



**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**  
**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Generación y caracterización de  
nuevas herramientas moleculares para  
estudiar el tráfico hacia la membrana  
plasmática del canal iónico TRPA1**

**Autor: Eduardo Abenza Severá**

**Tutores: Laura Almaraz Gómez, Félix Viana de la Iglesia y  
Jorge Fernández Trillo**

**Curso académico: 2019 – 2020**

## **RESUMEN**

El canal iónico TRPA1, debido a su expresión en nociceptores y su implicación en distintos procesos inflamatorios, representa una potencial diana terapéutica en el tratamiento del dolor crónico. El conocimiento de los mecanismos que regulan su tráfico y expresión en la membrana plasmática es todavía limitado. Una mejor comprensión de estos procesos es de gran interés, ya que podría abrir el camino al desarrollo de nuevas terapias basadas en la manipulación de su expresión. En este trabajo se han diseñado y generado nuevas herramientas moleculares que permiten estudiar el tráfico de TRPA1. En concreto, se han generado cuatro plásmidos que codifican proteínas quiméricas con el canal iónico fusionado a una proteína fluorescente (turboGFP) o una etiqueta química (SNAP). Mediante experimentos de imagen de calcio se ha confirmado la funcionalidad de tres de las construcciones generadas: tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP.

## **ABSTRACT**

The TRPA1 ion channel, due to its expression in nociceptors and its role in multiple inflammatory processes, represents a potential therapeutic target in chronic pain treatment. Knowledge of the mechanisms underlying the regulation of its traffic and expression in the plasma membrane is still limited. A better understanding of these processes is of big interest, because it might lead the way to new therapies based on TRPA1 expression manipulation. In this work, new molecular tools which allow the study of TRPA1 traffic have been designed and generated. Concretely, we have generated four plasmids which encode chimeric proteins with the ion channel fused to a fluorescent protein (turboGFP) or a chemical tag (SNAP). Calcium imaging experiments have confirmed the functionality of three of these proteins: tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 and hTRPA1-SNAP.

**Palabras clave:** dolor crónico, nociceptor, canal iónico TRPA1, turboGFP, SNAP, fluorescencia, imagen de calcio.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y GLOSARIO

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>NEB</b>	New England Biolabs
<b>AITC</b>	Alil-isotiocianato	<b>pb</b>	Pares de bases
<b>Cch</b>	Carbacol	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>Células HEK293</b>	Células embrionarias de riñón humano 293	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>CMV</b>	Citomegalovirus	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco	<b>S1R</b>	Receptor Sigma 1
<b>hTRPA1</b>	Proteína TRPA1 humana	<b>tGFP</b>	turboGFP

**ADN molde:** molécula de ADN empleada en una PCR porque contiene la secuencia a amplificar.

**Cebador (“primer”):** oligonucleótido monocatenario que hibrida de forma específica con una de las dos hebras de ADN de la región que se pretende amplificar en una PCR o secuenciar.

**Complejo SNARE:** conjunto de proteínas importante en la exocitosis de vesículas en los terminales sinápticos, que es bloqueado por las toxinas botulínica y tetánica.

**Diana de restricción:** secuencia de ácido nucleico reconocida por una endonucleasa, evento que permite que esta escinda el ADN o ARN. En este trabajo, todas las endonucleasas empleadas cortan ADN y lo hacen dentro de su diana de restricción.

**HBSS:** *solución salina balanceada de Hanks*; compuesta por sales inorgánicas, suplementada con glucosa y tamponada con fosfato a pH fisiológico. Puede ser empleada para el lavado de células.

**Medio LB:** *medio Luria-Bertani*; el más utilizado para el cultivo y crecimiento de bacterias, contiene los nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo de la mayoría de microorganismos.

**Metodología SNAP-tag:** técnica gracias a la cual la proteína SNAP escinde su sustrato fluorescente (en este trabajo, SNAP-Cell® 505-Star o SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647) y queda marcada covalentemente con el fluoróforo escindido como resultado.

**Plásmido:** molécula de ADN circular extracromosómico de replicación autónoma, presentes principalmente en bacterias. En este trabajo, estas moléculas de ADN han resultado útiles para la expresión de las proteínas quiméricas en células HEK293, permitiendo su estudio.

**Protein Data Bank:** base de datos que contiene estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos.

**Proteína AGT:** *O6-alquilguanosina-alquiltransferasa*; proteína humana involucrada en la reparación del ADN, encargada de la desalquilación de O6-alquildesoxiguanosinas.

**Proteína CLOVER:** proteína de fluorescencia constitutiva verde o amarilla, procedente de la medusa *Aequorea victoria*.

**Proteína quimérica o de fusión:** proteína producida por la traducción conjunta de dos o más genes previamente independientes.

**Proteína SNAP:** producto de la evolución in vitro de la proteína AGT humana, resulta útil su marcaje covalente con fluoróforos u otras moléculas con la metodología SNAP-tag (Lukinavicius et al., 2015).

**PyMOL:** sistema de visualización molecular de código abierto programado en Python, que puede producir imágenes 3D de pequeñas o incluso grandes moléculas como proteínas.

**Secuencia Kozak:** secuencia en el ARNm que facilita el reconocimiento del codón de iniciación (AUG) durante el proceso de traducción en los eucariontes.

**Tampón electrolito TAE:** disolución tampón ampliamente utilizada en electroforesis en gel de agarosa, compuesta por Tris, acetato y EDTA.

## **ÍNDICE DE MATERIAS**

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Dolor y nocicepción.....	5
1.2. Familia de canales iónicos TRP .....	7
1.3. El canal iónico TRPA1 .....	9
1.3.1. Expresión de TRPA1 .....	9
1.3.2. Estructura de TRPA1.....	9
1.3.3. Papel fisiológico de TRPA1 .....	11
1.3.4. Tráfico de TRPA1 .....	13
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
3.1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	15
3.2. Amplificaciones por PCR .....	16
3.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	16
3.4. Construcción de los plásmidos.....	17
3.4.1. tGFP-hTRPA1 .....	17
3.4.2. SNAP-hTRPA1 .....	18
3.4.3. hTRPA1-SNAP .....	18
3.4.4. hTRPA1-SNAP-EC.....	19
3.4.5. Transformación de bacterias competentes .....	19
3.5. Cultivo y transfección de líneas celulares de mamífero.....	20
3.5.1. Cultivo celular.....	20
3.5.2. Transfección.....	20
3.6. Marcaje con SNAP-Cell® 505-Star y SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647 .....	21
3.7. Fijado y montaje de células transfectadas.....	21
3.8. Experimentos de imagen de fluorescencia de Ca <sup>2+</sup> .....	22
4. RESULTADOS .....	23
4.1. La secuencia de tGFP-hTRPA1 es la esperada .....	23
4.2. Se obtiene con éxito la construcción SNAP-hTRPA1 .....	25
4.3. Es correcta la secuencia de la construcción hTRPA1-SNAP .....	27

4.4. Se confirma la integridad de la construcción hTRPA1-SNAP-EC .....	28
4.5. Fluorescencia de las células transfectadas con los cuatro plásmidos generados.....	31
4.6. Las proteínas codificadas por los plásmidos tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP son funcionales .....	32
5. DISCUSIÓN.....	34
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA .....	36
7. AGRADECIMIENTOS .....	36
8. BIBLIOGRAFÍA.....	37

## **ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados .....	15
Tabla 2. Sumario de los resultados obtenidos en los experimentos de imagen de calcio .....	34
Figura 1. Árbol filogenético de los canales TRP humanos .....	7
Figura 2. Canales ThermoTRP .....	8
Figura 3. Estructura tridimensional del canal TRPA1 .....	10
Figura 4. Detalles en la estructura de TRPA1 resuelta por Paulsen et al., 2015.....	11
Figura 5. Esquema del producto de PCR esperado para la construcción tGFP-hTRPA1 .....	23
Figura 6. Gel de agarosa de la digestión control de tGFP-hTRPA1 .....	24
Figura 7. Mapa del plásmido tGFP-hTRPA1 .....	24
Figura 8. Esquema del producto de PCR esperado para la construcción SNAP-hTRPA1 .....	25
Figura 9. Gel de agarosa de la digestión control de SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP .....	26
Figura 10. Mapa del plásmido SNAP-hTRPA1 .....	26
Figura 11. Esquema del producto de PCR esperado para la construcción hTRPA1-SNAP .....	27
Figura 12. Mapa del plásmido hTRPA1-SNAP .....	28
Figura 13. Esquema de los cebadores empleados para la primera fase de la construcción hTRPA1- SNAP-EC y el producto de PCR esperado .....	29
Figura 14. Esquema de los cebadores empleados para la segunda fase de la construcción hTRPA1- SNAP-EC y el producto de PCR esperado .....	30
Figura 15. Mapa del plásmido hTRPA1-SNAP-EC .....	30
Figura 16. Detección de fluorescencia verde de las proteínas de fusión SNAP-hTRPA1 y hTRPA1- SNAP tras el marcaje con el sustrato SNAP-Cell® 505-Star .....	31
Figura 17. Imágenes del campo del microscopio en experimentos de imagen de calcio .....	32
Figura 18. Resultados de los experimentos de imagen de fluorescencia de calcio .....	33

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Dolor y nocicepción**

Cada individuo percibe el dolor de manera diferente, por lo que este es un término difícil de definir. En palabras de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), «el dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de este». Atendiendo a esta definición, comprendemos que el dolor es una percepción con un componente altamente subjetivo que no debemos confundir con la nocicepción. Según el mismo organismo citado previamente, esta última se refiere a los «procesos neurales de codificación y procesamiento de eventos que producen o pueden producir un daño tisular» (Loeser y Treede, 2008). En otras palabras: mientras que el dolor está ligado a la percepción y al sufrimiento, la nocicepción lo está al estímulo nocivo y a la discriminación sensorial de este (Treede, 2018).

Una vez ha quedado clara la diferencia entre dolor y nocicepción, es conveniente repasar cómo los mamíferos llevan a cabo el proceso de nocicepción. Las neuronas sensoriales primarias son las encargadas de conectar el sistema nervioso central del individuo con el medio que le rodea, tanto el externo (ambiente) como el interno (órganos inervados como el corazón, el estómago o los pulmones). Estas células especializadas son capaces de detectar cambios en una gran cantidad de parámetros del medio, como la temperatura, la presión o la concentración de moléculas químicas e iones, que actúan como estímulos para las mismas. La transformación de este estímulo físico o químico en una señal eléctrica neural se denomina transducción sensorial.

Los estímulos potencialmente dañinos son detectados por una subpoblación especializada de neuronas sensoriales primarias denominados nociceptores, término acuñado por el fisiólogo británico Charles Sherrington. Se encuentran en las terminaciones de las fibras nerviosas aferentes primarias presentes en la periferia, las cuales expresan moléculas receptoras como los canales TRP. Estas fibras nerviosas hacen llegar la información a otras neuronas secundarias en el asta dorsal de la médula espinal, que a su vez la transmiten al cerebro a través de circuitos neuronales ascendentes. Este órgano es el que interpreta la sensación de dolor y decide de qué manera actúa el organismo (Julius, 2013).

Los nociceptores se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios. En función de la velocidad de conducción de sus axones, los nociceptores se clasifican como fibras A $\delta$  y fibras C (Viana, 2006). Las fibras C no están mielinizadas, tienen un pequeño diámetro y conducen la señal nociceptora a baja velocidad. Estos son nociceptores polimodales ya que responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos, los cuales evocan sensaciones de dolor quemante y de mayor latencia. Por otro lado, las fibras A $\delta$  están envueltas por vainas de

mielina, tienen un diámetro mayor y conducen rápidamente la señal nociceptora, que es de corta latencia y precisa de respuestas rápidas. Estos nociceptores median el dolor de inicio rápido, que está asociado a un dolor de tipo punzante.

También se ha clasificado el dolor de distintas maneras. Distinguimos entre dolor lento y rápido, dolor visceral y somático, dolor agudo y crónico, o dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático. Para la comprensión de los apartados que siguen es conveniente recordar la diferencia entre dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático, y entre dolor agudo y crónico.

El dolor nociceptivo es provocado cuando los nociceptores situados en el sistema nervioso periférico detectan algún tipo de estímulo nocivo. Tiene una función protectora y permiten al individuo ser consciente de posibles daños. En situaciones patológicas, este dolor puede ser provocado ante un estímulo que normalmente es inocuo (alodinia) o en forma de una respuesta exagerada ante un estímulo nocivo que en condiciones normales provocaría un dolor menor (hiperalgesia). El dolor inflamatorio se da cuando un tejido sufre una lesión y la respuesta inflamatoria ocasionada sensibiliza a los nociceptores disminuyendo su umbral de activación. Este tipo de dolor suele ser reversible y algunos ejemplos son el dolor postquirúrgico o la artritis. El tercer tipo de dolor, el neuropático, surge a partir de una lesión del sistema somatosensorial y está provocado por múltiples mecanismos que no siempre son conocidos (Patapoutian et al., 2009).

Por último, merece la pena explicar la diferencia entre dolor agudo y crónico (Grichnik y Ferrante, 1991). El dolor agudo es provocado por una enfermedad o lesión específica y tiene un propósito biológico útil. Por su parte, el dolor crónico es un tipo de dolor que se prolonga en el tiempo más allá del tiempo normal de cura, en el caso de que esté asociado con una enfermedad o lesión. Se suele clasificar como tal si su duración es mayor de tres meses, y no parece tener una finalidad biológica útil ni tiene un final reconocible. Desde el punto de vista clínico ambos suponen un problema, si bien el dolor crónico tiene una mayor relevancia. Mientras que el tratamiento del dolor agudo habitualmente se dirige hacia la causa de este y la interrupción de las señales nociceptivas, la terapia para el dolor crónico debe tener un enfoque multidisciplinar y comprender más de una modalidad terapéutica.

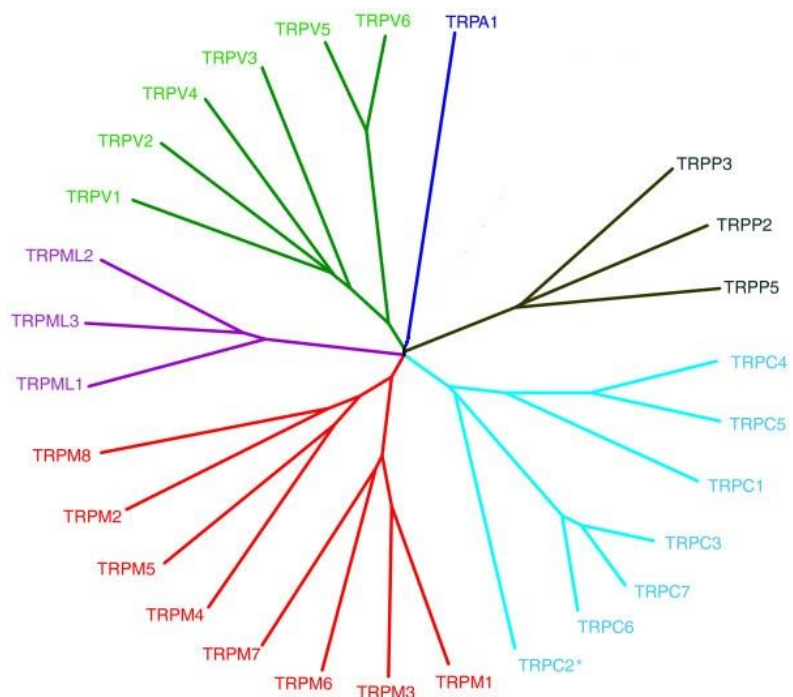
## 1.2. Familia de canales iónicos TRP

Los canales iónicos pertenecientes a la familia TRP (Transient Receptor Potential) son proteínas de membrana tetraméricas que tienen en común la permeabilidad a cationes de un modo no selectivo y la presencia de un dominio transmembrana formado por seis hélices- $\alpha$  antiparalelas en cada subunidad del tetrámero. No obstante, cada canal tiene un mecanismo de activación específico y puede ser activado a través de más de un mecanismo.

Como se muestra en la figura 1, las proteínas de la familia TRP se dividen en seis grupos: TRPA (ankyrin), TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPML (mucolipin), TRPP (polycystin) y TRPV (vanilloid). La secuencia y la estructura tridimensional de las proteínas de esta familia pueden ser muy dispares, pero todas están compuestas por cuatro subunidades que se ensamblan funcionalmente en forma de homo o heterotetrámeros (Moran, 2018).

Estos canales están presentes en todas las membranas celulares. La mayoría se localizan en la membrana plasmática y juegan un papel esencial en el paso de cationes a través de esta. Puesto que son canales iónicos no selectivos, permiten el paso de distintos cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y otros iones metálicos a su través. Su función a menudo está modulada por su asociación con proteínas accesorias y mediante formación de complejos con diferentes proteínas señalizadoras (Nilius y Owsianik, 2011).

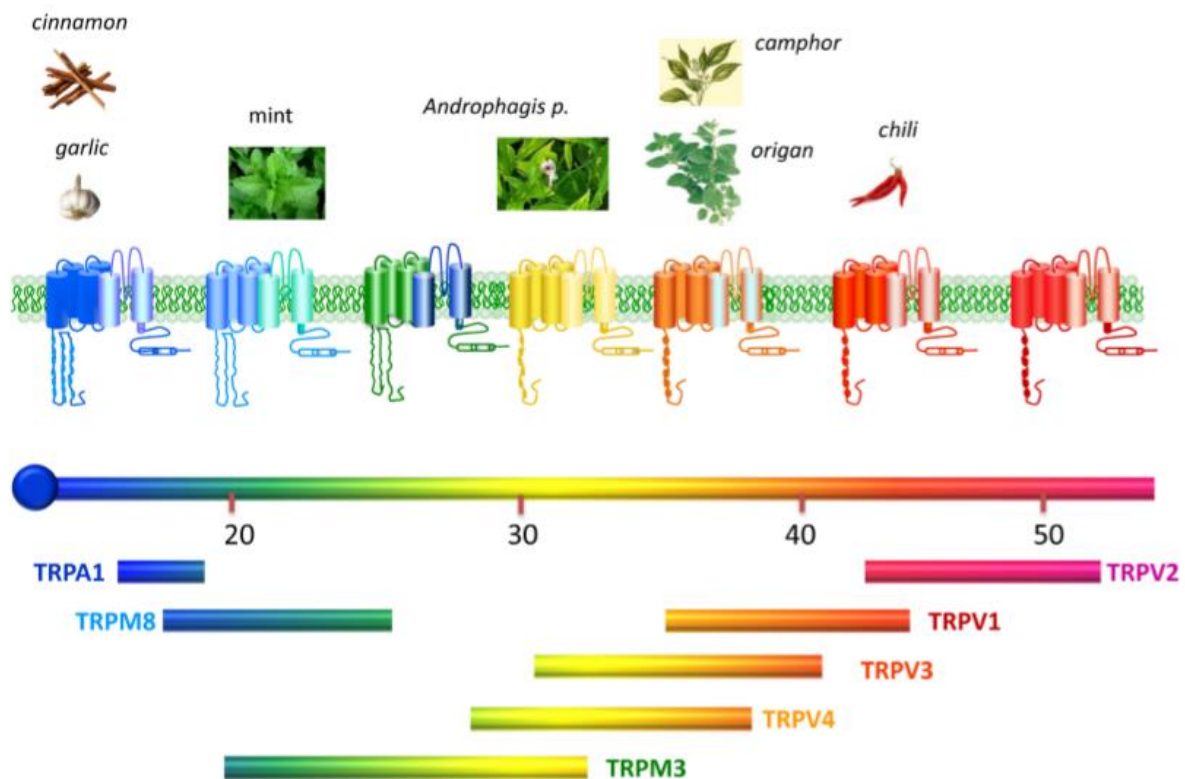
Las proteínas pertenecientes a esta familia son capaces de responder a una amplia variedad de señales sensoriales: los cambios de pH u osmolaridad, los estímulos mecánicos, las feromonas, algunas citoquinas, diversas moléculas volátiles o cambios de temperatura. Los llamados ThermoTRP (Figura 2),



**Figura 1. Árbol filogenético de los canales TRP humanos.** El análisis de homología de secuencias aminoacídicas muestra los seis grupos en los que se dividen los canales TRP presentes en humanos, en distintos colores. TRPC2 es un pseudogen en humanos. La distancia que separa dos proteínas es proporcional al número de aminoácidos que difieren entre ambas (Figura modificada de Nilius y Owsianik, 2011).



miembros de TRPV (V1 a V4), TRPM (M2, M3, M5 y M8) y TRPA (A1) son activados por este último estímulo, haciendo posible que el individuo sienta desde frío nocivo hasta calor extremo (Ferrer-Montiel et al., 2012).



**Figura 2. Canales TermotRP.** Se muestra el esquema de la subunidad que compone cada canal TermotRP (con la excepción de TRPM2 y TRPM5): seis dominios transmembrana (S1-S6), el bucle hidrofóbico del poro entre S5 y S6 y grandes regiones N y C-terminal que en la imagen no aparecen a escala. Aparecen también algunos activadores químicos de los distintos canales y los rangos de temperatura a los que se activa cada uno de ellos (Figura de Ferrándiz-Huertas et al., 2014).

El balance entre procesos de exocitosis y endocitosis define la expresión en la superficie celular de los canales TermotRP. La modulación de su expresión representa un mecanismo celular fundamental implicado en la patofisiología de estos canales iónicos. Se ha escrito sobre la contribución de su exocitosis regulada en la sensibilización inflamatoria aguda de neuronas sensoriales, pero todavía se desconocen los componentes moleculares que permiten el tráfico de estos canales hacia la membrana plasmática, el tipo de vesículas empleadas para este tráfico o el mecanismo molecular que media la endocitosis de estas proteínas (Ferrándiz-Huertas et al., 2014).

El estudio de los canales iónicos TRP ha contribuido en la resolución de diferentes controversias relacionadas con el dolor y han proporcionado un marco a nivel molecular para entender los mecanismos periféricos implicados en la detección de estímulos o la sensibilización provocada por una lesión (Julius, 2013).

### **1.3. El canal iónico TRPA1**

La proteína TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin subtype 1) es un canal catiónico no selectivo permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que tiene un papel principal en la nocicepción. Esta proteína fue clonada y caracterizada funcionalmente por primera vez en 2003 por Story et al. en células de ovario de hámster chino a partir de ganglios trigéminos de ratones adultos. El gen humano que codifica esta proteína contiene 27 exones y está localizado en el cromosoma 8. En el reino animal tiene múltiples homólogos, entre los cuales se ha conservado su habilidad para detectar electrófilos potencialmente dañinos (Zigmunt y Högestätt, 2014; Sinica et al., 2019).

#### **1.3.1. Expresión de TRPA1**

La expresión de este canal iónico varía considerablemente entre diferentes estudios, según la especie, edad de los animales, tipo celular, técnicas empleadas o condiciones experimentales. Por ello, la información sobre la expresión de esta proteína en neuronas nociceptivas es aún incompleta.

Este canal iónico se expresa principalmente en fibras nerviosas de los tipos A $\delta$  y C de los ganglios sensoriales trigémino, nodoso y raíz dorsal. En su mayor parte, TRPA1 se encuentra en una subpoblación de neuronas que también expresan TRPV1 (Story et al., 2003).

Dejando a un lado el tejido nervioso, también se encuentra en melanocitos, fibroblastos (donde fue descrito por primera vez este canal), odontoblastos, células enterocromafines o islotes pancreáticos. Recientemente se han descrito propiedades sensoriales en muchos de estos tipos celulares, que se comunican mediante señales químicas con las fibras nerviosas nociceptoras cercanas (Zigmunt y Högestätt, 2014; Meents et al., 2018).

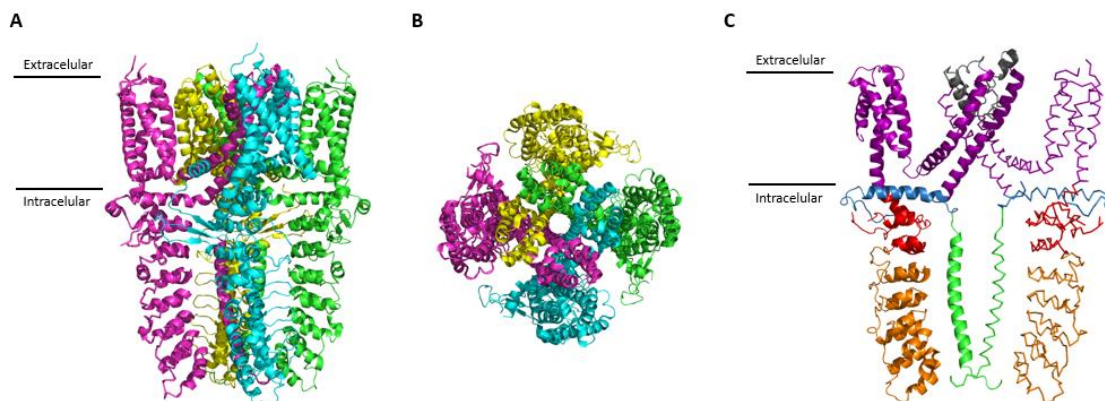
Finalmente, cabe reseñar que en ratones parece existir un aumento progresivo de TRPA1 durante el desarrollo, desde el nacimiento hasta la adultez (Hjerling-Leffler et al., 2007), y que su patrón de expresión puede cambiar drásticamente en condiciones patológicas, como ocurre en enfermedades inflamatorias y neuropáticas (Obata et al., 2005).

#### **1.3.2. Estructura de TRPA1**

TRPA1 es un canal catiónico no selectivo homotetramérico con una estructura tridimensional que ha sido resuelta por microscopía crioelectrónica (Paulsen et al., 2015; Suo et al., 2020). También puede encontrarse coensamblado principalmente con TRPV1, formando complejos funcionales capaces de responder a sus agonistas y antagonistas (Meents et al., 2018).

En cada monómero se pueden reconocer las siguientes regiones: un gran dominio N-terminal intracelular, un segmento denominado pre-S1, seis hélices transmembrana con el dominio del

poro entre la quinta y la sexta, una hélice intracelular denominada TRP-like y una larga hélice también intracelular cercana al extremo C-terminal (Figura 3).



**Figura 3. Estructura tridimensional del canal TRPA1.** **A.** Vista lateral. Las cuatro subunidades que forman el canal aparecen en colores distintos. **B.** Vista desde el exterior celular (estructura resuelta por Suo et al., 2020; código PDB: 6PQQ). **C.** Vista lateral de dos subunidades enfrentadas en el canal. Se muestran las regiones que se distinguen en colores distintos. En naranja la región N-terminal (que no se ha resuelto en su totalidad en estas estructuras tridimensionales), en rojo el dominio pre-S1, en morado el dominio transmembrana, en gris el dominio del poro, en azul el dominio TRP-like y en verde la estructura en hélice superenrollada en la región C-terminal (estructura resuelta por Paulsen et al., 2015; código PDB: 3J9P).

La región N-terminal es la parte más extensa, representando el 64% de la proteína, y es la que le da nombre, puesto que consta de un dominio de dieciséis repeticiones de ankirinas. Estos dominios son secuencias de 33 aminoácidos que forman una estructura de hélice-giro-hélice antiparalelas seguida por una horquilla- $\beta$ , y estas repeticiones están implicadas en interacciones proteína-proteína y formación de muelles moleculares (Sotomayor et al., 2005; Lee et al., 2006; Meents et al., 2018).

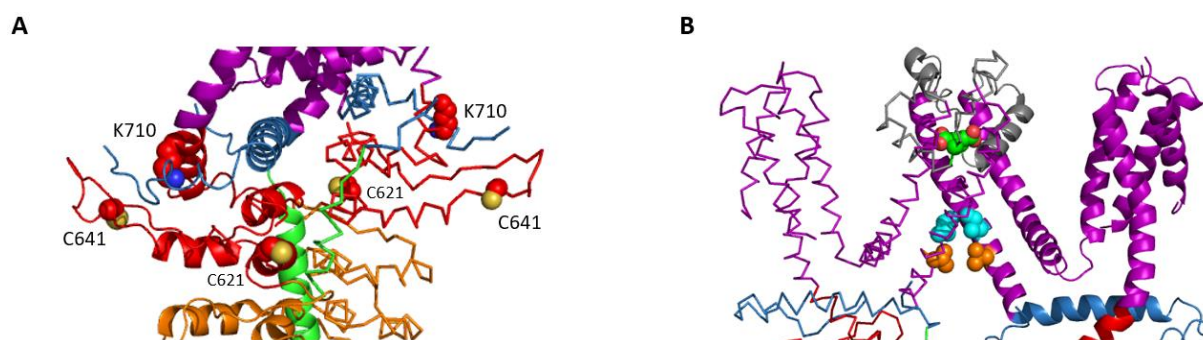
En cuanto al dominio pre-S1, se trata de la porción que conecta la región N-terminal con la primera hélice transmembrana. Consta de una hélice pre-S1 precedida por un conector, que está compuesto por dos motivos hélice-giro-hélice separados por dos hebras- $\beta$  antiparalelas. En esta región se localizan los principales residuos que contribuyen a la sensibilidad a electrófilos: C621, C641 y C665 en el conector y K710 en la hélice pre-S1 (Figura 4A).

A continuación, se encuentra el dominio transmembrana formado por seis hélices antiparalelas. En esta región se han descrito numerosas mutaciones que tienen diversos efectos en la actividad del canal. Entre las hélices transmembrana 5 y 6 se encuentra el dominio del poro, formado por dos pequeñas hélices, la segunda de ellas presentando aminoácidos con cargas negativas que podrían atraer cationes y alejar aniones de la boca del poro. El poro contiene dos compuertas (Figura 4B): la primera de ellas, más cercana al exterior

celular, está formada por aminoácidos con carga negativa (D915) mientras que la compuerta más cercana al interior celular está formada por aminoácidos hidrofóbicos (I957 y V961).

La región transmembrana es sucedida por la hélice- $\alpha$  intracelular TRP-like. Esta aparece directamente a continuación de la sexta hélice transmembrana, en el interior celular. Según los datos obtenidos por microscopía crioelectrónica (Figura 3C), este dominio se integra con el conector de pre-S1 a través de interacciones hidrofóbicas entre hélices- $\alpha$  apiladas y la formación de una lámina- $\beta$  de tres hebras, dos pertenecientes a pre-S1 y una a TRP-like. Además, este dominio también hace contacto con otras estructuras de la proteína, lo cual es consistente con el papel de lugar de modulación alostérica propuesto para los dominios TRP.

Finalmente, cercana a la región C-terminal se encuentra una estructura en forma de hélice superenrollada, debajo del poro por el que permean los iones. Esta región representa un lugar de interacción entre las cuatro regiones, dando lugar a una estructura con forma de tallo. En esta región del canal también se unen polifosfatos solubles, que han demostrado mantener la actividad del canal iónico en parches de membrana escindidos (Paulsen et al., 2015).



**Figura 4. Detalles en la estructura de TRPA1 resuelta por Paulsen et al., 2015.** **A.** Dominio pre-S1, se muestra la cadena lateral de algunos de los residuos que más contribuyen a la sensibilidad a electrófilos. **B.** Compuertas del poro. La cadena lateral de D915 aparece en color verde con sus átomos de oxígeno en rojo, la de I957 aparece en color cian y la de V961 aparece en color naranja.

### 1.3.3. Papel fisiológico de TRPA1

TRPA1 es un detector polimodal de señales de peligro. Se trata de un nocisensor químico promiscuo que también parece estar involucrado en la sensación de frío nocivo, de estímulos mecánicos, de picor y en otros aspectos fisiológicos (Viana, 2016).

Como nocisensor, sabemos que TRPA1 es activado por un gran número de compuestos (Zigmunt y Högestätt, 2014). Estos poseen diferentes estructuras químicas y es su reactividad química lo que los une: la mayoría son electrófilos fuertes capaces de formar aductos covalentes reversibles con grupos tiol de cisteínas libres. Merece la pena resaltar que estas modificaciones covalentes de la proteína pueden llevar a la desensibilización del canal iónico.

Otros compuestos, sin embargo, pueden activar a esta proteína sin formar ningún enlace covalente con ella. En un estudio reciente, se ha descrito la base molecular para el reconocimiento de electrófilos por C621, así como la mecánica de los cambios estructurales dependientes de estos electrófilos (Suo et al., 2020). Los agonistas de TRPA1 se encuentran de manera natural en plantas picantes, como el wasabi y la mostaza (AITC) o el ajo (alicina), y en sustancias producidas por muchos organismos para defenderse de sus depredadores, aunque también pueden tener un origen industrial (Viana, 2016).

Esta promiscuidad permite a TRPA1 ser un sensor de señales de peligro como el estrés celular y la inflamación. Las especies reactivas del oxígeno y las especies reactivas del nitrógeno juegan un papel esencial en la iniciación, mediación y regulación del estrés oxidativo celular, como productos secundarios del metabolismo aeróbico, y son capaces de activar TRPA1. Otras moléculas liberadas a partir de la inflamación o lesión de un tejido también lo son, como el producto de la peroxidación de lípidos 4-hidroxinonenal (Trevisani et al., 2007).

TRPA1 también juega un papel importante en la respuesta inmune innata del individuo (Viana, 2016). Ante una infección bacteriana, las neuronas que expresan TRPA1 son activadas y provocan dolor e inflamación. Se ha demostrado que esta activación se puede producir de manera indirecta a través de la activación de TRPA1 por el lipopolisacárido, un producto secundario tóxico de la lisis bacteriana (Meseguer et al., 2014). Además, es posible que esta activación pueda darse también de manera directa, ya que se ha encontrado activación directa de nociceptores por productos bacterianos como péptidos N-formilados (Chiu et al., 2013).

Por otra parte, hay evidencias que sugieren un papel relevante de TRPA1 en el picor independiente de histamina. Esto es así porque las proteínas MrgprA3 y MrgprC11, mediadoras de este tipo de picor, necesitan la acción de TRPA1 para ser activadas por los pruritógenos cloroquina y BAM8-22 (Wilson et al., 2011; Liu y Ji, 2012).

Según algunos estudios, este canal iónico también está implicado en la sensación de frío y de estímulos mecánicos, según la condición en que se encuentra el tejido periférico. En condiciones fisiológicas, la inhibición o ablación de neuronas latentes expresando TRPA1 apenas tiene influencia en la sensación de frío (Chen et al., 2011); de manera similar, tras el tratamiento con un inhibidor de TRPA1 tampoco se observa un déficit en la nocicepción aguda de estímulos mecánicos en ratones. No obstante, la implicación de TRPA1 en la alodinia al frío y a estímulos mecánicos parece clara en condiciones de inflamación o de neuropatía inducida por oxaliplatino o paclitaxel, agentes empleados como quimioterapéuticos (Obata et al., 2005; Petrus et al., 2007; Trevisani et al., 2013).

Se conoce que las variaciones en el gen que codifica TRPA1 pueden alterar la percepción del dolor en humanos. En concreto, la mutación puntual N855S altera las propiedades biofísicas

del canal iónico, propiciando la aparición del síndrome de dolor episódico familiar. Este trastorno neuropático periférico, de herencia autosómica dominante, está caracterizado por episodios de dolor debilitante en la parte superior del cuerpo, que son disparados por factores como el ayuno o el estrés físico (Kremeyer et al., 2010).

La literatura consultada sugiere que TRPA1 está involucrado en otras patologías (Basso y Altier, 2017). Algunos ejemplos son la neuropatía diabética periférica (Koivisto et al., 2013), la neuropatía traumática periférica (Obata et al., 2005; Eid et al., 2008), la osteoartritis (Moilanen et al., 2015), el dolor postquirúrgico (Sugiyama et al., 2017) o la migraña (Benemei et al., 2014). Por último, cabe mencionar que este canal iónico no solo participa en el dolor somático sino también en el visceral (Schwartz et al., 2013).

#### **1.3.4. Tráfico de TRPA1**

La densidad de canales iónicos activos en la superficie celular es un proceso dinámico. Su abundancia y su actividad dependen del balance entre su inserción y su recuperación desde la membrana plasmática.

Cada vez tenemos más información sobre el tráfico de diversos canales (Shah et al., 2010; Balse y Boycott, 2017). Sin embargo, aún se sabe poco acerca del tráfico de TRPA1 en particular, pese a que este conocimiento es clave para entender el papel de este canal en el dolor agudo y crónico.

A la vista de los experimentos publicados por Schmidt et al. en 2009, el comportamiento nocifensivo mediado por TRPA1 puede ser sensibilizado *in vivo*, ya sea activando la proteína quinasa A y la fosfolipasa C con sus correspondientes activadores o el propio canal TRPA1 con aceite de mostaza. Se observó también que estos estímulos incrementaron la superficie de la membrana plasmática *in vitro*, lo cual está relacionado con el aumento de la disponibilidad en membrana del canal TRPA1.

En la parte final de esta investigación, en ganglios de la raíz dorsal cultivados, trataron primero las células con la toxina tetánica y a continuación realizaron dos aplicaciones sucesivas de aceite de mostaza. Como aclaración, la toxina tetánica tiene como efecto la separación de las proteínas del complejo SNARE, que a su vez está implicado en procesos de fusión de membranas; de este modo, la toxina tetánica impide la fusión de membranas mediada por este complejo. Lo que observaron fue que la primera respuesta al aceite de mostaza fue normal, mientras que en la segunda hubo una atenuación en la respuesta de TRPA1.

Estos resultados sugieren que el incremento de la disponibilidad en membrana de TRPA1 tras suministrarle aceite de mostaza es, como mínimo, parcialmente dependiente de fusión de vesículas mediada por el complejo SNARE.

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Se conoce muy poco sobre los mecanismos que modulan el tráfico del canal TRPA1 hacia la membrana plasmática. Recientemente, el Grupo de Transducción Sensorial y Nocicepción del Instituto de Neurociencias de Alicante ha descubierto que una chaperona, el Receptor Sigma 1 (Hayashi, 2019), modifica la expresión de estos canales iónicos tanto en sistemas heterólogos como en neuronas. Para su estudio, en este grupo de investigación se han utilizado plásmidos que codifican las proteínas quiméricas CLOVER-hTRPA1 y hTRPA1-tGFP, que permiten etiquetar esta proteína humana con dos proteínas fluorescentes. En la primera construcción, la proteína fluorescente CLOVER está unida covalentemente con el extremo N-terminal de hTRPA1, mientras que en la segunda es la proteína fluorescente turboGFP (tGFP) quien está fusionada con el extremo C-terminal de la proteína humana. No obstante, puesto que los resultados obtenidos han sido distintos según la proteína de fusión empleada, es necesario el desarrollo de nuevas herramientas que proporcionen una visión más amplia de lo que sucede realmente a nivel molecular.

Con todo lo expuesto en el párrafo anterior, se plantea el objetivo general de este trabajo:

- Diseño y caracterización de nuevas herramientas moleculares que permitan marcar la proteína hTRPA1 con proteínas fluorescentes (tGFP) o etiquetas químicas (SNAP) para estudiar el tráfico hacia la membrana plasmática de este canal iónico.

Para lograr este objetivo general, es necesario alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Generación de plásmidos que codifiquen el canal hTRPA1 fusionado con ambos marcadores en diferentes localizaciones:
  - tGFP-hTRPA1, que codifica la proteína fluorescente verde turboGFP de *Pontellina plumata* (Shagin et al., 2004) en el extremo N-terminal de hTRPA1.
  - SNAP-hTRPA1, en el que la proteína SNAP es codificada en el extremo N-terminal de hTRPA1, que se encuentra en la región intracelular del canal iónico.
  - hTRPA1-SNAP, en el cual la proteína SNAP se sitúa en el extremo C-terminal de hTRPA1, que también se localiza en la porción intracelular de este canal.
  - hTRPA1-SNAP-EC, que codifica la proteína SNAP en un bucle extracelular del canal iónico, en el dominio transmembrana de este (Figura 3C).
- Expresión de estos plásmidos en células HEK293 y evaluación de su localización subcelular mediante técnicas de imagen fluorescente. Con este fin, para el marcaje fluorescente de las proteínas quiméricas con SNAP, se utilizaron los sustratos SNAP-Cell® 505-Star (las tres) y SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647 (hTRPA1-SNAP-EC).
- Análisis de la funcionalidad del canal hTRPA1 en células HEK293 expresando las distintas proteínas quiméricas a través de experimentos de imagen de calcio, evaluando la respuesta de este canal al agonista AITC.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

A lo largo de este trabajo se emplearon diversos oligonucleótidos sintetizados por la casa comercial Sigma-Aldrich. Su finalidad, denominación y secuencia aparecen recogidas en la tabla 1.

Finalidad	Nombre	Secuencias de los cebadores (5' → 3')
Generación de construcciones	tGA1-F	GCGACACCGGTACCATGGAGAGCGACGAGAGCGG
	tGA1-R	GGTCGAAGCTTGAACCTTTCTTCACCGGCAT
	SNA1-F	GACCTCCTGCAGGAATGAAGCGCAGCCTGAGGAAG
	SNA1-R	GTCTCGCGGCCCGCCTAAGGCTCAAGATGGTGTGTT
	A1SN-F	ACCTGGGCGCGCCACCATGAAGCGCAGCCTGAGGAAG
	A1SN-R	CTATGACCGGTAGGCTCAAGATGGTGTGTT
	SNEC-F	ATGACGGATCCGGTGGAAATGAACTAGTGAT
	SNEC-R	CTATGACCGGTACCTCCACTAGTTTCATTGATGAT
Secuenciación	CMV end F	CGGTAGGCGTGTACGGTGG
	TRPA1F 1	AAGGAGCTAAGCCATGTAAATCA
	TRPA1F 2	CAGCAACCTTATGGATTAAAAA
	TRPA1F 3	TTTTGCACCTTGCACTTCAC
	TRPA1F 4	TTGGGTATTGCAAAGAAGCG
	TRPA1F 5	AGAAGAAGCTGCCACTTTGG
	TRPA1R 1	CCATGCATTCTTTGGAACCT

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados.**

Para la construcción del plásmido con la proteína quimérica tGFP-hTRPA1 se emplearon los cebadores tGA1-F y tGA1-R, que en la secuencia de ADN hibridan con el extremo N-terminal y C-terminal de tGFP respectivamente y contienen dianas de restricción que permiten introducir el amplicón resultante aguas arriba de hTRPA1 en el vector utilizado (o lo que es lo mismo, antes del extremo 5' de la región codificante de esta proteína).

En el caso de SNAP-hTRPA1 se emplearon los cebadores SNA1-F y SNA1-R, que hibridan con el extremo N-terminal y C-terminal de hTRPA1, como también lo hacen los cebadores A1SN-F y A1SN-R utilizados para la construcción hTRPA1-SNAP. La diferencia entre estas dos últimas parejas de cebadores es que la primera contiene dianas de restricción que permiten introducir el amplicón aguas abajo de la región codificante de SNAP (es decir, después del extremo 3' de esta) en el vector pSNAPf mientras que las dianas de restricción presentes en la segunda pareja permiten introducir el amplicón aguas arriba de SNAP.



La construcción del plásmido con la proteína quimérica hTRPA1 con SNAP en la región extracelular del canal (hTRPA1-SNAP-EC) se realizó en dos fases. En la primera se emplearon los cebadores A1SN-F y SNEC-R, y en la segunda se utilizaron los cebadores SNEC-F y SNA1-R. El desarrollo de las cuatro construcciones aparece descrito más ampliamente en el apartado **3.4**.

Cuando se terminó cada construcción, los plásmidos obtenidos fueron secuenciados (GATC Service, Eurofins Genomics) en la región codificante de la proteína quimérica para evaluar su integridad. Los plásmidos con tGFP-hTRPA1 y SNAP-hTRPA1 se secuenciaron con los cebadores CMV end F y TRPA1R 1, el plásmido con hTRPA1-SNAP se secuenció solo en una dirección con el cebador TRPA1F 5 y el plásmido hTRPA1-SNAP-EC, al tratarse de una construcción más complicada, se secuenció con los cebadores TRPA1F 1, TRPA1F 2, TRPA1F 3, TRPA1F 4 y TRPA1F 5.

### **3.2. Amplificaciones por PCR**

Con el objetivo de construir las distintas proteínas quiméricas, en todos los casos se empleó como molde 277 ng del plásmido tGFP-hTRPA1, proporcionado por el laboratorio de Félix Viana, mientras que los cebadores empleados se añadieron a una concentración final de 1  $\mu$ M. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo con el kit KAPA Master Mix (Sigma-Aldrich), que contiene los cuatro nucleótidos, la polimerasa de ADN termoestable y el tampón de carga para electroforesis.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de pared fina de 0,2 ml utilizando un volumen final de 25  $\mu$ l por reacción, en un termociclador en el que se programó un total de 35 ciclos para la amplificación de la secuencia codificante de tGFP y 50 ciclos para la amplificación de la secuencia codificante de hTRPA1. Dado que la longitud de los cebadores empleados nunca fue menor de 30 nucleótidos, la temperatura de apareamiento (*annealing temperature*;  $T_m$ ) siempre se situó entre 65 y 69°C, ligeramente menor que la temperatura de elongación (72°C). La duración de la etapa de polimerización dependió del tamaño de la molécula que se pretendía amplificar, asumiéndose que la polimerasa de ADN utilizada habitualmente sintetiza ADN a razón de una kilobase por minuto. Se ha programado siempre una etapa final de 10 min a la misma temperatura que la etapa de elongación para permitir el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas protuberantes en 5´.

### **3.3. Electroforesis en geles de agarosa**

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa a distintas concentraciones, según correspondiera, con una relación masa/volumen entre 0,6 y 1,5 %. Estos geles fueron preparados a partir de la disolución de la cantidad correspondiente de agarosa en tampón

electrolito TAE en un microondas, en un volumen que dependió del número de muestras que se deseaba cargar en el gel. Se añadió RedSafe™ hasta una concentración de 1X mientras la disolución estaba aún caliente, y se vertió a continuación en un portageles para electroforesis, al cual previamente se le anclaron unos peines para la generación de 8 o 20 pocillos en el gel, en función del volumen. Se dejó enfriar la disolución hasta su solidificación, se extrajo el peine y se colocó el portageles en una cubeta horizontal para electroforesis que se rellenó con tampón de electroforesis 1x TAE.

Las muestras procedentes de PCR no necesitaron tampón de carga, ya que este estaba incluido en la mezcla de reacción de PCR, mientras que las muestras de ADN procedentes de minipreps fueron mezcladas con 2 µl de tampón de carga antes de ser cargadas en el gel. Cuando el objetivo de la electroforesis era averiguar el tamaño de las moléculas de ADN presentes en la muestra se añadieron 5 µl de cada muestra. Cuando lo que se pretendía era purificar el ADN de un tamaño concreto tras cortar la banda correspondiente, se añadió todo el volumen de la muestra en uno o varios pocillos en un volumen máximo de 25 µl por pocillo. Además, se reservaron pocillos en cada gel para cargar una alícuota del marcador de peso molecular a fin de inferir los tamaños aproximados de los fragmentos de ADN presentes en las muestras.

Se aplicó una corriente eléctrica a un voltaje constante de 70, 80 o 100 V, según el tamaño del ADN esperado, y el ADN migró hacia el polo positivo gracias a su carga negativa. Finalizada la electroforesis, se extrajo el portageles con el gel, y en un documentador de geles (Alphamager) se observó bajo luz ultravioleta y se fotografió para posteriormente estimar el tamaño de las moléculas obtenidas.

### **3.4. Construcción de los plásmidos**

En este trabajo se realizaron cuatro construcciones de la proteína TRPA1 humana fusionada con distintas proteínas fluorescentes o secuencias de unión a fluoróforos.

#### **3.4.1. tGFP-hTRPA1**

La región codificante de tGFP amplificada por PCR a partir del plásmido hTRPA1-tGFP y los cebadores tGA1-F y tGA1-R contiene en sus extremos 5' y 3' las dianas de restricción de las endonucleasas *AgeI* y *HindIII* respectivamente.

Se aisló el producto de PCR del tamaño deseado cortando la banda alrededor de 700 pb en un gel de electroforesis al 1,5% tras 37 minutos a 70 V empleando el kit GFX (GE Healthcare). Este fragmento de ADN y 2,8 µg del plásmido CLOVER-C2-hTRPA1 proporcionado por el laboratorio de Ana Gomis fueron digeridos con *AgeI* y *HindIII* (NEB) en presencia de buffer CutSmart 1x (NEB) a 37°C durante 2 horas. A continuación, se separó el vector y la región

codificante de CLOVER mediante electroforesis en gel de 1% agarosa durante 37 minutos a 70 V y se cortó la banda a 7300 pb correspondiente al vector. Se purificó el ADN de esta banda cortada y del amplicón digerido con el kit GFX, y se llevó a cabo la ligación de ambos fragmentos de ADN (40 ng del vector y 200 ng del inserto) empleando 0.5 µl de ADN ligasa T4 (TaKaRa) en presencia del buffer 1x indicado para el correcto funcionamiento de esta proteína (TaKaRa) durante 2 horas a temperatura ambiente.

### **3.4.2. SNAP-hTRPA1**

La región codificante de hTRPA1 amplificada por PCR a partir del plásmido hTRPA1-tGFP y los cebadores SNA1-F y SNA1-R contiene en sus extremos 5' y 3' las dianas de restricción de las endonucleasas *SbfI* y *NotI* respectivamente y un codón de stop final aguas arriba de la diana de *NotI*.

El producto de PCR y el vector pSNAPf (NEB) fueron digeridos cada uno con *SbfI* y *NotI* (NEB) en presencia de buffer CutSmart 1x (NEB) a 37°C durante tres horas. Se trató con fosfatasa alcalina (NEB) el vector digerido para evitar su recircularización y se llevó a cabo una electroforesis en gel de 0,7% agarosa para separar el producto de PCR digerido de otros artefactos que pudieran existir, cortando la banda entre 3000 y 4000 pb. Finalmente, se purificó el ADN de esta banda y del vector digerido con el kit GFX (GE Healthcare) y se llevó a cabo la ligación del producto de PCR y el vector (120 y 40 ng, respectivamente) empleando 0.5 µl de ADN ligasa T4 (TaKaRa) en presencia del buffer 1x indicado para el correcto funcionamiento de esta proteína (TaKaRa) durante 2 horas a temperatura ambiente.

### **3.4.3. hTRPA1-SNAP**

La región codificante de hTRPA1 fue amplificada por PCR a partir del plásmido hTRPA1-tGFP y los cebadores A1SN-F y A1SN-R contiene en sus extremos 5' y 3' las dianas de restricción de las endonucleasas *AscI* y *AgeI* respectivamente

El producto de PCR y el vector pSNAPf (NEB) fueron digeridos cada uno con *AscI* y *AgeI* (NEB) en presencia de buffer CutSmart 1x (NEB) a 37°C durante tres horas. Se trató con fosfatasa alcalina (NEB) el vector digerido para evitar su recircularización y se llevó a cabo una electroforesis en gel de 0,7% agarosa para separar el producto de PCR digerido de otros artefactos que pudieran existir, cortando la banda entre 3000 y 4000 pb. Posteriormente se purificó el ADN de esta banda y de la mezcla de reacción del vector con el kit GFX (GE Healthcare) y se llevó a cabo la ligación del producto de PCR y el vector (110 y 40 ng, respectivamente) empleando 0.5 µl de ADN ligasa T4 (TaKaRa) en presencia del buffer 1x indicado para el correcto funcionamiento de esta proteína (TaKaRa) durante 2 horas a temperatura ambiente.

#### 3.4.4. hTRPA1-SNAP-EC

La construcción de esta proteína quimérica fue llevada a cabo en dos pasos. Primero se introdujeron los 2268 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de hTRPA1 en el vector pSNAPf, entre el promotor de CMV y la secuencia codificante de SNAP. Este inserto contiene en sus extremos 5' y 3' las dianas de restricción de las endonucleasas de *AscI* y *AgeI* respectivamente. Tras comprobar que la introducción de este primer inserto en el vector había tenido éxito, se introdujo los nucleótidos desde el 2257 hasta el 3360 de la región codificante de hTRPA1 aguas abajo de la región codificante de SNAP. Este segundo inserto contiene las dianas de restricción de las endonucleasas *BamHI* y *NotI* en sus extremos 5' y 3' respectivamente, y un codón de stop aguas arriba de la diana de *NotI*.

En la primera fase, tras aislar el producto de PCR del tamaño deseado cortando la banda alrededor de 2300 pb en un gel de electroforesis al 0.7% tras una hora a 70 V, este y el vector pSNAPf (NEB) fueron digeridos cada uno con *AscI* y *AgeI* (ambas NEB) en presencia de buffer CutSmart 1x (NEB) a 37°C durante dos horas. Posteriormente se purificó el ADN de estas mezclas de reacción con el kit GFX (GE Healthcare) y se llevó a cabo la ligación del producto de PCR y el vector (120 y 40 ng, respectivamente) empleando 0.5 µl de ADN ligasa T4 (TaKaRa) en presencia del buffer 1x indicado para el correcto funcionamiento de esta proteína (TaKaRa) durante dos horas a temperatura ambiente.

A continuación, se transformaron bacterias competentes como se indica en **3.4.5** y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% durante una hora a 80 V para seguir adelante con el ADN plasmídico de una colonia que sí hubiera incorporado el inserto.

En la segunda fase, el segundo producto de PCR y el ADN plasmídico seleccionado en la fase anterior fueron digeridos cada uno con *BamHI* y *NotI* (ambas NEB) en presencia de buffer CutSmart 1x (NEB) a 37°C durante dos horas. Finalizada la digestión, se realizó una electroforesis durante 40 minutos a 80 V en gel de 1% agarosa para cortar la banda del producto de PCR digerido con el tamaño deseado, en torno a 1100 pb. Se purificó el ADN de esta banda cortada y el ADN plasmídico digerido con el kit GFX (GE Healthcare), y se llevó a cabo la ligación de ambos (40 ng del vector y 120 ng del inserto) empleando 0.5 µl de ADN ligasa T4 (TaKaRa) en presencia del buffer 1x indicado para el correcto funcionamiento de esta proteína (TaKaRa) durante dos horas a temperatura ambiente.

#### 3.4.5. Transformación de bacterias competentes

En todos los casos, tras la ligación final de vector e inserto, bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α fueron transformadas con los plásmidos correspondientes mediante choque térmico: 30 minutos en hielo, 90 segundos a 42°C y 2 minutos en hielo. Los clones resistentes

a kanamicina (construcción tGFP-hTRPA1) o ampicilina (el resto de las construcciones) fueron seleccionados en medio LB sólido suplementado con el antibiótico indicado a una concentración de 100 µg/ml y diez de ellos fueron transferidos a tubos con 5 ml de medio LB líquido suplementado con el mismo antibiótico (100 µg/ml también). En este medio crecieron a 37°C y 200 rpm hasta el día siguiente, cuando se purificó su ADN plasmídico con el kit NZYMiniprep (NZYTech), listo para secuenciar como se indica en la sección 3.1.

### **3.5. Cultivo y transfección de líneas celulares de mamífero**

#### **3.5.1. Cultivo celular**

Se mantuvieron células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) en 5 ml de medio DMEM con Glutamax, suplementado con suero fetal bovino al 10% y los antibióticos penicilina y estreptomycin al 1% (de ahora en adelante, medio DMEM completo o DMEMc), en un matraz para cultivo celular de 25 ml (Thermo Fisher Scientific). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un 80% de confluencia.

Cuando las células estuvieron suficientemente confluyentes, se retiró el medio DMEMc y se realizó un lavado con 3 ml de DMEM con Glutamax (sin suero fetal bovino ni antibióticos). A continuación, se levantaron las células con 1 ml de tripsina-EDTA al 0.25%, permaneciendo dos minutos en presencia de este medio. Transcurrido este tiempo, se añadió 3 ml de medio DMEMc al matraz y se pipeteó arriba y abajo varias veces para favorecer la dispersión de las células.

El siguiente paso fue transferir los 4 ml del matraz a un tubo Falcon de 10 ml y centrifugar a 1000 rpm durante cinco minutos, para descartar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de medio DMEMc. Finalmente, se añadieron 4,5 ml de medio DMEMc y 0.5 ml del contenido del tubo anterior a un nuevo matraz de cultivo celular de 25 ml.

#### **3.5.2. Transfección**

Las células HEK293 (en 100 µl de la suspensión del apartado 3.5.1) se sembraron en una placa de 24 pocillos (1.9 cm<sup>2</sup> cada uno) en presencia de medio DMEMc, en un volumen final de 500 µl por pocillo. Cuando alcanzaron aproximadamente un 60-70% de confluencia, estas células fueron transfectadas con la construcción correspondiente. Se empleó la construcción CLOVER2-hTRPA1 (laboratorio de Ana Gomis) como control positivo.

Previo a la transfección, se disolvió 1 µg de cada construcción de ADN que se deseaba transfectar en 50 µl de OPTImem (Thermo Fisher Scientific) en tubos Eppendorf de 1 ml. Además, por cada pocillo con células a transfectar, 1,5 µl de Lipofectamina 2000 (Thermo

Fisher Scientific) se mezclaron con 50 µl de OPTImem y se esperó 5 minutos una vez mezclados. Transcurrido este tiempo, se añadió 50 µl de la disolución de Lipofectamina a cada tubo Eppendorf con ADN con cautela para evitar la rotura de las micelas formadas, y se esperó durante 20 minutos. Se añadieron los 100 µl del contenido de los Eppendorf a cada pocillo que se deseaba transfectar y la transfección siempre tuvo lugar durante 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se cambió el medio donde ocurrió la transfección por 500 µl de medio DMEMc. Las células transfectadas fueron empleadas entre 24 y 48 horas tras la transfección.

### **3.6. Marcaje con SNAP-Cell® 505-Star y SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647**

Se empleó la metodología SNAP-tag para el marcaje de células vivas. A partir de un stock 1 mM de SNAP-Cell® 505-Star (fluorescencia verde, permeable) o SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647 (fluorescencia roja, no atraviesa la membrana celular) en DMSO, preparamos alícuotas de 500 µl de DMEMc con el ligando correspondiente a una concentración de 2.5 µM. Retiramos el medio DMEMc a las células y añadimos una de estas alícuotas a cada pocillo. Tras 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, retiramos este medio y lavamos 2 veces con 500 µl de HBSS, esperando 3 minutos durante cada lavado. Finalmente, añadimos 500 µl de DMEMc y dejamos las células tratadas durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, las células estuvieron listas para estudiar la expresión por métodos de imagen.

### **3.7. Fijado y montaje de células transfectadas**

Las células transfectadas con las construcciones SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP, 24 horas después del final de la transfección, fueron tripsinizadas y transferidas a cristales previamente tratados con poli-L lisina. Se realizó el marcaje de las células con SNAP-Cell® 505-Star unas 44 horas después del final de la transfección y, una vez finalizado el marcaje, las células fueron sumergidas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavaron los cristales con PBS, una primera vez rápidamente y después otros dos lavados durante 10 minutos cada uno. Los cristales con las células fijadas sumergidos en PBS fueron almacenados en nevera a 4°C.

Ambos cristales con las células fijadas se colocaron dos portaobjetos, se añadieron 50 µl de VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories) a cada uno y, tras colocar encima de cada portaobjetos un cubreobjetos, se dejaron secar durante tres horas. Transcurrido este tiempo, se sellaron aplicando laca de uñas alrededor del cubreobjetos. Ambos montajes fueron almacenados en nevera a 4°C durante dos días.

Finalmente, se observaron las muestras en un microscopio confocal y se tomaron imágenes, que se muestran en 4.5.

### 3.8. Experimentos de imagen de fluorescencia de $\text{Ca}^{2+}$

Se llevaron a cabo experimentos de imagen de calcio mediante el indicador de fluorescencia Fura-2 (Thermo Fisher Scientific), un indicador de tipo ratiométrico (Tsien y Poenie, 1986). Las células HEK293, transfectadas unas 48 horas antes y transferidas a cubres de cristal de 12 mm de diámetro tratados con poli-L lisina el día previo, fueron incubadas con Fura-2 AM 5  $\mu\text{M}$  y ácido plurónico 0.2% (Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  en solución extracelular estándar. La solución estándar extracelular (en mM: 140 NaCl, 10 HEPES, 10 glucosa, 3 KCl, 2.4  $\text{CaCl}_2$ , y 1.3  $\text{MgCl}_2$ ) fue ajustada a un pH de 7.4 con NaOH. Pasado este tiempo, los cubres de cristal con las células fueron transferidos a una pequeña cámara superfundida con solución extracelular donde se realizaron las mediciones de fluorescencia.

Las mediciones de fluorescencia fueron obtenidas en un microscopio invertido Leica con una cámara Orca ER CCD (Hamamatsu Photonics K.K.). Se excitó Fura-2 a 340 y 380 nm (el tiempo de excitación fue 60 ms) con un sistema basado en LED (Lambda OBS, Sutter Instruments). Los cocientes de intensidad de fluorescencia (F340/F380) fueron mostrados online cada 3 segundos con el software MetaFluor (Molecular Devices). Antes del inicio de cada experimento, se obtuvieron imágenes del campo del microscopio con luz transmitida y con excitación a 488 nm para identificar células fluorescentes verdes.

El experimento siempre comenzó con el flujo de solución control durante alrededor de 60 segundos. A continuación, durante cerca de 120 segundos, las células fueron expuestas a una solución extracelular con AITC 50  $\mu\text{M}$  (un agonista específico de TRPA1). Después, se reanudó el flujo de solución control hasta que el cociente de intensidad de fluorescencia de las células volvió a un valor próximo al inicial y se aplicó carbacol 40  $\mu\text{M}$  (agonista colinérgico), que aumenta el calcio intracelular en células HEK293 funcionalmente sanas. Finalmente se devolvió a las células al flujo de solución control hasta que el ratio de intensidad de fluorescencia de las células descendió.

La amplitud (magnitud) de las respuestas a AITC se calculó sustrayendo de los valores máximos de la señal de fluorescencia obtenidos durante la aplicación de este compuesto, el valor basal de fluorescencia (valor medio de la señal obtenida durante los 15 segundos previos a la aplicación del agonista). Las respuestas fueron anotadas como positivas cuando el aumento de fluorescencia fue superior a 0.08. El análisis de los datos se realizó a través de Microsoft Office Excel y RStudio.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. La secuencia de tGFP-hTRPA1 es la esperada

Se llevó a cabo la construcción de este plásmido amplificando por PCR la región codificante de tGFP a partir del plásmido hTRPA1-tGFP e insertando este producto de PCR en el vector CLOVER-hTRPA1 aguas arriba de hTRPA1, previa eliminación de la región codificante de la proteína CLOVER. La estrategia de clonación (Figura 5) implicaba la introducción de las dianas de restricción de *AgeI* y *HindIII* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y una secuencia Kozak justo antes del codón de inicio de tGFP. Esto permitió conseguir finalmente la secuencia de una proteína quimérica con la secuencia completa de hTRPA1 unida covalentemente en su extremo N-terminal a la proteína tGFP a través de un pequeño péptido espaciador, como se explica en los apartados 3.4.1 y 3.4.5.

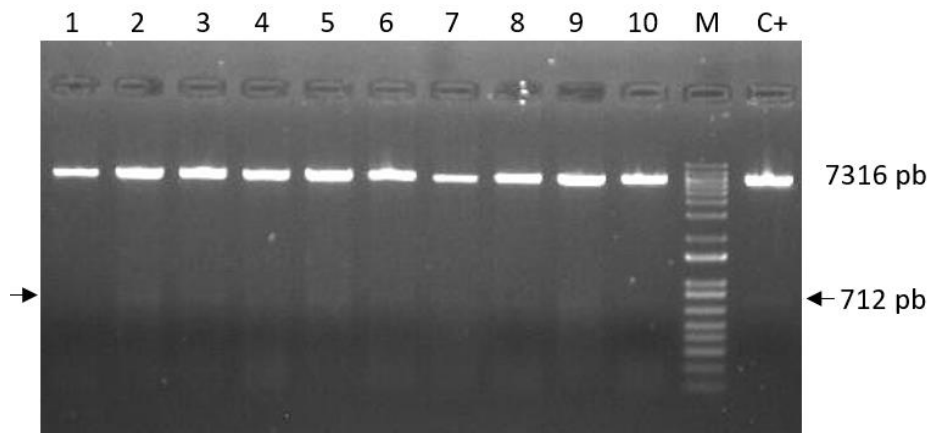


**Figura 5. Esquema del producto de PCR esperado para la construcción tGFP-hTRPA1.** Los cebadores utilizados para la amplificación específica de tGFP aparecen indicados en rojo y la región codificante de tGFP en verde. Las dianas de restricción de *AgeI* y *HindIII* están indicadas por flechas. Los números muestran la longitud de la región codificante de tGFP. En azul, secuencia Kozak.

Diez colonias de *E. coli* transformadas con la secuencia de tGFP insertada en el extremo 5' de hTRPA1 que crecieron en una placa con medio LB sólido suplementado con kanamicina fueron aisladas para su crecimiento en medio LB líquido suplementado también con este antibiótico. En todos los casos hubo crecimiento y los plásmidos de cada caldo de bacterias resistentes fueron extraídos.

Como control adicional de la correcta construcción del plásmido, 300 ng del ADN extraído de cada una estas colonias fueron digeridos con *AgeI* y *HindIII* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En el ADN plasmídico digerido de todas las colonias excepto la 1 y la 10 se observó la banda correspondiente al inserto digerido (Figura 6).

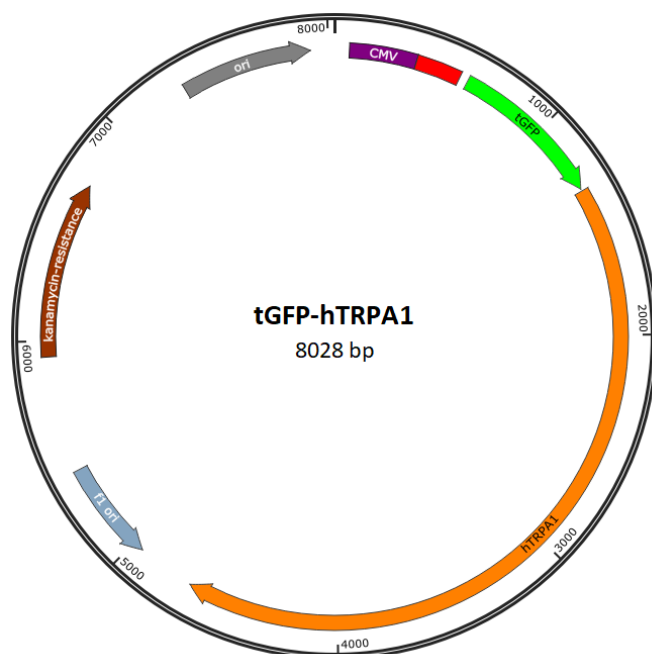




**Figura 6. Gel de agarosa de la digestión control de tGFP-hTRPA1.** A la izquierda del marcador de peso molecular (M) se encuentra el producto de la digestión de los plásmidos tGFP-hTRPA1 obtenidos a partir de las diez colonias bacterianas que crecieron y a la derecha el del plásmido CLOVER-hTRPA1 empleado como control positivo de digestión, tras digerirlos con *AgeI* y *HindIII*. En todas las calles se observa una banda intensa de un tamaño superior a 7000 pb, y parece que en todas excepto la 1 y la 10 se aprecia una tenue banda alrededor de 700 pb (entre las flechas) que se corresponde con el inserto que contiene la región codificante de tGFP (o CLOVER en el caso del control).

Llegado este punto, se eligió mandar a secuenciar los plásmidos tGFP-hTRPA1 procedentes de las colonias 2, 5, 6 y 9 por encontrarse entre los que mostraron una banda tenue a 700 pb en el gel de electroforesis. Fueron secuenciados en ambos sentidos, desde la región del promotor de citomegalovirus (CMV) hacia el inicio de la secuencia codificante de hTRPA1 y viceversa (apartado 3.1). Se alinearon las secuencias obtenidas con la secuencia de tGFP y se confirmó la integridad de la región codificante de la proteína quimérica en el plásmido de la colonia 5 (Figura 7).

**Figura 7. Mapa del plásmido tGFP-hTRPA1.** Se muestra el esquema del plásmido de 8028 pb que codifica la proteína quimérica tGFP-hTRPA1, que aparece en color verde (tGFP) y naranja (hTRPA1). En rojo, promotor de CMV. En morado, “*enhancer*” de citomegalovirus (CMV). En gris, origen de replicación bacteriano. En marrón, resistencia a kanamicina (gen *aph(3')-II*). En azul, origen de replicación del bacteriófago f1. Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer y modificada.



## 4.2. Se obtiene con éxito la construcción SNAP-hTRPA1

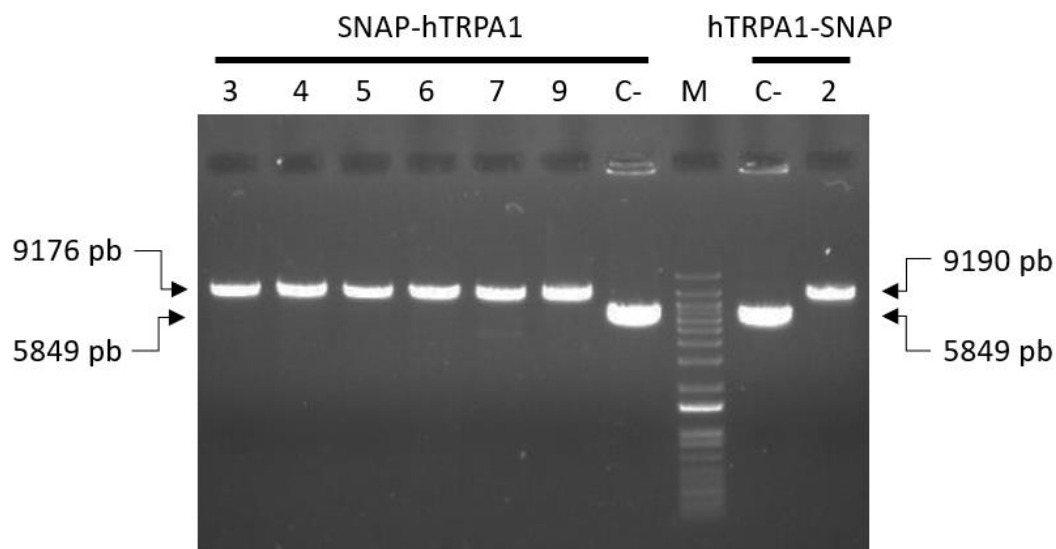
Para la generación de este plásmido, se amplificó por PCR la región codificante de la proteína humana TRPA1 a partir del plásmido hTRPA1-tGFP y se insertó este producto de PCR en el vector pSNAPf aguas abajo de la región codificante de la proteína SNAP. La estrategia de clonación (Figura 8) comprendía la introducción del codón de terminación al final de hTRPA1 y de las dianas de restricción de *SbfI* y *NotI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. Esto permitió obtener finalmente la secuencia de una proteína quimérica con la secuencia completa de hTRPA1 unida covalentemente en su extremo N-terminal a la proteína SNAP a través de un pequeño péptido espaciador, según se indica en los apartados 3.4.2 y 3.4.5.



**Figura 8. Esquema del producto de PCR esperado para la construcción SNAP-hTRPA1.** Los cebadores utilizados para la amplificación específica de hTRPA1 aparecen indicados en rojo y la región codificante de hTRPA1 en naranja. Las dianas de restricción de *SbfI* y *NotI* están indicadas por flechas. Los números muestran la longitud de la región codificante de hTRPA1. En morado, codón de stop.

Diez colonias de *E. coli* transformadas con la secuencia de hTRPA1 insertada en el extremo 3' de SNAP que crecieron en medio LB sólido suplementado con ampicilina fueron aisladas para su crecimiento en medio LB líquido suplementado también con este antibiótico. Crecieron seis de estas diez colonias y los plásmidos de estos seis caldos de bacterias resistentes fueron extraídos.

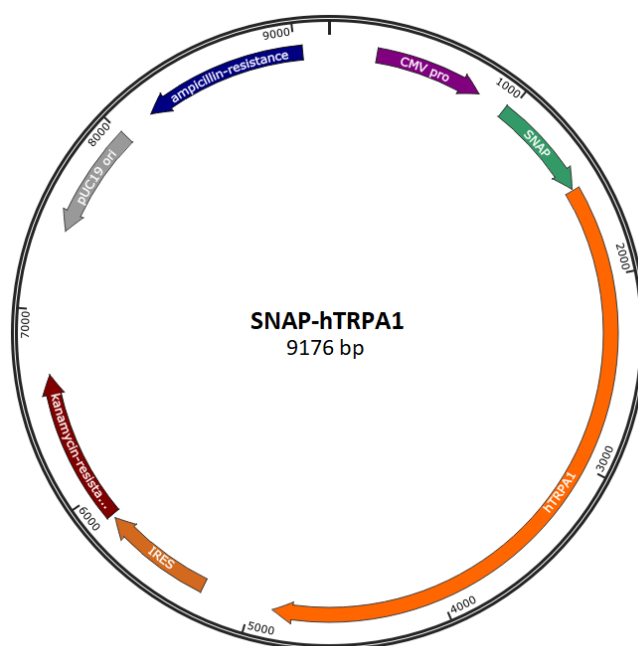
Como control adicional de la correcta construcción del plásmido, 300 ng del ADN extraído de cada una estas colonias fueron digeridos con la endonucleasa *SbfI* para linealizarlo y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En las seis colonias apareció la banda correspondiente al plásmido deseado, alrededor de 9000 pb, mientras que en el control negativo apareció la banda a aproximadamente 6000 pb (Figura 9).



**Figura 9. Gel de agarosa de la digestión control de SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP.** A la izquierda del marcador de peso molecular (M) se encuentran los plásmidos SNAP-hTRPA1 recogidos de las seis colonias bacterianas que crecieron y el vector pSNAP<sub>r</sub> utilizado como control negativo (C-) tras digerirlos con *Sbf*I. A la derecha, el plásmido hTRPA1-SNAP purificado a partir de la única colonia bacteriana que creció en este caso (2) y el vector pSNAP<sub>r</sub> utilizado como control negativo (C-) tras digerirlos con *Asc*I.

Se eligió enviar a secuenciar los plásmidos SNAP-hTRPA1 procedentes de las colonias 3 y 4 por tener una longitud cercana a 9000 pb y haber sido purificados a una concentración adecuada (404,0 y 451,9 ng/μl, respectivamente), según se describe en el apartado 3.1. Se alinearon las secuencias obtenidas con la secuencia esperada de SNAP-hTRPA1 y se confirmó la integridad del plásmido procedente de la colonia 4 (Figura 10).

**Figura 10. Mapa del plásmido SNAP-hTRPA1.** Se muestra el esquema del plásmido de 9176 pb que codifica la proteína quimérica SNAP-hTRPA1, que aparece en color verde (SNAP) y naranja (hTRPA1). En morado, promotor de citomegalovirus (CMV). En azul, resistencia a ampicilina (gen *bla*). En gris, origen de replicación pUC19. En granate, resistencia a kanamicina-neomicina (gen *neo*). En marrón, secuencia IRES. Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer y modificada.



### 4.3. Es correcta la secuencia de la construcción hTRPA1-SNAP

Se construyó este plásmido amplificando por PCR la región codificante de la proteína humana TRPA1 a partir del plásmido hTRPA1-tGFP e insertando este producto de PCR en el vector pSNAPf aguas arriba de la región codificante de la proteína SNAP. La estrategia de clonación (Figura 11) implicaba la introducción de las dianas de restricción de *AscI* y *AgeI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y la secuencia de Kozak justo antes del codón de inicio de hTRPA1. Así se consiguió finalmente la secuencia de una proteína quimérica con la secuencia completa de hTRPA1 unida covalentemente en su extremo C-terminal a la proteína SNAP a través de un pequeño péptido espaciador, como aparece indicado en los apartados 3.4.3 y 3.4.5.

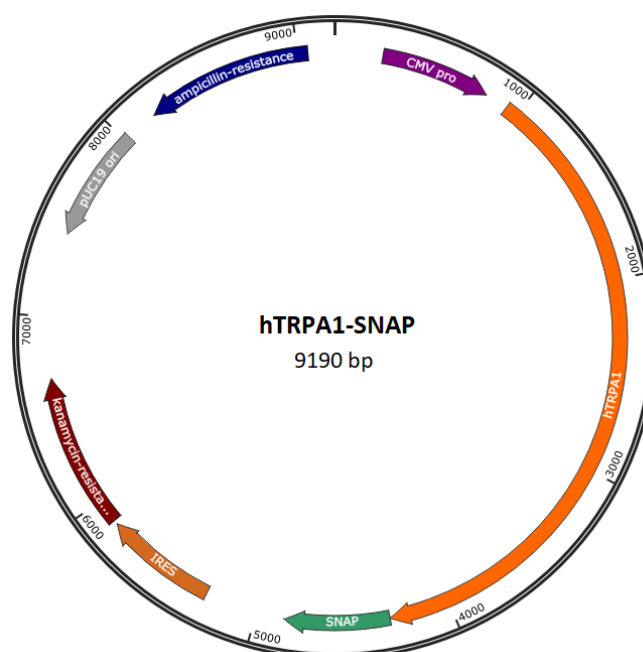


**Figura 11. Esquema del producto de PCR esperado para la construcción hTRPA1-SNAP.** Los cebadores utilizados para la amplificación específica de hTRPA1 aparecen indicados en rojo y la región codificante de hTRPA1 en naranja. Las dianas de restricción de *AscI* y *AgeI* están indicadas por flechas. Los números muestran la longitud de la región codificante de hTRPA1. En azul, secuencia de Kozak.

Diez colonias de *E. coli* transformadas con la secuencia de hTRPA1 insertada en el extremo 5' de SNAP que crecieron en medio LB sólido suplementado con ampicilina fueron aisladas para su crecimiento en medio LB líquido suplementado también con este antibiótico. Creció solo una de estas diez colonias y el ADN plasmídico de este caldo de bacterias resistentes fue purificado a una concentración de 344,9 ng/μl.

Como control adicional de la correcta construcción del plásmido, 300 ng del ADN extraído de cada esta colonia bacteriana fueron digeridos con la endonucleasa *AscI* para linealizarlos y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Este ADN era del tamaño esperado, alrededor de 9000 pb, mientras que en el control negativo apareció la banda a aproximadamente 6000 pb (Figura 9).

Finalmente, se envió a secuenciar el ADN plasmídico procedente de la única colonia bacteriana que creció en medio líquido. Fue secuenciado solo en un sentido, desde el final de la secuencia codificante de hTRPA1 hacia la región codificante de SNAP (apartado 3.1). Se alineó la secuencia obtenida con la secuencia esperada de hTRPA1-SNAP y se confirmó la integridad del plásmido procedente de la colonia 2 (Figura 12).

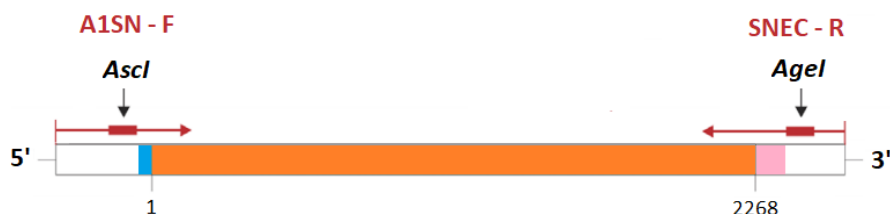


**Figura 12. Mapa del plásmido hTRPA1-SNAP.** Se muestra el esquema del plásmido de 9190 pb que codifica la proteína quimérica hTRPA1-SNAP, que aparece en color naranja (hTRPA1) y verde (SNAP). En morado, promotor de citomegalovirus (CMV). En azul, resistencia a ampicilina (gen *bla*). En gris, origen de replicación pUC19. En granate, resistencia a kanamicina-neomicina (gen *neo*). En marrón, secuencia IRES. Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer y modificada.

#### 4.4. Se confirma la integridad de la construcción hTRPA1-SNAP-EC

Mientras que en las tres construcciones anteriores el marcador fluorescente se encontraba en la región intracelular del canal iónico hTRPA1 (región N y C-terminal), el objetivo en esta ocasión era situar la proteína SNAP en una región extracelular de hTRPA1. Tras el análisis de la conformación tridimensional de este canal iónico en PyMOL utilizando la estructura 3J9P de Protein Data Bank, se eligió el bucle entre las dos primeras hélices transmembrana (llamadas S1 y S2) como lugar de la inserción (Figura 3C). El motivo de esta elección es que, de entre los tres bucles extracelulares que existen en cada subunidad del canal hTRPA1, el más largo y flexible de ellos es el que conecta estas dos primeras hélices transmembrana y por ello pensamos que la inserción de una proteína en este bucle tendría menor probabilidad de alterar la función del canal iónico que si la inserción tuviera lugar en cualquiera de los otros dos bucles extracelulares. El desarrollo de esta construcción aparece detallada en los apartados 3.4.4 y 3.4.5.

En primer lugar, se amplificó la primera región de hTRPA1 con los cebadores A1SN-F y SNEC-R utilizando como ADN molde el plásmido hTRPA1-tGFP proporcionado por el laboratorio de Félix Viana. Este producto de PCR, que contiene los primeros 2268 nucleótidos de hTRPA1 flanqueados por las dianas de restricción de las endonucleasas *AscI* y *AgeI* (Figura 13), fue insertado aguas arriba de SNAP en el plásmido pSNAPf.



**Figura 13. Esquema de los cebadores empleados para la primera fase de la construcción hTRPA1-SNAP-EC y el producto de PCR esperado.** Los cebadores, utilizados para la amplificación específica de la región codificante de hTRPA1 desde el nucleótido 1 hasta el 2268, aparecen indicados en rojo y la región codificante de hTRPA1 en naranja. Las dianas de restricción de *AscI* y *AgeI* están indicadas por flechas. Los números muestran la longitud de la región codificante de hTRPA1 que fue amplificada. En azul, secuencia de Kozak. En rosa, pequeño péptido conector entre hTRPA1 y SNAP.

Diez colonias de *E. coli* transformadas con esta primera construcción que crecieron en una placa con medio LB sólido suplementado con ampicilina fueron aisladas para su crecimiento en medio LB líquido suplementado también con este antibiótico. De entre ellas crecieron cinco y los plásmidos de cada caldo de bacterias resistentes fueron extraídos.

Como control adicional de la correcta construcción de la primera parte de este primer plásmido, 4 µl del ADN extraído de cada una estas colonias y el vector pSNAPf fueron digeridos con *AgeI* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En tres colonias apareció la banda correspondiente al plásmido deseado, alrededor de 8000 pb, mientras que en el control negativo apareció la banda a aproximadamente 5800 pb. Para seguir adelante se escogió el plásmido purificado de la colonia 3 por ser el que se obtuvo en una mayor concentración (347,3 ng/µl) de entre los que tenían el tamaño deseado.

El siguiente paso fue amplificar la segunda región de hTRPA1 con los cebadores SNEC-F y SNA1-R. Este producto de PCR, que contiene los últimos 1104 nucleótidos de hTRPA1 flanqueados por las dianas de restricción de las endonucleasas *BamHI* y *NotI* (Figura 14), fue insertado aguas abajo de la región codificante de SNAP en el plásmido de la colonia 3 anterior.

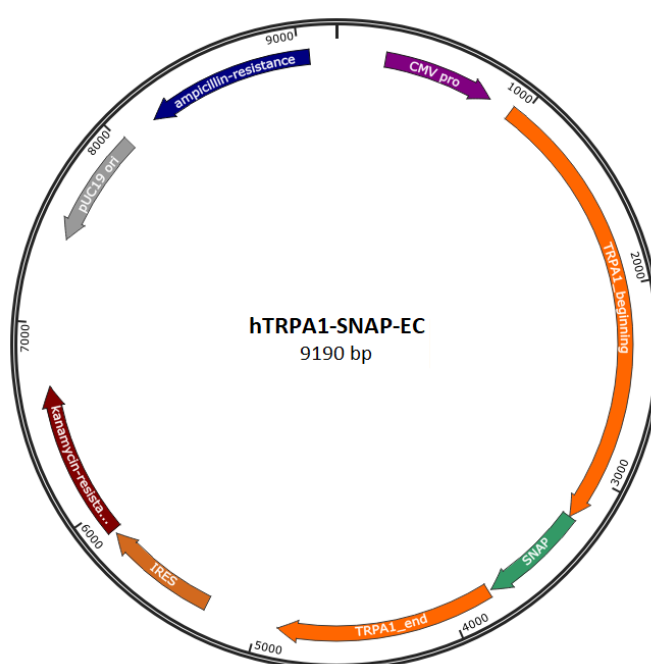
Diez colonias de *E. coli* transformadas con esta segunda construcción que crecieron en una placa con medio LB sólido suplementado con ampicilina fueron aisladas para su crecimiento en medio LB líquido suplementado también con este antibiótico. De entre ellas crecieron dos y los plásmidos de cada caldo de bacterias resistentes fueron extraídos.



**Figura 14. Esquema de los cebadores empleados para la segunda fase de la construcción hTRPA1-SNAP-EC y el producto de PCR esperado.** Los cebadores, utilizados para la amplificación específica de la región codificante de hTRPA1 desde el nucleótido 2257 hasta el 3360, aparecen indicados en rojo y la región codificante de hTRPA1 en naranja. Las dianas de restricción de *Bam*HI y *Not*I están indicadas por flechas. Los números muestran la longitud de la región codificante de hTRPA1 que fue amplificada. En rosa, pequeño péptido conector entre SNAP y hTRPA1. En morado, codón de stop.

Para evaluar la correcta incorporación del segundo inserto se realizó una electroforesis en gel de agarosa empleando como control positivo el plásmido de la colonia 3 del que se partió. Esta vez solo uno de los dos plásmidos extraídos tenía el tamaño deseado, cercano a 9000 pb, y fue enviado a secuenciar con los cinco cebadores *forward* de hTRPA1 disponibles en el laboratorio (apartado 3.1). La secuenciación, que cubrió la mayor parte de la región codificante de la proteína quimérica hTRPA1 con SNAP extracelular, reveló que la totalidad de la región secuenciada se correspondía con la secuencia esperada de esta proteína quimérica (Figura 15).

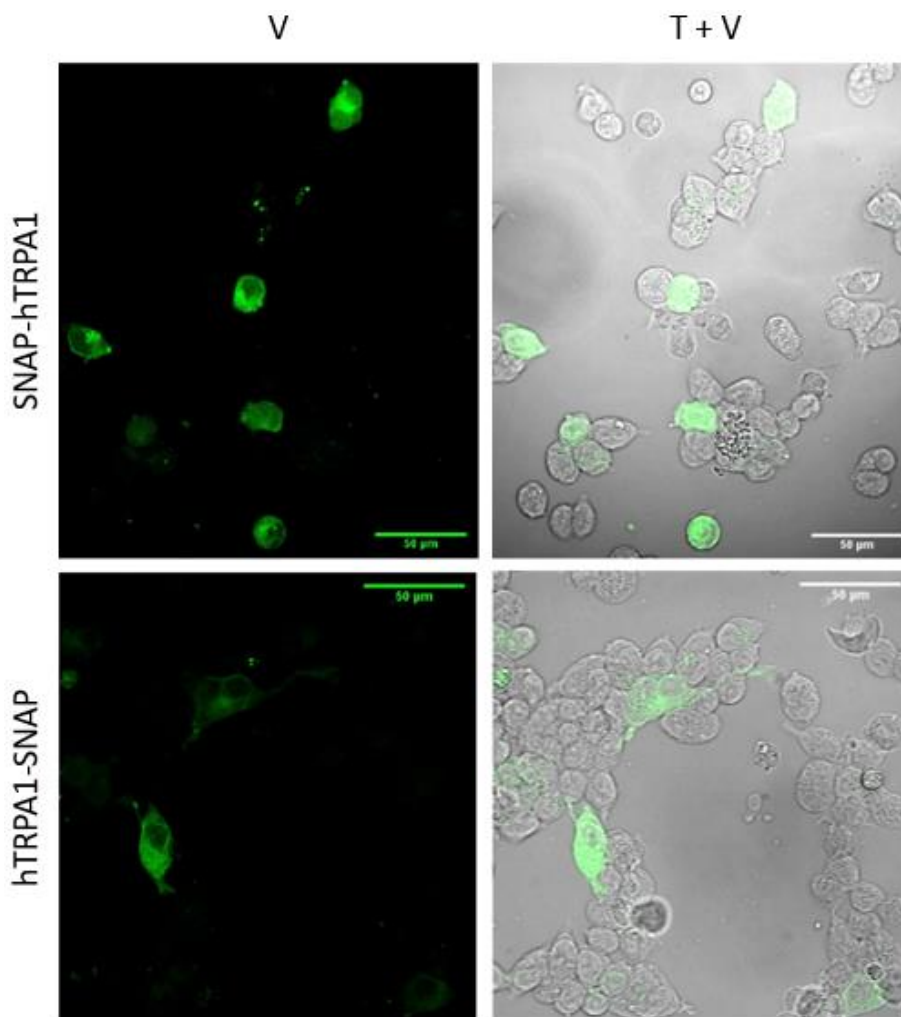
**Figura 15. Mapa del plásmido hTRPA1-SNAP-EC.** Se muestra el esquema del plásmido de 9190 pb que codifica la proteína quimérica hTRPA1 (naranja) con SNAP (verde) en el bucle S1-S2 extracelular. En morado, promotor de citomegalovirus (CMV). En azul, resistencia a ampicilina (gen *bla*). En gris, origen de replicación pUC19. En granate, resistencia a kanamicina-neomicina (gen *neo*). En marrón, secuencia IRES. Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer y modificada.





#### 4.5. Fluorescencia de las células transfectadas con los cuatro plásmidos generados

Con el objetivo de determinar la localización subcelular de las proteínas SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP, se observó su fluorescencia en un microscopio confocal como se describe en el apartado 3.7. Se capturaron varias imágenes de las células HEK293 transfectadas con ambas construcciones (previamente marcadas como se indica en el apartado 3.6), tanto en transmitida como usando el láser a 488 nm (Figura 16).



**Figura 16. Detección de fluorescencia verde de las proteínas de fusión SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP tras el marcaje con el sustrato SNAP-Cell® 505-Star.** Se muestran imágenes usando el láser a 488 nm (V) y transmitida en combinación con el láser a 488 nm (T + V).

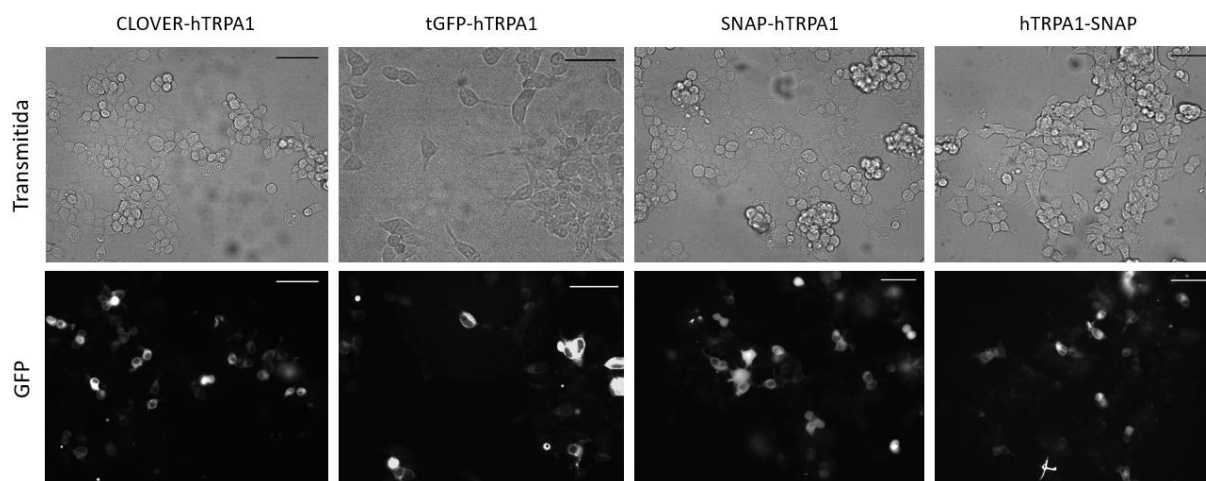
A la vista de la figura 16, la localización subcelular de ambas proteínas quiméricas parece ser la membrana y el sistema de endomembranas. También se observó este mismo patrón en las células transfectadas con tGFP-hTRPA1 (Figura 17). No obstante, no se detectó fluorescencia en las células transfectadas con hTRPA1-SNAP-EC y tratadas con el sustrato SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647 (imagen no mostrada).



#### 4.6. Las proteínas codificadas por los plásmidos tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP son funcionales

Para determinar si las proteínas quiméricas generadas dan lugar a canales iónicos funcionales, se evaluó el efecto de AITC, agonista de hTRPA1, en experimentos de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (apartado 3.8). Para ello, se expresaron individualmente en células HEK293, estudiándose la respuesta al agonista de una sonda sensible al calcio (Fura2). En el caso de las proteínas que contienen la secuencia de SNAP, se analizó la respuesta a AITC con y sin tratamiento previo con el sustrato de la proteína SNAP-Cell® 505-Star (como se describe en el apartado 3.6). Como control positivo de respuesta a AITC también se estudió la respuesta a AITC en células transfectadas con el plásmido CLOVER-hTRPA1.

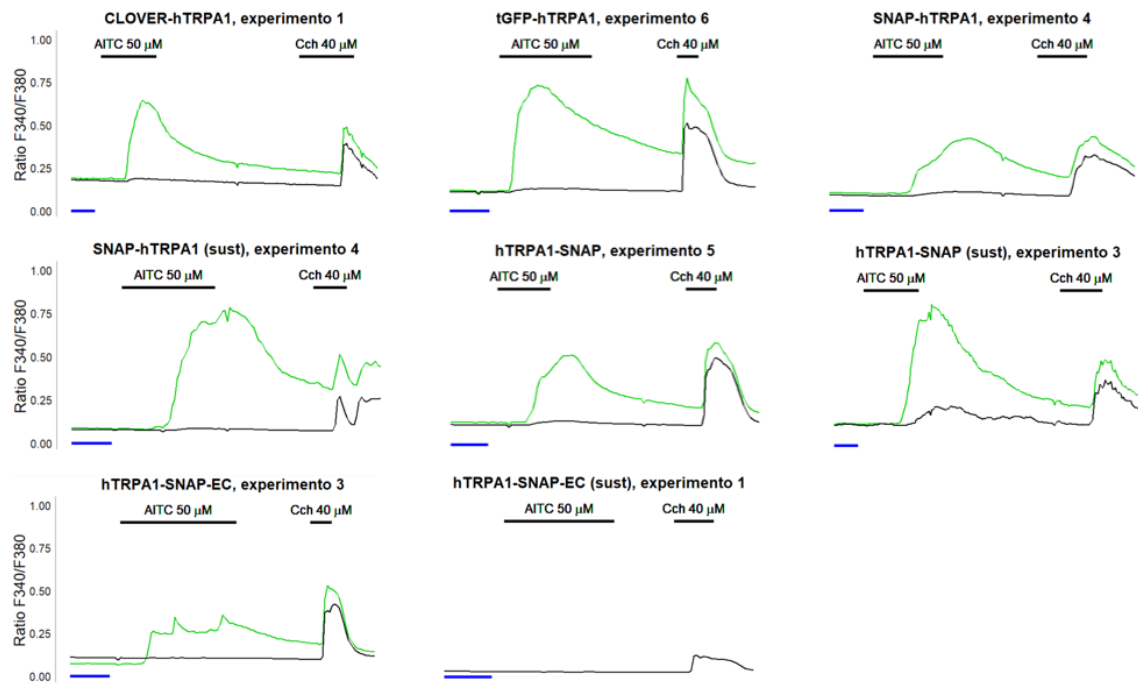
Antes de cada experimento se identificaron células fluorescentes tomando imágenes del campo del microscopio con luz transmitida y con excitación a 460 nm (Figura 17).



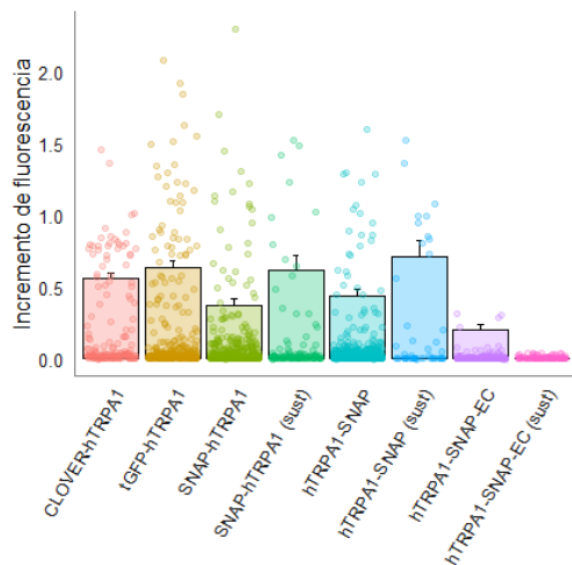
**Figura 17. Imágenes del campo del microscopio en experimentos de imagen de calcio.** Imágenes del campo del microscopio con luz transmitida (Transmitida) y con excitación a 460 nm con filtro GFP (GFP) de células transfectadas con tres de las cuatro construcciones evaluadas y con CLOVER-hTRPA1 (control positivo). Las células transfectadas con SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP mostradas fueron tratadas previamente con SNAP-Cell® 505-Star. La barra de escala en la esquina superior derecha de cada imagen se corresponde con 50  $\mu\text{m}$ .

Los resultados se muestran en la figura 18 y en la tabla 2. El comportamiento de las células transfectadas con tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP fue muy similar al del control utilizado, CLOVER-hTRPA1. En el caso de hTRPA1-SNAP-EC, sin tratamiento previo con el sustrato, el porcentaje de células que respondieron a AITC fue muy bajo y el incremento de fluorescencia medio en las células fue muy inferior al del resto de construcciones; por su parte, ninguna célula transfectada con hTRPA1-SNAP-EC y tratada previamente con el sustrato respondió a AITC. Esto se discutirá más ampliamente en el apartado 5.

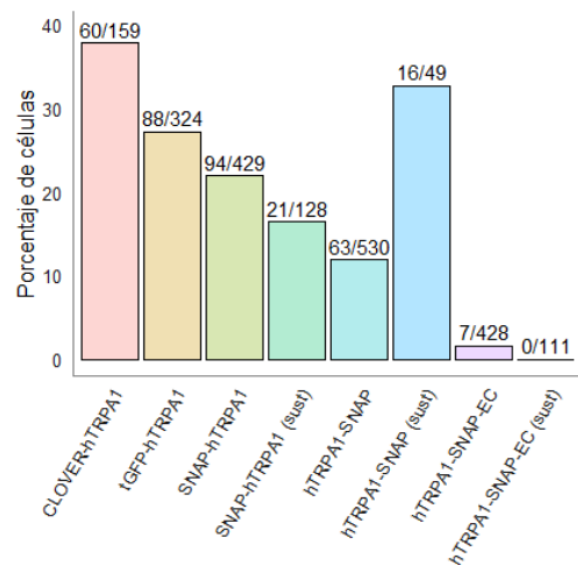
**A**



**B**



**C**



**Figura 18. Resultados de los experimentos de imagen de fluorescencia de calcio.** **A.** Cambios en la razón de fluorescencia en células HEK293 transfectadas con las distintas construcciones, tras la aplicación secuencial de AITC 50  $\mu$ M y carbachol 40  $\mu$ M (Cch). La funcionalidad de las construcciones con la secuencia de SNAP fue evaluada también tras haber tratado con el sustrato fluorescente de esta proteína las células transfectadas, que aparece indicado como (sust). La media de los cambios de la razón de fluorescencia de las células que respondieron a AITC aparece en verde, y en negro se muestra la media de las células que no respondieron a este agonista de hTRPA1. La barra horizontal azul en cada gráfica se corresponde con 50 segundos. **B.** Media del incremento de fluorescencia tras la aplicación de AITC 50  $\mu$ M en todas las construcciones evaluadas. La media y el error estándar de la

media (SEM, barra de error) corresponden a las células que sí respondieron a AITC. Los puntos representan los incrementos de fluorescencia individuales de cada célula analizada, respondiese o no a AITC. **C.** Porcentaje de células que respondieron a AITC de entre las que respondieron a carbacol. Los números encima de las barras indican el número de células que respondieron a AITC y el número de células que respondieron a carbacol.

Construcción	Incremento medio	SEM	Porcentaje de células
CLOVER-hTRPA1	0,559	0,042	37,7
tGFP-hTRPA1	0,633	0,052	27,2
SNAP-hTRPA1	0,371	0,043	21,9
SNAP-hTRPA1 (sust)	0,613	0,106	16,4
hTRPA1-SNAP	0,432	0,050	11,9
hTRPA1-SNAP (sust)	0,714	0,113	32,7
hTRPA1-SNAP-EC	0,196	0,041	1,6
hTRPA1-SNAP-EC (sust)	0	0	0

**Tabla 2. Sumario de los resultados obtenidos en los experimentos de imagen de calcio.** La segunda columna se refiere al incremento medio de fluorescencia en las células que respondieron a AITC, y en la tercera se muestra el error estándar de la media. En la última columna aparece el porcentaje de células que respondieron a AITC de entre el total de células que respondieron a carbacol.

## 5. DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo, se han construido cuatro plásmidos: tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1, hTRPA1-SNAP y hTRPA1-SNAP-EC. El primero codifica el canal iónico hTRPA1 fusionado a tGFP en el extremo N-terminal de la proteína humana, mientras que los otros tres codifican este canal fusionado a la proteína SNAP en los extremos N y C-terminal y en un bucle extracelular del canal. Se ha podido comprobar que la región codificante secuenciada de la proteína química en los cuatro plásmidos es idéntica a la que se diseñó en un principio (apartados 4.1 a 4.4).

La localización subcelular de las proteínas tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP, como se observa en las figuras 16 y 17, es muy similar al patrón de expresión de hTRPA1 (May, 2012). No se observó ninguna fluorescencia en las células transfectadas con hTRPA1-SNAP-EC tras el marcaje con SNAP-Cell® 505-Star ni con SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647 (imágenes no mostradas en este trabajo). Una posible explicación de esto es que, al encontrarse SNAP en una región de hTRPA1 menos flexible que los extremos N y C-terminal, no puede adoptar la conformación tridimensional adecuada y pierde su capacidad de escindir

los sustratos empleados y, por tanto, de formar un enlace covalente con los fluoróforos. Por ello, este plásmido parece no ser útil para caracterizar el tráfico hacia membrana de hTRPA1.

También se evaluó la respuesta de las proteínas quiméricas a AITC, agonista de hTRPA1, a través de experimentos de imagen de calcio (Figura 18 y Tabla 2). Al final de cada experimento se aplicó carbacol, un agonista colinérgico, que aumenta el calcio intracelular en las células funcionalmente sanas. En principio, tras la aplicación de AITC solo debe aumentar el calcio intracelular en las células transfectadas con los plásmidos generados, puesto que son las únicas que expresan el canal iónico hTRPA1. Además, para que se dé esta respuesta a AITC, el canal hTRPA1 en las distintas construcciones debe expresarse en membrana y ser funcional. Por otra parte, dado que las células no transfectadas no expresan ningún marcador fluorescente; las únicas células con fluorescencia verde son aquellas transfectadas; en el caso de las células transfectadas con construcciones que contienen la secuencia de SNAP, solo se observa fluorescencia verde si han sido tratadas previamente con el sustrato SNAP-Cell® 505-Star. En los párrafos que siguen, se discutirá la funcionalidad de las proteínas quiméricas en términos del incremento medio de la razón de fluorescencia F340/F380 en las células que respondieron a AITC y del porcentaje de células que respondieron a AITC de entre el total de células que respondieron a carbacol.

Las células transfectadas con tGFP-hTRPA1 alcanzaron de media un incremento de fluorescencia ligeramente superior al control (células transfectadas con CLOVER-hTRPA1). Lo mismo ocurrió con las células transfectadas con SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP tratadas previamente con el sustrato SNAP-Cell® 505-Star, mientras que el incremento de fluorescencia medio con estas dos últimas construcciones sin tratamiento previo fue algo menor; esto podría deberse a que la conformación de SNAP con el fluoróforo unido covalentemente hace que el canal hTRPA1 adopte una conformación más favorable para su apertura. En cuanto al porcentaje de células que respondieron de entre el total de células analizadas transfectadas con estas construcciones, los números parecen muy variables pero este porcentaje nunca fue menor de 11%. Quizá analizando en el futuro el porcentaje de células que respondieron a AITC de entre el total de células fluorescentes verdes se obtengan resultados más parecidos entre estas tres construcciones y el control.

Por otra parte, la respuesta a AITC de las células transfectadas con el plásmido hTRPA1-SNAP-EC sin tratamiento previo con el sustrato fue muy inferior a la del control: solo hubo respuesta en el 1,6% de las células analizadas y el incremento medio de fluorescencia de estas no llegó a 0,2. Además, tras el tratamiento con el sustrato, ninguna de las 111 células analizadas respondió al agonista de TRPA1. Esto confirma que esta proteína no es adecuada para el estudio del tráfico hacia la membrana de hTRPA1.

No ha sido posible completar el análisis de los resultados por la interrupción que ha causado el COVID-19. Queda pendiente profundizar en los experimentos de imagen de calcio, incluyendo en el análisis los datos de fluorescencia verde de las células, y completar la caracterización de las proteínas quiméricas funcionales a través de registros electrofisiológicos.

## **6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN FUTURA**

Con la realización del presente trabajo sobre el diseño y caracterización de nuevas herramientas moleculares para estudiar el tráfico hacia la membrana plasmática del canal hTRPA1, se ha determinado que:

- La secuencia codificante de la proteína quimérica es la esperada en los cuatro plásmidos: tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1, hTRPA1-SNAP y hTRPA1-SNAP-EC.
- La localización subcelular de las proteínas tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP es muy parecida a la de hTRPA1, principalmente en membranas.
- Los experimentos de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  han mostrado que las proteínas tGFP-hTRPA1, SNAP-hTRPA1 y hTRPA1-SNAP se expresan en membrana y son funcionales, puesto que responden a AITC, agonista específico del canal iónico hTRPA1.
- La proteína hTRPA1-SNAP-EC no ha sido un éxito, dado que en células transfectadas con esta construcción no se observó fluorescencia de esta proteína ni hubo respuesta a AITC en experimentos de calcio.

Este trabajo constituye la fase inicial de la caracterización de estas nuevas herramientas moleculares. Para estudiar la cinética de apertura y cierre del canal en las distintas construcciones y confirmar los resultados que se han obtenido mediante experimentos de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$ , será necesario recurrir a la realización de registros electrofisiológicos. Además, mediante la técnica TIRF-FRAP, sería posible estudiar el tráfico del canal entre el citoplasma y la membrana plasmática empleando estas construcciones. Por último, sería conveniente diseñar y caracterizar una nueva proteína con SNAP en un bucle extracelular de hTRPA1; una proteína quimérica con un péptido conector de mayor longitud entre SNAP y hTRPA1 quizá sea funcional y pueda unirse covalentemente a los fluoróforos empleados.

## **7. AGRADECIMIENTOS**

A Mireille Torá, Jorge Fernández Trillo y Félix Viana, por haber facilitado mi aprendizaje en este grupo de investigación desde el primer día. A Aida Marcotti, Ana Gómez del Campo, Pablo Hernández y Alejandro González, por haberme enseñado todo lo necesario para la realización de experimentos de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$ . A Félix Viana, Laura Almaraz y Jorge Fernández Trillo por haberme ayudado con sus correcciones en la redacción de esta memoria. Y a todo el Grupo de Transducción Sensorial y Nocicepción del Instituto de Neurociencias de Alicante, porque sin ellos este trabajo no habría sido posible.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Balse E, Boycott HE. (2017). Ion Channel Trafficking: Control of Ion Channel Density as a Target for Arrhythmias? *Frontiers in Physiology*, 8, 808.
- Basso L, Altier C. (2017). Transient Receptor Potential Channels in Neuropathic Pain. *Curr Opin Pharmacol*, 32, 9-15.
- Benemei S, Fusi C, Trevisan G, Geppetti P. (2014). The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br J Pharmacol*, 171, 2552-2567.
- Chen J, Joshi SK et al. (2011). Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain*, 152(5), 1165-72.
- Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, Sun C et al. (2013). Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nature Communications*, 4, 2501.
- Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, Von Hehn CA, Zhao F, Tran J et al. (2013). Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature*, 501(765), 52-7.
- Dubin AE, Patapoutian A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760-3772.
- Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA et al. (2008). HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*, 4, 48.
- Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, Ferrer-Montiel A. (2014). Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes*, 4, 525-564.
- Ferrer-Montiel A, Fernández-Carvajal A, Planells-Cases R, Fernández-Ballester G et al. (2012). Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Patents*, 22(9), 999-1017.
- Grichnik KP, Ferrante FM. (1991). The Difference Between Acute and Chronic Pain. *Mt Sinai J Med*, 58(3), 217-20.
- Hayashi T. (2019). The Sigma-1 Receptor in Cellular Stress Signaling. *Front Neurosci*, 13, 733.
- Hjerling-Leffler J, Alqatari M, Ernfors P, Koltzenburg M. (2007). Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *J Neurosci*, 27, 2435-2443.
- Julius D. (2013). TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 29, 355-84.
- Koivisto A, Jalava N, Bratty R, Pertovaara A. (2018). TRPA1 Antagonists for Pain Relief. *Pharmaceuticals*, 11, 117.
- Koivisto A, Pertovaara A. (2013). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in the pathophysiology of peripheral diabetic neuropathy. *Scand J Pain*, 4, 129-136.
- Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S et al. (2010). A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron*, 66(5), 671-80.

- Lee G, Abdi K, Jiang Y, Michael P, Bennett V, Marszalek PE. (2006). Nanospring Behaviour of Ankyrin Repeats. *Nature*, 440(7081), 246-9.
- Liu T, Ji RR. (2012). Oxidative stress induces itch via activation of transient receptor potential subtype ankyrin 1 in mice. *Neurosci Bull*, 28, 145–154.
- Loeser JD, Treede RD. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137(3), 473-7.
- Lukinavicius G, Raymond L, Johnsson K. (2015). Fluorescent labeling of SNAP-tagged proteins in cells. *Methods Mol Biol*, 1266, 107–118.
- May D, Bastrup J, Nientit MR, Binder A, Schünke M, Baron R, Cascorbi I. (2012). Differential Expression and Functionality of TRPA1 Protein Genetic Variants in Conditions of Thermal Stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27087–27094.
- Meents JE, Ciotu CI, Fischer MJ. (2018). TRPA1: a molecular view. *Journal of Neurophysiology*, 121, 427-443.
- Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B et al. (2014). TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nature Communications*, 5, 3125.
- Moilanen LJ et al. (2015). Monosodium iodoacetate-induced inflammation and joint pain are reduced in TRPA1 deficient mice--potential role of TRPA1 in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 23, 2017–2026.
- Moran MM. (2018). TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 309-30.
- Nilius B, Owsianik G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 12, 218.
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H et al. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Investig*, 115, 2393-2401.
- Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(1), 55-68.
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. (2015). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature*, 520(7548), 511-517.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N et al. (2007). A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain*, 3, 40.
- Schmidt M, Dubin AE, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. (2009). Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane. *Neuron*, 64, 498-509.
- Schwartz ES, La JH, Scheff NN, Davis BM et al. (2013). TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis. *J Neurosci*, 33, 5603–5611.

- Shagin DA, Barsova EV, Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Labas YA et al. (2004). GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity. *Mol Biol Evol*, 21(5), 841-50.
- Shah MM, Hammond RS, Hoffman D. (2010). Dendritic Ion Channel Trafficking and Plasticity. *Trends Neurosci*, 33(7), 307-316.
- Sinica V, Zimova L, Barvikova K, Macikova L, Barvik I, Vlachova V. (2020). Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells*, 9(1), 57.
- Sotomayor M, Corey DP, Schulten K. (2005). In Search of the Hair-Cell Gating Spring Elastic Properties of Ankyrin and Cadherin Repeats. *Structure*, 13(4), 669-82.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SSR, Mosbacher J, Hricik TR et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*, 112, 819-829.
- Sugiyama D, Kang S, Brennan TJ. (2017). Muscle reactive oxygen species (ROS) contribute to post-incisional guarding via the TRPA1 receptor. *PLoS One*, 12(1), e0170410.
- Suo Y, Wang Z, Zubcevic L, Hsu AL, He Q, Borgnia MJ, Ji RR, Lee SY. (2020). Structural Insights into Electrophile Irritant Sensing by the Human TRPA1 Channel. *Neuron*, 105, 1-13.
- Treede RD. (2018). The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *Pain Reports*, Mar, 3(2), e643.
- Trevisani G, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B et al. (2007). 4-Hidroxinonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(33), 13519-13524.
- Trevisani G, Materazzi S, Fusi C et al. (2013). Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res*, 73(10), 3120-31.
- Tsien RY, Poenie M. (1986). Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(11), 450-455.
- Viana F. (2006). Fisiología de la Transducción Sensorial. En *Tratado de Dolor Neuropático* (41-50). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Viana F. (2016). TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. *The Journal of Physiology*, 594(15), 4151-4169.
- Wilson SR, Gerhold KA, Bifolck-Fisher A, Liu Q, Patel KN et al. (2011). TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci*, 14, 595-602.
- Zarkovic N. (2020). Roles and Functions of ROS and RNS in Cellular Physiology and Pathology. *Cells*, 9, 767.
- Zigmunt PM, Högestätt ED. (2014). TRPA1. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 222, 583-630.