



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”  
Multidisciplinario  
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

## La interacción de los receptores P2X4/P2X7 establece la respuesta purinérgica a ATP en macrófagos de ratón.

Nombre completo del autor: Gabriela Pérez Flores.

Gabriela Pérez-Flores<sup>1</sup>, Sébastien A. Lévesque<sup>3</sup>, Jonathan Pacheco<sup>4</sup>, Luis Vaca<sup>4</sup>, Steve Lacroix<sup>3</sup>, Patricia Pérez-Cornejo<sup>2</sup> and Jorge Arreola<sup>5</sup>

- (1) Escuela de Medicina, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- (2) Departamento de Fisiología y Biofísica, Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- (3) Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec et Département de Médecine Moléculaire de l'Université Laval, Québec, QC, Canada.
- (4) Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad de México, México.
- (5) Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

Grado académico: Doctorado en Ciencias Biomédicas Básicas.

Correo electrónico: [gaby17\\_perez@yahoo.com.mx](mailto:gaby17_perez@yahoo.com.mx)

Nombre de la Institución: Escuela de Medicina. Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Fraccionamiento Rafael Curiel, CP 79060. Cd. Valles, S.L.P



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

### Título

La interacción de los receptores P2X4/P2X7 establece la respuesta purinérgica a ATP en macrófagos de ratón.

### Resumen

Los receptores purinérgicos P2X4 y P2X7 son receptores ionotrópicos activados por ATP. El P2X4 y P2X7 son co-expresados en varios tipos celulares donde participan en dolor, desarrollo óseo, liberación de citocinas pro-inflamatorias, muerte celular, etc. La función como canal de P2X7 es regulado por P2X4; sin embargo el mecanismo preciso de interacción y las consecuencias fisiológicas de esta interacción no han sido determinados. En este trabajo P2X4 y P2X7 fueron fusionados a través del extremo carboxilo terminal con CFP y YFP respectivamente. Las proteínas de fusión fueron usadas para experimentos de transferencia de energía por resonancia (FRET). La señal de FRET fue observada solo en células estimuladas con 5 mM de ATP o 0.1 mM de BzATP indicando que los receptores se encuentran a una proximidad corta cuando P2X7 es activado. Además, el P2X4 co-inmunoprecipito con el extremo carboxilo terminal de P2X7. Importantly, las respuestas dependientes de la activación de P2X7 que incluyen la formación de macroporo, muerte celular y liberación de IL-1 $\beta$  disminuyeron significativamente en macrófagos aislados de ratones P2X4KO. Con base en estos resultados, nosotros proponemos que la activación de P2X7 le permite interactuar con P2X4 y esta interacción atenúa las respuestas fisiológicas mediadas por P2X7 en macrófagos de ratón.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

### Abstract

The ATP-gated P2X4 and P2X7 receptor channels are co-expressed in neurons, epithelial and immune cells where they participate in pain, bone development, cytokine release, cell death, etc. The function of P2X7 is regulated by P2X4; however the precise mechanism(s) and the physiological consequences of such regulation remain undetermined. In this work P2X4 and P2X7 tagged on their C-termini with CFP and YFP, respectively, were used to record changes in fluorescence resonance energy transfer (FRET) after stimulation with 0.02 and 5 mM ATP or 0.1 mM 2'(3)-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate (Bz-ATP). FRET increased only in cells stimulated with 5 mM or 0.1 mM Bz-ATP indicating the receptors come into close physical proximity after P2X7 is activated. In addition, P2X4 co-immunoprecipitated with the carboxyl tail of P2X7 suggesting that such physical interaction takes place via the C-terminus of P2X7. Importantly, P2X7-dependent responses including cell death, macropore formation and IL-1 $\beta$  release were significantly attenuated in macrophages isolated from P2X4-KO mice. Thus, we propose that after activation P2X7 interacts with P2X4 and disruption of this interaction would hamper P2X7-mediated physiological responses.

Palabras clave: Receptores purinérgicos, FRET, Interacción, P2X4, P2X7.

### I. Introducción

El efecto del ATP extracelular es mediado por la activación de receptores conocidos como P2 que se subdividen en dos grandes familias: P2Y y P2X. Los



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

receptores P2X forman canales iónicos no selectivos cuando son activados por ATP. Los receptores P2X se encuentran ampliamente distribuidos a través del cuerpo humano y participan en diversos procesos fisiológicos (Suprenant & North, 2009). En este trabajo nos enfocamos en los receptores P2X4 y P2X7.

El receptor P2X4 se encuentre en el cerebro, pero también se expresa en células epiteliales de diferentes tejidos y en células del sistema inmune (Suprenant & North, 2009). El P2X7 es el miembro más grande de la familia P2X porque tiene un extremo carboxilo terminal largo que participa en la interacción de P2X7 con otras proteínas. El P2X7 es ampliamente expresado en células de linaje inmune, pero también está presente en células epiteliales de diferentes tejidos (Suprenant & Burnstock, 2009). En los trabajos publicados se destaca como principal antagonista de P2X7 al A438079. El receptor P2X7 al activarse funciona como un canal iónico y promueve otros efectos como apertura de un macroporo, la liberación de citocinas proinflamatorias, la muerte celular, entre otras (Suprenant & Burnstock, 2009).

La carencia de antagonistas selectivos para el P2X4 ha sido un obstáculo para la validación del papel del receptor P2X4 en distintas patologías, por lo que su papel fisiológico se ha hecho más evidente con el uso de RNA de interferencia o con la generación de ratones knockout. El receptor P2X7 ha sido de gran interés por su asociación con cuadros de dolor neuropático e inflamación.

Hace algunos años aparece evidencia que indica una asociación molecular y funcional entre el P2X4 y P2X7 (Casas-Pruneda et al., 2009). Los datos sugieren que P2X4 y P2X7 podrían funcionar como homotrómeros independientes que al



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

asociarse dan lugar a propiedades farmacológicas y funcionales novedosas (Antonio et al., 2011).

Los datos en la literatura nos permitieron suponer que la regulación purinérgica debe ser modulada por la función combinada de P2X7 y P2X4, y que probablemente este fenómeno sea resultado de una interacción proteína-proteína. Muchos tipos celulares co-expresan a los receptores P2X4 y P2X7 (Suprenant & North, 2009), además de que la expresión de ambos receptores incrementa en condiciones patológicas. Por lo que este trabajo explora la posibilidad de que el extremo carboxilo terminal del P2X7 sea un dominio de interacción con P2X4 y que la interacción P2X4/P2X7 tenga un efecto sobre la función de células que co-expresan ambos receptores.

### II. Metodología

*Generación de proteínas fusionadas.* Se diseñaron los oligos para amplificar la secuencia que codifica para P2X4 completo, P2X7 completo o para P2X7 desde el aminoácido 418 al 595. Las secuencias fueron clonadas en el vector pEYFP-N1. Para P2X4, las secuencias fueron clonadas en vector pECFP-N1.

*Cultivo celular y transfección.* Las células HEK-293 y J774 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, 1% gentamicina y 0.11 mg/ 5 mL de piruvato de sodio. Se mantuvieron bajo un ambiente con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C hasta alcanzar una confluencia de entre 0.05 -1x10<sup>6</sup> cel/ml (60-70%). Las células HEK-293 fueron transfectadas y usadas de 24-48 h posteriores a la transfección.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

*Aislamiento de macrófagos peritoneales residentes y activados.* Se usaron ratones adultos P2X4KO y WT C57BL/6. Los macrófagos residentes peritoneales y los estimulados con tioglicolato fueron obtenidos de los ratones WT o P2X4KO.

*Captura de YO-PRO1.* La fluorescencia fue medida utilizando longitud de onda exc/ emisión 488/520 nm. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal. Se estimularon con 5 mM de ATP. Las imágenes fueron analizadas usando el programa Olympus FluoView ASW3.1a. Para captura de colorantes, los datos fueron exportados al programa Origin versión 8.

*Microscopia confocal para experimentos de FRET.* Las células fueron transfectadas con P2X4-CFP o P2X7-YFP de manera individual o en co-transfección. Los experimentos fueron realizados con células vivas a 37°C aplicando el método de FRET espectral. Se utilizó un microscopio confocal TCS-SP5 LEICA.

*Ensayos de co-inmunoprecipitación.* Las células se crecieron en cajas de cultivo para lograr obtener al menos 700 µg de proteína. Se agregó un anticuerpo policlonal anti-P2X4 de ratón y posteriormente se agregaron las perlas de agarosa A/G. Se tomaron 120 µg de proteína para SDS-PAGE. Al terminar se realizó un Western Blot. Los anticuerpos primarios que se usaron fueron: anti-P2X4 (1:500), anti-P2X7 (1:2000).

*Ensayos de la liberación de IL-1β.* La técnica de cuantificación se hizo con un kit de ELISA. Los macrófagos fueron pre-incubados durante 3 h con 10 ng/mL de lipopolisacárido. Los macrófagos fueron estimulados con 5 mM de ATP por 30 min. Se agregó un grupo que fue pre-incubado con 25 µM de A438079.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

*Ensayos de muerte celular por liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).* Se incubo a las células con 5 mM de ATP durante 3 h. Al terminar el tiempo de incubación se tomaron 50  $\mu$ L del sobrenadante y se utilizó un kit de medición de LDH. Se agregó un grupo experimental con el inhibidor A438079.

*Análisis estadístico.* Se aplico *t* de Student para comparaciones entre dos grupos de datos. Para comparar más de dos grupos se realizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Bon-Ferroni. Una  $p < 0.05$  fue considerada significativa.

### III. Resultados

Para investigar si la regulación funcional de P2X7 por P2X4 se debe a una interacción proteína-proteína, se empleó la técnica de transferencia de energía por resonancia (FRET). Para estos experimentos co-transfectamos las proteínas de fusión P2X7-YFP y P2X4-CFP en células HEK-293 y medimos la señal de FRET bajo las siguientes condiciones experimentales: a) sin agonista; b) 20  $\mu$ M de ATP (para inducir la activación de P2X4); c) 5 mM de ATP (para inducir activación de P2X4 y P2X7) y d) 100  $\mu$ M de ATP (para inducir la activación de P2X7).

FRET no fue detectado en ausencia del agonista ni con la aplicación de 20  $\mu$ M de ATP. Sin embargo, la señal de FRET en células estimuladas con 5 mM de ATP o 100  $\mu$ M de BzATP incrementó de forma significativa comparada con aquella obtenida en 0 o 20  $\mu$ M de ATP. Los datos muestran que la activación de P2X7 es suficiente para que las proteínas interactúen. Esto sugiere una direccionalidad en la manera en que los receptores interactúan.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Las construcciones del receptor P2X7 completo y P2X7COOH-YFP (418-595) que corresponde al extremo carboxilo terminal se usaron para los experimentos de Co-IP. En los experimentos se precipitó P2X4 y se evaluó si las versiones de P2X7 co-precipitaban. Las señales de las proteínas para las versiones de P2X7 fueron observadas. Los resultados de los experimentos de FRET en conjunto con estos resultados de co-inmunoprecipitación apoyan la hipótesis de que la asociación entre P2X4 y P2X7 resulta de una interacción tipo proteína-proteína donde el dominio carboxilo terminal de P2X7 participa.

En los siguientes experimentos se evaluó la captura de YO-PRO1 para medir la formación del macroporo. Los resultados mostraron que varios macrófagos de ratones WT presentan alta fluorescencia a los 1200 s en comparación con macrófagos de P2X4KO. Se observó que en los macrófagos WT la captura de YO-PRO1 ocurre antes que en los macrófagos P2X4KO. Mientras a los macrófagos WT les toma un promedio de 669 s alcanzar la fluorescencia máxima a los macrófagos P2X4KO les toma un promedio de 856 s. Los datos indican que la ausencia de P2X4, modifica la captura de YO-PRO1 promovida por P2X7.

La maduración y liberación de IL-1 $\beta$  es otro efecto observado tras la activación de P2X7. Para determinar el papel de P2X4 sobre la liberación de IL-1 $\beta$  se obtuvieron los macrófagos peritoneales tanto de ratones WT como de P2X4KO. Los macrófagos derivados de ratones P2X4KO liberaron una cantidad estadísticamente menor de IL-1 $\beta$  en comparación a los macrófagos WT. La aplicación de 25  $\mu$ M de A438079, bloqueó completamente la liberación de IL-1 $\beta$  en macrófagos obtenidos de ratones P2X4KO. Este bloqueo fue incompleto en macrófagos WT, aunque se redujo más del 50%. En cuanto a la muerte celular,





## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

se hicieron experimentos de liberación de LDH. Los macrófagos obtenidos de ratones P2X4KO son menos susceptibles a liberar LDH en comparación con los macrófagos obtenidos de ratones WT después de que son estimulados con 5 mM de ATP. El pre-tratamiento con A438079, inhibió la liberación inducida por ATP tanto en macrófagos WT como en macrófagos P2X4KO.

#### IV. Conclusión.

Los principales resultados de este estudio demuestran que: a) la activación de P2X7 produce una interacción directa con P2X4, b) el extremo carboxilo terminal del receptor P2X7 interacciona con P2X4, c) la eliminación del receptor P2X4 disminuye la formación del macroporo, la liberación de IL-1 $\beta$  y la muerte celular.

Nuestros datos de FRET muestran que los receptores P2X4 y P2X7 tienen una interacción directa cuando se produce la activación del receptor P2X7, pero no por la activación del receptor P2X4. Esto sugiere una interacción direccional donde algunos dominios del receptor P2X7 necesitan reestructurarse para ser capaces de interactuar con el receptor P2X4. Además encontramos que el receptor P2X4 co-inmunoprecipita con el extremo carboxilo terminal del receptor P2X7.

Encontramos que la eliminación del gen de P2X4 y por tanto la expresión del receptor P2X4, provoca una disminución en la formación del macroporo, la liberación de IL-1 $\beta$  y la muerte celular en macrófagos peritoneales de ratones. Nuestros resultados apoyan evidencia reciente que muestra que la disminución en la expresión del receptor P2X4 con RNA de interferencia atenúa las funciones inflamatorias y citolíticas dependientes de la activación del receptor P2X7 (Kawano et al., 2012 a,b). La información recopilada de nuestro laboratorio y de otros



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

grupos muestra que el receptor P2X4 individualmente no favorece la captura de colorantes ni la muerte celular (Casas-Pruneda et al., 2009). Los datos apuntan a que la interacción de los receptores P2X4 y P2X7 es un mecanismo coordinado y sinérgico. Esto sugiere que la interacción P2X7/P2X4 tiene consecuencias funcionales en los macrófagos de ratón que son estimulados con ATP.

### V. Bibliografía.

1. Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD & Edwardson JM (2011). P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *Br J Pharmacol Jul*; 163(5): 1069-77.
2. Casas-Pruneda G, Reyes JP, Pérez-Flores G, Pérez-Cornejo P & Arreola J (2009). Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia. *J Physiol Jun 15*; 587(Pt 12): 2887-901.
3. Kawano A, Tsukimoto M, Moi D, Noguchi T, Harada H, Takenouchi T, Kitani H & Kojima S (2012a). Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun Mar 30*; 420(1): 102-7.
4. Kawano A, Tsukimoto M, Noguchi T, Hotta N, Harada H, Takenouchi T, Kitani H & Kojima S (2012b). Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun Mar 9*; 419(2): 374-80.
5. Surprenant A & North RA (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol 71*: 333-59.