello fue utilizado el kit SensiFAST SYBR No-ROX, consistente en una mezcla de RT-PCR de 10 µl, que incluye 5 µl de 2xSensiFAST, 0,4 µl del cebador *forward* (F), 0,4 µl del cebador *reverse* (R), 2,2 µl de H₂O libre de DNAsa y RNAsa, y 2 µl de DNAc a una concentración de 21 ng/µl, siendo 4,2 µl el máximo volumen que se puede poner de muestra. En la placa de la PCR se traspasaron 10 µl de cada muestra (Non-treated, ShRNA V2, ShRNA V3 y un blanco). La placa se centrifugó (centrifuga *Haereus*) a máxima velocidad, a 3000 rpm durante 10 seg. Para la posterior amplificación del DNAc se utilizó el modelo 7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). El programa de RT-PCR utilizado tenía una etapa inicial de 2 min a 95°C, seguida de 40 ciclos con tres etapas: la primera etapa de 5 seg a 95°C, de desnaturalización de la doble cadena; una segunda etapa de hibridación de los cebadores de 10 seg a 61°C y; la tercera etapa de elongación de 5-20 seg a 72°C. *PATJ* se identificó mediante el uso de cebadores específicos para un amplicón de 93 pb incluido en el exón 2 del transcrito 1 de *PATJ* (*PATJ1*). Los cebadores utilizados fueron (F: 5'-GAAGGGTCAACTCAACCA-3'; R: 5'-GTGATGGAACCATCTGTG-3'; Eurofins Genomics). Por otro lado, se identificó el gen *SDHA* (gen succinato deshidrogenasa), como gen normalizador. Los cebadores utilizados fueron (F: 5'-GAGATGTGGTGTCTCGGTCCAT-3'; R: 5'-GCTGTCTCTGAAATGCCAGGCA-3'; Eurofins Genomics).

- Extracción y cuantificación de proteínas

Para cuantificar las muestras proteicas, se realizó una dilución a 1:10 del lisado original. A su vez, se preparó una recta patrón de proteína con BSA diluido en solución RPPA (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml y 0 mg/ml). Para la cuantificación se utilizó el método de Bradford (BioRad), y se procedió siguiendo las instrucciones del comerciante. Se prepararon los reactivos Reagent 1 (980 μ l de Reagent A y 20 μ l de Reagent S) y Reagent 2. Por este orden, se pusieron 10 μ l de cada muestra en triplicados en una placa de 96 pocillos, seguidos de 25 μ l de Reagent 1 y 200 μ l de Reagent 2, posteriormente se tapó con papel de aluminio y a T° ambiente se llevó al agitador horizontal (*RSLab-7L*) durante 5 min a velocidad 5. La placa de cuantificación de proteínas se leyó a 650 nm, donde las muestras fueron neutrófilos Non-treated, neutrófilos tratados con C-GSF y neutrófilos tratados con IL-8

- Western Blot

50 μ g de lisado proteico se diluyeron en 20 μ l de solución RPPA y se añadió solución de carga LDS 4X (Invitrogen) hasta una concentración final 1X. Las proteínas se desnaturalizaron, incubándolas a 90°C en el Termoblock durante 10 min. Concluida la incubación se pusieron en hielo hasta el momento de cargar el gel de electroforesis. Se cargaron las muestras en cada pocillo del gel y se realizó la electroforesis a 200V durante 50 min.

Mientras, se preparó el Transfer Buffer (0,2 g/l). Una vez concluida la electroforesis, se preparó la transferencia en semi-seco con el sistema Trans-Blot Turbo de BioRad. Para ello, el gel de la electroforesis que contenía las proteínas se depositó sobre 2 papeles de filtro "Whatman", previamente hidratados con solución de transferencia. Sobre el gel se depositó la membrana, previamente hidratada en metanol al 100%, seguida de inmersión en solución de transferencia. Sobre la membrana se depositaron otros 2

papeles Whatman, también hidratados con solución de transferencia. Las condiciones de transferencia fueron 22V y 0.5mA durante 45 min. Posteriormente, la membrana se cortó por debajo de 75 kDa, y la parte de arriba de la membrana, donde se esperaba ver PATJ, se bloqueó con tampón de bloqueo con leche desnatada al 3%. La parte inferior de la membrana se bloqueó con tampón de bloqueo de BSA al 5% para poder incubar GAPDH. En un ensayo posterior, la parte de debajo de la membrana se bloqueó con tampón de bloqueo de BSA al 5% para incubar actina. El bloqueo duró 1h en el agitador. Seguidamente, en ambas placas de Petri se pusieron los anticuerpos primarios de PATJ y GAPDH, previamente se vaciaron las placas de leche y BSA respectivamente. El anticuerpo primario de PATJ se encontraba diluido 1:500 en leche desnatada 3%, y el de GAPDH estaba diluido 1:1000 en BSA al 5%. En cuanto al anticuerpo primario de la actina, este se encontraba diluido 1:1000 en BSA al 5%. Los anticuerpos se incubaron durante toda la noche a 4°C en el agitador horizontal (*Sky Line*) a 42 rpm.

Se retiró el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con TBS-Twin (Tris-Buffered Saline-Twin) al 1% y, se añadió el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario anti-conejo (PATJ y GAPDH) conjugado con fluorocromo 800 nm estaba diluido 1:500 en leche desnatada al 3% y el anticuerpo secundario anti-ratón (actina) conjugado con fluorocromo 680 nm estaba diluido 1:1000 en BSA al 5%. Se dejó durante 1h en el agitador a T°C ambiente. A continuación, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 5 lavados con TBST 1X. Finalmente, se reveló la membrana utilizando el sistema de revelado basado en la técnica de detección fluorescente, en el cual se procedió a excitar lumínicamente a los marcadores fluorescentes. Esta excitación fue detectable por un fotosensor equipado con filtros de emisión apropiados, y de esta forma se consiguió una imagen digital del Western Blot. (*LI-COR odyssey clx*).

- Migración

Para este ensayo se usaron unas cámaras llamadas “ μ -slides Chemotaxis”, utilizadas para realizar ensayos de quimiotaxis en tiempo real, en 2D y 3D, con células migratorias adherentes y no adherentes, sobre una matriz de gel. Estas cámaras se pusieron en una placa de Petri de 10 cm con un paño húmedo estéril alrededor. Se realizó una matriz de

colágeno I (0,5 mg/ml) de la siguiente forma: 1 μ l de NaHCO_3 al 7%, 12,5 μ l de colágeno I (4 mg/ml) y 86,5 μ l de medio RPMI 1x. Se mezclaron los neutrófilos y la matriz de colágeno en una concentración final de 3×10^6 células/ml. Posteriormente, se aplicaron 6 μ l de la matriz de colágeno en el puerto A de la cámara, más tarde se aspiró desde el puerto opuesto B (Imagen 1), hasta que el gel rellenase el canal de forma homogénea. Se incubó la cámara una atmósfera húmeda para minimizar la evaporación hasta que el gel completó su polimerización. Por ello la cámara se incubó dentro de una placa de Petri de 10 cm con un paño húmedo estéril alrededor. A continuación, el resto de los puertos se rellenaron con medio RPMI 1X libre de quimioatrayente, de esta forma las células solo migraron dentro del gel. Seguidamente, se añadieron 30 μ l de quimioatrayente IL-8 (10 nM) en el puerto C, y de igual forma que antes, desde el puerto opuesto D (Imagen 1) se aspiró para que se extendiese de forma homogénea por todo el canal.

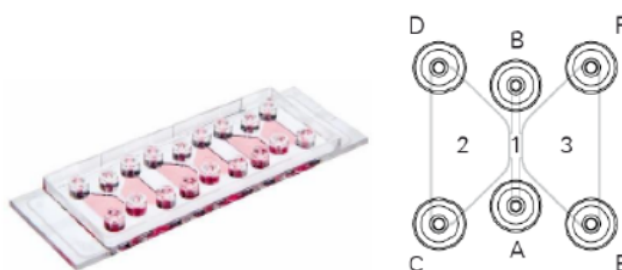


Imagen 1. Cámaras quimiotaxis, se observan los puertos A, B, C, D, E y E. Siendo el área 1, la zona de observación, el área 2 el reservorio izquierdo y el área 3 el reservorio derecho.

- **Ensayo de Adherencia e Infiltración de Neutrófilos a través de una monocapa de células endoteliales.**

Para realizar este ensayo, se utilizó el sistema de la cámara Boyden. En primer lugar, se cultivaron células endoteliales derivadas de microendotelio cerebral humano hCMEC/D3 sobre los soportes de la cámara. Para ello se invirtieron los soportes permeables en una placa de 25 mm de profundidad estéril. Para sembrar sobre dicho soporte las células endoteliales, primero se tripsinizaron de su flasco de cultivo original. Para ello se realizaron los siguientes pasos: primero se retiró el medio del flasco y se hizo un lavado con PBS 1x. Seguidamente, se añadió 1 ml de Tripsina y se incubó a 37°C/ 5% de CO_2

durante 3 min. Se añadieron 500 μ l de medio EBM2 (Endothelial Cell Growth Basal Medium) y se recogieron las células endoteliales, que se traspasaron a un tubo Falcon de 15 ml. Posteriormente, se centrifugaron a 1800 rpm durante 3 min a 25°C, y se aspiró el sobrenadante. Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en 1,5 ml de medio (EBM2 más FBS al 10%). Se sembraron 2×10^5 células sobre cada soporte permeable de la cámara Boyden (Quimigen) y las células se incubaron a 37°C/ 5% CO₂ durante 16h. Pasado este tiempo, con unas pinzas estériles se colocaron los soportes permeables en una placa de 24 pocillos que contenían 0,6 ml de EBM2 y FBS al 10% por pocillo. Finalmente, se añadió 0,1 ml de EBM2 suplementado con FBS al 10%, en el depósito superior de cada pocillo.

Para fomentar la permeabilización de las células endoteliales, el medio de cultivo se suplementó con 5 ng/ml de TNF- α , y las células endoteliales se cultivaron en presencia de dicho estímulo durante 24h.

- Transmigración de Leucocitos

En primer lugar, se retiró el medio de cultivo RPMI de las cámaras Boyden, donde se encontraba el cultivo de células endoteliales. La cámara superior que contenía las células endoteliales se transfirió a otro pocillo, el cual contenía 500 μ l de medio RPMI más el quimioatrayente utilizado (se pusieron TNF- α e IL-8, ambos a 20 nM). A continuación, se centrifugaron los neutrófilos a 1800 rpm durante 3 min a 25°C y, se resuspendieron en 100 μ l de medio RPMI. Estos 100 μ l de la suspensión de neutrófilos se añadieron al compartimento superior de la cámara Boyden, que contenía las células endoteliales, y se incubaron durante 3h a 37°C/5% CO₂. Posteriormente, se recogió el medio de cultivo con los neutrófilos que quedaron en la cámara superior (no infiltrantes), añadiendo 400 μ l de medio RPMI. Para recoger las células endoteliales y los neutrófilos adheridos a ellas, se añadió 200 μ l de Tripsina, se incubaron las células con la tripsina durante unos minutos a 37°C/ 5% CO₂, y se recogieron los 200 μ l de Tripsina, añadiendo 300 μ l de RPMI. Los neutrófilos infiltrantes que atravesaron la monocapa de células endoteliales se recogieron de la cámara inferior añadiendo 300 μ l de medio RPMI. La cuantificación de los neutrófilos en la cámara superior (no infiltrados, H), adheridos a la

monocapa de célula endotelial (adheridos, M) y los presentes en la cámara inferior (infiltrantes, L) se contaron por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD66b conjugado con el fluorocromo PErC/Cyanine 5.5 (BioLegend) para marcar específicamente los neutrófilos, y GFP como marcador de las células transfectadas con los shRNAs contra PATJ (V2 y V3).

- Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se ejecutó siguiendo el método Pfaffl. Este método se utiliza para calcular los datos de expresión génica relativa teniendo en cuenta las diferencias en las eficiencias de los cebadores. Se calcularon las eficiencias de los cebadores (primer efficiency), cuyos valores debían adaptarse a esta fórmula:

$$\text{Converted primer efficiency} = \left(\frac{\text{Primer efficiency (\%)}}{100} \right) + 1$$

Por otro lado, se calculó el valor medio, en formato de umbral de ciclo (Ct), de las réplicas técnicas para los datos de la muestra y los datos de control. Después, se calculó el ΔCt para cada gen de interés (GOI) y el gen housekeeping (HKG) por separado. La ecuación para ello es:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Control sample average Ct} - \text{Sample of interest average Ct}$$

Una vez reunidos todos esos datos, se aplicó la ecuación de Pfaffl:

$$\text{Gene expression ratio} = \frac{(E_{\text{GOI}})^{\Delta\text{Ct GOI}}}{(E_{\text{HKG}})^{\Delta\text{Ct HKG}}}$$

Resultados

- Transfección del shRNA de PATJ en Neutrófilos

Debido a la corta vida media de los neutrófilos primarios y a su baja eficiencia de transfección, es muy difícil introducir ácidos nucleicos en los neutrófilos. Con la intención de alargar su supervivencia en cultivo primero se pensó en suplementar factores de estimulación, pero al final, tras varias pruebas con diferentes factores de estimulación, como CGSF (*Colony Granulocyte Stimulating Factor*), e IL-8 (*interleukin 8*), se desistió dicha idea porque con la presencia de estos agentes quimioatrayentes, se producía estimulación clonal de los neutrófilos y se diluía la ya baja eficiencia de células transfectadas. Por otro lado, también se probaron diferentes cantidades de células a transfectar. En un principio se realizó con 1×10^6 células/mL, 2×10^6 células/mL y 3×10^6 células/mL. El número de células que mostró mayores eficiencias fue 1×10^6 células/mL (Figura 1). Para realizar todas estas pruebas para optimizar las condiciones se utilizó el plásmido GFP Turbo, que venía con el kit (*Nucleofector Lonza*), que facilita la cuantificación de las células nucleofectadas mediante cuantificación por microscopía de fluorescencia. Una vez optimizadas las condiciones de transfección, se optó por realizar la nucleofección con los plásmidos que contenían el shRNA contra PATJ V2 y V3.

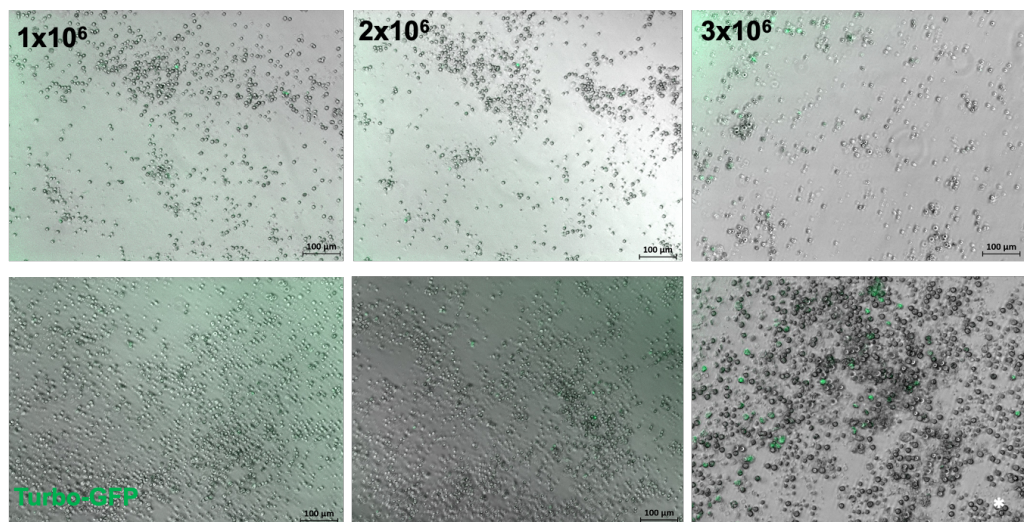


Figura 1. Transfección de neutrófilos con el plásmido GFP Turbo. Se realizó con 1×10^6 células/mL, 2×10^6 células/mL y 3×10^6 células/mL.

- Western Blot Neutrófilos

Con el objetivo de conocer la expresión proteica de PATJ y de la actina, en los neutrófilos, tras estimulación de quimioatrayentes, se realizó un Western-Blot. Para ello, se utilizaron neutrófilos no expuestos a ningún quimioatrayente (CTL), neutrófilos estimulados con quimioatrayente C-GSF y neutrófilos estimulados con quimioatrayente IL-8. En estos neutrófilos se estudiaron los niveles proteicos de PATJ, α -Actina, β -actina y GAPDH, como proteína normalizadora (Figura 2). La proteína PATJ se expresa de forma tenue, aunque se aprecia que su expresión aumenta con la incubación tanto de C-GSF como de IL-8. En cuanto a los niveles proteicos de la actina, se aprecia una tendencia similar entre α -Actina y β -Actina, la expresión de ambas proteínas aumenta en los neutrófilos estimulados con quimioatrayente, siendo superior en aquellos que han sido estimulados con IL-8.

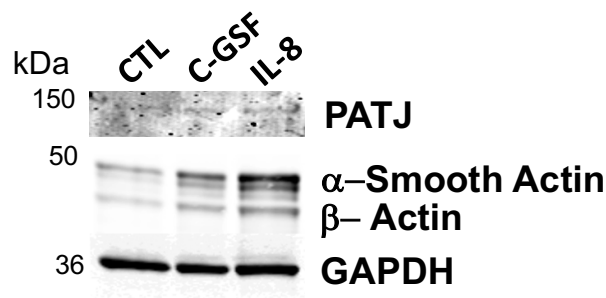


Figura 2. Western Blot neutrófilos no estimulado (CTL), neutrófilos estimulados con quimioatrayente C-GSF y estimulados con quimioatrayente IL-8. Se marcó con anticuerpos GAPDH, PATJ, α -Actina y β -Actina. Se midió la fluorescencia a 700 nm de absorbancia y a 800 nm para visualizar los diferentes niveles de proteínas.

Para cuantificar las diferencias de expresión observadas en el WB se realizó una densitometría de cada una de las bandas visualizadas en la Figura 2. Se calculó el ratio de α -Actina, β -Actina y PATJ (Figura 3, a, b y c respectivamente) respecto a GAPDH. Los resultados confirmaron que cuando los neutrófilos son estimulados con quimioatrayentes, tanto PATJ como las proteínas β -actina y α -smooth actina se sobre-expresan de forma significativa respecto a las células sin estimular (40% expresión

proteica PATJ C-GSF vs. 15% CTL, 50% expresión proteica PATJ IL-8 vs. 15% CTL; 35% expresión proteica α -actina C-GSF vs. 8% CTL, 71% expresión proteica α -actina IL-8 vs. 8% CTL; y 50% expresión proteica β -actina C-GSF vs. 12% CTL, 73% expresión proteica β -actina C-GSF vs. 12% CTL).

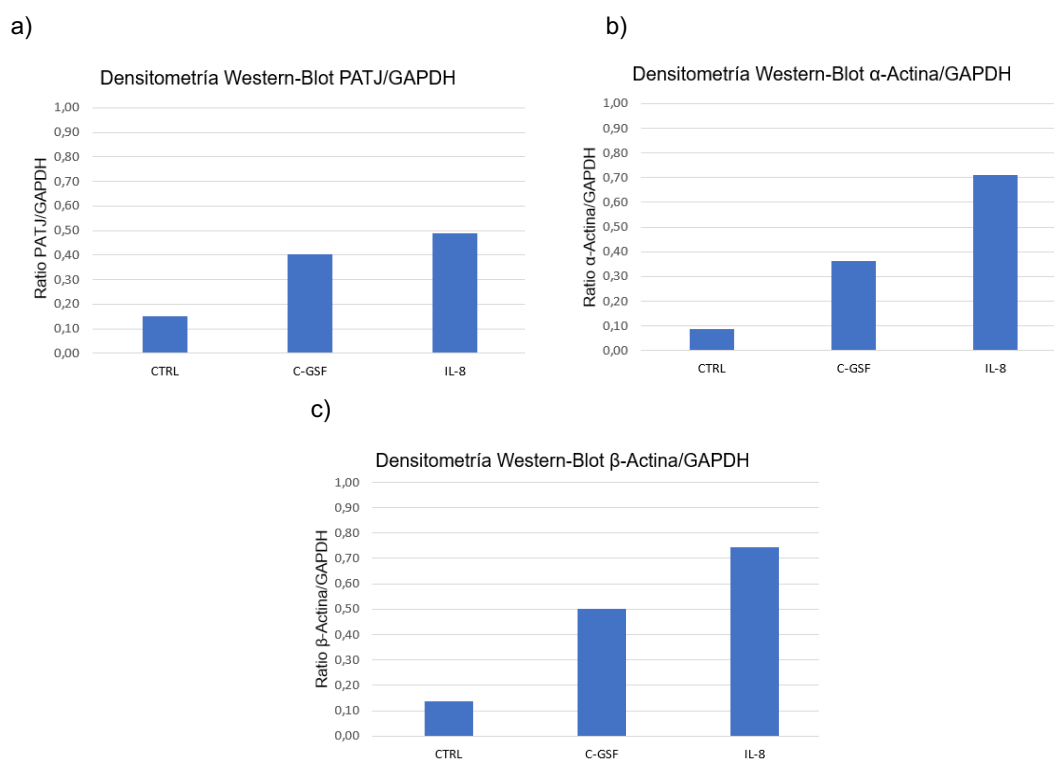


Figura 3. Densitometría Western-Blot. Ratio expresión proteínas, según la densidad de las bandas en el Western-Blot, PATJ/GAPDH (a), α -Actina/GAPDH (b) y β -Actina/GAPDH (c).

- RT-PCR gen *PATJ* y gen *SDHA* (housekeeping gen) en Neutrófilos

Para conocer la eficiencia del silenciamiento de *PATJ* en los neutrófilos tratados con shRNA V2, se realizó una RT-PCR. En la Figura 5, se muestra el ratio de expresión de *PATJ* entre neutrófilos sin transfectar y neutrófilos transfectados con el plásmido shRNA V2. Los resultados se representan como la diferencia de expresión entre las células

control (no transfectadas) y las células transfectadas con shRNA PATJ V2. Dicha expresión se calculó por el método de método Pfaffl, tal y cómo se explica en detalle en el apartado metodológico (ver apartado análisis estadístico). El gen *SDHA* se utilizó cómo normalizador. Sorprendentemente las muestras transfectadas con shRNA V2 muestran niveles de ARNm de PATJ 5,4 veces superiores que las células control (Figura 5). Dichos resultados pueden ser debidos al hecho que el shRNA de PATJ está bloqueando la traducción, impidiendo que el ARNm se traduzca a proteína, y la célula tiende a generar más transcrito de PATJ para compensar. Esta hipótesis tendría que haberse validado determinando directamente los niveles de proteína en las células silenciadas de PATJ, pero las bajas eficiencias de transfección impidieron poder realizar dicho experimento. Cabe señalar también que el hecho que la amplificación del gen normalizador *SDHA* fuera tan dispar entre células control y células transfectadas evidencia las grandes diferencias entre las células de partida que se consiguieron transfectar, que fueron un porcentaje muy reducido (7%) respecto a las células no transfectadas.

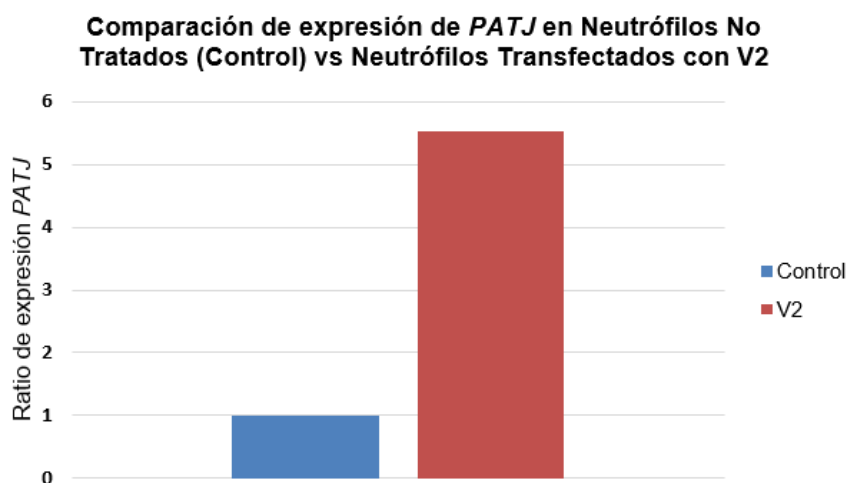


Figura 4. RT-PCR gen *PATJ*. Se utilizó DNA complementario de neutrófilos tratados con shRNA V2 (rojo) y neutrófilos no transfectados (control, azul). Las diferencias de expresión se representan en cambios de expresión (*fold-change*) respecto a las células CTL.

Muestra	Cq Mean PATJ	Cq Mean SDH	Δ Ct diana	Δ Ct ref.
Control	26,7	25,4	0	0
V2	30,8	31,6	-4,1	-6,2

Muestra	Ratio de expresión	Fold Change (FC)	Log10 (FC)	Log2 (FC)
Control	1	1	0	0
V2	5,525	5,525	0,742	2,466

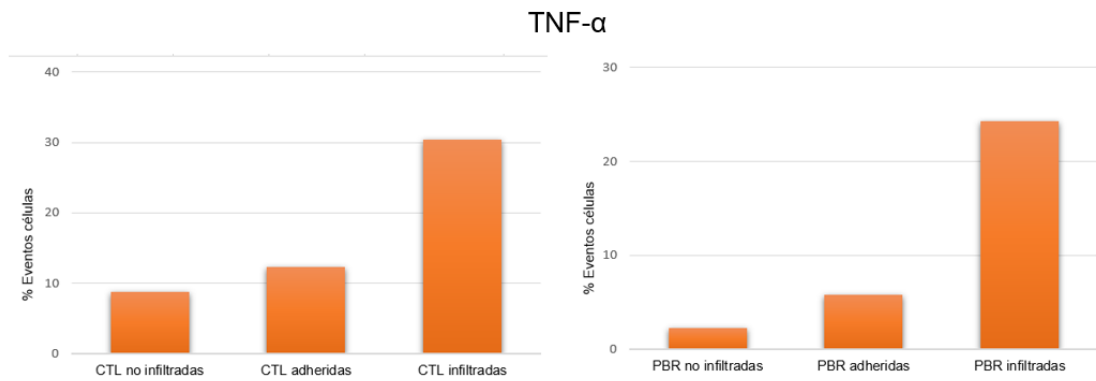
Figura 5. RT-PCR gen *PATJ* y gen *SDHA* (House keeping). Cq (Cycling Quotient) indica el número de ciclos necesarios para identificar el gen objetivo. Para calcular el ratio de expresión génica se llevó a cabo el análisis estadístico siguiendo el método Pfaffl.

- Transmigración Leucocitos

Con la finalidad de determinar si la modulación de la expresión de *PATJ* mediante la sobre-expresión de shRNA V2 y V3 modifica la capacidad de los neutrófilos de adherirse e infiltrar a través de una monocapa de células endoteliales, se realizaron los ensayos de migración. En primer lugar, se realizó una citometría de flujo en neutrófilos transfectados con shRNA V3 estimulados con diferentes quimioatrayentes, TNF- α e IL-8 (Figura 6, a y b respectivamente). Estos resultados muestran que, los neutrófilos transfectados con shRNA V3 estimulados con TNF- α poseen un mayor porcentaje de células infiltradas respecto al grupo control (no transfectados), si se compara con las células adheridas, es decir, teniendo en cuenta el porcentaje de células adheridas, los neutrófilos transfectadas presentan una mayor diferencia frente a las adheridas que lo neutrófilos no transfectados (neutrófilos no transfectados poseen un 12% de adhesión y un 30% de infiltración, mientras que, los neutrófilos transfectados con shRNA V3 anti-*PATJ* poseen un 5% de adhesión y un 24% de infiltración) (Figura 6, a). Del mismo modo se observa que, los neutrófilos transfectados con shRNA V3 anti-*PATJ* estimulados con IL-8 poseen un mayor porcentaje de células infiltradas respecto al grupo control (29% de células infiltradas transfectadas vs. 19% células infiltradas sin transfectar) (Figura 6, b). Por otro lado, se aprecia que el porcentaje de infiltración de neutrófilos transfectados con shRNA V3 anti-*PATJ* y estimulados con IL-8, es superior a aquellos estimulados con TNF- α . Si se compara el grupo control con aquellos que poseían *PATJ* infraexpresado, se observa un mayor porcentaje de infiltración de neutrófilos, a través de las células

endoteliales, respecto a eventos de adherencia en el grupo problema que en el grupo control.

a)



b)

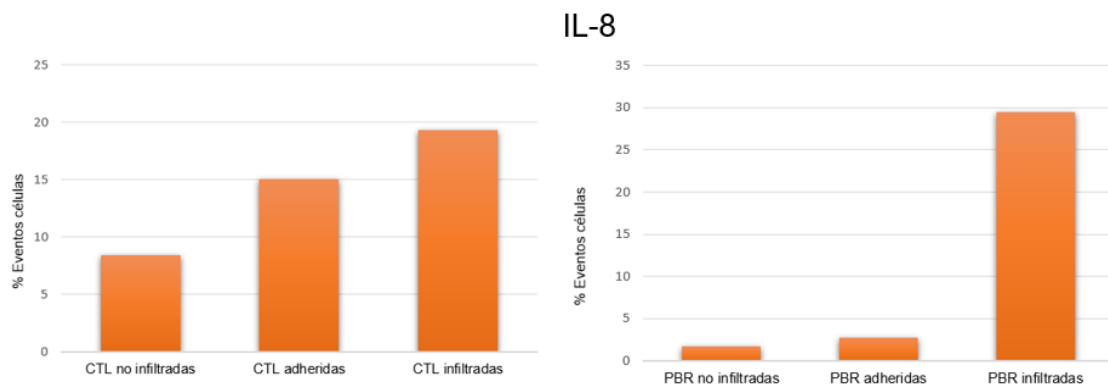
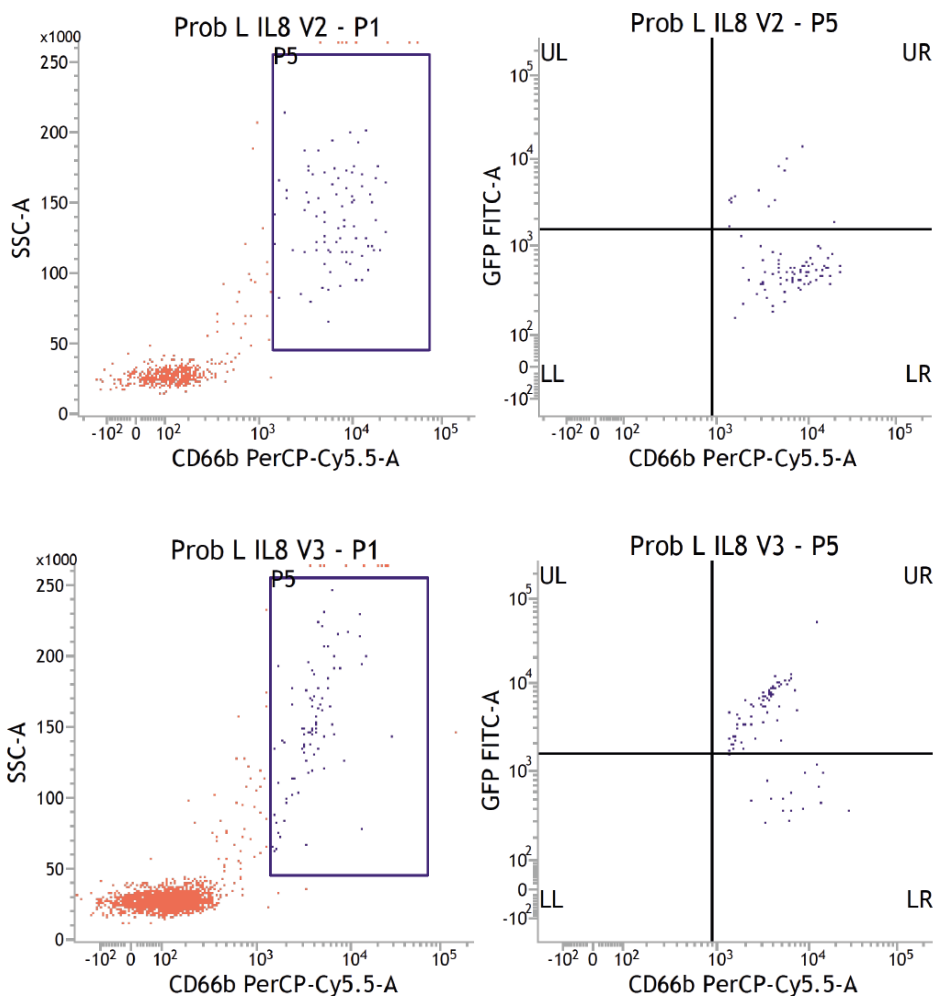


Figura 6. Resultados citometría de flujo. Se utilizaron neutrófilos control sin tratamiento estimulados con quimioatrayentes TNF- α e IL-8 (a y b) y neutrófilos tratados con ShRNA V3 estimulados con los mismos quimioatrayentes (PBR). El eje x representa los eventos celulares (neutrófilos) en %. Siendo los eventos, la capacidad de adherirse y posteriormente infiltrarse en la barrera de células endoteliales.

Posteriormente, se realizó el mismo ensayo, pero utilizando un anticuerpo anti-neutrófilo (CD66b PerC/Cyanine), que nos permite separar específicamente los neutrófilos del número de de células. Posteriormente, se separan los neutrófilos que expresan GFP,

que son los que han incorporado el plásmido con el shRNA anti-*PATJ* (V2 y V3). Se puede observar que respecto al número total de neutrófilos que expresan el shRNA anti-*PATJ* V2 (Figura 7, a) poseen mayor porcentaje de infiltración (LR) que aquellos que han adquirido el shRNA anti-*PATJ* V3 (Figura 7, b). Respecto a las células estimuladas con el quimioatrayente IL-8, se observó mayor porcentaje de neutrófilos infiltrantes en ambos tratamientos con el shRNA anti-*PATJ* que en los grupos control respectivos. Además, si se comparan entre si shRNA V2 y V3, se observa un porcentaje ligeramente superior de neutrófilos infiltrantes, para aquellos que habían adaptado shRNA V3 que los que poseían shRNA V2 (Figura 8). Estos resultados difieren de lo observado en la Figura 7, ya que los resultados de dicha figura no son cuantitativos sino observacionales.

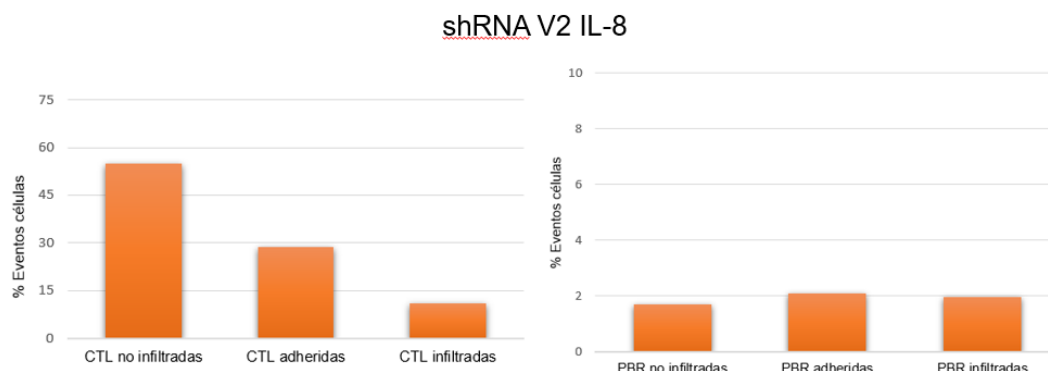
a)



b)

Figura 7. Resultados citometría de flujo utilizando anticuerpo CD66b PerC/Cyanine, para marcar neutrófilos que hayan incorporado shRNA V2 y V3. Se observa el número de neutrófilos que han adoptado el shRNA V2 (a izq.) y V3 (b izq.) respecto al total de células que se habían transfectado. Dentro del grupo de células que expresan el shRNA V2 (a) se observa las que han sido capaz de infiltrarse (LR) a través de la barrea de células endoteliales (a LR). Y, dentro del grupo de células que expresan el shRNA V3 (b) se observa las que han sido capaz de infiltrarse (LR) a través de la barrea de células endoteliales (b LR). Ambos grupos de células fueron estimuladas con quimioatrayente IL-8.

a)



b)

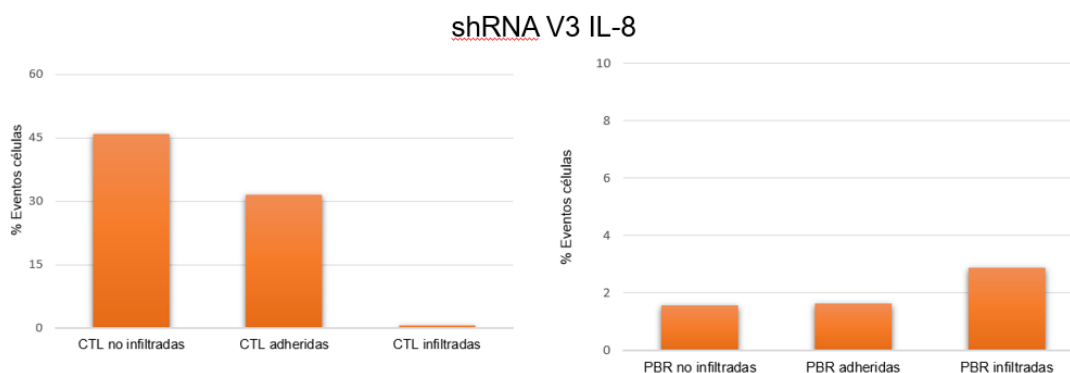


Figura 8. Resultados citometría de flujo utilizando anticuerpo CD66b PerC/Cyanine, para marcar neutrófilos que hayan incorporado shRNA V2 y V3. Se utilizaron neutrófilos que no habían sido sometidos a ningún tratamiento (CTL) y neutrófilos tratados con shRNA V2 y V3 (PBR) (a y b respectivamente), ambos fueron estimulados con quimioatrayente IL-8. El eje de las x indica los eventos celulares (neutrófilos) en %. Siendo los eventos, la capacidad de adherirse y posteriormente infiltrarse en la barrera de células endoteliales.

Discusión

Actualmente, el ictus es la segunda causa de muerte el mundo y con el paso del tiempo están aumentando las muertes causadas por esta enfermedad, debido al envejecimiento y al crecimiento de la población (Vivanco-Hidalgo *et al.*, 2019). Es por ello, que es importante estudiar a que se debe el buen, o mal pronóstico funcional del ictus y su posible mejora.

Con el objetivo de estudiar la modulación de PATJ, así como de α -Actina y β -Actina enfrente de estímulos quimioatrayentes, los neutrófilos se trataron con diferentes quimioatrayentes, C-GSF e IL-8, para realizar el Western Blot (Fig. 2). Los neutrófilos en este caso no habían sido transfectados con shRNA-anti-PATJ, por tanto, no se había editado genéticamente *PATJ*, con la finalidad de observar si los neutrófilos estimulados con quimioatrayentes presentaban una mayor expresión de la proteína PATJ con respecto al grupo control. En los resultados presentados se puede observar una tendencia a expresar una mayor cantidad de proteína PATJ al ser estimulados con quimioatrayentes (Figura 2). El mismo perfil de expresión proteica se puede observar en α -Actina y β -Actina. Por tanto, la expresión de PATJ, α -Actina y β -Actina se modifica enfrente de estímulos quimioatrayentes, como C-GSF e IL-8, presentando una mayor expresión proteica cuando los neutrófilos son estimulados con IL-8 (Figura 3). Estos resultados sugieren una interrelación entre PATJ y el citoesqueleto de actina. Resultados recientes del grupo receptor en los que han modulado la expresión de PATJ en células endoteliales también han observado modulación del citoesqueleto de actina (Medina-Dols, *et al.* 2022).

Por otro lado, se realizó un ensayo RT-PCR para conocer la eficiencia de silenciamiento de *PATJ* en los neutrófilos que habían sido transfectados con plásmidos que contienen shRNA contra *PATJ* humano (V2 y V3). Tal y como se ha explicado, las células transfectadas tenían niveles más elevados de ARNm de *PATJ* (Figura 4). El posible bloqueo de la traducción, y la consiguiente disminución de la traducción puede provocar una sobre-activación transcripcional, aumentando el número de transcritos de ARNm

para compensar el déficit protéico, tal y cómo se ha descrito anteriormente (Kumagai *et al.*, 2016).

Se realizó un ensayo de transmigración de leucocitos con el objetivo de estudiar la funcionalidad de PATJ en procesos de adherencia e infiltración. Para ello, se utilizaron neutrófilos transfectados con shRNA anti-PATJ V2 y V3, estimulado con quimioatrayentes TNF- α e IL-8. Los resultados presentados muestran un mayor porcentaje de infiltración en aquellos neutrófilos transfectados con shRNA contra PATJ respecto a los neutrófilos no transfectados, tras ser estimulados con ambos quimioatrayentes (Figura 6). Además, tras comparar la eficiencia de los dos quimioatrayentes utilizados, se observa una mayor tasa de infiltración cuando los neutrófilos son estimulados con IL-8 (Figura 6). Por tanto, los resultados demuestran que existe una diferencia en el proceso de infiltración de neutrófilos en función del quimioatrayente utilizado, en este caso IL-8 fue el que presentó un mayor porcentaje de infiltración. Resultados recientes en los que se ha estudiado la capacidad de invasión de células infiltrantes, como los macrófagos, han demostrado que cuando los macrófagos están estimulados con TNF- α se facilita el proceso de invasión, en el que la modulación de PATJ está implicada (Ratheesh *et al.*, 2018). Por otro lado, en el segundo ensayo de transmigración de leucocitos, para comprobar la funcionalidad de PATJ, se compararon neutrófilos transfectados con shRNA V2 y shRNA V3. En primer lugar, los resultados expuestos muestran, en ambos grupos, una tasa de infiltración pequeña respecto al número total de células utilizadas en el ensayo (Figura 7). Esto se debe a que, el número de neutrófilos transfectados con respecto al número de células total, utilizadas en el ensayo es pequeño. Esto se debe a la baja eficiencia de transfección por nucleofección y a la escasa viabilidad de los neutrófilos, comentado anteriormente. Aunque el número de células infiltradas en los neutrófilos transfectados sea pequeño, muestran una mayor tasa de infiltración que el grupo control (neutrófilos no transfectados) (Figura 8). Si se compara la capacidad de infiltración de aquellos neutrófilos transfectados, se puede observar que aquellos neutrófilos que poseían en su genoma shRNA V3 presentan una mayor tasa de infiltración que shRNA V2, aunque la diferencia es mínima. Estos resultados demuestran que los neutrófilos que presentan un knockdown de *PATJ*, expresaran menor cantidad de la proteína PATJ; modulando así el citoesqueleto de

actina de los neutrófilos (Medina- Dols *et al.*, 2022). Por consiguiente, los neutrófilos que infraexpresen la proteína PATJ presentarán un mayor grado de adherencia y mayor capacidad infiltrante, traspasando el endotelio vascular. Evento que supondrá una mayor presencia de neutrófilos y células leucocitarias en la región isquémica, llevando a cabo una mayor respuesta inflamatoria y, con ello un peor pronóstico funcional tras padecer un ictus isquémico (Daneshvar *et al.*, 2020).

Limitaciones del Estudio: Este Trabajo de Fin de Grado presenta varias limitaciones que cabe tener en cuenta a la hora de extraer las conclusiones y se enumeran a continuación:

1. Debido a la vida corta de los neutrófilos y a la baja eficiencia de transfección, no hemos sido capaces de transfectar suficientes neutrófilos para realizar estudios de expresión proteica por WB, con lo que no hemos podido validar que la eficiencia de silenciamiento de PATJ a nivel de proteína. Este hecho dificulta poder extraer conclusiones sólidas de los estudios funcionales realizados.
2. Los estudios de trans migración de neutrófilos a través de la monocapa de células endoteliales requieren ser validados con más experimentos en los que se comparen células transfectadas con shRNAs anti-PATJ con células también transfectadas con plásmidos que contengan shRNAs scramble, sin diana conocida en el genoma humano. No podemos descartar que la simple transfección sea causal de la activación de los neutrófilos. Además, se tiene que conseguir validar la eficiencia de silenciamiento de PATJ utilizando los plásmidos V2 y V3, que cabe destacar han sido validados anteriormente por el grupo receptor en otros tipos celulares, tales como células epiteliales renales (HEK293T9 y endoteliales cerebrales (hCMEC/D3).

Conclusiones

A nivel tecnológico:

1. Este Trabajo de Fin de Grado ha contribuido a desarrollar un protocolo de extracción y cultivo de neutrófilos primarios que ha permitido su modulación genética mediante nucleofección con plásmidos portadores de ARNs de interferencia contra *PATJ* humano. También ha permitido poner a punto el estudio de trans migración celular de leucocitos a través de monocapa de célula endotelial.

A nivel de resultados de investigación:

2. La proteína PATJ se sobre-expresa en neutrófilos sobre-estimulados con los quimioatrayentes C-GSF e IL-8, al igual que las proteínas del citoesqueleto de actina b-actina y a-smooth actina.
3. Estudios de trans migración celular utilizando la cámara de Boyden sugieren que los neutrófilos que infra-expresan PATJ tienen mayor capacidad infiltrante a través de una monocapa de células endoteliales.

Referencias Bibliográficas

Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love B, Gordon L and Marsh EE. (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicentre clinical trial. *Stroke*, 24(1):35-41.

Bazellères E, Aksenova V, Barthélémy R, Massey D and Le Bivic A. (2018) Role of the Crumbs proteins in ciliogenesis, cell migration and actin organization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 81:13-20.

Herranz, S. (2013). Participación de las proteínas CRB y proteínas asociadas en el desarrollo de la retina y en distrofias retinianas. [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]. Instituto de neurociencias de Castilla y León. Extraído de: <https://pdfs.semanticscholar.org/922d/358a9a615f7595b0e3a9e4adfb5fde7e962a.pdf?ga=2.121057160.106664522.1654019159-1326395913.1654019159>

Jayaraj R, Azimullah S, Meiram R, Jalal F and Rosenberg G. (2019) Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 16(142):1742-20194.

Kumagai T, Aratsu Y, Sugawara R, Takamitsu S, Miyairi S and Nagata K. (2016) Indirubin, a component of Ban-Lan-Gen, activates *CYP3A4* gene transcription through the human pregnane X receptor. *Drug metabolism and Pharmacokinetics*, 31 (2):139-145.

Medina-Dols A, Sole M, Mola-Caminal M, Cullell N, Tur S, Jiménez C, Díaz-Navarro R, Carrera C, Muiño E, Gallego-Fabrega C, *et al.* (2022) Role of PATJ in Stroke Prognosis by modulating Endothelial to Mesenchymal Transition through the Hippo/Notch/PI3K Axis. *Stroke*.

Mola M, Carrera C, Soriano C, Giralt E, Díaz R, Tur S, Jiménez C, Medina A, Cullell N, Torres NP, Muiño E, Rodríguez A, Ois A, Cuadrado E, Vivanco R, Hernández M, Solé M, Delgado P, Bustamante A, García T, *et al.* (2018) PATJ low frequency variants are associated with worse ischemic stroke functional outcome. *Circulation Research*, 124:114-120.

Ojaghihaghighi S, Vahdati SS, Mikaeilpour A and Ramouz A. (2017) Comparison of neurological clinical manifestation in patients with hemorrhagic and ischemic stroke. *World J Emerg Med*, 8(1):34-38.

Planas AM and Vila E. (2018). La inflamación como diana terapéutica en la isquemia cerebral. Aportaciones de los estudios funcionales a la investigación farmacológica básica (pp. 27-35). Extraído de: <https://www.esteve.org/ca/capitulos/3-la-inflamacion-como-diana-terapeutica-en-la-isquemia-cerebral/>

Radu RA, Terecoasa EO and Bajenaru OA. (2017). Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 159:93-106.

Ratheesh A, Biebl J, Vesela J, Smutny M, Papusheva E, Krens G, Kaufmann W, Gyoergy A, Casano A and Siekhaus D. (2018). *Drosophila* TNF modulates tissue tension in the embryo to facilitate macrophage invasive migration. *Developmental Cell*, 45: 331–346.

Shin K, Wang Q and Margolis B. (2007) PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO reports*, 8:158:164.

Smajlovic D. (2015) Strokes in young adults: Epidemiology and prevention. *Vascular Health and Risk Management*, 11:157-164.

Vivanco-Hidalgo RM, Ribera A, Abilleira S. (2019) Association of socioeconomic status with ischemic stroke survival. *Stroke*, 50(12):3400-3407.

Wang W, Lyu T and Li Z. (2021) Research progress on PATJ and underlying mechanisms associated with functional outcomes after stroke. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 17:2811-2818

Yang S, Yan S, Niu R and Lin X. (2009) VEGF Gene silencing by Cytomegalovirus promoter driven ShRNA expression vector results in vascular development defects in Zebrafish. *Russian Journal of Genetics*, 45 (9):1040-1046.

Daneshvar R, Dehghanei M, ArefNezhad R and Motedayyen H. (2020) The predicting role of neutrophil– lymphocyte ratio in patients with acute ischemic and hemorrhagic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 29 (11).

ANEXO

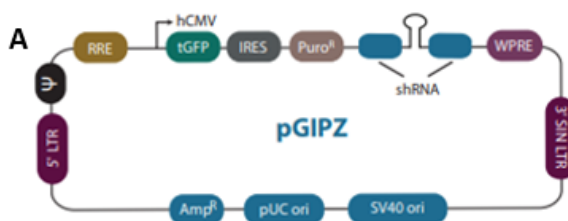


Figura 9. Esquema del vector lentiviral pGIPZ. Plásmido pGIPZ con un gen de resistencia a la puomicina al que se la incorporado un ARN silenciador pequeño de PATJ. Presenta la proteína de fluorescencia verde para en el microscopio se puedan identificar las células que han incorporado el plásmido.

Plasmidi	Gen	Seqüència madura
pGIPZ V2	PATJ	TATGGTTCATCTCTAAATC
pGIPZ V3	PATJ	TGAATGGTATGATGAAGCT

Figura 10. Tabla secuencia del gen PATJ en vector lentiviral pGIPZ V2 y pGIPZ V3.

