

## Treball de Fi de Grau

### *Caracterització de macròfags de moll d'ós (BMM) del model murí de la lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI).*

Judith Giroud Gerbetant Deus

**Grau en Biotecnologia**

Tutora: Susanna Bodoy

Vic, Juny de 2017



*Als meus pares,*

## AGRAÏMENTS

Hi ha gent que dirà que és sort, d'altres que l'esforç està lligat a la recompensa, i d'altres que senzillament no diuen res. La possibilitat de que algun dia puguem arribar a tenir totes les respostes a totes les preguntes, és tan efímera que en comptes de ser un somni a perseguir és una utopia amb la que somiar. Tot i això, després de quatre anys, puc dir amb una seguretat incondicional que he ampliat els meus coneixements i horitzons, i me fet més gran, no només d'edat, si no interiorment.

La Universitat està considerada per la gran part de la població una de les millors etapes de la vida, per mi representa el 18,18 % periòdic del temps viscut, i de moment, se'ns dubte, m'afegeixo a la massa i, afirmo que és la millor etapa que he viscut.

Molts cops em llevo i penso, perquè, perquè ha sigut la millor etapa? És per l'objectiu aconseguit? Pels coneixements adquirits? Pel camí? O per la gent que tan acompanyat durant el camí? Com ja he dit, no tinc les respostes a tot i, el saber és personal, és un element abstracte que té un significat diferent en funció d'aquí preguntis, però segons el meu saber, la gent que t'acompanya durant les etapes que marquen la teva vida, és el que fa d'aquella etapa un record commemorable.

Una altra conclusió que puc extreure del meu saber, és que durant aquests 4 anys he invertit un esforç, voluntat i una constància en el ser en el que avui me convertit, no només amb l'etiqueta de Biotecnòloga, si no amb uns valors i unes creences que em permeten trobar el meu camí.

El saber sense valors és mera tècnica. És el valor de les coses el que ens dona el saber i, són els valors que ens transmeten els del voltant el que ens permet ser grans i excel·lents.

Després d'escriure aquestes paraules, però i penso quines són les persones que s'han emportat part de mi i, quines són aquelles que m'han aportat a mi, i evidentment, em venen una quantitat de persones a la ment, que seria impossible de plasmar l'agraïment que els i tinc, però d'unes quantes crec que si que podria parlar. Gràcies a tots els companys de laboratori que he tingut durant aquest any, vaig arribar a un lloc desconegut amb persones desconegudes i me'n vaig d'un lloc on em sento com a casa i amb persones a les quals, la gran majoria considero com els meus mentors. Meu ajudat tant en les petites com en les grans dificultats, i he fet d'un any complicat un any inoblidable.

Gràcies al LPI TEAM. Seguint amb les probabilitats, he format part del 4,54 % periòdic de la meua vida. Fer, aun no siendo una persona de mil palabras, cada día tienes alguna frase, gesto o movimiento que podría hacer reír a todas las células activadas con LPS, pero después de muchos experimentos creo que en función de la concentración de LPS que les pusieras se reirían más o menos, ya sabes, los caminos de la activación son caminos raros y oscuros. Tengo que decir, que me lo he pasado muy bien este año a tu lado, sobretodo en esos momentos de colapso total intentando calcular las concentraciones de los estímulos del día siguiente. Me he reído un montón con lo terco que eres, tú si quieres preparar un stock nuevo de aminoácidos a mí no me llames, y menos cuando hay en la nevera para dar y para vender. Pero para todo lo otro llámame cuando quieras, incluso si quieres hacer un heat map o mirar las rutas del KEGG. No tengo nada más que decirte excepto lo más importante, gracias a ti ya nunca más seré una palurda por Madrid, he aprendido que las cosas no se hacen **asin**, sino que se hacen **así!**

Susanna, el que m'has transmès tu no és ni la meitat del que et puc transmetre jo, m'agradaria ser capaç de dir el més adequat en cada moment, de poder-te donar la solució a tots els problemes i se'ns dubte facilitar-te cada instant del dia a dia. Se que no soc una persona fàcil, però vas ser tu qui em va donar la oportunitat

de créixer, vas ser tu qui va creure en mi, i puc afirmar que tot el que après al teu costat no té preu, ni estudiant 10 carreres aprendria el que m'has ensenyat, perquè crec que no tot el saber és coneixement sinó que el saber implica molt més que això, és un conjunt de fets, es el que sentim, el que veiem, el que palpem dia a dia. Espero que t'emportis alguna cosa de mi, ja que jo si que m'emporto alguna cosa de tu, i com ja he dit no només són coneixements si no que són passions, emocions, records i desitjos. Desitjos de que això no sigui un adéu, si no un hola, de que no sigui un final sinó un començament i desitjos de seguir creixent, aprenent i investigant, perquè tot i ser un grup petit, som una gran família.

Gràcies a tot l'equip del IRB, de Medicina Molecular, de Palacín, i sobretot gràcies al LPI TEAM! Tot hi les mil dificultats que ens trobem cada setmana seguim aquí amb constància i esforç, perquè.. a pesar de tot sempre, sempre i sempre **estem a tope!**

**Però sobretot m'agradaria agrair a la meva família, per haver-me donat el suport i les eines per ajudar-me a arribar on són ara. Gràcies per aguantar-me en tots els meus mals dies, gràcies per l'esforç que eu fet i feu dia a dia per mi, sense vosaltres estic segura que aquest text no hagués sigut possible. Sou de lo millor que hi ha! Us estimo!**

## *Índex de continguts*

	Pàg
Resum	9
Llista d'Abreviacions	11
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>12</b>
1. Transportadors d'aminoàcids	13
1.1. Transportadors catiónics	14
1.1.1. $\gamma^+$ LAT1 (SLC7A7)	15
2. LPI	15
3. Els macròfags	16
3.1. Activació dels macròfags	18
3.1.1. Via clàssica	18
3.1.2. Via alternativa	18
3.2. Metabolisme de l'arginina al macròfag	18
3.3. Metabolisme del ferro al macròfag	19
3.3.1. Metabolisme del ferro en macròfags durant infecció microbiana	20
<b>OBJECTIUS</b>	<b>22</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>24</b>
1. Cultius cel·lulars	25
1.1. Obtenció del M-CSF	25
1.2. Derivació de cèl·lules pluripotents a macròfags	25
1.3. Congelació i descongelació	26
1.4. Quantificació de nitrits	26
1.5. Caracterització dels macròfags per citometria de flux	26
2. Tècniques d'obtenció, manipulació i detecció de RNA	27
2.1. Extracció de RNA mitjançant el <i>kit</i> de ThermoFisher	27
2.2. Electroforesis en gel d'agarosa	27
2.3. Retrotranscripció	27
3. Tècniques de detecció de DNA	28
3.1. qRT-PCR	28
4. Tècniques d'obtenció, manipulació i detecció de proteïnes	28
4.1. Obtenció de proteïnes totals	28
4.2. Extracció de proteïnes de membrana	29
4.2.1. Proteïnes de membrana totals procedents de ronyó i melsa	29
4.2.2. Proteïnes de membrana totals procedents	29

de cèl·lules en cultius	
4.3. Determinació de la concentració de proteïnes: mètode BCA	29
4.4. Western Blot	29
4.4.1. Electroforesis SDS-PAGE	30
4.4.2. Transferència	30
4.4.3. Immunodetecció	30
5. Eines estadístiques	31
5.1. Anàlisi estadístic	31
<b>RESULTATS</b>	32
1. Validació del model LPI: eliminació de y <sup>+</sup> LAT1	33
2. Efecte de LPS sobre macròfags derivats de moll d'ós.	34
3. Efecte de l'ambient LPI en la producció de NO en macròfags derivats de cèl·lules de moll d'ós.	38
4. Efecte del grup Hemo sobre BMDM ( <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> )	39
<b>DISCUSSIÓ</b>	41
1. Generació i caracterització de BMDM ( <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> ).	42
2. Efecte de LPS sobre macròfags derivats de moll d'ós.	42
3. Efecte de l'ambient LPI en la producció de NO en macròfags derivats de cèl·lules de moll d'ós.	43
4. Efecte del hemo	43
<b>CONCLUSIONS</b>	44
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	46
<b>APÈNDIXS</b>	
Apèndix 1- Protocols	50
Apèndix 2- Material Suplementari	68



RESUM TREBALL FINAL DE GRAU  
GRAU EN BIOTECNOLOGIA

**Títol:** *Caracterització de macròfags de moll d'ós (BMM) del model murí de la lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI).*

**Paraules clau:** *Macròfags derivats de moll d'ós (BMDM), Lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI), arginina, ferro.*

**Autora:** Judith Giroud-Gerbetant Deus

**Tutora:** Susanna Bodoy Salvans

**Data:** Juny de 2017

Els aminoàcids són elements essencials pel nostre organisme. Aquests poden ser captats per diferents teixits gràcies a les proteïnes hidrofòbiques situades en les membranes cel·lulars anomenades transportadors. Mutacions en diferents transportadors, donen lloc a una gran varietat de malalties. El gen *Slc7a7*, codifica per una proteïna que intercanvia obligatòriament aminoàcids bàsics per aminoàcids neutres amb  $\text{Na}^+$  i que es localitza a la membrana basolateral (Torrents et al., 1999) de cèl·lules epitelials. Mutacions en el transportador  $\text{y}^+\text{LAT1}$  que s'expressa principalment a l'intestí i al ronyó causen la Lisinúria amb Intolerància a Proteïnes (LPI) (Torrents et al., 1999).

El fenotip de la malaltia és molt variat i, s'ha observat que els macròfags són un dels tipus cel·lulars més afectats. En estudis previs al grup, s'ha observat que la concentració de ferro intracel·lular en macròfags de polpa vermella de la melsa és major i, per altra banda, s'han observat desequilibris en la concentració de  $\text{NO}^{3-}$  i la producció d'òxid nítric per macròfags activats requereix de la ingesta d'arginina extracel·lular, aminoàcid en baixes concentracions en pacients LPI. La hipòtesi de partida del present *Treball de Final de Grau* és avaluar l'impacte de la manca de  $\text{y}^+\text{LAT1}$  en el macròfag i/o l'ambient generat per la falta de  $\text{y}^+\text{LAT1}$  en cèl·lules epitelials (baixa concentració d'arginina i alta concentració d'amoni) en l'expressió dels gens involucrats en l'activació clàssica i en la producció de NO per part dels macròfags. Així doncs, mitjançant tècniques de cultius primaris, anàlisis quantitatiu d'expressió gènica i quantificació de proteïnes, l'objectiu principal del projecte és la caracterització de macròfags procedents de moll d'ós amb diferents estímuls, amb l'objectiu d'identificar i verificar els gens implicats en la senyalització dels macròfags via M1, diferències d'expressió d'aquests gens en diferents condicions, analitzar el metabolisme del ferro en macròfags i avaluar la recuperació del fenotip amb citrul·lina.

Els resultats obtinguts mostren diferències en l'activació dels gens implicats en l'activació via M1 en medis diferents, diferències en la producció de NO en concentracions variants d'arginina, recuperació dels valors normals de NO en presència de citrul·lina i diferències en l'expressió gènica de gens relacionats amb el ferro en presència d'hemo. Aquests poden ser un punt de partida per altres anàlisis destinats a verificar la capacitat de fagocitosis i anàlisis de la concentració intracel·lular d'arginina en macròfags amb l'objectiu de trobar un model que sigui capaç d'explicar el mecanisme metabòlic de la malaltia i, així poder trobar possibles tractaments terapèutics pels afectats amb aquesta malaltia.

FINAL DEGREE PROJECT SUMMARY  
BIOTECHNOLOGY DEGREE

**Title:** *Bone marrow macrophages (BMM) characterization of the animal model of Lisinuric Protein Intolerance (LPI).*

**Key words:** *Bone marrow derived macrophages (BMDM), Lisinuric Protein Intolerance (LPI), arginine, iron.*

**Author:** Judith Giroud-Gerbetant Deus

**Tutor:** Susanna Boday Salvans

**Date:** June 2017

Aminoacid are essential elements for our organism. They can be captured through different tissues thanks to hydrophobic proteins located on the cellular membrane, named transporters. Mutations on these transporters give a wide range of disease. The *Slc7a7* gene codifies for a protein which is an obligated exchanger of basic aminoacids for neutral aminoacids with  $\text{Na}^+$ , and it's located on the basolateral membrane of epithelial cells. Mutations on the  $\text{y}^+\text{LAT1}$  transporter (Torrents et al., 1999), which is mainly expressed on the intestine and kidney, cause Lisinuric Protein Intolerance (LPI) (Torrents et al., 1998).

The disease phenotype covers an extensive range of characteristics and, it has been pointed out that, macrophages are one of the most type of cells affected. On previous studies carried out on our group, it has been observed an intracellular accumulation of iron in red pulp macrophages and imbalances of the concentration of  $\text{NO}^3$ . The production of NO in activated macrophages requires of extracellular arginine, an aminoacid which is present in low concentrations on plasma in LPI patients. The hypothesis of this *Final Degree Project* is to assess the impact of the lack of  $\text{y}^+\text{LAT1}$  in macrophages and/or the environment generated by the lack of  $\text{y}^+\text{LAT1}$  in epithelial cells (low concentration of arginine and high concentration of ammonia) in the expression of genes involved in the classic activation and, the NO production by macrophages.

Thus, using primary cultures techniques, quantitative analysis of gene expression and protein quantification, the main objective of the project is the characterization of bone marrow macrophages with different conditions, aiming to identify and verify genes involved in signaling through M1 macrophage pathway, differences in expression of these genes in different conditions, analyze the iron metabolism in macrophages and asses the recovery of the phenotype with citrulline.

The results show differences in the activation of genes involved in activation of M1 pathway in different environments, differences in NO production through different concentrations of arginine, the recovery of normal levels of NO in the presence of citrulline and differences in gene expression of genes related to the iron metabolism in presence of heme. These can be a starting point for other tests designed to verify whether the capacity of erythrophagocytosis is affected and analysis of intracellular concentration of arginine in macrophages, in order to fins a model which is able to explain the metabolic mechanisms of the disease in order to find a possible therapeutic treatment for those affected with the disease.

## ABREVIATURES:

4F2hc:	Cadena pesada del antigen de superfície 4F2
B <sup>o+</sup> AT:	<i>System B<sup>o+</sup> Amino acid Transporter</i>
b <sup>o+</sup> AT:	<i>System b<sup>o+</sup> Amino acid Transporter</i>
ARE:	<i>Antioxidant Response Element</i>
Arg-1:	Arginasa1
BSA:	Albúmina sèrica bovina
cDNA:	DNA complementari a una seqüència de RNA sintetitzat a partir d'una reacció de retro-transcripció
CSF:	<i>Colony Stimulating Factors</i>
Ct:	<i>Cycle number at the threshold</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO:	Dimetilsulfòxid
DNA:	Acrònim en anglès d'àcid desoxirribonucleic
DTT:	Ditiotreitòl. Agent reductor i antioxidant, capaç de trencar els ponts disulfur
et al.:	Llatíisme abreviat que significa: i col·laboradors
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GM-CSF:	<i>Granulocyte-macrophage CSF</i>
HAT:	<i>Heteromeric Amino acid Transporter</i>
IL1:	Interleucina 1
IL4:	Interleucina 4
IL13:	Interleucina 13
INF $\gamma$ :	Interferó- $\gamma$
iNOS:	Òxid nítric sintasa induïble
kDa:	Kilodalton
KO:	<i>Knockout</i>
LAT1:	<i>L-type Amino acid Transporter-1</i>
LAT2:	<i>L-type Amino acid Transporter-2</i>
LPI:	Lisinúria amb Intolerància a Proteïnes
LPS:	Lipopolisacàrid
M-CSF:	<i>Macrophage-CSF</i>
NO:	Òxid nítric
NO <sub>2</sub> :	Nitrit
PAP:	Proteïnosis alveolar pulmonar
PBS:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T:	PBS amb tween al 0,1%
PCR:	<i>Polimerase chain reaction</i>
rBAT:	<i>Related to b<sup>o+</sup> Amino acid Transporter</i>
RNA:	Acrònim en anglès d'àcid ribonucleic
SDS-PAGE:	<i>Sodium dodecyl sulphate-poliacrilamide gel electroforesis</i>
SLC7A(x):	<i>Solute Carrier Family 7, gene (x)</i>
TEMED:	<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.</i>
T <sub>H</sub> :	<i>T Helper</i>
TLR:	Receptors tipus <i>Toll</i>
TNF $\alpha$ :	Factor de necrosi tumoral $\alpha$
y+ LAT:	<i>System y+ L Amino acid Transporter.</i>

## *Introducció*

Els aminoàcids són elements essencials pel nostre organisme, ja que tenen una gran varietat de funcions en el metabolisme, entre elles podem trobar la construcció de proteïnes, com a combustible per les nostres cèl·lules i precursors de molts metabòlits. Aquestes molècules orgàniques s'ingereixen mitjançant les proteïnes, que un cop ingerides mitjançant la dieta es degraden trencant els enllaços peptídics i donant lloc als aminoàcids, que seran eficientment absorbits pels enteròcits del intestí prim (Bröer, 2008). Però com passen aquestes molècules del sistema digestiu a ser substrats per les reaccions metabòliques? Gràcies als transportadors.

Les membranes cel·lulars es troben presents en totes les formes de vida possibles, formades per una bicapa lipídica semipermeable que manté els continguts de la cèl·lula junts. Però darrera la seva aparent simplicitat rau una gran complexitat funcional (Hart, 2010). L'estructura permet intercanviar de forma passiva ions, polímers i molècules petites entre les cèl·lules i el seu entorn. Tot i això, les membranes més evolucionades, més complexes, contenen proteïnes hidrofòbiques que realitzen un transport específic, permeten així l'intercanvi d'altres tipus de molècules amb diverses funcions. L'especialització d'aquestes proteïnes de membrana ha sigut tan gran que actualment el 30% total de les proteïnes eucariòtiques són proteïnes de membrana (Krogh, Larsson, von Heijne, & Sonnhammer, 2001).

Aquest transport facilitat a través de proteïnes de membranes comprèn diversos sistemes, que poden ser dependents de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$  o no. Avui en dia, aquestes proteïnes, anomenades transportadors, es classifiquen en funció de l'activitat del transport i del tipus de molècula que desplacen entre d'altres.

## 1. Transportadors d'aminoàcids

Com ja s'ha comentat abans, els pèptids i aminoàcids resultants de la digestió són absorbits pels enteròcits, i posteriorment alliberats al torrent sanguini, el que dona lloc a dos localitzacions possibles dels transportadors, a la membrana apical o basolateral de les cèl·lules epitelials.

Sistema de transport	SLC	Acrònim	Substrat/s	Malaltia
ASC	SLC1A4	ASCT1	A, S, C	Creixement tumoral
	SLC1A5	ASCT2	A, S, C, T, Q	
asc	SLC7A10	Asc-1/4F2hc	A, S, C, T, G	Cistinúria
	SLC7A12	Asc-2	A, S, C, T, G	
$\text{b}^{0,+}$	SLC7A9	$\text{b}^{0,+}$ AT/rBAT		Cistinúria
	SLC6A15	$\text{B}^0$ AT2	P, L, V, I, M	
$\text{B}^0$	SLC6A17	NTT4/ $\text{B}^0$ AT3	L, M, P, C, A, Q, S, H, G	Obesitat?
	SLC6A19	$\text{B}^0$ AT1	Tots els aminoàcids neutres	
$\text{B}^{0,+}$	SLC6A14	ATB $^{0,+}$	Tots els aminoàcids catiónics i neutres	Obesitat?
Gly	SLC6A5	GlyT2	G	Hiperekplexia
	SLC6A9	GlyT1	G	
	SLC7A5	LAT1/4F2hc	H, M, L, I, V, F, Y, W	
L	SLC7A8	LAT2/4F2hc	Tots els aminoàcids neutres excepte la prolina	Creixement tumoral
	SLC43A1	LAT3	L, I, M, F, V	
	SLC43A2	LAT4	L, I, M, F, V	
T	SLC16A10	TAT1	F, Y, T	Creixement tumoral
	SLC7A1	CAT-1	K, R, H	
$\text{y}^+$	SLC7A2	CAT-2	K, R, H	Lisinúria amb Intolerància a les proteïnes (LPI)
	SLC7A3	CAT-3	K, R, H	
	SLC7A6	$\text{y}^+$ LAT2/4F2hc	K, R, H, G, M, L	
$\text{y}^+\text{L}$	SLC7A7	$\text{y}^+$ LAT1/4F2hc	K, R, H, G, M, L, C	Lisinúria amb Intolerància a les proteïnes (LPI)

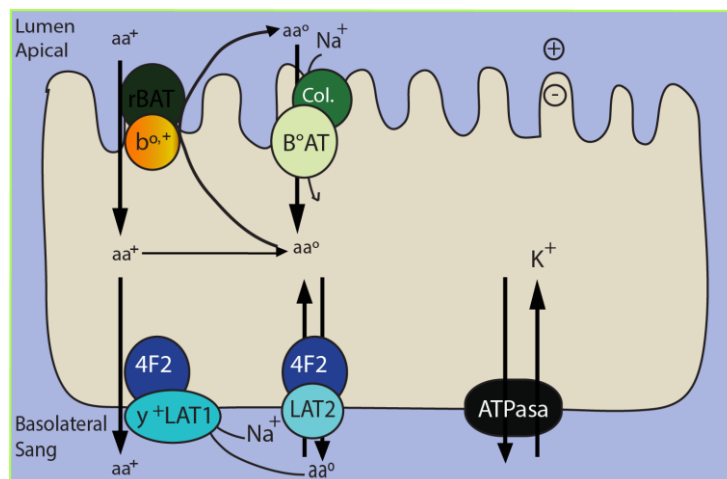
Taula 1.1. Sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers. Adaptada i actualitzada de (Bröer & Palacín, 2011)

Diferents estudis (Christensen, 1984) van demostrar que els transportadors s'especialitzen en grups d'aminoàcids en comptes d'aminoàcids individuals (Taula 1.1). A partir d'aquí es va establir una classificació dels transportadors en funció dels grups d'aminoàcids que eren capaços de transportar:

- 1) Sistema neutre, per aminoàcids neutres.
- 2) Sistema bàsic, per aminoàcids catiònics i cisteïna.
- 3) Sistema àcid, per aminoàcids amb propietats àcides.
- 4) Sistema iminoglicina, pel transport de prolina, hidroxiprolina i glicina.
- 5) Sistema per  $\beta$ -aminoàcids i taurina.

### 1.1 Transportadors catiònics

Dins dels transportadors catiònics és pot fer una subfamília en funció del nombre de cadenes proteiques que formen el transportador. Segons aquest criteri, els sistemes  $y^+$  i  $B^{0,+}$  són proteïnes monomèriques, mentre que els sistemes  $y^+L$  i  $b^{0,+}$  tenen una estructura heterodimèrica<sup>1</sup>. Aquests transportadors estan compostos per una subunitat pesada i una subunitat lleugera units mitjançant un enllaç disulfur (Palacín & Kanai, 2004). Les cadenes pesades són glicoproteïnes de tipus II i les cadenes lleugeres són proteïnes de membrana proteolítiques formades per 12 segments transmembrana, aquesta última actua com a subunitat catalítica del transportador. Actualment es coneixen dos cadenes pesades rBAT i 4F2hc, que es localitzen a la membrana apical i a la cara basolateral de les cèl·lules epitelials respectivament. (Bertran et al., 1992; Furriols et al., 1993). 4F2hc pot interactuar amb: LAT1, LAT2,  $y^+LAT1$ ,  $y^+LAT2$ , asc1 i xCT mentre que rBAT només interactua amb  $b^{0,+}AT$  o AGT1. Aquests transportadors és localitzen principalment a l'epiteli intestinal i al renal; mutacions en aquests transportadors poden donar lloc a malalties hereditàries.



**Figura 1.1.1 Esquema dels transportadors d'aminoàcids.** Flux d'aminoàcids a través del epitel·li.  $aa^{\circ}$ : neutres,  $aa^{+}$ . A la cara basolateral és pot veure l'heterodímer 4F2 amb LAT2, 4F2 amb  $y^+LAT1$ , i l'ATPasa. A la cara apical és pot veure l'heterodímer  $b^{0,+}$  amb rBAT i  $B^{\circ}AT$  amb col·lectrina. (Adaptada de (Palacín, 2005)).

<sup>1</sup> Estructura heterodimèrica: *HAT*, heterodimeric amino acid transporters

### 1.1.1 $y^+$ LAT1 (SLC7A7)

Transportador format per una cadena lleugera,  $y^+$ LAT1 (GenBank RefSeq: NP\_003973), lligada mitjançant un enllaç disulfur a una cadena pesada, 4F2hc (GenBank RefSeq: NP\_002394), amb un pes molecular de 135 kDa (Palacin, 2005). És un transportador que intercanvia obligatòriament aminoàcids bàsics per aminoàcids neutres amb  $Na^+$  i que es localitza a la membrana basolateral (Figura 1.1.1), participant així en la reabsorció renal i l'absorció intestinal d'aminoàcids bàsics (arginina, lisina i ornitina). (Torrens et al., 1999)

Un cop les proteïnes són ingerides aquestes són degradades i transportades per ser absorbides per l'intestí i reabsorbides pel ronyó. Aquests epitelis estan formats per cèl·lules polaritzades amb proteïnes distribuïdes al llarg de les membranes d'ambdós cares, tan apical com basolateral. Poden realitzar un transport tan a favor com en contra del gradient electroquímic fent possible així el transport de molècules des de el lumen fins a l'espai extracel·lular.

Existeixen diferents tipus de malalties hereditàries relacionades amb el transport d'aminoàcids catiònics a través de la membrana, com la cistinúria, aminoacidúria autosòmica hiperdibàsica de tipus 1 i per últim mutacions en el transportador  $y^+$ LAT1 que s'expressa principalment a l'intestí, ronyó i en menor grau al pulmó, placenta i macròfags, causen una malaltia autosòmica i recessiva anomenada Lisinúria amb Intolerància a Proteïnes (LPI) (Torrens et al., 1998)

## 2. Lisinúria amb Intolerància a Proteïnes (LPI)

La Lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI; OMIM 222700) és una autosòmica recessiva degut a mutacions en el gen SLC7A7. És una malaltia que ha sigut descrita arreu del món, tot i així, la població Finlandesa mostra una prevalença més alta (1/60000) (Ogier de Baulny, Schiff, & Dionisi-Vici, 2012; Sebastio, Sperandio, & Andria, 2011). Els defectes és produeixen a la subunitat lleugera del transportador localitzat a la membrana basolateral de ronyó, melsa, pulmó, intestí i en macròfags i monòcits circulants, donant lloc a una aminoacidúria hiperdibàsica juntament amb intolerància a les proteïnes.

La simptomologia associada és molt variada, però les més comuns són: excreció d'aminoàcids catiònics a l'orina (arginina, ornitina i lisina) però nivells baixos d'aquests aminoàcids en plasma, vòmits i nàusees després de la ingestió de dietes riques en proteïnes, desenvolupament tardí, hepatosplenomegàlia, osteoporosi, afecció pulmonar, alopecia, insuficiència renal i caquèxia (Taula 1.2.1).

La desorganització metabòlica també està relacionada amb la des-regularització del cicle de la urea degut a nivells baixos en plasma de arginina i ornitina, substrats del cicle. Això provoca hiperamonèmia després de la ingesta de dietes riques en proteïna i incrementa l'àcid oròtic en orina. Posteriorment es va descriure l'únic tractament conegut que consta d'una dieta baixa en proteïnes i l'administració de citrul·lina, que millorava la qualitat de vida dels pacients afectats, ja que la citrul·lina és un precursor d'arginina i ornitina (Lukkarinen, Nántö-Salonen, Pulkki, Aalto, & Simell, 2003)

Una de les majors complicacions de la LPI és una variant de la Proteïnosis Pulmonar Alveolar (PAP), on els espais alveolars estan plens d'un material lipoproteïnós a causa de l'eliminació alterada de surfactants per part dels macròfags alveolars residents.

### Característiques comuns de la Lisinuria amb intolerància a les proteïnes

Creixement	Pes Altura	Retràs en el desenvolupament
Respiratori	Pulmó	PAP (Proteinosis Alveolar)
Abdominal	Fetge Melsa Ronyó Intestí	Hepatosplenomegàlia Vòmits Diarrea
Òssia		Osteoporosis Tendència a fractures
Muscular		Debilitat muscular Atrofia muscular
Hematològic		Activació dels macròfags Nivells baixos d'arginina i ornitina en plasma

Taula 1.2.1 Característiques comuns de la Lisinuria amb Intolerància a les proteïnes.(Sebastio et al., 2011)

Un important factor del fenotip és l'arginina. Aquest aminoàcid essencial, apart de participar en el cicle de la urea i altres processos de biosíntesis, és el únic precursor d'òxid nítric (NO).

Els macròfags tenen un paper important en la regulació de la immunitat innata i l'adquirida, gràcies a la secreció de citocines, factors de necrosis tumoral entre d'altres. S'ha observat que els macròfags activats també sintetitzen òxid nítric (NO). Després de diferents estudis s'ha observat que els nivells de NO<sup>-3</sup> en plasma són mes elevats en pacients LPI, i la producció de òxid nítric per macròfags activats requereix de la ingesta d'arginina extracel·lular. (Ogier de Baulny et al., 2012)

El comportament natural de la malaltia pot ser molt variat, i no és correlaciona amb la naturalesa de les mutacions, per tant, la gran amplitud de fenotips fa que sigui una malaltia difícil de tractar.

### **3. Els macròfags**

Els macròfags són cèl·lules hematopoètiques que formen part del sistema fagocític mononuclear i s'expressen en tots els teixits, tenen l'habilitat de colonitzar tots els ambients i realitzar diferents funcions immunològiques, entre les quals podem destacar:

1. Ingerir i eliminar microbis, on s'inclou la generació d'espècies reactives de l'oxigen i del nitrogen que són tòxiques pels microbis.
2. Ingerir cèl·lules danyades o mortes, procés antiinflamatori que permet netejar i reparar el teixit danyat.

Les diferents subpoblacions de macròfags difereixen en grandària, granularitat citoplasmàtica, morfologia i en l'expressió de molècules de superfície, com ara molècules d'adhesió i receptors.

Els macròfags en estat basal és poden trobar proliferant, o bé s'activen deixant així de proliferar i comencen a realitzar les seves funcions específiques. Si aquestes cèl·lules no reben estímuls de proliferació o d'activació només poden romandre en repòs durant un període curt de temps, després moren per apoptosis (Celada & Nathan, 1994).

Totes les cèl·lules hematopoètiques tenen un origen comú a la medul·la òssia. Allà podem trobar cèl·lules mare hematopoètiques pluripotents que gràcies a diferents estímuls poden donar lloc a cèl·lules del sistema fagocític mononuclear. La proliferació i maduració dels precursors residents al moll d'ós són estimulats per citocines, la majoria d'aquestes s'anomenen factors estimuladors de colònies (CSF, colony-



stimulating factors) perquè originàriament es va comprovar la seva habilitat per estimular el creixement i desenvolupament en colònies d'eritròcits provinents del moll d'ós.

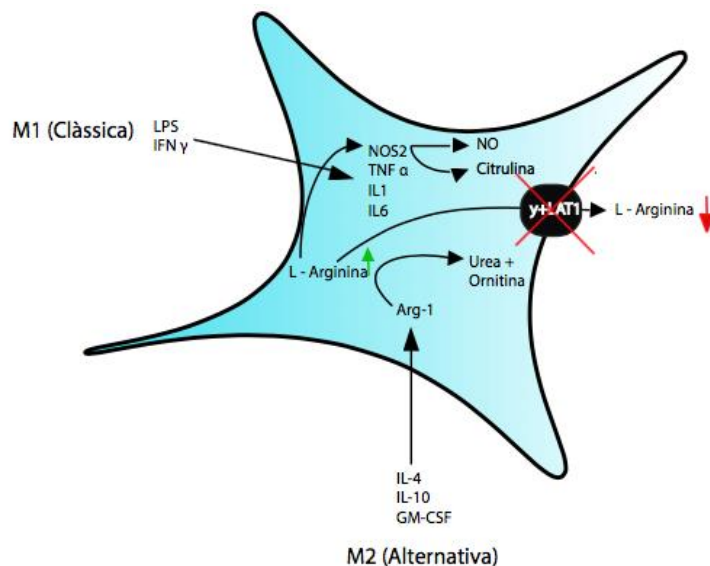
Un cop les citocines són alliberades els progenitors comencen a diferenciar-se a monòcits, que abandonen el moll d'os per entrar a la circulació sanguínia i arribar als teixits, on acabaran de madurar a cèl·lules dendrítiques o macròfags.

Dins dels diferents factors estimuladors podem trobar el GM-CSF (granulocyte-macrophage CSF) i IL4 que donen lloc a granulòcits i el M-CSF (macrophage CSF) induïx la proliferació dels monòcits a macròfags. El M-CSF és produït principalment per cèl·lules del sistema fagocític mononuclear, cèl·lules endotelials i fibroblasts.

Tot-hi que aquests macròfags comparteixen el mateix origen, la seva funció depèn del teixit on residiran, per exemple: a la melsa és troben colonitzant la polpa vermella i realitzen al funció de fagocitació d'eritròcits vells, en llocs d'infecció emeten uns pseudòpodes que recobreixen els microorganismes i els ingereixen per poder ser eliminats.

Després de la diferenciació i proliferació, els macròfags poden dur a terme una sèrie de funcions basals, però no és fins que són activats per una sèrie d'estímuls que donen lloc a macròfags efectors. L'activació és el procés pel qual el macròfag pateix modificacions bioquímiques, morfològiques i funcionals que li donen la capacitat per dur a terme funcions complexes, i està condicionat pel medi extracel·lular en el que resideix la cèl·lula.

El procés pot seguir dos camins diferents en funció de a quines citocines responguin, les que vinguin dels limfòcits  $T_H1$  donen lloc a un fenotip inflamatori, i les que responguin a les citocines provinents de  $T_H2$  adquiriran un fenotip antiinflamatori (Goerdts et al., 1999; Mills et al., 2000). Aquestes dues vies es coneixen més comunament com via clàssica i via alternativa, respectivament (Fig. 1.3.1). Es tracta de dues vies amb elevada heterogeneïtat fenotípica amb activitats funcionals diferents que s'han considerat oposades.



**Figura 1.3.1. Vies d'activació del macròfag:** És pot veure les dues vies d'activació dels macròfags. La via M1 dóna lloc a l'augment d'expressió de  $TNF\alpha$ , NOS2, IL1 i IL6. NOS2 utilitza L-arginina com a substrat per produir Citrulina i NO. La via M2 dóna lloc a l'augment d'expressió de l'Arg-1 que utilitza L-arginina com a substrat per degradar-la i produir urea i ornitina. Hipotetitzem que la depleció del transportador catiónic  $y^+LAT1$  produeix un augment de la concentració d'arginina intracel·lular, i una disminució de la concentració d'arginina extracel·lular.

### 3.1 Activació dels Macròfags

Els macròfags porten associat un seguit de molècules que són capaces de detectar i respondre als diferents estímuls, com ara els TLR, que es tracta d'alteracions exògenes, les lectines i receptors de citocines. L'acció conjunta d'aquestes molècules dona lloc a l'activació dels macròfags, ja sigui per la via clàssica o la via alternativa.

#### 3.1.1 Via clàssica

Els macròfags activats per la via M1 són induïts per l'interferó gamma i LPS, o citocines com el GM-CSF que porta associat la generació de IL12, IL13 entre d'altres. Aquestes molècules tenen accions pro-inflamatòries ja que alliberen TNF $\alpha$ , IL1, IL6 i estan relacionades amb l'activitat antimicrobiana (Gordon, 2003). La via clàssica també dóna lloc a l'augment d'expressió de l'enzim iNOS (Òxid Nítric Sintasa Induïble) amb la conseqüent generació de NO (Òxid Nítric). El NO conjuntament amb els enzims lisosomals permet als macròfags digerir el material intracel·lular ingerit, com ara els patògens extracel·lulars. Tot i ser altament efectives contra intrusions microbianes aquestes substàncies podrien tenir un efecte devastador al teixit. S'ha postulat que un defecte en el transport d'arginina dels pacients afectats amb LPI podria alterar al seu metabolisme i alterar la producció de NO, promovent una inflamació crònica que afavoreix el desenvolupament de PAP (DW, TERRITO, TN, & MJ, 1976)

#### 3.1.2 Via alternativa

Els macròfags activats per la via M2 gràcies a la presència de IL4 i IL10 produeixen macròfags amb tres fenotips diferents: M2a, M2b, M2c i estan relacionats en la resposta antiinflamatòria i la reparació del teixit. L'activació per via alternativa dóna lloc a la inhibició de l'enzim iNOS i una activació de l'Arg-1 (Bronte & Zanovello, 2005), aquesta contribueix a la síntesi de prolines i poliamines que afavoreixen el creixement cel·lular i la reparació dels teixits (Hesse et al., 2001).

### 3.2 Metabolisme de l'arginina al macròfag

Les proteïnes provinents de la dieta són la principal font d'arginina per l'organisme, però també pot ser sintetitzada gràcies a la citrul·lina mitjançant l'enzim argininosuccinat sintasa (ASS) i l'argininosuccinat liasa (ASL). Aquest procés pot ser induït per la NOS2, que promourà la producció de citrul·lina que podrà ser utilitzada en el cicle citrul·lina - NO (Wu & Morris Jr., 1998) per reciclar i recuperar l'arginina.

La regulació dels gens involucrats en el metabolisme de l'arginina en resposta a les citocines que promouen l'activació dels macròfags per via M1 o M2 participen en la regulació dels processos inflamatoris (Satriano, 2004).

Com ja s'ha comentat, la L-arginina és substrat dels enzims productors d'òxid nítric, NOS (òxid nítric sintasa). La família està composta per tres membres; NOS1 i NOS3 que produeixen NO de forma intermitent, i NOS2 que augmenta la seva expressió en resposta a determinades citocines produint un augment de la concentració de NO. En presència d'oxigen i a través de diferents intermediaris la NOS2 utilitza la L-arginina com a substrat per produir NO i citrul·lina. L'activador més comú de la seva expressió és el LPS o l'INF- $\gamma$ . La combinació d'aquests dos estimuladors té un efecte sinèrgic augmentant l'expressió (Nathan & Xie, 1994). Mentre que la presència de LPS produeix una regulació positiva del enzim, la manca

de L-arginina produeix l'efecte contrari regulant negativament la traducció del RNA missatger de la NOS2 (Lee, Ryu, Ferrante, Morris Jr., & Ratan, 2003).

Per altra banda, quan la via activada és l'alternativa, els nivells d'Arg-1 augmenten. Aquest enzim hidrolitza la L-arginina a L-ornitina i urea. L'ornitina s'utilitza com a precursors per la síntesi de poliaminas i de prolins, molècules que intervenen en el creixement cel·lular i la producció de col·lagen (Wu & Morris Jr., 1998). La IL4 i la IL10 promouen l'activació de l'Arg-1 i supprimeixen l'activitat tan a nivell transcripcional com traduccional de la NOS2.

### 3.3 Metabolisme del ferro al macròfag

El ferro és un metall que degut a la seva habilitat per intercanviar electrons amb una gran varietat de molècules és essencial per la vida. En els mamífers, el ferro és troba principalment en forma d'hemo, incorporat dins d'un anell de protoporfirina actuant com a grup prostètic. Gràcies a la seva abundància, el ferro s'utilitza per donar suport a la cadena de transport d'electrons per la producció d'ATP. Tot i això, l'intercanvi d'electrons entre el ferro i l'O<sub>2</sub> ha d'estar altament regulat, ja que la producció excessiva d'espècies reactives ROS, NOS o CO pot ser citotòxic i promoure l'estrès oxidatiu.

L'hemoglobina és el principal transportador del grup hemo, i per tant de ferro (Hamza & Dailey, 2012). L'alliberament del grup hemo és una amenaça ja que pot induir citotoxicitat degut al potencial del ferro. Per tant, els macròfags eritrofagocítics tenen un paper essencial en prevenir l'alliberament de l'hemoglobina per part dels eritròcits. Aquest tipus de macròfags estan especialitzats en digerir el contingut de l'hemoglobina i reciclar el ferro facilitant que és pugui tornar a sintetitzar hemo i hemoglobina.

Els macròfags eritrofagocítics deriven de monòcits originaris del moll d'ós gràcies a la resposta al factor de transcripció del hemo Spi-C (Miguel P. Soares & Hamza, 2016). Després adquireixen l'habilitat de fagocitar als eritròcits, captar el grup hemo i acumular-lo intracel·lularment. L'augment de la concentració d'aquest grup prostètic dona lloc a l'activació d'una sèrie de gens com ara, l'hemo oxigenasa 1 (HO-1), enzim responsable de catalitzar el grup hemo, alliberar el ferro i generar CO i biliverdina. El ferro produït pot ser exportat a través de la membrana via el transportador de ferro Slc40a1 (FPN-1) o bé pot ser emmagatzemat intracel·lularment gràcies a la ferritina, una proteïna multimèrica que està per dos vies. La regulació transcripcional implica l'activació del factor nuclear kappa β (NF-KB), el factor nuclear Nrf2 i el factor Bach1 (Sakamoto, Iwasaki, Sugiyama, & Tsuji, 2009).

Els enzims responsables de la síntesi d'òxid nítric (NOS) són una família d'heteroproteïnes que generen NO a partir d l'oxidació de L-arginina per donar lloc a citrul·lina (Nathan & Xie, 1994). El reconeixement del LPS per part del TLR4 combinat sinèrgicament amb INF-γ induïx l'expressió de iNOS en macròfags. Aquest fet passa essencialment a nivells transcripcionals via l'activació de la ruta NF-KB. Contràriament, l'acumulació de ferro en macròfags dóna lloc a la inhibició transcripcional de NOS2 per un mecanisme que encara no és del tot conegut (Nathan & Xie, 1994). L'òxid nítric pot actuar a través de diferents mecanismes. Intracel·lularment interactua directament amb hemo-proteïnes, com ara la citocrom c oxidasa inhibint la respiració mitocondrial però promovent la producció de ROS (Moncada & Erusalimsky, 2002).

L'acumulació intracel·lular de ROS és detectada per Keap1, un component de la cadena d'ubiquitinació que té com a principal funció ubiquitar el factor de transcripció Nrf2 induïnt la seva degradació proteolítica (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). Per altra banda, l'acumulació de ferro reprimeix

l'expressió de Keap1 i activa Nrf2, que promou la transcripció de gens involucrats en el metabolisme del ferro com ara HO1 (Alam et al., 1999), Slc40a1 (Marro et al., 2010) entre d'altres. L'activació de Nrf2 també pot ser deguda a la interacció entre els receptors de reconeixement de patrons (PRR) i el TLR4, que també indueix indirectament NOS2 i augmenta la concentració de NO, que recíprocament inhibirà l'expressió de NOS2 i la consegüent producció de NO. Nrf2 competeix amb Bach1 per unir-se a les regions ARE (*Antioxidant responsive elements*) del DNA, regió promotora de HO1, Slc40a1 entre d'altres (Sun et al., 2004). Amb presència d'hemo, aquest grup s'uneix a Bach1, marcant-lo i dirigint-lo per ser ubiquitinat i seguidament degradat, per tant donant lloc a l'activació de HO1 que degradarà el grup hemo, i activant la transcripció de FPN1 per tal de que el ferro intracel·lular pugi ser alliberat. Aquest seguit d'accions també produiran la repressió de NOS2, la concentració intracel·lular de RNS<sup>2</sup> baixarà i llavors Nrf2 s'activarà donant lloc a una amplificació del cicle.

Per altra banda, la hipòxia, disminució de la pressió d'O<sub>2</sub> per sota del límit establert, és detectat per un enzim que també actua en resposta al ferro, la prolil hidroxilasa (PHD)2 (Semenza, 2012) aquest gen controla l'activació del factor d'inducció d'hipòxia (HIF1). Estudis recents (Chin et al., 2007) han demostrat que els receptors que reconeixen patrons també poden activar HIF1 via la inducció de TNF, que aquest sinèrgicament activarà NF-κB i seguidament la transcripció de la ferritina augmentarà, produint així una molècula capaç de retenir el ferro intracel·lularment i evitant la seva alliberació al medi extracel·lular, limitant el seu ús per part dels microorganismes. La producció de NO també està relacionada amb l'augment de ferro intracel·lular, ja que s'ha demostrat que NO pot actuar de formes semblants al CO, activar NF-κB i induir la transcripció de la ferritina (Chin et al., 2007).

Per tant, l'hemoglobina extracel·lular actua sinèrgicament unint-se a LPS per induir la producció de citocines i activant un fenotip pro-inflamatori en macròfags residents en teixits específics. El LPS promou l'augment en la concentració de ROS i RNS, induint l'expressió de HO1, HIF1 i ferritina, que degradaran el hemo, induiran el factor d'hipòxia, que promourà la transcripció de la ferritina i emmagatzemarà el ferro intercel·lularment, respectivament. (Zuckerbraun et al., 2007).

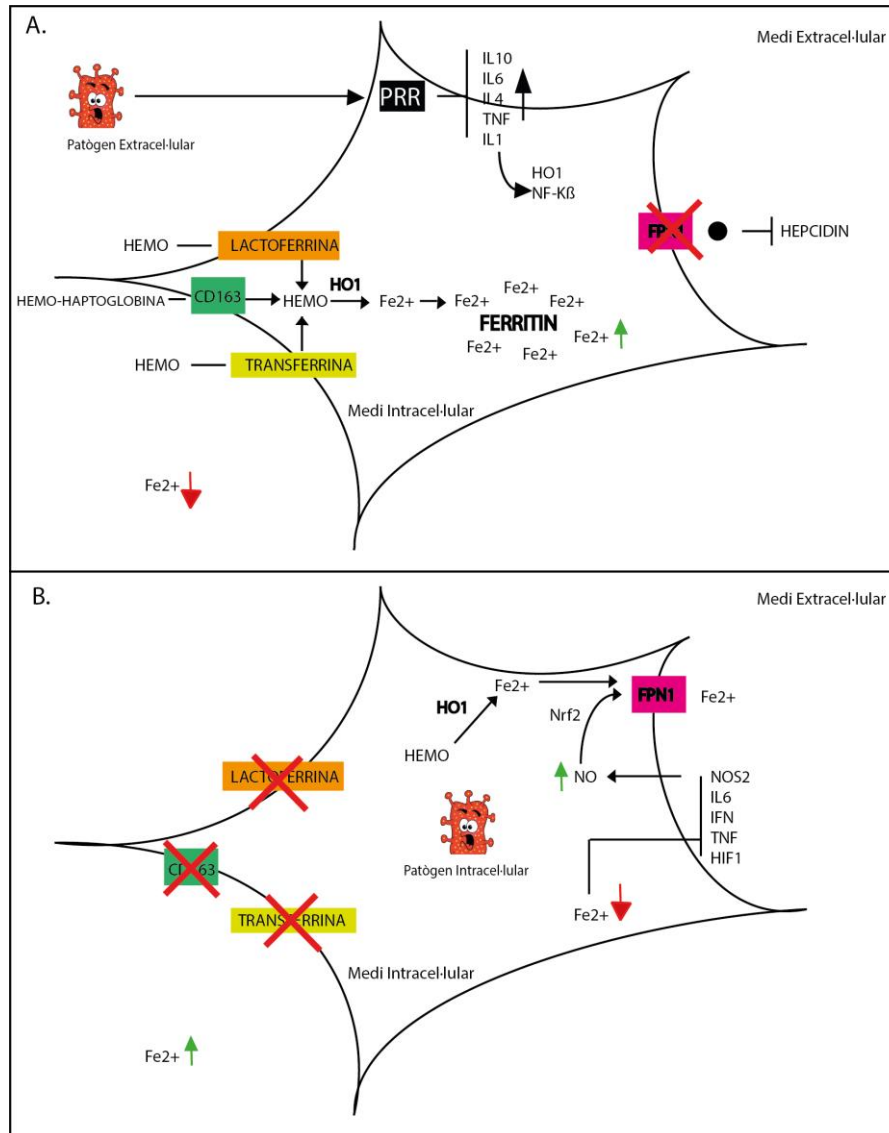
### 3.3.1 Metabolisme del ferro en macròfags durant infecció microbiana

Degut a les diferents vies d'acció dels patògens, la cèl·lula ha evolucionat per tal de poder protegir-se i enfrontar-se a diferents situacions d'estrès immunològic. La majoria de respostes microbicides dels macròfags residents estan associades amb la modulació del metabolisme del ferro, produint una re-organització del metabolisme dels macròfags (M. P. Soares & Weiss, 2015).

Els macròfags tenen l'habilitat de re-organitzar-se per tal de restringir l'accés de hemo-ferro als patògens (M. P. Soares & Weiss, 2015). Aquesta estratègia defensiva varia en funció si es tracta d'un patògen intracel·lular o extracel·lular (Fig.1.3.3.1).

---

<sup>2</sup> RNS: espècies reactives del nitrogen.



**Figura 1.3.3.1. Metabolisme del ferro en infeccions microbianes.** (A) El mecanisme de resistència dels macròfags en contra dels patògens extracel·lulars inclou la reducció de ferro circulant (M. P. Soares & Weiss, 2015). Aquest fet comporta la inhibició del transportador de ferro FPN1, augment de l'import de ferro a través de receptors específics. Entre aquests trobem; el receptor CD163 que s'uneix i internalitza el complex hemo - haptoglobina, per degradar posteriorment el grup hemo mitjançant l'HO1, la lactoferrina i la transferrina. Sinèrgicament amb l'acció protectora contra els patògens extracel·lulars l'alliberació de citocines pro-inflamatòries, IL6, IL1 indueix la secreció d'hepcidina, un pèptid encarregat d'unir-se a FPN1 i promoure la seva degradació. (B) Les infeccions per patògens intracel·lulars dona lloc a una reducció del ferro intracel·lular. Els mecanismes inclouen la reducció de l'import de ferro per part de la transferrina. L'activació de NOS2 indueix l'augment de la concentració de NO intercel·lularment; aquest actua induint la transcripció de Nrf2, que inclou l'expressió de FPN1 i la conseqüent reducció de ferro intracel·lular.

*Objectius*

### **Antecedents:**

Les malalties rares són malalties genètiques amb molt baixa prevalença, i els estudis relacionats amb aquestes no es poden comparar amb els estudis que tracten malalties com el càncer, diabetis, malalties neurològiques entre d'altres. Des de fa uns quants anys el nostre grup a invertit esforços i, a contribuït a la clonació de diferents transportadors d'aminoàcids, entre ells, Slc7a7, el gen causant de la malaltia LPI. Diferents estudis han mostrat que les mutacions al transportador y<sup>+</sup>LAT1 donen lloc a una gran varietat de fenotips, entre les quals cal destacar l'augment de NO en plasma, la disminució de la concentració d'aminoàcids catiónics en sang, i l'acumulació de ferro a l'interior dels macròfags (Sebastio et al., 2011). Arrel de les observacions s'ha realitzat diverses hipòtesis sobre el mecanisme molecular de la malaltia. Els diferents indicis indiquen que, segurament degut a l'acumulació d'arginina intracel·lular és produeix un desequilibri metabòlic que indueix l'activitat d'una sèrie de gens, com podrien ser la iNOS i TNF, que activen la via de senyalització NF-κB. Aquesta activa la HIF-1 que sinèrgicament indueix la transcripció de la ferritina i promou l'acumulació de ferro intracel·lular. Per altra banda, s'ha demostrat que el LPS indueix la IL-6, una citocina que activa l'expressió de l'hepcidina, un pèptid que s'encarrega d'unir-se a FPN1 i degradar-lo, evitant així que el ferro pugui ser exportat al medi extracel·lular (M. P. Soares & Weiss, 2015). També s'ha vist que l'acumulació d'arginina intercel·lularment produeix un augment en la concentració de NO.

### **Objectius:**

Per tant, l'objectiu d'aquest treball de fi de grau era:

1. Generar i caracteritzar alteracions en BMDM (*Bone Marrow Derived Macrophages*) afectats amb LPI.
2. Identificar i verificar els gens implicats en la senyalització dels macròfags via M1, producció de NO i metabolisme del ferro en macròfags LPI.
3. Valorar la recuperació del fenotip amb citrul·lina.

## *Materials i mètodes*



## 1. CULTIUS CEL·LULARS

Els cultius cel·lulars engloben un conjunt de tècniques i manipulacions que s'han de realitzar en les condicions apropiades per evitar contaminacions. Per tant, s'ha de treballar en un ambient estèril lliure de patògens. S'ha treballat amb campana de flux laminar que, en cada ocasió, s'ha inicialitzat la campana amb una exposició al llum UV durant un període de 10', i per tal d'assegurar que el material de treball també fos estèril, durant el període d'exposició de la campana a l'UV s'hi ha afegit el material prèviament autoclavat. Seguidament s'ha netejat la campana amb etanol al 70%. Per mantenir les condicions de esterilitat dels medis, material etc.. cal obrir i tancar el material dins de la campana. Les restes biològiques es tracten amb lleixiu al 20%. Un cop finalitzada la feina dins la campana es torna a netejar amb etanol al 70% i s'apaga.

Els medis de cultiu es guarden a 4°C, abans d'utilitzar-los, s'han d'atemperar a 37°C. Els suplementes són substàncies que s'afegeixen als medis per complementar-los, dins d'aquest grup s'inclouen els antibiòtics, aminoàcids i sèrums. El sèrum utilitzat es el *Fetal Bovine Serum* (FBS). Els suplementes també han de ser prèviament atemperats a 37°C.

Tots els cultius cel·lulars s'han mantingut en incubadors en condicions de 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO<sub>2</sub>.

Els cultius cel·lulars duts a terme en aquest treball han crescut sobre plaques no tractades. Aquest sistema juntament amb el suplement de M-CSF permet a les cèl·lules provinents del moll d'ós muri créixer, adherir-se i diferenciar-se a macròfags derivats de cèl·lules de moll d'ós.

### 1.1 Obtenció del M-CSF

El M-CSF és un suplement que indueix a la diferenciació de les cèl·lules pluripotents provinents del moll d'ós. S'obté a partir de recollir el sobrenedant de la centrifugació de les cèl·lules provinents de la línia L929 després d'haver-les incubat durant 7 dies amb DMEM suplementat amb el 10% de FBS. Les alíquotes s'han de mantenir a -20°C.

### 1.2 Derivació de cèl·lules pluripotents a macròfags

Les condicions de cultius poden variar en funció del nombre d'ossos extrets. Per un fèmur i una tibia s'utilitza una placa de 15 cm<sup>2</sup>. Les cèl·lules obtingudes es cultiven amb DMEM suplementat amb un 10% de FBS i un 30% de medi diferenciador a macròfag (M-CSF). En les cèl·lules provinents del moll d'ós s'observa un canvi de morfologia cel·lular i un augment de l'adherència de les cèl·lules a la placa. Les cèl·lules es cultiven fins a un estat subconfluent (6-7 dies), en aquest punt les cèl·lules que no fossin macròfags no s'han adherit a la placa i s'obté una població homogènia amb marcadors típics de macròfags.

Un cop obtens el cultiu subconfluent s'extreu el medi, es duen a terme dos rentats amb PBS, rascar i subcultivar. Abans d'iniciar les estimulacions, s'ha d'esperar dos hores perquè les cèl·lules es puguin assentar a la placa.

Veure annex pel protocol.

### 1.3 Congelació i descongelació

Les cèl·lules que no han pogut ser cultivades en el moment de l'aïllament del moll d'ós s'ha procedit a congelar-les. La conservació d'aquestes cèl·lules és duu a terme en congeladors a  $-80^{\circ}\text{C}$  utilitzant DMSO (dimetilsulfòxid) com a criopreservant amb FBS (sèrum fetal boví). Un cop les cèl·lules són congelades poden ser descongelades en el moment que siguin necessàries.

Veure annex pel protocol.

### 1.4 Quantificació de nitrts

El procés de detecció de nitrts serveix per mesurar l'activitat de  $\text{NOS}_2$  que dona lloc a la producció de NO aquest és un component que és genera en resposta a estímuls en cèl·lules inflamatòries. Pot formar peroxinitrit, grups tiols i en solucions aquoses s'oxida a nitrit  $\text{NO}_2^-$ . Per dur a terme la quantificació s'ha utilitzat un *kit* comercial de Promega (G2930). El sistema de reactius de Griess és basa en la reacció química que va ser descrita originalment per Griess al 1879, la reacció utilitza sulfanilamida i N-1- diclorhidrat de naftilendiamina (NED) en condicions àcides (àcid fosfòric). El límit de detecció és  $2.5\mu\text{M}$  nitrit.

Veure annex pel protocol.

### 1.5 Caracterització dels macròfags per citometria de flux

La caracterització de macròfags és un procés útil per assegurar-te de què la població que has derivat a partir de les cèl·lules pluripotents, és realment la població que desitges. Per altra banda la caracterització sumada a un procés de sorteig de cèl·lules et permet, a més a més d'assegurar-te del fenotip de la teva població, seleccionar-la i extreure-la de la mostra on és troben presents diferents tipus cel·lulars. Aquest anàlisi és pot realitzar mitjançant citometria de flux, una tècnica que és basa en la refracció dels fluorocroms utilitzats per detectar els marcadors d'interès. La mostra és impactada amb un flux d'una determinada longitud d'ona llavors la refracció dels fluorocroms és detectada i mesurada. Tots els protocols de citometria de flux és basen en els mateixos passos generals:

1. Obtenció de la mostra.
2. Bloqueig.
3. Incubació amb l'anticòs (tinció).
4. Preparació de la mostra pel flux.

Els marcadors són epítops situats a la membrana dels macròfags; no cal que siguin epítops que s'expressin, ja que alguns receptors són compartits per diferents tipus de cèl·lules, sinó que també és pot analitzar la no expressió d'un receptor. En aquest treball s'ha utilitzat els següents marcadors:

- F4/80 High amb PE
- CD11b low/negative amb APC Cy7
- VCAM-1 High amb FITC
- CD11c low amb BV786

Veure annex protocol.

## 2. TÈCNiques D'OBTENCIÓ, DETECCIÓ I MANIPULACIÓ DE RNA

El RNA és una molècula que té una alta capacitat de degradació degut a la seva sensibilitat a l'acció de les RNAses, aquest fet fa que l'extracció de RNA s'ha de realitzar acuradament. La zona de treball ha d'estar degudament netejada i el material i les solucions han de ser lliures de RNAses (*RNAse-free*).

### 2.1 Extracció de RNA mitjançant el *kit* PureLink de ThermoFisher (12183025)

Aquest *kit* permet l'extracció de RNA a partir de teixits congelats, cèl·lules en suspensió i cèl·lules cultivades, té l'avantatge respecte altres *kits* que la utilització de reactius perillosos com el fenol no és necessària. S'inicia amb una lisis de les cèl·lules utilitzant tampó de lisis que conté isocianat de guanidina conjuntament amb DTT (un agent reductor que trenca els ponts disulfur), el procés de lisis i la concentració de DTT varia en funció de la procedència de la mostra<sup>3</sup>. S'ha de tenir en compte que si les cèl·lules provenen de cultius s'han de rentar amb PBS abans d'aplicar el tampó de lisis. L'adició d'etanol afavoreix la unió del RNA a la columna.

El *kit* permet la detecció del RNA que tingui més de 200 bases. El protocol inclou un tractament de DNase utilitzant la DNase I, que digereix el DNA contaminant i ens permet obtenir un procés de purificació amb un rendiment més elevat<sup>4</sup>.

Veure annex pel protocol.

### 2.2 Electroforesis en gel d'agarosa

Els gels d'agarosa s'utilitzen per determinar la integritat del RNA extret i, ens permet saber si existeix contaminació de DNA. Els gels d'agarosa són un sistema d'electroforesis desnaturalitzant on el RNA migra en una matriu electroforètica proporcionalment a la seva mida.

Veure annex pel protocol.

Un cop s'ha avaluat la integritat del RNA, és pot procedir a la seva quantificació. La valoració s'ha realitzat mitjançant el NanoDrop ND-100, que gràcies a la tècnica espectrofotomètrica determina la concentració d'àcids nucleics utilitzant 1,5 µL.

### 2.3 Retrotranscripció

Un cop s'ha obtingut el RNA total, es pot convertir a cDNA, molècula més. Aquest procés es basa en el principi de l'ús d'un enzim que és capaç de sintetitzar cDNA utilitzant una cadena de RNA com a motlle. Quan dins la mix s'afegeixen oligonucleòtids degenerats s'obté la retrotranscripció de tot el RNA, en el cas que s'utilitzi un encebador específic podem amplificar una seqüència concreta.

En aquest treball de fi de grau s'ha utilitzat el *kit* de *Quanta Biosciences*, el *kit* s'anomena *qScript cDNA Synthesis Kit*, l'avantatge del *kit* és que dona tots els components necessaris per la síntesis del cDNA excepte la mostra de RNA. És un mètode robust i consistent on s'obté un cDNA compatible amb RT-PCR. El rendiment del *kit* és 1:1.

Veure annex pel protocol.

---

3 Mirar annex per saber la concentració de DTT adequada per cada mostra.

4 Mirar annex per concentració de la mix de DNase I.

### 3. TÈCNIQUES DE DETECCIÓ DE DNA

La manipulació de DNA és una eina útil per tal d'analitzar l'expressió gènica de les diferents mostres de cultius primaris sota diferents estímuls. El anàlisi d'expressió s'ha realitzat mitjançant la tècnica de PCR a temps real, qRT-PCR.

#### 3.1 qRT-PCR, *Real Time - Polimerase Chain Reaction*

És tracta d'un mètode que utilitza les mateixes bases que la PCR estàndard amb la diferència que aquesta permet quantificar en termes absoluts o relatius l'expressió gènica de qualsevol producte de DNA. S'utilitza un motlle de DNA, en el nostre cas és el producte de cDNA obtingut per retrotranscripció, encebadors<sup>5</sup> “forward” i “reverse” dels gens d'interès i un reactiu fluorescent que permet fer el seguiment de la reacció a temps real. Aquests reactius poden emetre fluorescència quan s'uneixen específicament a la seqüència amplificada (sonda) o quan s'intercalen en el DNA bicatenari, com el SYBR-Green.

La quantificació absoluta determina el nombre de còpies de RNA valorat utilitzant com a recta patró un DNA que conté el fragment de DNA amplificat a diferents concentracions. Per altra banda, la quantificació relativa utilitza l'expressió d'un gen constitutiu, el qual no modifica la seva expressió en les condicions experimentals, per determinar l'expressió del DNA valorat. En aquest treball de fi de grau, s'ha utilitzat la quantificació relativa utilitzant el “SYBER-Green PCR Master Mix” de “Applied Biosystems” com a reactiu fluorescent i plaques de 384 amb l'aparell *QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR* de “ThermoFisher”. La taula 3 mostra els encebadors utilitzats amb les seves seqüències corresponents. Cada mostra ha sigut normalitzada amb els nivells del gen constitutiu  $\beta$ -actina (ACTB1). Les reaccions s'han dut a terme per triplicat i els resultats han sigut analitzats segons el mètode del  $\Delta$ Ct.

Veure annex pel protocol.

### 4. TÈCNIQUES D'OBTENCIÓ, MANIPULACIÓ I DETECCIÓ DE PROTEÏNES

En funció de la localització de la nostra proteïnes d'interès es pot procedir a l'obtenció de proteïnes de dos formes diferents, o bé purificant membranes totals, com el cas de  $\gamma$ LAT1 una proteïna que s'expressa en les membranes cel·lulars, o bé obtenció de proteïnes totals

#### 4.1 Obtenció de proteïnes totals

Per obtenir les proteïnes produïdes per la cèl·lula cal llisar i permeabilitat la membrana plasmàtica i tots els seus components. En aquest treball s'ha utilitzat el tampó RIPA<sup>6</sup>. En el moment de procedir a la lisis el tampó s'ha de suplementar amb un inhibidor de proteases (INH II Cocktail) a una concentració 1:1000.

Veure annex pel protocol.

---

<sup>5</sup> La taula d'encebadors amb tota la seva relativa informació és troba a l'annex.

<sup>6</sup> Composició del tampó RIPA: NaCl 50 mM, Tritó X-100 0,5%, deoxicolat sòdic 0,5%, SDS 0,1% i Tris-HCl 50mM ajustat a pH 8.0.

## 4.2 Extracció de proteïnes de membrana

Com ja s'ha comentat, per detectar les proteïnes de membrana amb l'anticòs casolà de y<sup>+</sup>LAT1 cal enriquir la mostra. En aquest cas, el tampó utilitzat és un tampó d'homogeneïtzació<sup>7</sup> de sacarosa, suplementat amb l'inhibidor de proteases (1:1000) per evitar la degradació de les proteïnes. L'extracció de membranes pot ser directament de teixit o bé de cèl·lules cultivades.

### 4.2.1 Proteïnes de membrana totals procedents de ronyó i melsa

Tots els processos s'han de realitzar en fred per tal d'evitar la desnaturalització de les proteïnes. En el cas dels teixits cal dur a terme una disgregació i una posterior centrifugació per descartar les restes cel·lulars que no s'hagin disgregat. La precipitació de les membranes és duu a terme mitjançant la ultracentrífuga Òptima TLX amb el rotor TLA-55. Si la quantificació de proteïnes no s'ha de fer just després de l'extracció de membranes és preferible congelar el pellet en comptes de congelar el pellet re-suspès, ja que el tampó fa que les proteïnes siguin menys estables.

Veure annex pel protocol.

### 4.2.2 Proteïnes de membrana totals procedents de cultius cel·lulars

El procediment d'extracció és gairebé el mateix que l'utilitzat en l'extracció de membranes a partir de teixits, a diferència que en comptes d'utilitzar el disgregador s'utilitza un sonicador per llisar la membrana citoplasmàtica i els seus components. S'ha de tenir en compte que abans de recollir les cèl·lules s'ha de rentar el medi amb PBS i tots els processos s'han de dur a terme en fred. El tampó d'homogeneïtzació és el mateix que anteriorment.

Veure annex pel protocol.

## 4.3 Determinació de la concentració de proteïnes: mètode BCA

Aquest mètode es basa en la reacció de Biuret, on el Cu<sup>2+</sup> es redueix a Cu<sup>+</sup> quan aquest entra en contacte amb les proteïnes, el Cu<sup>+</sup> alliberat al medi alcalí reacciona amb el BCA (Àcid bicinconític) i forma un compost de color lilós. La determinació és realitzada en una placa Elisa de 96 pous amb la presència d'una recta patró realitzada amb BSA a diferents concentracions creixents (0-20 µg). Tant l'anàlisi de les mostres com la recta patró s'ha de realitzar per duplicat. La lectura de l'absorbància és a 562 nm.

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant: (Pierce BCA Protein Assay Reagent (Pierce, #23225). <http://www.pierce.com/>

## 4.4 Western Blot

És una tècnica utilitzada per la detecció d'una proteïna en concret que es troba present en una mostra. El reconeixement d'aquesta proteïna és du a terme mitjançant la unió d'un anticòs específic que reconeix la nostra proteïna d'interès. Per poder realitzar aquest procediment primer és necessari separar les proteïnes presents en la mostra, mitjançant la electroforesis SDS-PAGE, seguidament és realitza una transferència, on les proteïnes quedaran fixades en la mateixa posició en la qual és troben al gel, després és realitza una

---

<sup>7</sup> Tampó d'homogeneïtzació pH 7.4 (Camps et al., 1992): Hepes 25 mM, EDTA 4 mM, Sacarosa 250 mM

incubació amb l'anticòs primari (anticòs específic contra la nostra proteïna d'interès) i finalment incubació amb l'anticòs secundari, aquest és un anticòs comercial que està conjugat a la peroxidasa (HRP, *Horse Rabish Peroxidase*), que, en presència d'un substrat, com l'ECL (*Enhanced Chimioluminescence*), genera llum.

#### 4.4.1 Electroforesis SDS-PAGE

L'electroforesis en gel de poliacrilamida amb SDS és un dels sistemes més comunament utilitzats per la detecció de proteïnes en funció de la seva massa molecular. S'aplica el SDS en la mescla per la preparació dels gels. Aquest actua desnaturalitzant les proteïnes i, a més a més, els hi confereix per igual carga negativa a totes les proteïnes, fent que la migració de les proteïnes depengui del seu pes molecular. El fonament de la tècnica es basa en la preparació de dos gels amb diferent pH i diferent concentració d'acrilamida:

- Gel concentrador: on les proteïnes es mouen ràpidament gràcies a la mida gran del porus, així es crea un únic front quan les proteïnes entren al gel separador.
- Gel separador: on les proteïnes es mouran més lentament i es separaran en funció del seu pes molecular.

En aquest treball de fi de grau, tots els gels separadors s'han realitzat al 10% d'acrilamida, ja que permet separar proteïnes a partir de 40-50 kDa. Les mostres no han sigut analitzades en condicions reductors però s'han incubat a 90°C durant 5 minuts.

Durant la separació de les proteïnes s'afegeixen uns patrons de pes molecular que permeten calcular aproximadament el pes de les bandes observades un cop es revela el gel.

Veure annex pel protocol.

#### 4.4.2 Transferència

S'utilitza una membrana que pot ser de nitrocel·lulosa o bé de PVDF. S'ha de tenir molta cura de no tocar-la amb les mans, per això sempre treballar amb pinces. La membrana perquè sigui útil ha de ser activada amb metanol prèviament. També s'ha de tenir en compte que es tracta d'un material molt sensible i que un cop activada s'ha de trobar sempre en un ambient aquós per evitar que s'assequi. El sistema per realitzar la transferència és el anomenat "*Sandwich*", en el qual es situa un paper Whatmann (Mini-Protean TransBlot Cell, BioRad) en contacte amb cada esponja, i entre mig la membrana en contacte amb el gel.

Veure annex pel protocol.

#### 4.4.3 Immunodetecció

Un cop s'ha acabat la transferència, es desmunta el sistema, amb pinces s'agafa la membrana i es realitza un procés de bloqueig amb llet descremada per tal d'eliminar els llocs d'unió inespecífics. Després del bloqueig, es tallen les membranes en funció del nombre de proteïnes que vulguem detectar. Per exemple, tallem pel marcador de 50 kDa per separar b-actina (proteïna constitutiva) i  $\gamma$ <sup>+</sup>LAT1. Es procedeix amb la incubació del anticòs primari <sup>8</sup>que vindrà seguida de tres rentats amb PBS Tween 0.1% i finalment la incubació amb l'anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa i la seva detecció amb ECL.

Veure annex pel protocol.

---

<sup>8</sup> La taula d'anticossos primaris utilitzats és troba a l'apèndix I.

## **5. EINES ESTADÍSTIQUES**

Les diferents bases de dades s'han utilitzat per la recerca d'informació, obtenció d'articles rellevants pel treball entre d'altres.

### **5.1 Anàlisi estadístic**

L'anàlisi estadístic dels resultats obtinguts de les diferents qRT-PCR han sigut analitzats mitjançant GraphPAD Prism v4.0. Permet realitzar gràfics i els diferents anàlisis estadístics.

## *Resultats*



En el següent capítol, organitzat en 4 parts, es presenten els resultats obtinguts durant aquest treball de fi de grau.

L'efecte multi-orgànic de la LPI en els diferents pacients afectats per aquesta, ha portat el grup a voler aprofundir en la caracterització i en l'estudi de l'efecte de la depleció del transportador Slc7a7, causant del fenotip LPI (Torrents et al., 1999), en macròfags. Amb la finalitat d'analitzar tant la part metabòlica com la part immunològica de la malaltia, es va realitzar una línia de ratolins que havien eliminat l'expressió del gen  $y^+LAT1$ . El ratolí nul obtingut de la recombinació de cèl·lules ES per l'expressió del transportador no és viable (Sebastio et al., 2011) per tant la línia a sigut produïda gràcies a la tecnologia cre-Lox, amb la inserció de dos seqüències LoxP, que en resposta a la inducció amb Tamoxifè, un suplement dietètic que s'administra als ratolins després del deslletament, eliminen l'expressió del gen.

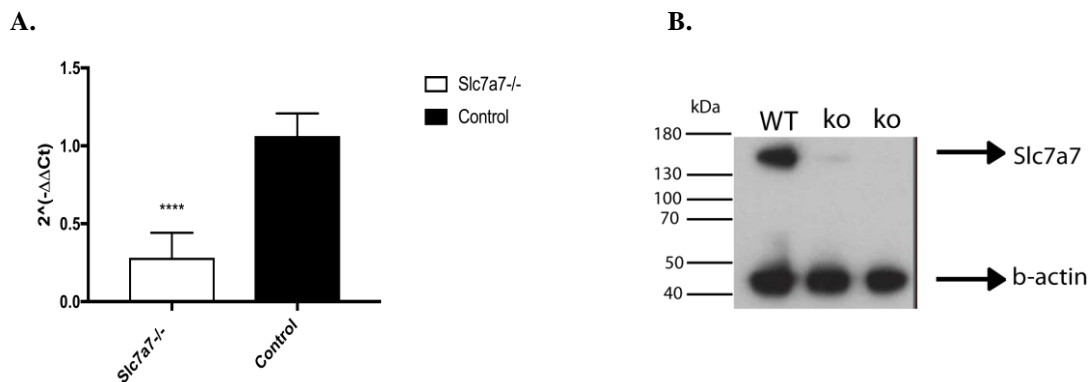
Com s'ha descrit en la introducció, un dels components més alterats en la lisinúria amb intolerància a les proteïnes (LPI) són els macròfags. Aquests pateixen una desregulació de la concentració de la concentració d'arginina i de la producció d'òxid nítric (NO). Per altra banda, també s'ha observat que aquests macròfags acumulen ferro intracel·lularment (dades no publicades), fet que es relaciona amb l'activitat de diferents receptors scavengers, transportadors de ferro i pèptids, com ara el CD163, la ferroportina (FPN1, Slc40a1) i la ferritina, respectivament.

#### 1. Validació del model LPI: eliminació de $y^+LAT1$

Per l'obtenció de les cèl·lules de moll d'ós és necessari el sacrifici de ratolins amb i sense expressió de Slc7a7. Mitjançant tècniques quirúrgiques, s'ha procedit a l'extracció de: fèmurs i túbies, , melsa, ronyó i sang. Tal i com s'ha comentat, el mètode utilitzat per l'obtenció dels ratolins Slc7a7<sup>-/-</sup> ha sigut la inducció de la depleció del gen mitjançant la inducció amb tamoxifè de la tecnologia Cre-Lox. L'efectivitat del tamoxifè no, és del 100%, per aquest motiu, seguit de l'extracció del ronyó es procedeix a una extracció de proteïnes de membranes, amb l'objectiu de realitzar un anàlisi de l'expressió de la proteïna  $y^+LAT1$  codificada pel gen Slc7a7, mitjançant Western Blot. Simultàniament, l'extracció d'ossos permet l'obtenció del moll d'ós. Com ja a sigut comentat anteriorment, el procediment de diferenciació de cèl·lules pluripotents a macròfags es duu duu a terme gràcies al cultiu de les cèl·lules en presència de M-CSF durant 7 dies. En el moment de procedir a la preparació dels cultius, també es prepara una placa de 6 pous amb 2 mL de mostra de cada animal. L'expressió de  $y^+LAT1$  és analitzada per RT al cap de 3 dies de la seva sembra.

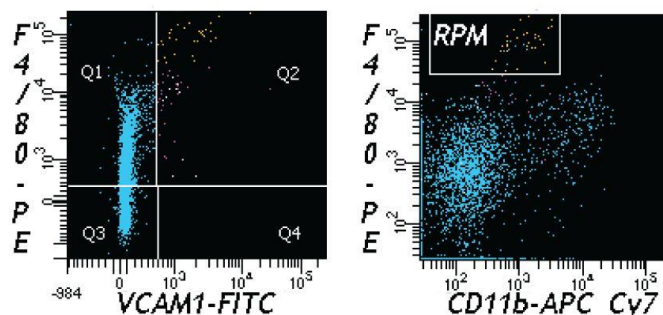
Per verificar aquestes observacions, s'ha utilitzat un encebador específic de la seqüència eliminada durant la inducció i, un anticòs específic contra la proteïna codificada pel gen Slc7a7. El resultat observat és la disminució de l'expressió gènica per part de les cèl·lules cultivades i la no expressió proteica de  $y^+LAT1$  a les membranes de ronyó (Figura 4.1.1). Aquestes observacions ens permeten concloure que  $y^+LAT1$  a sigut eliminat de ronyó i que la seva expressió gènica en macròfags de moll d'ós a disminuït fins a un 90%.

La falta d'expressió de  $y^+LAT1$  a la membrana basolateral de ronyó explica la disminució de la concentració d'aminoàcids bàsics en plasma i la des-regulació del cicle de la urea, ja que aquest transportador és la principal via de flux d'aquests aminoàcids des de la cara apical dels enteròcits fins a la sang.



**Figura 4.1.1 Abundància relativa del transportador Slc7a7 en macròfags derivats de moll d'ós i proteïna de membrana de ronyó. A:** Es va aïllar mRNA a partir de macròfags derivats de medul·la òssia cultivats durant tres dies. Aquest es va utilitzar per fer la transcripció reversa i es analitzar per PCR a temps real. Les dades corresponen a la mitjana  $\pm$  sem de 16 preparacions de cèl·lules i estan normalitzades per l'amplificació de  $\beta$ -actina. Les quantitats relatives de Slc7a7 ( $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{(CT_{\beta actin} - CT_{transportador})}$ ) es van calcular a partir dels valors de CT corregits. \*\*\*\*  $p < 0,00001$  **B:** Western Blot utilitzant un anticòs específic contra Slc7a7 (142 kDa). Les mostres corresponen a membranes aïllades de ronyó. Les dades de Western Blot han sigut normalitzades amb el senyal de  $\beta$ -actina (42 kDa), que era quasi idèntica en els diferents carrils.

També es va purificar i comprovar l'eliminació dels macròfags de polpa vermella (RPM) de la melsa, el qual representen aproximadament 1,5% de número total d'esplenòcits. Per tal de purificar els RPM vam utilitzar F4/80 amb PE, VCAM-1 amb FITC i la baixa expressió de CD11b amb APC-Cy7 i CD11c amb BV786. El patró d'expressió que observem en el diagrama correspon al patró d'expressió dels macròfags (Figura 4.1.2).



**Figura 4.1.2 Panells de citometria amb marcadors per purificar RPM.** Melsa homogeneïtzada incubada amb anticossos específics fluorescents que permet la purificació de macròfags de polpa vermella.

## 2. Efecte de LPS sobre macròfags derivats de moll d'ós.

Per tal d'estudiar el mecanisme molecular de la malaltia, vam generar un model *in vitro* de macròfags per cultiu primari. La derivació de les cèl·lules de moll d'ós a macròfags es realitza a través del M-CSF. S'ha descrit en la literatura que el M-CSF indueix als macròfags a expressar certs marcadors específics i, ha adoptar un fenotip típic de macròfag (Martín Jaular, 2006).

El LPS, és un lipopolisacàrid que actua com a principal component de la paret dels bacteris gram-negatius, i s'ha descrit que té capacitat per activar els macròfags seguint una via clàssica gràcies a l'increment en la síntesi i secreció de citocines pro-inflamatòries (Celada & Nathan, 1994).

Per verificar aquestes observacions es va procedir a la realització de cultius primaris amb macròfags

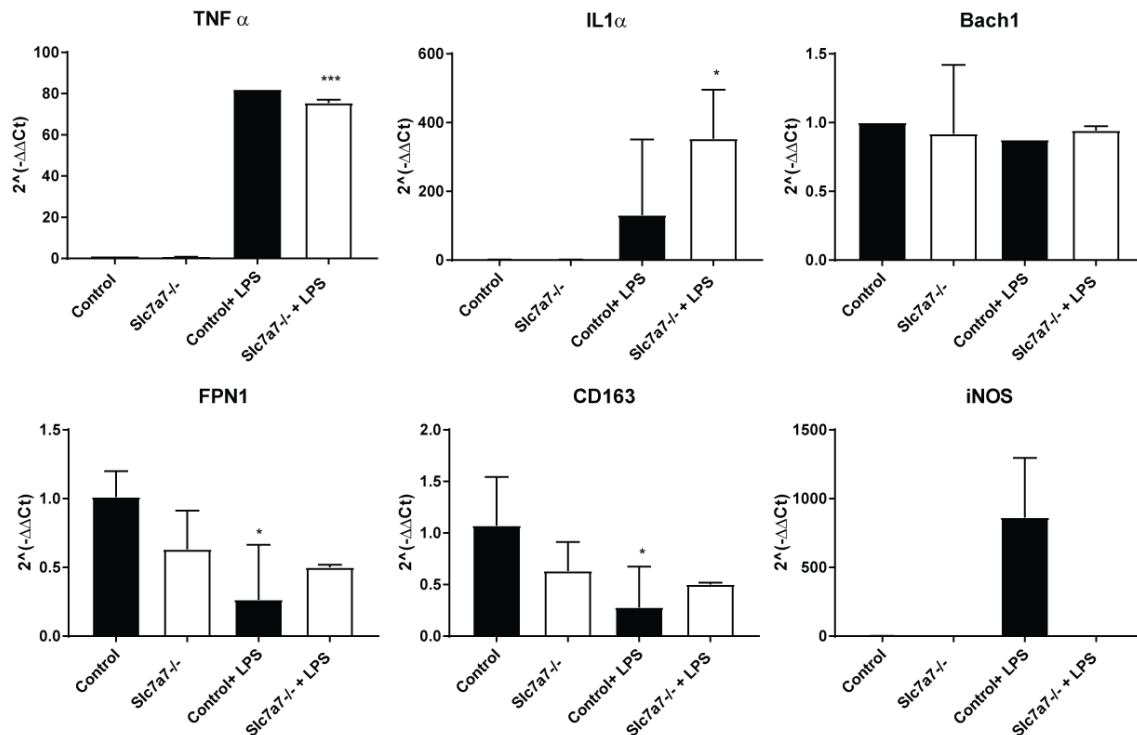
derivats de moll d'ós. Aquests van ser caracteritzats gràcies a diferents marcadors específics via citometria de flux, i posteriorment induïts sota diferents estímuls específics per l'activació via clàssica.

La derivació també es va avaluar mitjançant un seguiment del cultiu durant el període de diferenciació, 7 dies. El seguiment es va realitzar mitjançant tècniques microscòpiques. (Figura 4.2.1).



**Figura 4.2.1. Procés de diferenciació de cèl·lules de moll d'ós a macròfag en presència de M-CSF.** De dreta a esquerra; s'observa el procés de diferenciació de cèl·lules pluripotents a macròfags. L'observació microscòpica permet ressaltar les diferències morfològiques al llarg dels 6 dies de diferenciació. (Magnificació x4).

Amb el fenotip ja comprovat, es va procedir a l'estimulació de les cèl·lules amb LPS. S'ha descrit en la literatura que la inducció amb LPS promou la síntesi de gens pro-inflamatoris, com ara; TNF  $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , iNOS (M. P. Soares & Weiss, 2015). El LPS també pot regular negativament l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme del ferro. El resultat observat és un patró d'expressió on es pot observar l'augment de gens pro-inflamatoris i una disminució dels gens relacionats amb el metabolisme del ferro (Figura 4.2.2). Aquestes observacions ens van portar a concloure que els macròfags derivats de moll d'ós en presència de LPS s'activaven a través de la via clàssica i que, aquest mateix estímul reduïa l'expressió de transportadors de sortida de ferro de la cèl·lula i, de receptors scavengers involucrats en la captació d'hemoglobina per part dels macròfags.



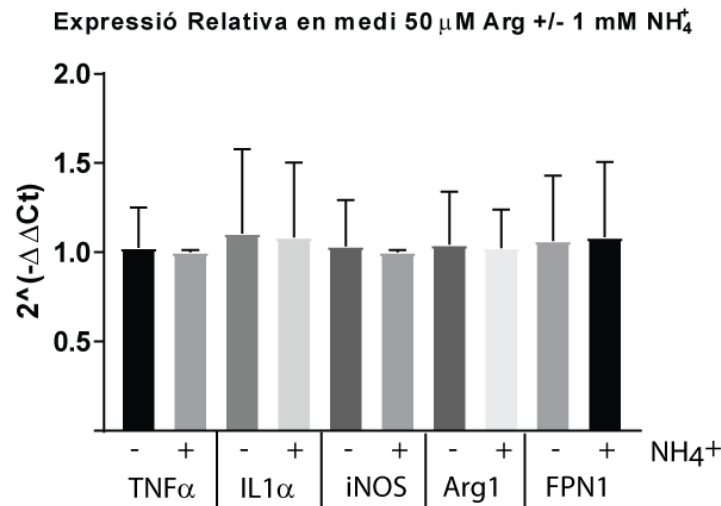
**Figura 4.2.2 El cultiu de cèl·lules de medul·la òssia en presència de M-CSF és capaç d'activar-se davant d'estímuls de tipus via clàssica.** Cèl·lules procedents de medul·la òssia es van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF. Els macròfags davant d'estímuls de tipus M1 han incrementat la producció de TNF  $\alpha$  i IL1 $\alpha$  significativament, i han reduït l'expressió de CD163 i FPN1 significativament. Les dades corresponen a la mitjana  $\pm$  S.E.M. i estan normalitzades per l'amplificació de  $\beta$ -actina. Les quantitats relatives de cada gen ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{CT_{bactin} - Ct_{Gen}}$ ) es van calcular a partir dels valors de CT corregits. Les mostres procedents de ratolins control i Slc7a7<sup>-/-</sup> es comporten igual, excepte en el cas de IL1  $\alpha$  on la seva expressió és més elevada en el cas del genotip Slc7a7<sup>-/-</sup>. Les diferències són estadísticament significatives i es compara cada genotip amb i sense tractament amb LPS, \* p<0,05; \*\*\* p<0.001.

Degut a què no s'han observat diferències significatives entre control i Slc7a7<sup>-/-</sup>, i conjuntament amb la literatura descrita sobre el mecanisme de l'arginina en macròfags i l'afectació d'aquesta en el fenotip LPI, s'ha procedit a estudiar l'activació d'aquestes gens en l'ambient característic de la LPI (i. e. baixa concentració d'arginina i alta concentració d'amoni).

### 2.1 Avaluació de l'activació del macròfag via M1 en condicions LPI

Ens vam plantejar l'estudi de la inducció dels gens involucrats en la producció d'òxid nítric (NO) mitjançant diferents condicions. Després dels 6 dies de cultius en medi amb M-CSF les cèl·lules van ser incubades amb concentracions de L-Arg variants, en presència i absència d'amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) i en presència o absència de LPS per avaluar la inducció d'aquests gens en condicions fisiològiques i en condicions LPI.

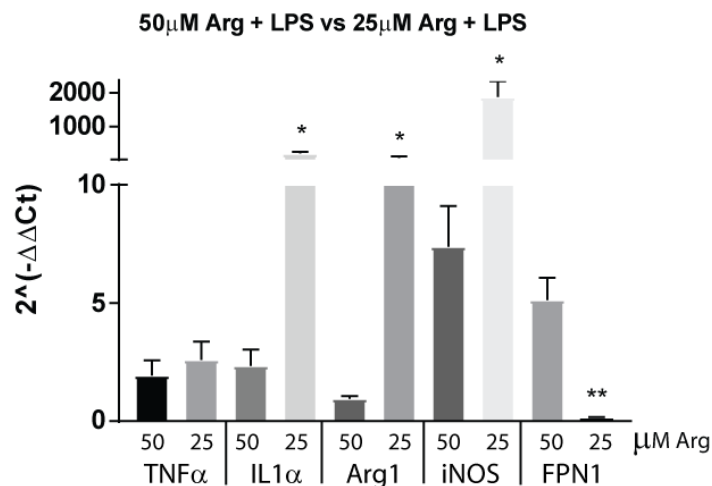
S'ha observat que els nivells d'expressió gènica dels gens IL1 $\alpha$ , TNF  $\alpha$ , iNOS, FPN1 i Arg1 no presenten diferències variant les concentracions d'amoni. (Figura 4.2.1.1).



**Figura 4.2.1.1 L'expressió gènica és independent de  $\text{NH}_4^+$ .** Cèl·lules procedents de medul·la òssia es van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF. Posteriorment van ser estimulades amb 50  $\mu$ M d'arginina i amb presència o absència de 1 mM  $\text{NH}_4^+$ . Les quantitats relatives de cada gen ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{(\text{CT}_{\text{bactin}} - \text{CT}_{\text{Gen}})}$ ) es van calcular a partir dels valors de CT corregits. L'expressió relativa dels gens no mostra diferències significatives entre el medi amb 50  $\mu$ M d'arginina i el medi 50  $\mu$ M d'arginina 1 mM  $\text{NH}_4^+$ . n=2 (Ratolins Control).

A continuació es va procedir a analitzar si existien diferències en els nivells d'expressió gèniques degudes a l'amoni en medis amb concentracions més baixes d'arginina (25 $\mu$ M d'arginina), amb o sense 1 mM de  $\text{NH}_4^+$ , amb presència o absència de LPS i entre genotips (Control i *Slc7a7*<sup>-/-</sup>). Com havíem vist anteriorment, tant en presència de LPS com en condicions més baixes d'arginina els nivells d'expressió relativa no presenten diferències davant de 1mM de  $\text{NH}_4^+$ . (Figura S2.1) L'amoni tampoc produeix diferències significatives en macròfags procedents de ratolins *Slc7a7*<sup>-/-</sup> (Figura S2.2).

Donat que no s'observen efectes de l'amoni en l'expressió gènica dels gens relacionats amb la via clàssica, es va procedir a avaluar si, les diferents concentracions d'arginina podien causar un efecte en l'activació mitjançant LPS (Figura 4.2.1.2). Els resultats mostren que l'expressió varia en funció de la concentració d'arginina present en el medi en el cas dels gens IL1 $\alpha$ , iNOS i FPN1 en macròfags de mòll d'òs.



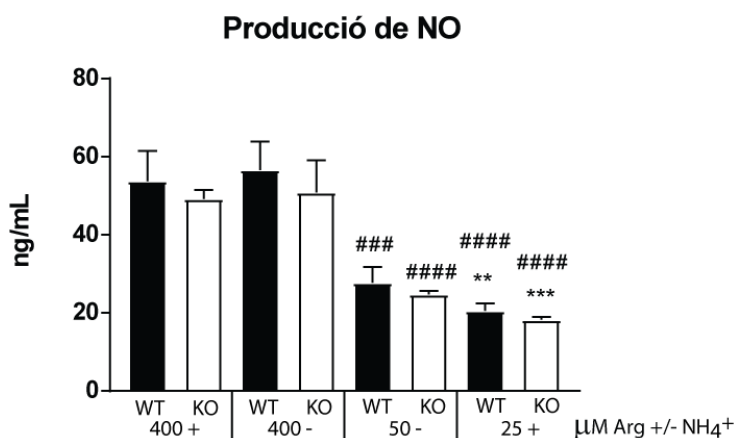
**Figura 4.2.1.2 L'expressió gènica en resposta a LPS és diferent en funció de la concentració d'arginina.** Cèl·lules procedents de medul·la òssia es van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF. Seguidament van ser estimulades amb 50 µM d'arginina o 25 µM d'arginina i, en ambdós casos, activades amb LPS. Les quantitats relatives de cada gen ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{(C_{Tbactin} - C_{TGen})}$ ) es van calcular a partir dels valors de CT corregits. L'expressió relativa dels gens mostra diferències significatives entre el medi amb 50 µM d'arginina i el medi 25 µM d'arginina en els gens IL1α, iNOS i FPN1. Només es mostra l'expressió dels gens de mostres procedents de BMM de ratolins Slc7a7<sup>-/-</sup>. Resultats similars es van observar en macròfags control. \* p<0,05 i \*\* p < 0.01. N=3.

### 3. Efecte de l'ambient LPI en la producció de NO en macròfags derivats de cèl·lules de moll d'ós.

Com ja s'ha comentat anteriorment, la L-arginina actua com a substrat del enzim productor d'òxid nítric (NOS) per donar lloc a citrul·lina i NO. L'activador més comú és el LPS. En aquest treball de fi de grau s'ha procedit a l'avaluació de la producció de NO en condicions fisiològiques i de LPI per part de macròfags derivats de cèl·lules de moll d'ós activades amb LPS.

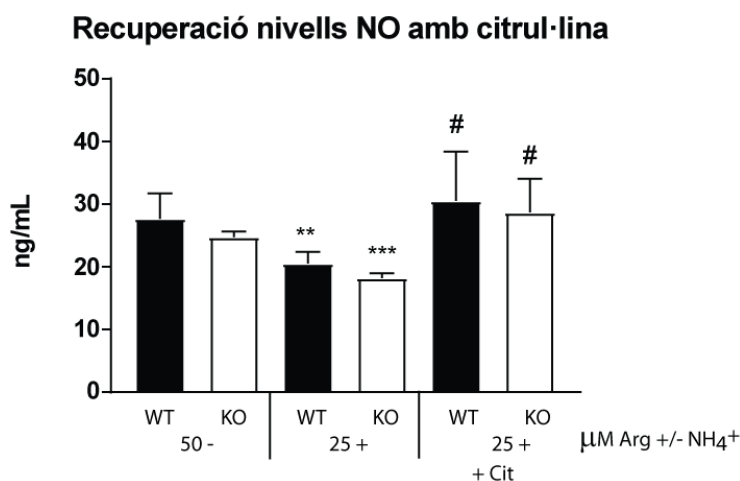
#### 3.1 L'ambient LPI afecta a la producció de NO en macròfags defectius per γ<sup>+</sup>LAT1

Gràcies a la col·laboració amb l'estudiant de doctorat Fernando Sotillo vam poder determinar que existeixen diferències en la producció de NO en funció de la concentració d'arginina del medi independentment del genotip. (Figura 4.3.1)



**Figura 4.3.1 La producció de NO varia en funció de la concentració d'arginina en el medi.** Cèl·lules procedents de medul·la òssia es van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF, posteriorment van ser incubades en plaques de 96 pous amb concentracions de L-Arg variants (400 µM, 50 µM i 25 µM) en presència i absència d'amoni (+/- 1 mM NH4<sup>+</sup>). ### < 0.001 o #### < 0.0001 50 o 25µM respecte a 400 µM Arg. \*\* < 0.01 o \*\*\* < 0.001 25 µM respecte 50 µM Arg. KO = Slc7a7<sup>-/-</sup>

Es pot observar que la producció de NO és menor en presència de concentracions més baixes de L-arginina i en presència de  $\text{NH}_4^+$  (medi LPI) i que no hi ha diferències entre animals WT i *Slc7a7<sup>-/-</sup>* (KO). Arrel d'aquests resultats es va procedir a estudiar la producció de NO en les mateixes condicions però amb la presència de citrul·lina, un aminoàcid capaç de transformar-se en arginina. (Figura 4.3.2). Els nivells de NO en medi LPI amb presència de citrul·lina recuperen els nivells de NO de macròfags en condicions fisiològiques.



**Figura 4.3.2. La producció de NO es recupera amb citrul·lina.** Cèl·lules procedents de medul·la òssia es van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF, posteriorment van ser incubades en plaques de 96 pous amb concentracions de L-Arg variants (50  $\mu\text{M}$  i 25  $\mu\text{M}$ ) en presència i absència d'amoni (1 mM  $\text{NH}_4^+$ ) i en presència o absència de citrul·lina (1mM). # < 0.05 condició respecte amb i sense citrul·lina. \*\* < 0.01 o \*\*\* < 0.001 50  $\mu\text{M}$  sense amoni respecte a 25  $\mu\text{M}$  Arg i 1 mM  $\text{NH}_4^+$ . KO = *Slc7a7<sup>-/-</sup>*

#### 4. Efecte del grup Hemo sobre BMDM (*Bone Marrow Derived Macrophages*)

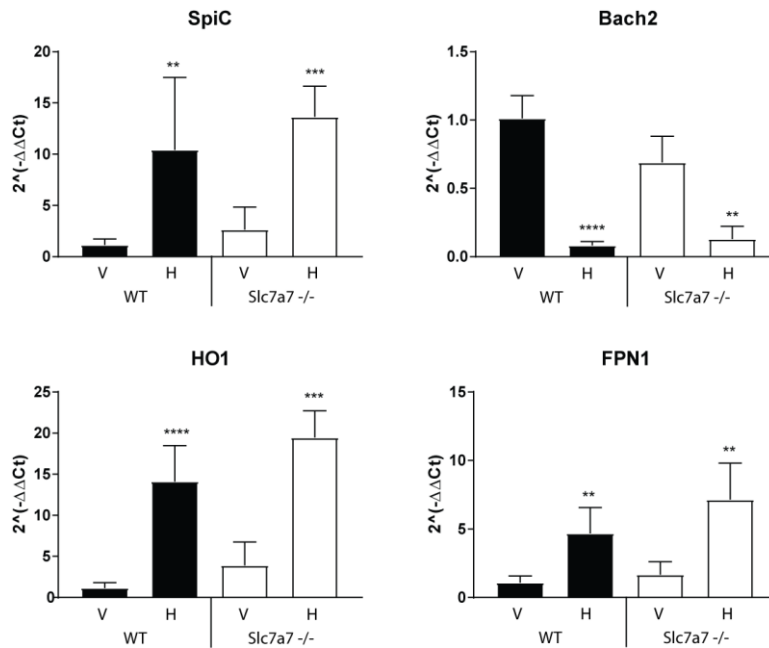
El grup Hemo és un grup prostètic implicat en el transport de ferro i oxigen molecular des dels pulmons fins als teixits. Aquesta molècula és capaç d'activar el factor de transcripció Spi-C, que indueix un fenotip eritrofagocític als macròfags i promou l'activació d'una sèrie de gens com ara, l'hemo oxigenasa 1, l'alliberació de ferro a través de transportadors específics o la seva acumulació intercel·lular (Kohyama et al., 2009).

S'ha observat que l'acumulació de ferro intercel·lular és una característica típica dels macròfags afectats amb LPI. Vam voler estudiar l'efecte d'aquesta molècula sobre l'activació o repressió de transportadors específics de ferro i, sobre factors de transcripció en macròfags derivats de moll d'ós.

##### 4.1 Avaluació del fenotip dels BMDM activats amb Hemo.

S'ha descrit en la literatura que el factor de transcripció Spi-C s'activa en resposta al grup hemo (Hoshino et al., 2000) per tant, aquest ha servit com a control positiu de l'activació.

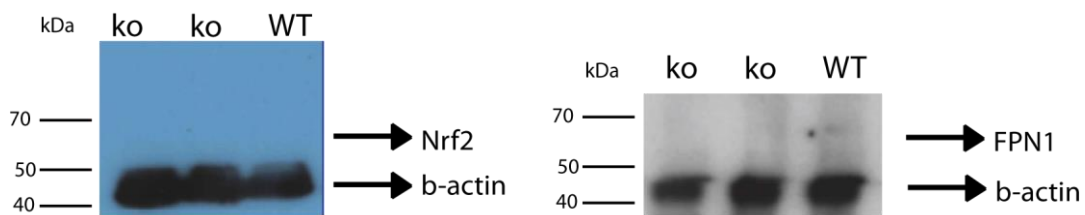
Tal com veiem en la Figura 4.4.1, l'hemo augmenta l'activitat de Spi-C, Arg1, HO1 i FPN1 tant en BMM procedents d'animals control, com *Slc7a7<sup>-/-</sup>*.



**Figura 4.4.1 Abundància relativa dels gens involucrats en el metabolisme del ferro en macròfags derivats de moll d'ós.** Cèl·lules procedents de medul·la òssia és van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF, posteriorment van ser estimulades amb hemo i vehicle (KOH) durant 24h. L'expressió del factor de transcripció Spi-C, HO1 i FPN1 ha augmentat, per altra banda l'expressió de Bach1 ha disminuït. Les dades corresponen a la mitjana ± sem i estan normalitzades per l'amplificació de β-actina. Les quantitats relatives de cada gen ( $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{(CT_{bactin} - CT_{Gen})}$ ) es van calcular a partir dels valors de CT corregits. \*\*\*\* p<0,0001; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01. Vehicle vs hemo.

La disminució en l'expressió transcripcional de Bach1 es correspon amb un augment en l'activitat de FPN1. S'ha descrit en la literatura que aquest fet és gràcies a la competició de Bach1 amb Nrf2 (Alam et al., 1999) per unir-se a les regions ARE, regions promotora del transportador Slc40a1.

A continuació, analitzem si l'increment d'expressió transcripcional de FPN1 és proporcional a l'increment en la quantitat de proteïna, i si aquest increment és degut a l'augment de l'expressió proteica del factor de transcripció Nrf2. (Figura 4.4.2). En aquestes condicions no s'observa cap banda específica per Slc40a1 ni de Nrf2 en membranes de macròfags estimulats amb hemo.



**Figura 4.4.2 Expressió del transportador de ferro Slc40a1 i Nrf2 en macròfags derivats de moll d'ós:** Western Blot utilitzant un anticòs específic contra Slc40a1 (62 kDa) i contra Nrf2 (68kDa) . Les mostres corresponen a membranes de macròfags derivats de moll d'ós després de ser estimulats amb el grup Hemo durant 24h. S'ha utilitzat la β-actina (42 kDa) com ha control de càrrega.



## *Discussió*

## 1. Generació i caracterització de BMDM (*Bone Marrow Derived Macrophages*).

Per tal d'eliminar la proteïna  $y^+$ LAT1 (Slc7a7) de totes cèl·lules disposem d'un animal transgènic que té una part dels exons flanquejat per 2 llocs de recombinació homòloga (loxP) i també expressa la proteïna Cre-ERT<sub>2</sub> sota el promotor humà de la Ubiquitina C. Aquest model animal induïble per tamoxifè dona lloc a l'únic model animal viable per la Lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI).

Hem comprovat que el tamoxifè no té una eficiència del 100%, per tant, en cada experiment s'ha hagut de comprovar a nivell proteic i gènic, l'eliminació del transportador (Fig. 4.1.1).

En aquest treball s'ha generat macròfags primaris derivats de medul·la òssia procedents de ratolins Slc7a7<sup>-/-</sup> i control per tal d'estudiar les possibles diferències en la seva activació. També s'ha aconseguit purificar macròfags de la polpa vermella de la melsa utilitzant citometria de flux (Fig. 4.1.2).

Podem concloure que disposem d'un model animal controlat on després de comprovar en cada experiment l'eliminació del transportador, podem obtenir macròfags de diferent procedència (BMM i RPM) i treballar amb un model cel·lular robust i reproducible on assajar diferents mecanismes moleculars per entendre la LPI.

## 2. Efecte de LPS sobre macròfags derivats de moll d'ós.

Hem observat que, com ja s'havia descrit a la bibliografia, l'estimulació dels macròfags amb LPS dona lloc a l'augment d'expressió de citocines pro-inflamatoris com, IL1 $\alpha$  i el TNF $\alpha$  (Fig. 4.2.2), o induir l'activitat de iNOS. D'altra banda, observem que Bach1 no presenta diferències significatives com era d'esperar. Finalment, FPN1 i CD163 disminueixen la seva expressió després de la inducció amb LPS per tal de no alliberar ferro en el medi extracel·lular en el cas de la FPN1, i tal com s'ha observat en pacients LPI humans, CD163 es troba disminuït sense un mecanisme conegut fins el moment (Tringham et al., 2012). Sorprenentment, no s'han observat diferències entre el genotip control i Slc7a7<sup>-/-</sup>, per tant, sembla que la pèrdua de  $y^+$ LAT1 no regula l'expressió d'aquests gens.

Basant-nos en el fenotip de la lisinúria amb intolerància a les proteïnes que, dona lloc a una disminució de la concentració d'arginina extracel·lular i a l'augment de NH<sub>4</sub>, hipotetitzem que la depleció del transportador catiònic  $y^+$ LAT1 produeix un augment de la concentració d'arginina intracel·lular, fet que pot alterar el metabolisme de l'arginina en el macròfag, representat en gens com ara Arg1 i la iNOS. Per tant, es va procedir a analitzar si existien diferències en l'activitat d'aquests gens en diferents concentracions d'arginina i NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

D'una banda, en la Figura 4.2.1.1 es mostra com l'amoni no influeix en l'expressió de gens com el TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , iNOS, FPN1 ni Arginasa I. D'altra banda, en la Figura 4.2.1.2 es va analitzar l'expressió dels mateixos gens incubant els BMM amb diferents concentracions d'arginina. Es pot concloure que a baixes concentracions d'arginina (25  $\mu$ M) s'indueix IL1 $\alpha$ , Arginasa I i iNOS i es reprimeix FPN1. Podem interpretar que sota unes condicions de manca d'arginina, el macròfag adopta un fenotip més inflamatori, potenciant gens de la via M1 i disminuint els de la M2.

### 3. Efecte de l'ambient LPI en la producció de NO en macròfags derivats de cèl·lules de moll d'ós.

Degut a que l'arginina és substrat de la iNOS vam voler valorar també el producte de la reacció amb la iNOS. La iNOS catalitza la reacció per convertir arginina amb citrulina i NO. Per tant, contra una infecció, el macròfag activa a iNOS i produeix NO com a mecanisme de defensa immunitària.

Després d'incubar els macròfags amb LPS, vam valorar la quantitat de NO produït durant 48 hores amb diferents condicions d'arginina i amoni. En la Figura 4.3.1 Veiem que al disminuir la concentració d'arginina, disminueix significativament la producció de NO, tal com era d'esperar. També caldria valorar si l'amoni a la mateixa concentració d'arginina, té alguna contribució. Tot i això, en la Figura 4.3.2 veiem que la citrulina, és capaç de recuperar els nivells de NO del medi LPI als valors del fisiològic. Per tant, tot sembla indicar, que el responsable d'aquesta disminució és l'arginina. Tot i això, caldrà valorar l'amoni individualment.

### 4. Efecte del Hemo.

El grup Hemo és un grup prostètic que té incorporat un grup de ferro a l'interior de l'anell de protoportfirina. El ferro s'utilitza per donar suport a la cadena de transport d'electrons i està involucrat en la producció d'espècies reactives del oxigen i del nitrogen.

Els macròfags eritrofagocítics deriven de monòcits originaris del moll d'ós gràcies a la resposta al factor de transcripció del hemo Spi-C (Kohyama et al., 2009). Seguidament capten el grup hemo, i aquest pot seguir dues vies diferents: acumular-se intracel·lularment gràcies a la ferritina o ser exportat a través de la membrana via el transportador del ferro ferroportina. L'acumulació del ferro intracel·lularment activa Nrf2, un factor de transcripció que promou els gens involucrats en el metabolisme del ferro i reprimeix l'expressió de iNOS.

Els resultats prèviament obtinguts al nostre laboratori demostren que, els macròfags *Slc7a7<sup>-/-</sup>* residents a la polpa vermella tendeixen a acumular ferro intracel·lularment. Per això, vam voler comprovar si, existien diferències en l'expressió gènica de BMDM *knockout* i control, de gens relacionats amb el metabolisme del ferro com, el transportador *Slc40a1*, SpiC, Hemoxigenasa I i Bach2.

Com es pot observar a la figura 4.4.1 i en acord amb la bibliografia, l'estimulació amb Hemo dóna lloc a l'augment d'expressió gènica de Spi-C, Hemoxigenasa I (HO1) i ferroportina (FPN1). En cap cas s'observen diferències significatives en els nivells d'expressió entre genotips. Pel que fa a Bach2 veiem que disminueix, ja que s'ubiquitina, activa Nrf2 i activa FPN1, tal com està descrit a la bibliografia. A més a més, com que l'expressió gènica pot no correlacionar-se directament amb l'expressió proteica, es va analitzar si l'augment d'expressió dels nivells gènics de *Slc40a1* estaven relacionats amb els nivells proteics del factor de transcripció Nrf2. Vam intentar validar a nivell proteic Nrf2 i Ferroportina 1, però no vam ser capaços de detectar-los. Per tant, no s'ha pogut comprovar l'activació de FPN-1 via Nrf2. Estem considerant testar diferents anticossos per millorar l'especificitat en la detecció, ja que vam purificar la mostra obtenint membranes, però no va ser suficient.

## *Conclusions*

- I. La inducció dels ratolins amb tamoxifè produeix la depleció del transportador Slc7a7.
- II. L'amoni al medi no afecta en els nivells d'expressió gènica de TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , iNOS, FPN1 i Arg1, en presència o absència de LPS dels BMDM.
- III. No s'observen diferències significatives entre genotips entre les condicions assajades.
- IV. Baixes concentracions d'arginina que mimetitzen les LPI, produeixen augment de l'expressió de gens característics de la via M1 i repressió de la via M2.
- V. El medi LPI (baix en arginina i alt en amoni) provoca una disminució en la producció de NO. Aquest fet es correlaciona amb la baixa concentració de NO descrita en pacients LPI. (Tringham et al., 2012)
- VI. La presència de citrul·lina en medis amb 25  $\mu$ M d'arginina permet la recuperació dels nivells de NO, igualant-los amb les concentracions d'òxid nítric en medis fisiològics de ratolí. Tot i això, no s'observen diferències entre genotips.
- VII. El grup hemo produeix una disminució de l'expressió de Bach1 i un augment en l'expressió de FPN1. Aquest fet concorda amb què Bach1 competeix amb el lloc d'unió a ARE amb Nrf2, un factor de transcripció que promou la transcripció de FPN1.
- VIII. No s'ha pogut avaluar la relació entre l'expressió gènica de Slc40a1 i l'expressió proteica de Nrf2 i FPN1.

## *Bibliografia*

- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M. K., & Cook, J. L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26071–26078. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26071>
- Bertran, J., Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., ... Murer, H. (1992). Stimulation of system y(+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5606–5610. JOUR. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC49341/>
- Bröer, S. (2008). Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiological Reviews*, 88(1), 249 LP-286. JOUR. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/88/1/249.abstract>
- Bröer, S., & Palacín, M. (2011). The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *Biochemical Journal*, 436(2), 193–211. <http://doi.org/10.1042/BJ20101912>
- Bronte, V., & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 641–654. <http://doi.org/10.1038/nri1668>
- Celada, A., & Nathan, C. (1994). Macrophage activation revisited. *Immunology Today*. [http://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90150-3](http://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90150-3)
- Chin, B. Y., Jiang, G., Wegiel, B., Wang, H. J., MacDonald, T., Zhang, X. C., ... Otterbein, L. E. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 5109–5114. JOUR. <http://doi.org/10.1073/pnas.0609611104>
- Christensen, H. N. (1984). Organic ion transport during seven decades the amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 779(3), 255–269. [http://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90012-1](http://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90012-1)
- DW, G., TERRITO, M., TN, F., & MJ, C. (1976). DEfective lung macrophages in pulmonary alveolar proteinosis. *Annals of Internal Medicine*, 85(3), 304–309. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-85-3-304>
- Furriols, M., Chillarón, J., Mora, C., Castelló, A., Bertran, J., Camps, M., ... Palacín, M. (1993). rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. *Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 27060–27068. JOUR. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/268/36/27060.abstract>
- Goerdts, S., Politz, O., Schledzewski, K., Birk, R., Gratchev, A., Guillot, P., ... Orfanos, C. E. (1999). Alternative versus Classical Activation of Macrophages. *Pathobiology*, 67(5–6), 222–226. JOUR. Retrieved from <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000028096>
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23–35. <http://doi.org/10.1038/nri978>
- Hamza, I., & Dailey, H. A. (2012). One ring to rule them all: Trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1617–1632. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.009>
- Hart, T. (2010). An Interview with Dr. Bruce Lipton, The workings of new biology explained. *Quantum Health*, 6–10.
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., ... Wynn, T. A. (2001). Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of &lt;span class=&quot;sc&quot;&gt;l&lt;/span>-Arginine Metabolism. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6533 LP-6544. JOUR. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/167/11/6533.abstract>
- Hoshino, H., Kobayashi, A., Yoshida, M., Kudo, N., Oyake, T., Motohashi, H., ... Igarashi, K. (2000). Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15370–6. <http://doi.org/10.1074/JBC.275.20.15370>
- Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B. T., Wilker, P. R., Hildner, K., Mejia, C., ... Murphy, K. M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature*, 457(7227), 318–321. <http://doi.org/10.1038/nature07472>
- Krogh, a, Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein

- topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris Jr., S. M., & Ratan, R. R. (2003). Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8), 4843–4848. <http://doi.org/10.1073/pnas.0735876100>
- Lukkarinen, M., Nääntö-Salonen, K., Pulkki, K., Aalto, M., & Simell, O. (2003). Oral supplementation corrects plasma lysine concentrations in lysinuric protein intolerance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 52(7), 935–938. [http://doi.org/10.1016/S0026-0495\(03\)00089-1](http://doi.org/10.1016/S0026-0495(03)00089-1)
- Marro, S., Chiabrando, D., Messina, E., Stolte, J., Turco, E., Tolosano, E., & Muckenthaler, M. U. (2010). Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position –7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica*, 95(8), 1261 LP-1268. JOUR. Retrieved from <http://www.haematologica.org/content/95/8/1261.abstract>
- Martín Jaular, L. (2006). El Transporte de arginina en macrófagos : respuesta a activación, proliferación y GM-CSF, 160. Retrieved from <http://catalog.ub.edu/record=b1767602~S1%2Acat>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166 LP-6173. JOUR. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/164/12/6166.abstract>
- Moncada, S., & Erusalimsky, J. D. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3), 214–220. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm762>
- Nathan, C., & Xie, Q. (1994). Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915–918. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90266-6](http://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90266-6)
- Ogier de Baulny, H., Schiff, M., & Dionisi-Vici, C. (2012). Lysinuric protein intolerance (LPI): A multi organ disease by far more complex than a classic urea cycle disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(1), 12–17. <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.02.010>
- Palacin, M. (2005). The Genetics of Heteromeric Amino Acid Transporters. *Physiology*, 20(2), 112–124. <http://doi.org/10.1152/physiol.00051.2004>
- Palacín, M., & Kanai, Y. (2004). The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflügers Archiv*, 447(5), 490–494. article. <http://doi.org/10.1007/s00424-003-1062-7>
- Sakamoto, K., Iwasaki, K., Sugiyama, H., & Tsuji, Y. (2009). Role of the Tumor Suppressor PTEN in Antioxidant Responsive Element-mediated Transcription and Associated Histone Modifications. *Molecular Biology of the Cell*, 20(6), 1606–1617. JOUR. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08-07-0762>
- Satriano, J. (2004). Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. *Amino Acids*, 26(4). <http://doi.org/10.1007/s00726-004-0078-4>
- Sebastio, G., Sperandio, M. P., & Andria, G. (2011). Lysinuric protein intolerance: Reviewing concepts on a multisystem disease. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, 157(1), 54–62. <http://doi.org/10.1002/ajmg.c.30287>
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*, 148(3), 399–408. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Soares, M. P., & Hamza, I. (2016). Macrophages and Iron Metabolism. *Immunity*, 44(3), 492–504. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.016>
- Soares, M. P., & Weiss, G. (2015). The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO Reports*, 16(11), 1482–1500. <http://doi.org/10.15252/embr.201540558>
- Sun, J., Brand, M., Zenke, Y., Tashiro, S., Groudine, M., & Igarashi, K. (2004). Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1461–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0308083100>
- Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y. B., ... Palacín, M. (1998). Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32437–45. <http://doi.org/10.1074/JBC.273.49.32437>
- Torrents, D., Mykkänen, J., Pineda, M., Feliubadaló, L., Estévez, R., de Cid, R., ... Palacín, M. (1999). Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nature Genetics*, 21(3), 293–296. <http://doi.org/10.1038/6809>
- Tringham, M., Kurko, J., Tanner, L., Tuikkala, J., Nevalainen, O. S., Niinikoski, H., ... Mykkänen, J. (2012). Exploring the transcriptomic variation caused by the Finnish founder mutation of lysinuric protein intolerance (LPI). *Molecular Genetics and Metabolism*, 105(3), 408–415.



<http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.12.007>

Wu, G., & Morris Jr., S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J*, 336 ( Pt 1), 1–17. [http://doi.org/10.1016/S0928-4680\(98\)80513-0](http://doi.org/10.1016/S0928-4680(98)80513-0)

Zuckerbraun, B. S., Chin, B. Y., Bilban, M., de Costa d'Avila, J., Rao, J., Billiar, T. R., & Otterbein, L. E. (2007). Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Faseb J*, 21(4), 1099–1106. <http://doi.org/fj.06-6644com> [pii]\r10.1096/fj.06-6644com [doi]

## *Apèndix I*

## Protocol de derivació de cèl·lules pluripotents a macròfag

### Material i reactius:

1. Medi DMEM comercial
2. Medi DMEM sense suplementar (- L – piruvat, - Arg)
3. FBS
4. M-CSF
5. Antibiòtics: Penicilina-streptomicina
6. Plaques de Petri no tractades de 15 cm<sup>2</sup>
7. Xeringues de plàstic de 5 mL
8. Agulles de 25-Gauge
9. Material de cirurgia estèril: tisores i pinces

### Procediment:

Per l'obtenció de les cèl·lules de moll d'ós és sacrificuen ratolins mitjançant cambra de CO<sub>2</sub>. S'afegeix etanol per sobre la pell del ratolí per tal de netejar el pelatge i no contaminar les tíbies i els fèmurs. El procés d'aïllament dels fèmurs i les tíbies s'ha de fer amb precaució per evitar esquinçar l'ós. Un cop extrets els ossos és mantenen amb PBS<sup>9</sup> i gel fins al seu ús dins la campana de flux laminar. Els ossos aïllats és dipositen sobre plaques de Petri amb medi dins de la campana prèviament netejada amb etanol al 70%. Paral·lelament preparem una placa amb 10 mL de DMEM per cada animal, amb el qual és recollirà la medul·la òssia. Amb les pinces agafem l'ós i en tallem els extrems evitant que s'esquerdi l'ós, llavors és duen a terme 3-4 rentats del interior amb medi mitjançant la xeringa de 25G. És preferible que després dels rentats és dugui a terme un procés de disgregació tornant a passar la xeringa uns quants cops més, així evitem que és formin agregats a la placa. Finalment, és reparteixen equitativament els 10 mL de DMEM amb les cèl·lules disgregades en plaques de Petri de 15cm acondicionades amb DMEM, 10% de FBS i 30% de M-CSF, amb un volum final de 30 mL per placa. És deixen a l'incubador en condicions de 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO<sub>2</sub> durant 6-7 dies.

---

9

PBS: KCl 2,7 mM, KH PO<sub>2</sub> 1,5 mM, NaCl 136 mM, Na HPO<sub>2</sub> 8 mM. El pH s'ha d'ajustar a 7.4. Si la finalitat del PBS són cultius cel·lulars, la solució s'ha d'autoclavar.

## **Protocol congelació – descongelació de cèl·lules.**

### **Protocol de congelació:**

#### **Material i reactius:**

10. DMSO
11. FBS
12. Tubs de crio-congelació

#### **Procediment:**

Centrifugació de les cèl·lules a 200 g 3' i re-suspendre amb una solució de FBS amb 10% de DMSO. És realitzen alíquotes i és guarden a -80°C.

### **Protocol de descongelació:**

#### **Material i reactius:**

13. DMEM
14. M-CSF
15. FBS
16. Falcons de 15 mL
17. Plaques de petri no tractades de 15 cm<sup>2</sup>

#### **Procediment:**

El procés de descongelació s'ha de fer amb agilitat, ja que el DMSO és un crio-preservant que a llargues exposicions és tòxic per les cèl·lules. Sota campana és prepara els falcons de 15 amb 7 mL de DMEM degudament retolats, és descongela el crio-tub i ràpidament és re-suspèn la solució amb els 7 mL de DMEM per neutralitzar l'efecte tòxic del DMSO. És realitza una centrifugació a 1500 rpm durant 5'. El sobrenedant és aspirat i el pellet re-suspès amb 5 mL de DMEM. Finalment, és prepara la placa de 15 cm<sup>2</sup> amb DMEM, 10% de FBS i 30% de M-CSF i s'afegeix els 5 mL de solució, amb un volum final de 30 mL per placa. És deixen a l'incubador en condicions de 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO<sub>2</sub> durant 8-9 dies, ja que les cèl·lules que han estat congelades tenen més dificultats per despertar i assentar-se. El volum de DMEM per re-suspendre i el nombre de plaques pot variar en funció del nombre d'ossos que aïllessim inicialment.

## Protocol determinació de Nitrits amb el *kit* Promega.

### Material i reactius:

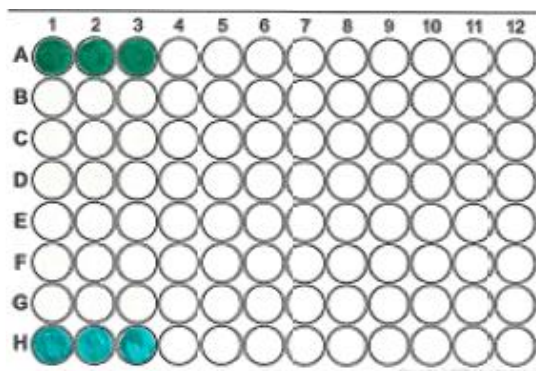
18. Medi DMEM
19. 1 mL d'Estàndard de Nitrit (Estoc a 0.1M)
20. Solució de NED (0.1% N-1- diclorhidrat de naftilendiamina en aigua)
21. Solució de sulfanilamida (1% sulfanilamida en 5% d'àcid fosfòric)
22. Placa Elisa

**Condicions d'emmagatzematge:** Els components s'han de mantenir a 4°C, protegits de la llum. S'han de guardar per separat.

### Procediment:

Primer de tot s'ha de preparar la recta patró.

1. Prepara 1 mL a 100  $\mu$ M de solució de nitrits a partir de la solució del kit a 0,1 M. 1:1000 en DMEM (1  $\mu$ L en 1 mL de DMEM).
2. La corba s'ha de fer per triplicat, per tant, destina 24 dels 96 pous a la corba, i afegeix 50  $\mu$ L de DMEM a cada pou de la lletra B-H que formi part de la recta patró.
3. Afegeix 100  $\mu$ L de la solució a 100  $\mu$ M de nitrits als tres pous restants de la recta patró (pous lletra A, columnes 1,2,3).
4. Realitza dilucions seriades (50  $\mu$ L/pou) en triplicat en direcció descendent de la placa per generar una recta patró amb 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 i 1.56  $\mu$ M de Nitrits, descartant els últims 50  $\mu$ L. Els últims pous de la recta patró, que pertanyen a la lletra G, no han de contenir nitrits.



### Imatge 1. Disseny placa ELISA per determinació de Nitrits:

Carrils 1,2 i 3 destinats a la recta patró. Lletres A d'aquests carrils 100  $\mu$ L de la solució a 100  $\mu$ M de nitrits. Pous B-G dilucions seriades (50  $\mu$ L/pou). Lletres H, només medi DMEM sense nitrits.

Reacció de Griess (Les solucions de sulfanilamida i NED s'han d'atemperar a temperatura ambient durant 15-30 minuts)

1. Afegeix 50  $\mu\text{L}$  de mostra per duplicar o triplicat.
2. Afegeix 50  $\mu\text{L}$  de la solució de sulfanilamida a cada pou amb mostra o recta patró. Incubació durant 5'-10' a temperatura ambient i a la foscor.
3. Afegeix 50  $\mu\text{L}$  de NED a cada pou. Incubació durant 5'-10' a temperatura ambient i a la foscor.
4. Mesura l'absorbància amb un filtre d'entre 250 nm i 550nm.
5. Fes la mitja de les absorbàncies per cada valor que pertanyen a la recta patró, gràfica les mitges a l'eix de les Y i les concentracions de nitrits a l'eix de les X.
6. Determina la mitja d'absorbàncies dels valors experimentals.
7. Determina la concentració comparant els resultats amb la recta

## Protocol Citometria de Flux.

### Material:

- Mostres
- Anticòs marcat amb fluorocrom
- PBS

### Procediment:

1. Preparació de la mostra: Disgregar les cèl·lules del teixit amb un filtre de 60mm en medi fred. (DMEM +2%FBS, 6mL)
    1. Posar en falcons de 15 i centrifugar 5' 1600 rpm 4°C, per eliminar el medi
    2. Descarta el sobrenedant i re-suspèn en 5mL de tampó de lisis per eritròcits. 5' a temperatura ambient
    3. Afegeix 10 mL de PBS-FACS.
    4. Centrifuga 5' 1600 rpm 4°C i re-suspèn en 10 mL de PBS-FACS<sup>10</sup> i contar cèl·lules.
    5. Dividir les cèl·lules a tenyir. Cada mostra pot contenir com a màxim 10<sup>6</sup> cèl·lules. Apart de les mostres és necessita un control negatiu, tenyir amb un IGg no específic, i un control positiu per cada fluorocrom que s'utilitzarà.
  2. Bloqueig: Centrifugar les mostres i re-suspendre (10<sup>6</sup> cèl·lules en 100 µl de PBS-FACS a 4°C)
    1. Incubació per bloquejar amb αCD16/CD32 15' a 4°C
    2. Parar la reacció afegint 200 µl de PBS-FACS i centrifuga 3' 300g a 4°C
  3. Tinció:
    1. Re-suspèn en PBS-FACS fred i afegeix la Mix d'anticòs.
    2. Incubar durant 30' a 4°C hi ha la foscor.
    3. Para la reacció afegint 200 µl de PBS-FACS i centrifuga 3' 300g a 4°C
- Si es necessita un segon anticòs s'ha de repetir el mateix procés: netejar i afegir la mix d'anticòs amb el anticòs secundari (50 µl de PBS + dilució d'anticòs), i incubar 20' a temperatura ambient.
4. Preparació de les mostres per el flux: neteja les mostres amb PBS, centrifuga i repeteix el procés.
    1. Re-suspèn la mostra en 300-400 µl de PBS i posar-ho als tubs de citometria.

### Abs: Controls (10<sup>6</sup> cèl·lules):

1. Control negatiu, sense Ab, només DAPI.
2. F4/80 Hi-PE → 1 µl
3. CD11b-APC Cy7 → 1 µl
4. VCAM1-FITC → 0.5 µl
5. CD11c-BV786 → 1 µl

---

<sup>10</sup> PBS-FACS (10x): 4,5 g NH<sub>4</sub>Cl 1,7 M; 0.6g KHCO<sub>3</sub> 120Mm; 0.13g EDTA 9mM en 50 µl H<sub>2</sub>O MQ; pH 7.3 a 4°C.

## Protocol Extracció RNA amb el *kit* PureLink de Termofisher.

A partir de:

- 6) Teixit congelat:
  - 1) Talla 1/2 ronyó en una placa metàl·lica en gel sec
  - 2) Posa el mig ronyó en un tub rodó amb boles de ceràmica, i afegeix 800 µL de “*TRIzol*”<sup>11</sup>
  - 3) Homogeneïtzació 2x30" a 3300 rpm 5' a temperatura ambient (RT)
  - 4) Centrifugació 12000g a 4°C 10'

La centrifugació dóna lloc a dos fases, l'aquosa i l'orgànica. El RNA és troba soluble en la fase aquosa

1. Afegeix el sobrenedant en un nou Eppendorf
  2. Afegeix 500 µL de tampó de lisis + 1:50 DTT 2M
- 
1. Cèl·lules en suspensió:
    1. Centrifugació a 1300 rpm 5' a RT
    2. Descarta el sobrenedant i re-suspèn el pellet amb 800 µL de “*TRIzol*” i llisa amb una agulla de 25 G entre 5-10 cops. Manté les mostres en gel
    3. Afegeix 200 µL de cloroform. Barreja però no amb vòrtex
    4. Centrifuga 12000g a 4°C 15'. (mentrestant prepara el mix de DNase)
    5. Recull el sobrenedant i afegeix-lo a un nou Eppendorf
  3. Cèl·lules cultivades:
    1. Aspira el medi
    2. Renta amb PBS (2x)
    3. Afegeix 300 µL de tampó de lisis amb DTT (200 µL en 10 mL)
    4. Vòrtex (en aquest pas les cèl·lules poden ser congelades)
    5. Lisa mitjançant una agulla de 25G entre 5-10 cops. Manté les mostres en gel

### En comú:

1. Afegeix el mateix volum que tens a l'Eppendorf de EtOH 70% *RNAse free* i manté la mostra 10' a RT. Després vòrtex durant 30"
2. Afegeix 700 µL a una columna
3. Centrifuga 12000g 30" a RT i descarta el sobrenedant
4. Afegeix 350 µL de *Wash Buffer I*. Centrifuga 12000g 30" a RT i descarta el sobrenedant
5. Tractament amb el mix de DNase. 15' a RT (mentrestant calenta H<sub>2</sub>O *RNAse free* a 70°C)
6. Afegeix 350 µL de *Wash Buffer I*. Centrifuga 12000g 30" a RT i descarta el sobrenedant, canvia el tub de re-col·lecció

---

11

El “*TRIzol*” és un reactiu comercial que permet l'obtenció de RNA a partir de teixits. És tracta d'una solució de isotiocianat de guanidini, que preserva la integritat del RNA, i de fenol. L'acció conjunta d'aquests dos reactius dóna lloc a la lisi de les cèl·lules i la dissolució dels seus components.



7. (2x) Afegeix 500  $\mu$ L de *Wash Buffer II*. (+EtOH --> Mirar si la solució del kit conté EtOH). Centrifuga 12000g 30" a RT i descarta el sobrenedant, canvia el tub de re-col·lecció
8. Centrifuga 16000g 4' RT per assecar la membrana, canvia el tub de re-col·lecció pel tub de re-col·lecció net.
9. Afegeix 20  $\mu$ L del *H<sub>2</sub>O RNase free* per-escalfada, incubació durant 5' a RT.
10. Centrifuga 16000g 2' a RT.

Tractament amb DNase (1x):

1. DNase 10 $\mu$ l
2. Buffer 8 $\mu$ l purelink.
3. H<sub>2</sub>O RNase free 62 $\mu$ l

## Protocol Electroforesis en gel d'agarosa.

### Reactius:

1. Tampó de càrrega desnaturalitzant<sup>12</sup>(formamida desionitzada 48% (v/v), formaldehid 6,4% (2,1 M), blau de bromofenol 0,53%, glicerol 5,3% en tampó d'electroforesi 1x)
2. Tampó d'electroforesis de RNA 10X<sup>13</sup> (MOPS 400 mM a pH 7, acetat sòdic 100 mM i EDTA 10 mM)
3. Gel d'agarosa: el percentatge d'agarosa varia en funció de la mida del RNA que és desitja detectar. Nosaltres realitzem el gel al 1% d'agarosa amb tampó d'electroforesis 1X.
4. Formaldehid 0,66 M
5. Bromur d'etili 400 µg/ml
6. Marcador de pes molecular

### Procediment:

- 1 Afegir x grams d'agarosa i dissoldre'ls en el tampó d'electroforesis.
- 2 Escalfar la mostra fins que l'agarosa s'hagi dissolt
- 3 Deixar refredar la mostra i afegir el formaldehid. La polimerització del gel és porta a terme sota la campana extractora
- 4 Preparació de la mostra:
  - 4.1 1 µL de RNA
  - 4.2 2 µL de tampó de mostra (SB)
  - 4.3 9 µL d'H<sub>2</sub>O *RNAse free*
- 2 Desnaturalitzar les mostres durant 20 min a 65°C.
- 3 Carregar les mostres
- 4 Corre el gel 10' a 100 V.
- 5 Detecció amb transil·luminador.

---

<sup>12</sup> És guarda a temperatura ambient i protegit de llum.

<sup>13</sup> És guarda a -20°C.

## Protocol PCR, de RNA a cDNA amb el *kit* qScript cDNA Synthesis

### Material i reactius:

- 3.1 Mostra de RNA
- 3.2 Tubs de 0,2 mL per PCR
- 3.3 qScript Reaction mix (5x)<sup>14</sup>
- 3.4 H<sub>2</sub>O Auto-clavada

### Procediment:

- 4 Afegeix al tub de PCR els següents reactius:
  - 5.1.1 4 µL de qScript Reaction Mix (5x)
  - 5.1.2 RNA
  - 5.1.3 H<sub>2</sub>O Auto-clavada

La quantitat de RNA i aigua variarà en funció de la concentració de RNA valorada amb el NanoDrop. El volum final ha de ser 20 µL.

Posar les mostres al termociclador (*2720 Thermal Cycler* de Applied Biosystems), on seguiran un cicle de:

- 1 5' a 22°C
- 2 30' a 42°C
- 3 5' a 85°C
- 4 És manté a 4°C fins que és recullen les mostres

---

<sup>14</sup> qScript Reaction Mix(5x) conté: Tampó optimitzat, magnesi, oligo(dT), primers aleatoris, dNTPS concentrats 5x.

## Protocol qRT-PCR utilitzant “*QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR*” de “*ThermoFisher*”

### Material i Reactius:

2.2 Producte de cDNA

2.3 Encebadors “*forward*” i “*reverse*”

2.4 *SYBER-Green PCR Master Mix*” de “*Applied Biosystems*”

2.5 Placa de 384 pous

### Procediment:

2. Dissolt les mostres per obtenir una concentració final <sup>15</sup>de 75 ng de cDNA.
3. Prepara els encebadors seguint les següents concentracions (1x = 1 pou):
  1. 5 µL Sybr-Green
  2. 0,6 µL Encebador F + R
  3. 0,4 µL H<sub>2</sub>O Auto-clavada

S'ha de preparar per cada encebador tenint en compte el nombre de pous que s'utilitzaran per encebador.

3. Càrrega 4 µL d'encebador per pou. Cada mostra s'ha d'analitzar per triplicat
4. Càrrega 6 µL de mostra a cada pou
5. Cobreix la placa de 384 amb un film específic per plaques de PCR, evitant la formació de bombolles
6. Posar la placa dins de l'aparell i especificar els següents paràmetres:
  - Placa de 384 pous
  - Syber-Green Reagent
  - Quantitative PCR
  - Include MeltCurve
  - 10 µL/well
7. Engagar l'experiment

La placa és pot preparar el dia anterior i mantenir a 4°C.

---

<sup>15</sup> La concentració de cDNA per la qRT-PCR és variable.

<b>Símbol del gen</b>	<b>Descripció</b>	<b>Referència</b>	<b>Encebador esquerra</b>	<b>Encebador dreta</b>
Arg1	Arginasa I	NM_017134.2	TTGCGAGACGTAGACC CTGG	CAAAGCTCAGGTG AATCGGC
$\beta$ ACTIN	Endògen	NM_007393.2	GGGAAATCGTGCGTGA CATT	GCGGCAGTGGCCA TCTC
Bach1	Regulador transcripcional	NM_206866.2	CGGATAATTTGCTCTC ACG	TAAAAAGGAAAGC GGGCAGTCGGAG
Bach2	Regulador transcripcional	NM_021813.3	AGTTCATCCACGACATC C	AGGTGATTCCTCTC CGAC
CD163	Receptor scavenger ric en cisteïnes	NM_001107887.1	GCTAGACGAAGTCATC TGCACTGGG	TCAGCCTCAGAGAC ATGAACTCGG
FPN1	SLC40A1	NM_014585.5	GTCGGCCAGATTATGA CATTG	ATTCCAACCGGAA ATAAAACCA
HO1	Hemo oxigenasa 1	NM_001138825.2	ACATCGACAGCCCCAC CAAGTTCAA	CTGACGAAGTGAC GCCATCTGTGAG
IL1 $\alpha$	Interleucina 1 $\alpha$	NM_000575.4	GACCGACCTCATTTTCT TCTG	CACCCGACTTTGTT CTTTGG
SpiC	Factor de transcripció	NM_011461.3	TCCGCAACCCAAGACT CTTCAA	GGGTTCTCTGTGGG TGACATTCCAT
TNF	Tumor Necrosis Factor	NM_012675.3	CACAAGATGCTGGGAC AGTGA	TCCTTGATGGTGGT GCATGA
$\gamma$ -LAT1	SLC7A7	NM_001126105.2	AGCGTTTTCTTCCCGAT TGTCT	ATGCCGATGAGGG AGTTGATAGTA

Taula 1. Llistat d'encebadors.

## **Protocol extracció proteïnes total amb tampó RIPA**

Dur a terme tot el procediment amb fred per evitar la degradació de proteïnes.

### **Materials i reactius:**

- Scrappers
- Tampó RIPA
- Centrifugadora
- Inhibidor de proteases (INH II Cocktail)

### **Procediment:**

1. Aspira el medi i renta amb PBS (2x)
2. Afegeix el tampó RIPA (0,3-1 mL per plaques de 10 cm, 150 µL per plaques de 6 pous)
3. Deixar en agitació 1h a 4°C
4. Centrifugació a 12000 rpm, 4°C durant 20'
5. Recull el sobrenedant en un nou Eppendorf
6. Valoració de proteïnes

Les mostres s'han de mantenir a -80°C, a menys que és deixin en solució amb LSB per valorar en Western Blot, en aquest cas és poden mantenir a -20°C.

## **Protocol extracció de proteïnes de membrana totals procedents de ronyó i melsa.**

### **Material i reactius:**

- Tap rosca tub 2 mL (VWR: 215-1266)
- Tubs 2 mL amb rosca (VWR: 215-1261)
- Boles de 2.8 mm d'òxid de zirconi (VWR: BERT03961-1-102)
- Tubs Ultracentrífuga
- Rotor TLA-55
- Tampó homogeneïtzador
- Inhibidor de proteases (INH II Cocktail) (1:1000)

### **Procediment**

1. Afegix 1/2 ronyó o una melsa sencera en un Eppendorf de 2mL amb rosca i el seu tap amb 1 mL de tampó homogeneïtzador, Inhibidor de proteases i 3 boles d'òxid de zirconi.
2. Homogeneïtza amb el homogeneïtzador de teixits "*Precellys 24*" amb 5000, 20"x2
3. Recull el sobrenedant i transfereix-lo a un nou Eppendorf de 1.5 mL
4. Centrifugació 10000g, 4°C durant 10'
5. Recull el sobrenedant i transfereix-lo a un Eppendorf d'ultracentrifugació i equilibra'ls.
6. Centrifugació amb Optima TLX utilitzant el rotor TLA55. 1H, 55000 rpm i 4°C.
7. Descarta el sobrenedant i re-suspèn el pellet en 50-300 µL de tampó de membranes amb el inhibidor de proteases
8. Utilitza 2 µL per la valoració de proteïnes

El procediment per l'extracció de membranes a partir de cèl·lules en cultiu cal: rentar les cèl·lules amb PBS, afegir el tampó, rascar-les i recollir-les en Eppendorfs. En comptes d'utilitzar l'homogeneïtzador de teixits s'utilitza el Somicador per tal disruptar-les cèl·lules. Seguidament és continua pel punt 4 del protocol. El temps de sonicació és 30" a màxima potència, mantenir l'Eppendorf en fred en tot moment.

## Protocol Electroforesis SDS-PAGE.

### Materials i reactius:

#### 23. Gel concentrador:

1. Acrilamida 30%
2. Tris-HCl 0.5 M a Ph 6.8
3. SDS 10%
4. Persulfat amònic (APS) 10%
5. TEMED

#### 24. Gel separador:

1. Acrilamida 30%
2. Tris-HCl 1.5 M a Ph 8.8
3. SDS 10%
4. Persulfat amònic (APS) 10%
5. TEMED

#### 25. LSB (Tampó de càrrega de Laemmli) 4X.

#### 26. Tampó d'electroforesis 1X:

1. 100 mL tampó electroforesis 10X<sup>16</sup>
2. 900 mL aigua destil·lada

#### 27. Marcador pes molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder de Termofisher)

#### 28. Isopropanol

### Procediment:

1. Preparació de les mostres: s'afegeix la quantitat de proteïnes que és desitgi valorar, tenint en compte el volum final que pot entrar en el pou del gel concentrador. En aquest treball, carregat com a màxim 30 µL de mostra en una pinta de 10 pous de 1.5 mm de gruix. S'afegeix el LSB 4X (tenint en compte que la concentració final del tampó de càrrega, LSB, ha de ser 1X en aquest treball sempre s'han carregat 7.5 µL de LSB 4X). S'afegeix H<sub>2</sub>O destil·lada fins a tenir un volum final de 30 µL. S'escalfen les mostres a 90°C durant 5 minuts i se'ls hi fa un pols.
2. Polimerització dels gels: és preparen els vidres en el sistema d'electroforesis. Preparem la mescla del gel separador, el TEMED ha de ser l'últim reactiu ha ser afegit a la mescla, ja que és tracta del catalitzador de la reacció de polimerització. La solució preparada s'afegeix als vidres fins a ocupar ¾ parts del espai, seguidament és pot aplicar una fina capa de isopropanol per tal d'eliminar les bombolles i evitar que l'oxigen inhibeixi la polimerització. Esperem uns 15 minuts, durant aquest temps podem preparar la solució del gel separador. Un cop s'ha polimeritzat és decanta el isopropanol i s'afegeix el gel concentrador, immediatament s'ha de col·locar la pinta, ja que si no els pous no és formaran correctament.
3. Electroforesis: un cop s'han preparat les mostres i els gels s'han polimeritzat, s'omple una cubeta amb el tampó d'electroforesis 1X, i és col·loquen els gels al sistema i seguidament és

---

<sup>16</sup> Tampó d'electroforesi 10x: Tris-base 250 mM; glicina 1.9 M; SDS 1%.



submergeixen. En aquest punt ja estem llestos per carregar les mostres i els marcadors de pes molecular (10  $\mu$ L). És col·loca la tapa amb els elèctrodes i és connecta a la font d'alimentació. Inicialment fixem una velocitat de 100V fins que les proteïnes arribin al gel concentrador, un cop s'hagi format l'únic front augmentem a 150V. La duració de la electroforesis varia en funció de les proteïnes que vulguem separar, si es tracta de proteïnes que és troben molt conjuntament s'hauria de pensar en deixar la separació durant més temps. La duració habitual és de 1-2 hores. Finalment és separen els vidres i és procedeix a la transferència.

## Protocol Western Blot

### Transferència

#### **Materials i reactius:**

29. Membrana PVDF (Immobilon<sup>TM</sup>-P; Millipore, IPVH00010)
30. Paper Whatmann 3MM
31. Metanol
32. H<sub>2</sub>O destil·lada
33. Pinces
34. Sistema Sandwich
35. Tampó de transferència<sup>17</sup>

#### **Procediment:**

1. És talla un tros de la membrana de la mateixa mida que el gel i s'activa amb metanol per una correcta transferència, després la membrana ha de ser deshidratada amb aigua destil·lada
2. És tallen dos papers Whatmann de la mateixa mida que el gel
3. S'utilitza una safata amb tampó d'electroforesis per realitzar el muntatge del Sandwich, ja que la membrana no és pot deixar assecar
4. Sobre la part negra del sistema si fica una esponja de color negra, un paper Whatmann i el gel. Un cop la membrana s'ha deshidratat sobre el gel és fica la membrana
5. S'afegeix el segon paper Whatmann sobre la membrana i seguidament l'esponja blanca, que estarà en contacte amb la part blanca del sistema

És molt important que no es formin bombolles sobre la membrana, ja que aquestes impedeixen la correcta transferència de les proteïnes

6. És tenca el sistema i és col·loca dins d'una cubeta amb tampó de transferència, orientat de manera que les proteïnes migren del gel a la membrana
7. Ficar gel per evitar que s'escalfin les proteïnes
8. Aplicar corrent de 250 mA durant 90'
9. És desmunta evitant que la membrana s'assequi

---

<sup>17</sup> Tampó de transferència: Tris-Base 25 mM a pH 8.3, glicina 192 mM i metanol al 20%

## Protocol Immunodetecció

### Material i reactius:

36. Solució de bloqueig: varia en funció del anticòs primari, en aquest treball s'ha utilitzat llet descremada al 5% en PBS 1X
37. Solució d'anticòs primari
38. Tampó de rentat: PBS 1X + Tween al 0,1%
39. Solució d'anticòs secundari. Els anticossos secundaris utilitzats són anticossos comercials conjugats amb HRP de diferents cases comercials
40. Reactiu ECL(*Enhanced Chemiluminescence*, #RPN 2209, Amersham): permet la detecció dels anticossos conjugats amb HRP, ja que la peroxidasa catalitza una reacció química que produeix llum.
41. Films per revelar (Fujifilm)

### Procediment:

1. Bloqueig de les membranes amb llet desnatada al 5% en PBS 1X. 60' a temperatura ambient
2. Incubació de la membrana amb l'anticòs primari específic contra la proteïna d'interès. ON<sup>18</sup> a 4°C
3. 3 rentats de 10' amb PBS 1X + Tween al 0.1%
4. Incubació de la membrana amb l'anticòs secundari adequat conjugat amb HRP. 60' a temperatura ambient
5. 3 rentats de 10' amb PBS 1X + Tween al 0.1%
6. Detecció de l'activitat enzimàtica amb el sistema ECL

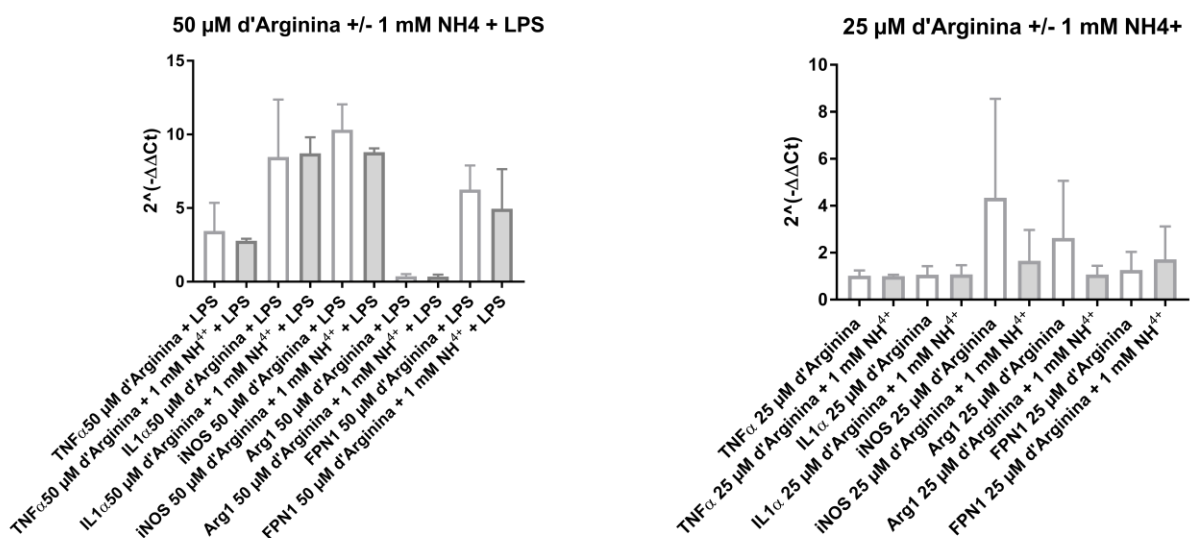
Anticòs	Detecció Kb	Dilució primari	Tipus de secundari	Dilució secundari
$\beta$ -Actin	42	1:10000 (1 % llet)	Mouse - HRP	1:10000
FPN1	62	1:10000 (5 % llet)	Rabbit - HRP	1:10000
Nrf2	68	1:2500 (1 % llet)	Rabbit - HRP	1:10000
$\gamma$ <sup>+</sup> LAT1	142	1:1000 (5 % llet)	Rabbit - HRP	1:5000
$\gamma$ <sup>+</sup> LAT2	120	1:1000	Rabbit - HRP	1:5000

Taula 2. Llistat d'anticossos amb les seves corresponents dilucions utilitzats.

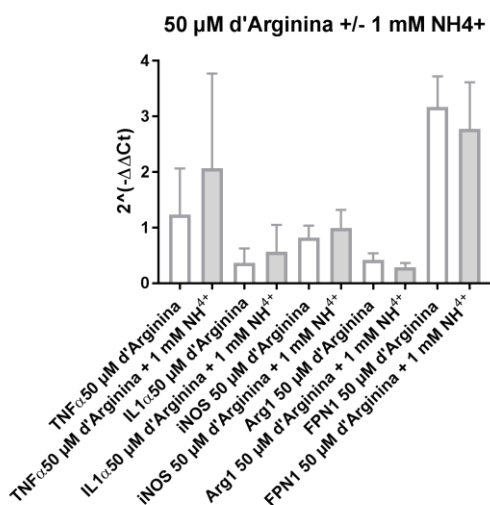
---

<sup>18</sup> Overnight.

## *Apèndix II*



**Figura S2.1.** Nivells d'expressió en presència o absència de NH<sup>4+</sup> i +/- LPS. Cèl·lules procedents de medul·la òssia es van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF. Posteriorment van ser estimulades amb 50 μM o 25 μM d'arginina, amb presència o absència de 1 mM NH<sup>4+</sup> i +/- 100 ng/mL de LPS. Les quantitats relatives de cada gen ( $2^{-\Delta CT} = 2^{(CT_{bactin} - CT_{Gen})}$ ) es van calcular a partir dels valors de CT corregits. N=2 (Ratolins Slc7a7<sup>+/+</sup>).



**Figura S2.3.** Nivells d'expressió en presència o absència de NH<sup>4+</sup> en BMDM. Cèl·lules procedents de medul·la òssia es van cultivar durant 7 dies en presència de M-CSF. Posteriorment van ser estimulades amb 50 μM d'arginina, amb presència o absència de 1 mM NH<sup>4+</sup>. Les quantitats relatives de cada gen ( $2^{-\Delta CT} = 2^{(CT_{bactin} - CT_{Gen})}$ ) es van calcular a partir dels valors de CT corregits. N=3 (Ratolins Slc7a7<sup>-/-</sup>).