

Tesi doctoral presentada per En/Na

Marta PUIGMULÉ RAURICH

amb el títol

**"Caracterització dels sistemes renals de ratolí i humà
(PCT3 I HK-2). Mecanismes moleculars implicats en la
nefrotoxicitat produïda per la CsA en el túbul proximal
renal"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 29 de maig de 2008

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ÍNDEX

| | |
|------------------------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓ | 17 |
| 1. L'aparell renal | 19 |
| 1.1. Els sistema excretor | 19 |
| 1.2. El ronyó | 19 |
| 1.2.1. Origen embrionari del ronyó | 19 |
| 1.2.2. Anatomia general | 20 |
| 1.2.3. La nefrona (o nefró) | 21 |
| 1.2.3.1. El corpuscle renal | 22 |
| 1.2.3.2. El túbul proximal | 22 |
| 1.2.3.3. La Nansa de Henle | 24 |
| 1.2.3.4. Els túbuls distal o col·lectors | 24 |
| 1.2.3.5. L'aparell juxtaglomerular | 25 |
| 1.2.4. Aspectes funcionals | 25 |
| 2. La ciclosporina A | 27 |
| 2.1. Aspectes generals | 27 |
| 2.2. Activació i proliferació de la cèl·lula T | 28 |
| 2.3. Mecanisme d'immunosupressió de la CsA | 29 |
| 2.4. Nefrotoxicitat causada per la CsA | 30 |
| 2.5. Altres immunosupressors | 35 |
| 3. Les immunofilines | 37 |
| 3.1. Aspectes generals | 37 |
| 3.2. Les ciclofilines | 37 |
| 3.2.1. La ciclofilina A (CypA) | 37 |
| 3.2.2. La ciclofilina B (CypB) | 42 |
| 3.2.3. La ciclofilina D (CypD) | 46 |
| 3.2.4. Altres ciclofilines | 50 |
| 3.3. Les FK506 <i>binding proteins</i> | 50 |
| 3.3.1. FKBP12 | 50 |
| 3.3.2. FKBP25 | 50 |
| 3.3.3. FKBP52 | 50 |
| 4. Les ciclofilines i el dany renal | 51 |
| 4.1. CypA i el dany renal induït per la CsA | 51 |
| 4.2. CypB i el dany renal induït per la CsA | 52 |
| 4.3. CypD i el dany renal induït per la CsA | 53 |
| OBJECTIUS | 55 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| MATERIALS | 59 |
| 1. Línies cel·lulars | 61 |
| 1.1. Cèl·lules | 61 |
| 1.2. Medis de cultiu | 62 |
| 2. Soques bacterianes | 63 |
| 3. Vectors i constructes | 63 |
| 3.1. Vectors | 63 |
| 3.1.1. Vector mU6pro | 63 |
| 3.1.2. pEGFP-C3 | 63 |
| 3.1.3. p <i>Silencer</i> TM 4.1-CMV Hygro (AMBION) | 63 |
| 3.2. Constructes | 64 |
| 4. Oligonucleòtids | 64 |
| 4.1. Transfecció transitòria dels siRNA | 64 |
| 4.1.1. <i>Small hairpin</i> RNA (shRNA) | 65 |
| 4.1.2. siRNA doble cadena | 65 |
| 4.2. Transfecció estable dels siRNA | 65 |
| 5. Reactius Químics | 66 |
| 6. Instruments i Aparells | 66 |
| | |
| MÈTODES | 69 |
| 1. Purificació d'àcids nucleics | 71 |
| 1.1. Extracció d'RNA total | 71 |
| 1.1.1. Extracció d'RNA amb el <i>Kit RNeasy</i> de QIAGEN | 71 |
| 1.2. Purificació de DNA plasmídic | 71 |
| 1.2.1. Purificació a petita escala de DNA plasmídic (<i>Miniprep</i>) | 71 |
| 1.2.2. Purificació a gran escala de DNA plasmídic (<i>Maxiprep</i>) | 71 |
| 1.3. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa | 72 |
| 1.4. Precipitació del DNA | 72 |
| 2. Anàlisi dels àcids nucleics | 72 |
| 2.1. Electroforesi en gels d'agarosa | 72 |
| 2.1.1. Electroforesi analítica | 72 |
| 2.1.2. Electroforesi preparativa | 73 |
| 2.2. Amplificació d'àcids nucleics | 73 |
| 2.2.1. PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) | 73 |
| 2.2.2. qRT-PCR (<i>Quantitative Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction</i>) | 74 |
| 2.3. Seqüenciació del DNA | 77 |
| 3. DNA Recombinant | 78 |
| 3.1. Clonatge de DNA | 78 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.1. Digestió i purificació del vector de clonatge mU6pro | 78 |
| 3.1.2. Preparació de l'insert a clonar: anellament dels oligonucleòtids | 78 |
| 3.1.3. Lligació de l'insert a clonar | 79 |
| 3.2. Transformació de bacteris competents | 79 |
| 3.2.1. Transformació per xoc tèrmic | 79 |
| 4. RNA d'interferència (RNAi) | 80 |
| 4.1. Eliminació de l'expressió gènica de forma transitòria | 80 |
| 4.1.1. Vector d'expressió mU6pro | 80 |
| 4.1.2. siRNA-Cy3 | 81 |
| 4.2. Eliminació de l'expressió gènica de forma estable | 82 |
| 5. Cultius cel·lulars i transfeccions | 83 |
| 5.1. Cultius cel·lulars | 83 |
| 5.1.1. Tripsinització | 83 |
| 5.1.2. Recompte de cèl·lules | 84 |
| 5.1.3. Conservació de cèl·lules | 84 |
| 5.1.4. Descongelació de cèl·lules | 85 |
| 5.2. Transfecció transitòria i estable | 85 |
| 5.2.1. Transfecció transitòria | 85 |
| 5.2.2. Transfecció estable | 89 |
| 6. Estudi de la viabilitat, toxicitat i mort cel·lular | 89 |
| 6.1. Tractament amb els diferents fàrmacs | 89 |
| 6.2. Estudi de la viabilitat cel·lular | 91 |
| 6.2.1. Assaig XTT | 92 |
| 6.2.2. MTT en temps real | 92 |
| 6.2.3. Citometria de flux. Anàlisi del cicle cel·lular | 93 |
| 6.2.4. Mesures de respiració endògena. El consum d'oxigen | 94 |
| 6.3. Estudi de la mort cel·lular | 95 |
| 6.3.1. Assaig de la mort cel·lular | 95 |
| 6.3.1.1. <i>In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein</i> | 95 |
| 6.3.1.2. <i>Cell Death Detection ELISA^{PLUS}</i> | 96 |
| 7. Anàlisi de proteïnes | 97 |
| 7.1. Extracció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars | 97 |
| 7.2. SDS-PAGE d'una dimensió | 97 |
| 7.3. L'electroforesi bidimensional (2D) | 98 |
| 7.4. <i>Western blot</i> | 101 |
| 8. Anàlisi estadístic | 101 |
| Annex: composició de tampons i medis | 103 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESULTATS | 107 |
| 1. Caracterització dels sistemes cel·lulars tubulars renals | 109 |
| 1.1. Estudi de la viabilitat cel·lular | 109 |
| 1.1.1. Efecte dels diferents fàrmacs en la viabilitat cel·lular | 109 |
| 1.1.2. Efecte dels temps de tractament i de les dosis de CsA en la viabilitat cel·lular | 111 |
| 1.1.3. Efecte de la CsA en la respiració mitocondrial | 114 |
| 1.1.4. Efecte de la CsA en el cicle cel·lular | 115 |
| 1.2. Estudi de la mort cel·lular produïda per la CsA | 116 |
| 2. Estudi proteòmic diferencial i identificació de proteïnes implicades en la toxicitat renal produïda per la CsA | 119 |
| 2.1. Anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 tractades amb diferents dosis de CsA | 119 |
| 2.2 Anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 i cèl·lules PCT3 tractades amb 10 µM de CsA | 121 |
| 2.2.1. Estudi proteòmic diferencial i identificació de proteïnes | 121 |
| 2.2.2. Agrupació i classificació de les proteïnes diferencialment expressades amb CsA | 122 |
| 2.2.3. Comprovació d'algunes de les proteïnes identificades per <i>Western blot</i> | 127 |
| 2.3. Anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 i cèl·lules HK-2 | 129 |
| 2.3.1. Estudi proteòmic diferencial i identificació de proteïnes | 129 |
| 2.3.2. Validació del model cel·lular PCT3 | 131 |
| 3. Eliminació de l'expressió gènica de les ciclofilines A i B mitjançant RNA d'interferència (RNAi) | 132 |
| 3.1. Eliminació de l'expressió gènica de les ciclofilines A i B | 133 |
| 3.1.1. Transfecció transitòria del vector d'expressió mU6pro | 133 |
| 3.1.2. Transfecció transitòria dels siRNA sintetitzats químicament i marcats amb Cy3™ | 133 |
| 3.1.3. Transfecció estable: p <i>Silencer</i> ™ 4.1-CMV Hygro | 135 |
| 3.2. Estudi de l'efecte de la CsA en absència dels seus receptors: la CypA i la CypB | 137 |
| 3.2.1. Estudi de la viabilitat cel·lular | 138 |
| 3.2.2. Estudi de la mort cel·lular | 138 |
| 3.2.3. Estudi de l'adhesió cel·lular | 139 |
| 3.3. Estudi proteòmic i identificació de proteïnes afectades per l'eliminació de l'expressió de la CypA i la CypB | 141 |

| | |
|---------------------|-----|
| DISCUSSIÓ | 145 |
| CONCLUSIONS | 163 |
| BIBLIOGRAFIA | 169 |

ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

FIGURES

INTRODUCCIÓ

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 | El sistema urinari | 19 |
| FIGURA 2 | Esquema del desenvolupament de la nefrona | 20 |
| FIGURA 3 | Secció vertical del ronyó | 20 |
| FIGURA 4 | La nefrona | 21 |
| FIGURA 5 | El corpuscle renal | 22 |
| FIGURA 6 | Segments dels túbul proximal renal | 23 |
| FIGURA 7 | Túbuls distals i col·lectors | 25 |
| FIGURA 8 | La ciclosporina A | 27 |
| FIGURA 9 | Senyals intracel·lulars generats en l'activació del limfòcit T | 29 |
| FIGURA 10 | Manifestacions de la nefrotoxicitat causada per la CsA | 30 |
| FIGURA 11 | La CsA i el TGF- β | 31 |
| FIGURA 12 | La CsA induïx senescència a les cèl·lules HK-2 | 33 |
| FIGURA 13 | Altres immunosupressors | 36 |
| FIGURA 14 | Isomerització cis-trans d'un enllaç peptidil-prolil | 37 |
| FIGURA 15 | Alineament de seqüències de diferents membres de la família de la CypA | 38 |
| FIGURA 16 | Distribució de la CypA en teixits humans | 39 |
| FIGURA 17 | Alineament de CypA i CypB | 43 |
| FIGURA 18 | Esquema de la cadena de transport d'electrons i de la síntesi d'ATP | 47 |
| FIGURA 19 | Vies d'inducció de la mort cel·lular per apoptosi | 48 |
| FIGURA 20 | Manifestacions histològiques en ronyons després de l'administració de CsA | 52 |
| FIGURA 21 | L'expressió de la proteïna KAP protegeix de la toxicitat induïda per la CsA | 53 |

MATERIALS

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 22 | Representació gràfica dels diferents vectors d'expressió | 64 |
|-----------|----------------------------------------------------------|----|

MÈTODES

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 23 | Model d'amplificació d'una corba de la qRT-PCR | 75 |
| FIGURA 24 | Esquema de la síntesi de la doble cadena de siRNA | 82 |
| FIGURA 25 | Esquema del disseny de l'oligonucleòtid que donarà lloc | |

| | | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| | al <i>hairpin</i> siRNA | 83 |
| FIGURA 26 | Esquema de la cambra d'oxigen | 94 |
| RESULTATS | | |
| FIGURA 27 | Efecte dels diferents fàrmacs i dosis sobre la viabilitat cel·lular | 110 |
| FIGURA 28 | Efecte de les dosis de 20 i 50 μ M sobre la viabilitat cel·lular | 111 |
| FIGURA 29 | Efecte dels temps de tractament i de les dosis de CsA en la viabilitat cel·lular | 112 |
| FIGURA 30 | Efecte de la CsA en l'activitat deshidrogenasa mitocondrial en temps real | 113 |
| FIGURA 31 | Efecte de la CsA en l'activitat deshidrogenasa mitocondrial durant temps de tractament curts | 114 |
| FIGURA 32 | Efecte de la CsA en el consum d'oxigen | 115 |
| FIGURA 33 | Efecte de la CsA en el cicle cel·lular | 116 |
| FIGURA 34 | Apoptosi en cèl·lules PCT3 i HK-2 induïda per la CsA | 117 |
| FIGURA 35 | Enriquiment oligonucleosomal en cèl·lules PCT3 i HK-2 induït per la CsA | 118 |
| FIGURA 36 | Mapa proteic de cèl·lules PCT3 | 119 |
| FIGURA 37 | Comportament d'algunes proteïnes al sotmetre's al tractament amb dosis creixents de CsA | 120 |
| FIGURA 38 | Anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 i cèl·lules PCT3tractades amb CsA | 122 |
| FIGURA 39 | Exemples de classificació del GO | 124 |
| FIGURA 40 | Exemples de classificació del FATIGO | 125 |
| FIGURA 41 | Exemples de classificació del MAPPFinder | 126 |
| FIGURA 42 | Anàlisi de l'expressió proteica d'algunes proteïnes diferencialment expressades al sotmetre les cèl·lules PCT3 al tractament amb CsA 10 μ M | 128 |
| FIGURA 43 | <i>Western blot</i> de gels bidimensionals per a les proteïnes RACK-1, α -B-cristalina i CypA | 128 |
| FIGURA 44 | Anàlisi de l'expressió proteica d'algunes proteïnes diferencialment expressades al sotmetre els ratolins al tractament amb CsA (80 mg/kg.dia) durant 14 dies | 129 |
| FIGURA 45 | Anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 i de cèl·lules HK-2 | 130 |
| FIGURA 46 | <i>Western blot</i> de les mostres interferides amb els diferents siRNA CypB, recollides a les 48 i 72 hores post-transfecció | 134 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 47 | <i>Western blot</i> de les mostres interferides amb els diferents siRNA CypA, recollides a les 48 i 72 hores post-transfecció | 135 |
| FIGURA 48 | Anàlisi dels clons resultants de la interferència estable de la ciclofilina B | 136 |
| FIGURA 49 | Anàlisi dels clons resultants de la interferència estable de la ciclofilina A | 137 |
| FIGURA 50 | Efecte de les dosis en la viabilitat cel·lular dels clons interferits | 138 |
| FIGURA 51 | Enriquiment oligonucleosomal en els diferents clons induït per la CsA | 139 |
| FIGURA 52 | Estudi de l'adhesió cel·lular | 140 |
| FIGURA 53 | Anàlisi proteòmic diferencial de les cèl·lules PCT3 interferides amb la CypA o la CypB | 141 |

DISCUSSIÓ

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 54 | Esquema representatiu de la hipòtesi del metabolisme energètic | 157 |
|-----------|----------------------------------------------------------------|-----|

TAULES

MATERIALS

| | | |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TAULA 1 | Soca bacteriana d' <i>Escherichia coli</i> | 63 |
| TAULA 2 | Detall dels constructes utilitzats en aquest treball | 64 |
| TAULA 3 | Oligonucleòtids utilitzats per la síntesi dels shRNA transfectats transitòriament | 65 |
| TAULA 4 | Oligonucleòtids utilitzats per a la síntesi dels siRNA | 65 |
| TAULA 5 | Oligonucleòtids utilitzats per la síntesi dels shRNA transfectats de forma estable | 66 |
| TAULA 6 | Noms i models dels principals aparells utilitzats | 66 |

MÈTODES

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| TAULA 7 | Volums i quantitats de transfecció | 86 |
| TAULA 8 | Volums i quantitats de transfecció recomanats al utilitzar siPORT <i>Amine</i> | 87 |
| TAULA 9 | Volums i quantitats de transfecció recomanats al utilitzar siPORT <i>Lipid</i> | 88 |
| TAULA 10 | Quantitat de cèl·lules PCT3/HK-2 sembrades segons el tamany de la placa | 90 |

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TAULA 11 | Esquema de les dilucions i volums emprats en el tractament cel·lular amb els diferents tipus de CsA | 90 |
| TAULA 12 | Esquema de les dilucions i volums emprats en el tractament cel·lular amb Crempophor®EL | 91 |
| TAULA 13 | Resum de les condicions emprades en els diferents experiments realitzats | 91 |
| TAULA 14 | Volums necessaris per a la preparació de dos mini-gels per SDS-PAGE | 98 |
| TAULA 15 | Quantitats i volums necessaris per a la realització de l'IEF | 99 |
| TAULA 16 | Volums necessaris per a la preparació del gel separador per a la segona dimensió | 100 |
| TAULA 17 | Anticossos primaris utilitzats per a la immunodetecció per <i>Western blot</i> | 102 |
| TAULA 18 | Anticossos secundaris utilitzats per a la immunodetecció per <i>Western blot</i> | 102 |

RESULTATS

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TAULA 19 | Mesures del consum d'oxigen de la mostra CONTROL i de la mostra TRACTAMENT | 115 |
| TAULA 20 | Quantificació de cèl·lules apoptòtiques per la tècnica de TUNEL i per la tècnica d'immunoassaig enzimàtic <i>Cell Death Detection ELISA^{PLUS}</i> kit | 118 |
| TAULA 21 | Proteïnes diferencialment expressades de cèl·lules PCT3 tractades amb la dosi de 10 µM de CsA | 123 |
| TAULA 22 | Proteïnes d'humà i de ratolí seqüenciades per a confirmar la semblança entre els dos proteomes | 131 |
| TAULA 23 | Eficiències de transfecció del vector d'expressió mU6pro | 133 |
| TAULA 24 | Nivells transitoris d'expressió de CypB en cèl·lules PCT3 a les 48h post-transfecció. | 135 |
| TAULA 25 | Nivells d'expressió de CypB en cèl·lules PCT3 després de la transfecció estable. | 136 |
| TAULA 26 | Proteïnes diferencialment expressades de cèl·lules PCT3 interferides amb la CypA. | 142 |
| TAULA 27 | Proteïnes diferencialment expressades de cèl·lules PCT3 interferides amb la CypB | 143 |

ÍNDEX D'ABREVIATURES

| | |
|----------------|-------------------------------------------------------|
| aa | aminoàcid |
| Abs | absorbància |
| b, kb | base, kilobase |
| cDNA | DNA complementari |
| Da, kDa | Dalton, kilodalton |
| DNA | àcid desoxiribonucleic |
| h | hora |
| l | litre |
| M, nM, μ M | molar, nanomolar, micromolar |
| min | minut |
| mRNA | RNA missatger |
| o/n | durant tota la nit (<i>over night</i>) |
| RNA | àcid ribonucleic |
| rpm, g | revolucions per minut, força centrífuga relativa |
| RT | transcripció reversa (<i>reverse transcription</i>) |
| s | segon |
| u.a. | unitats arbitràries |
| UV | ultraviolat |
| Vf | volum final |