

Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON CypA, CypB  
Y FKBP12 Y SU IMPLICACIÓN EN LA TOXICIDAD RENAL PRODUCIDA POR  
LOS INMUNOSUPRESORES CsA Y FK506

Realizada por  
**Guillermo Suñé Rodríguez**

Para optar al grado académico de Doctor por la Universidad de Barcelona  
Trabajo realizado en el Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular  
(CIBBIM)  
del Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron bajo la dirección de la  
**Dra. Anna Meseguer i Navarro**

Tesis inscrita en Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, programa de  
Biomedicina (Bienio 2003-2005), de la  
Universidad de Barcelona.

Tutor: Dr. Marçal Pastor Anglada

Guillermo Suñé Rodríguez

Dra. Anna Meseguer i Navarro

Dr. Marçal Pastor Anglada

Barcelona, Octubre de 2008

Agradecimientos:

Esta tesis ha recibido la ayuda económica del Fondo Social Europeo y del Departamento de Universidades, Investigación y Sociedad de la Información de la Generalidad de Cataluña.





Figuras y tablas	6
Abreviaturas	9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
1. El Riñón	13
1.1. Origen embrionario del riñón	13
1.2. Estructura renal	14
1.3. La neurona	14
1.3.1. El corpúsculo renal	16
1.3.2. El túbulo proximal	17
1.3.3. El asa de Henle	19
1.3.4. El túbulo distal	20
1.3.5. El aparato yuxtaglomerular	20
1.4. La función renal	21
2. La ciclosporina A	22
2.1. Activación del linfocito T e inmunosupresión	23
2.1.1. Activación del linfocito	23
2.1.2. Inmunosupresión	24
2.1.3. Los NFATs	24
2.1.3.1. NFATs en el riñón	25
2.1.4. La calcineurina	26
2.2. Mecanismo de nefrotoxicidad producida por la CsA	28
2.2.1. Efectos agudos	29
2.2.2. Efectos crónicos	29
2.3. Otros inmunosupresores	32
2.3.1. FK-506 (tacrolimus)	33
2.3.2. Sirolimo (SRL)	33
2.3.3. Micofenolato mofetilo (MMF)	33
2.3.4. Sanglifehrin	33
3. Las inmunofilinas	35
3.1. Las ciclofilinas	35
3.1.1. Ciclofilina A (hCypA)	36
3.1.2. Ciclofilina B (hCypB)	42
3.1.3. Otras ciclofilinas	47
3.1.3.1. Ciclofilina D	47

3.1.3.2. Ciclofilina C	48
3.1.3.3. Ciclofilina 40	48
3.2. Las <i>FK506 Binding proteins</i> (FKBP)49	
3.2.1. FKBP1249	
<b>OBJETIVOS</b>	51
<b>MATERIALES</b>	55
1. Animales y tejidos	57
1.1. Ratones	57
1.2. Extracción de tejidos	57
2. Líneas celulares	57
2.1. PKSV-PCT3	57
2.2. HEK293	58
2.3. Cos-7	58
2.4. HK-2	58
3. Medios de cultivo	58
4. Cepas bacterianas	60
5. Vectores	61
6. Constructor	63
7. Oligonucleótidos	65
8. Reactivos químicos	66
9. Instrumentación y aparatos	66
<b>MÉTODOS</b>	71
1. Purificación de ácidos nucleicos	73
1.1. Extracción de RNA total	73
1.1.1. Método de Chomczynski-Sacchi	73
1.1.2. Extracción de RNA con el <i>kit RNeasy</i> de QUIAGEN	73
1.2. Purificación de DNA plasmídico	74
1.2.1. Purificación a pequeña escala de DNA plasmídico ( <i>Miniprep</i> )	74
1.2.2. Purificación a gran escala de DNA plasmídico ( <i>Maxiprep</i> )	74
1.3. Purificación de DNA a partir de geles de azarosa	75
1.4. Purificación de los productos de PCR o RT-PCR	75
2. Análisis de ácidos nucleicos	75

2.1. Electroforesis en geles de azarosa	75
2.1.1. Electroforesis analítica	76
2.1.2. Electroforesis preparativa	76
2.2. Amplificación de ácidos nucleicos	76
2.2.1. PCR ( <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> )	77
2.2.2. RT-PCR ( <i>REVERSE TRANSCRIPTION CHAIN REACTION</i> )	78
2.2.3. Mutagénesis dirigida	79
2.3. Secuenciación de DNA	81
3. DNA recombinant	82
3.1. Clonaje y subclonaje de DNA	82
3.1.1. Clonaje de productos de PCR	82
3.1.2. Subclonaje de DNA	84
3.2. Transformación de bacterias competentes	86
3.2.1. Preparación de bacterias competentes para transformar por choque térmico	86
3.2.2. Transformación por choque térmico	87
4. Cultivos celulares y transfecciones	88
4.1. Cultivos celulares	88
4.1.1. Líneas y medios de cultivo	88
4.1.2. Tripsinización	89
4.1.3. Recuento de células	90
4.1.4. Conservación de células	90
4.1.5. Descongelación de células	91
4.2. Transfección transitoria	92
4.2.1. Transfección con fosfato de calcio	93
5. Producción de lentivirus	94
6. Extracción de proteínas	96
6.1. Extracción de proteínas totales	96
6.1.1. Extracción de proteínas totales a partir de cultivo celular	96
6.1.2. Extracción de proteínas totales a partir de tejido	97
7. Expresión de proteínas <i>in vitro</i> : Traducción <i>in vitro</i> mediante reticulocitos de conejo	98
8. Técnicas inmunológicas	99
8.1. Análisis de proteínas por SDS-PAGE y <i>western-blot</i>	99
8.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	99
8.1.2. Electro-transferencia de proteínas: <i>Western Blot</i>	101
8.1.3. Inmunodetección	102
9. Inmunoprecipitación	103
10. Inmunofluorescencia y microscopia confocal	105

10.1. Sistema de fijación con alcohol	106
10.2. Sistema de fijación con paraformaldehído (PFA)	107
11. Ensayo de interacción proteína-proteína	108
11.1. Ensayo de doble híbrido en levadura	108
11.1.1. Transformación de levaduras competentes	109
11.2. Ensayo de <i>Pull-Down</i>	110
11.2.1. Expresión de las proteínas GST-hCypA, GS-hCypB, GST-FKBP12	111
11.3. Purificación por cromatografía de afinidad	113
11.4. Ensayo <i>Pull-Down</i>	113
12. Actividades enzimáticas	114
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa	114
13. <i>Blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i>	115
13.1. Preparación geles <i>Blue Native</i>	116
14. Ensayos enzimáticos en gel	118
14.1. Complejo I cadena respiratoria mitocondrial	119
14.2. Complejo IV cadena respiratoria mitocondrial	119
14.3. Complejo V cadena respiratoria mitocondrial	119
15. Composición de tampones y medios	123

## RESULTADOS<sup>127</sup>

1. Interacciones para CypA, CypB y FKBP12 mediante ensayos de doble híbrido	129
1.1. Identificación de las interacciones con ciclofilina A	131
1.2. Identificación de las interacciones con ciclofilina B	133
1.3. Identificación de las interacciones con FKBP12	134
2. Ensayos de <i>Pull-Down</i>	136
3. Ensayos de co-inmunoprecipitación	142
4. Co-localización de CypB, CypA y la subunidad β de la Na/K	141
5. Localización de CypA, CypB y la subunidad β de la bomba Na/K en células HK-2 tratadas y sin tratar con CsA	142
6. Interferencia para ciclofilina B y ciclofilina A	145
7. La interacción entre CypA, CypB con la subunidad β de la bomba Na/K podría estar mediada por la actividad PPIasa	147
8. Actividad enzimática de la subunidad β de la bomba Na/K	148
9. CypB interacciona con la subunidad b1 de la ATP sintasa mitocondrial	151
10. CsA afecta a los complejos mitocondriales via ciclofilina	153

<b>DISCUSIÓN</b>	157
1. Interacciones encontradas para HCypB-HCypA-FKBP12	159
2. Na/K- $\beta$ interacciona con CypB y CypA en ensayos de doble híbrido	163
3. Na/K- $\beta$ colocaliza con CypB en el retículo endoplasmático y la membrana	165
4. La localización de CypB , CypA y Na/K- $\beta$ está afectada en células HK-2 que han sido tratadas con el inmunosupresor CsA	166
5. El inmunosupresor CsA afecta la actividad Na/K-ATPasa en células HK-2	167
6. CypB interacciona con la subunidad b1 de la ATP sintasa mitocondrial (ATP5F1) en ensayos de doble híbrido	169
7. Efectos de CsA sobre la expresión de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	170
<b>CONCLUSIONES</b>	177
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	181

# FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura 1. Sección vertical del riñón	14
Figura 2. Neurona	16
Figura 3. Corpúsculo renal	17
Figura 4. Segmentos del túbulo proximal renal	18
Figura 5. El túbulo proximal y distal	19
Figura 6. Asa de henle	19
Figura 7. Aparato yuxtaglomerular	20
Figura 8. CsA	22
Figura 9. Activación de la célula T en ratones K/O para NFAT1 y NFAT2	25
Figura 10. Expresión de las subunidades $\alpha$ de la calcineurina	27
Figura 11. Mecanismos de acción de fármacos inmunosupresores	28
Figura 12. CsA y TGF- $\beta$ , CsA induce el aumento de la expresión del mRNA de $\alpha$ -(I)-colágeno	30
Figura 13. Efectos de CsA	32
Figura 14. Otros inmunosupresores	34
Figura 15. Actividad PPIasa o rotamasa	35
Figura 16. Estructuras primarias de ciclofilinas	36
Figura 17. Estructura de ciclofilina A (CypA)	36
Figura 18. Proliferación de células interferidas para CypA es resistente a CsA	37
Figura 19. CD147 es necesario para la respuesta quimiotáctica de CypA	39
Figura 20. Ensayo <i>pull-down</i> que demuestra la interacción de CypA y calreticulina	40
Figura 21. CypA es esencial para la replicación de GT-1a y GT-1b	41
Figura 22. Estructura de ciclofilina B (CypB)	42
Figura 23. CsA afecta la distribución de CypB	43
Figura 24. Chaperonas moleculares asociadas con apoB que está localizado en retículo endoplásmico y aparato de golgi	44
Figura 25. Interacción entre CypB/prolactina/Stat5a y actividad transcripcional de Stat5a	46

Figura 26. Localización de CypD en la membrana mitocondrial y proteínas asociadas	48
Figura 27. Estructura de <i>FK-binding protein 12</i> (FKBP12)	49
Figura 28. Interacción entre FKBP12 y T $\beta$ R-I	50
<b>MÉTODOS</b>	
Figura 29. Producción de virus mediante el virus del HIV-1	94
<b>RESULTADOS</b>	
Figura 30. Imagen de un clon positivo resultante tras la cotransformación en la cepa de levadura AH109	128
Figura 31. Expresión de GST y proteínas recombinantes	135
Figura 32. Expresión de la subunidad beta de Na/K, aldolasa B y proteína S en Cos7	136
Figura 33. Ensayos de <i>pull-down</i>	137
Figura 34. Co-inmunoprecipitación	138
Figura 35. Co-localización	139
Figura 36. Localización de CypA, CypB y Na/K- $\beta$	142
Figura 37. mRNAi para CypAB y CypA	145
Figura 38. <i>Pull-down</i> con los residuos mutados de CypA y CypB	146
Figura 39. Actividad Na/K-ATPase1	147
Figura 40. Actividad Na/K-ATPase2	148
Figura 41. Expresión de Na/K- $\beta$	149
Figura 42. Interacción entre CypB y ATP5F1 en los ensayos de doble híbrido	150
Figura 43. Ensayo de <i>pull-down</i> para confirmar la interacción entre CypB y ATP5F1	151
Figura 44. <i>BLUE-NATIVE-SDS-PAGE</i> en PCT3	152
Figura 45. <i>BLUE-NATIVE-SDS-PAGE</i> en células silenciadas para CypA y CypB	153
Figura 46. <i>BLUE-NATIVE-SDS-PAGE</i> en células mutadas para CypA y CypB	154

## **TABLAS**

### **MATERIALES**

Tabla 1. Medio PKSV-PCT3 y HK-2	59
Tabla 2. Medio Cos-7 y HEK293	60
Tabla 3. Cepas bacterianas	60
Tabla 4. Mapa de los vectores utilizados	61
Tabla 5. Constructor	63
Tabla 6. <i>Primers</i>	65
Tabla 7. Aparatos e instrumentos	66

### **MÉTODOS**

Tabla 8. Cantidades y volúmenes de transfección	95
Tabla 9. Volúmenes necesarios para la preparación de 2 geles de acrilamida para SDS-PAGE	100
Tabla 10. Volúmenes necesarios para la preparación de geles para <i>blue-native</i>	116
Tabla 11. Anticuerpos empleados en la inmunodetección para <i>western blot</i>	119
Tabla 12. Tampones y medios	121

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tabla 13. Interacciones con CypA	129
Tabla 14. Interacciones con CypB	130
Tabla 15. Interacciones con FKBP12	131
Tabla 16. Procesos moleculares	162

## ABREVIATURAS

**AD** dominio de activación

**AldoB** aldolasa B

**ANT** *Adenine Nucleotide Translocator*

**Aop1** *antioxidant protein 1*

**AP-1** *Activator Protein 1*

**ApoB** apolipoproteína B

**AR** Artritis Reumatoide

**ATP1 $\beta$ 1** subunidad beta de la bomba Na/K

**ATP5F1** ATP sintasa subunidad B1

**b, kb** base, kilobase

**Bcl-2** *Bcell CLL/lymphoma2*

**BD** dominio de union

**bp** pares de base

**CD** *Cluster of Differentiation*

**cDNA** acido desoxirribonucleico complementario

**cfu** unidades formadoras de colonia

**Ck1** caseína quinasa 1

**CLD** *Cyclophilin-Like-Domain*

**CNA** calcineruina A

**CNB** calcineurina B

**CsA** ciclosporina A

**Cyp** ciclofilina

**DAG** diacilglicerol

**DMDGH** *dimethylglycine dehydrogenase*

**DNA** acido desoxirribonucleico

**eIF-2- $\beta$**  factor de inicio de elongación

**EMMPRIN** *extracelullar matrix metalloproteinase inducer*

**ERP72** *endoplasmic reticulum protein 72*

**FAM13A1** *family with sequence similarity 13*

**FKBPs** *FK-binding proteins*

**FRET** *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

**g, mg,  $\mu$ g** gramo, miligramo, microgramo

**GAGs** glicosaminoglicanos de sulfato

**GATA3** *Gata binding protein 3*

**GFP** *Green Fluorescence Protein*

**GRP94** *Glucose-Regulated Protein of 94*

**GSK3** glicogeno sintasa quinasa 3

**H** histona

**H** hora

**HA** hemaglutinina

**HCV** virus de la hepatitis C

**hCyp** ciclofilina humana

**HDAC2** *histone-deacetylase 2*

**HIV** virus de inmunodeficiencia humana

**hsp** *heat shock protein*

**IFN $\gamma$**  *interferon  $\gamma$*

**IL** *interleukin*

**IMPDH** monofosfato inosin deshidrogenasa

**iNOS** NO sintasa

**IP** inmunoprecipitación

**IP<sub>3</sub>** 1,4,5-inositol trifosfato

**IP3R2** receptor inositol 1,4,5-trifosfato

**IPTG** *isopropyl-1-thio- $\beta$ D-galactopiranoside*

**I $\beta$ R-1** receptores TGF- $\beta$  tipo 1

**JNK** Jun-N-terminal quinasa

**KAP** *Kidney Androgen regulated Protein*

**M** molar

**mA** miliamperios

**MAPK** Mitogen-Activated Protein Kinase

**MeBmt** 3-hydroxy-4-metil-2-metilamino-6-octanoico

**MEFs** *Mouse Embryonic Fibroblasts*

**MHC** complejo mayor de histocompatibilidad

**min** minuto

**MMF** micofenolato mofetilo

**MMP** *Matrix MetalloProteinases*

**MPTPs** poros permeables de transición mitocondrial

**mRNA** ácido ribonucleico mensajero

**MT1-MMP** *matrix metalloproteinase 14*

**mTOR** *mammalian target of rapamycin*

**NFAT** *nuclear factor of activated T*

**NF- $\kappa$ B** *nuclear factor-kappa  $\beta$*

**NLS** señal de localización nuclear

**NO** óxido nítrico

**NUC18** *18 kDa nuclease*

**Oct-1** *octamer 1*

**PARVA** *parvin alpha*

**PCK2** fosofenolpiruvato carboxiquinasa 2

**PCR** *polymerase chain reaction*

**PKC** proteína quinasa C

**PLC $\gamma$**  fosfolipasa C

**PPIasa** actividad peptidil-prolina cis/trans isomerasa

**PTOV1** *prostate tumor overexpressed gene 1*

**RISC** *RNA induced silencing complex*

**RNAi** RNA de interferencia

**ROS** *reactive oxygen species*

**RT-PCR** PCR-transcripción inversa

**RyR2** rianodina tipo 2

**S** segundo

**SC5DL** *sterol-C5-desaturase*

**SHR** *spontaneously hypertensive rats*

**shRNA** *short hairpin RNA*

**Stat5** *signal transducer and activator of transcription 5a*

**SV40** virus de simio 40

**T<sub>a</sub>** temperatura de anillamiento

**TATDN1** *TaT D NNase domain containing 1*

**TCR** receptor de la célula T

**TGF- $\beta$**  factor de crecimiento beta

**TIMP-1** metaloproteinasa-1 inhibidora de tejido

**TRL** tacrolimo

**UBOX5** *U-box domain containing 5*

**V** voltaje

**VDAC** *voltage dependent ion selective channel*

**VEGF** factor de crecimiento del endotelio vascular

**VSMC** células de musculatura vascular

**WNK** with-no-lysine = K

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN



## EL RIÑÓN

El riñón es el órgano fundamental del aparato urinario propio de los vertebrados. Importa y exporta grandes volúmenes de agua y sales en respuesta a diferentes situaciones fisiológicas.

Los riñones de mamíferos son dos órganos parejos situados en la parte posterior del abdomen debajo del peritoneo que se localizan a cada lado de la columna vertebral. Están envueltos por un envoltorio fibroso que forma una lámina firme que recubre todo el órgano. En la mayoría de los mamíferos cada riñón se alimenta de una sola arteria renal que emana directamente de la aorta abdominal de manera que, recibe la sangre arterial a la máxima presión disponible. Una vez filtrada en el glomérulo, la sangre sale del riñón por la vena renal.

El riñón lleva a cabo sus acciones homeostáticas a través de una filtración glomerular selectiva, mediada por la elevada presión en el glomérulo, secreción tubular de toxinas y reabsorción de sustancias metabólicas importantes (azúcares, aminoácidos, etcétera). Todos estos procesos son los que regulan la concentración de los productos finales del metabolismo, la presión osmótica, el equilibrio ácido-base, la composición iónica y el volumen del medio interno.

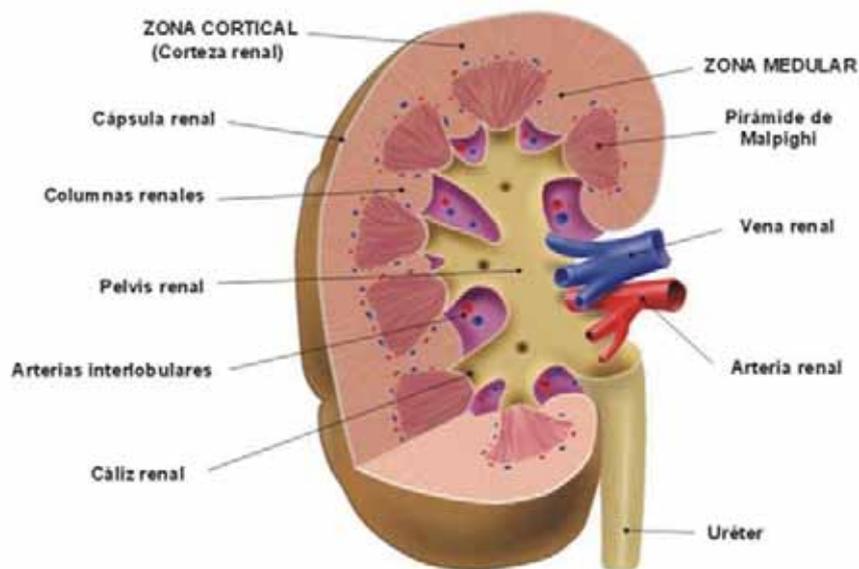
El riñón también interviene en dos mecanismos homeostáticos mediados por hormonas de vital importancia. Uno de ellos es la síntesis y secreción de eritropoyetina implicada en la producción de eritrocitos por la médula ósea. El otro es la participación en el mantenimiento y regulación de la presión sanguínea por el sistema renina-angiotensina principalmente a través de la secreción de renina.

### 1.1. Origen embrionario del riñón

El desarrollo embrionario del riñón se sucede en tres órganos secretores diferentes: el pronefro, el metanefro y el mesonefro originados a partir de una masa celular intermedia mesodérmica. En mamíferos, el pronefro y el metanefro están solo presentes durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, de manera que el riñón definitivo se forma a partir del mesonefro. En ratón, el desarrollo del metanefro se inicia alrededor del día 11 de gestación. El proceso más importante es la estimulación mutua entre las células mesenquimales metanéfricas y las células epiteliales del bulbo urético. A partir de este momento las células mesenquimales indiferenciadas se condensan sufriendo una transformación y diferenciándose para dar lugar al corpúsculo renal rudimentario. Paralelamente el bulbo urético se expande y crece ramificándose por el cortex en expansión. El desarrollo morfológico de esta nefrona inmadura se confirma el día 17 de gestación, completándose durante el periodo perinatal.

## 1.2. Estructura Renal

En un corte longitudinal se pueden diferenciar en el riñón dos zonas el córtex situado en la parte externa y la médula situada en la parte interna. La médula se presenta como una serie de masas estriadas cónicas, las pirámides renales, las bases de las cuales se encuentran en la región límite corticomédular, mientras que sus puntas convergen en el sinus renal. En los mamíferos pequeños, como la rata y el ratón, el riñón es unipapilar por lo que se presenta una sola pirámide, en cambio en las especies de tamaño superior, como el hombre o el perro, el riñón es multipapilar.




---

**Figura 1. Sección vertical del riñón.** Esquema de la estructura macroscópica del riñón donde se observa las dos secciones en las que se distribuye la sustancia renal, la zona cortical y la zona medular. <http://www.aula2005.com/html/cn3eso/10excretor/rinon4es.jpg>.

---

## 1.3. La Nefrona

Es la unidad funcional del riñón. Es la responsable de la filtración y de la purificación de la sangre. Un riñón humano contiene alrededor de un millón de nefronas, mientras que el riñón de una rata adulta contiene unas 30.000 aproximadamente.

Cada nefrona está constituida secuencialmente por el corpúsculo renal, el aparato juxtaglomerular, el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal. Funcionalmente, la nefrona se divide en diferentes segmentos cada uno de ellos con capacidad para desarrollar funciones específicas y diferentes que en último término vienen determinadas por los genes que expresan.

Se identifican dos poblaciones de nefronas:

- i) Las nefronas corticales: Los glomérulos están situados en la parte externa del córtex y tienen asas de Henle reducidas que se mantienen en el mismo córtex o penetran únicamente en la zona externa de la médula.
- ii) Las nefronas juxtamedulares: los glomérulos están situados en el córtex interno y presentan asas de Henle más largas que penetran en la zona interna de la médula.

Según la posición de los diferentes segmentos de la nefrona, la médula se divide en tres regiones diferenciadas:

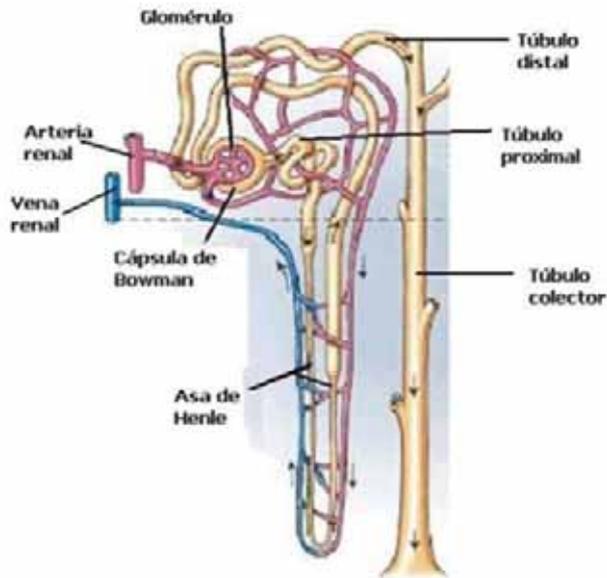
- La médula interna que contiene parte del segmento delgado ascendente y descendente del asa de Henle y parte del túbulo colector.
- La zona interna de la médula externa que contiene el resto de fragmentos delgado descendente y el grueso ascendente del asa de Henle y parte del túbulo colector.
- La zona externa de la médula externa que contiene el túbulo proximal recto, el túbulo distal recto y el túbulo colector.

En la región cortical se localizan los corpúsculos renales, el segmento contorneado de los túbulos proximales y distales, parte del segmento recto de estos túbulos y parte de los túbulos colectores.

Así pues, la función renal comienza en el corpúsculo renal que está formado por un ovillo entrelazado de capilares sanguíneos, el glomérulo, y una cubierta membranosa que la envuelve, la cápsula de Bowman. Los elementos del plasma se filtran por los capilares glomerulares y el filtrado glomerular es conducido al túbulo renal. A lo largo del recorrido por el túbulo proximal, el filtrado glomerular se convierte en orinal al producirse la reabsorción de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ...), agua y sales orgánicas como la glucosa y la secreción de ácidos y bases orgánicas. El paso por el asa de Henle supone una reabsorción continuada de sodio, cloro y agua que determina el mantenimiento de equilibrio hídrico del organismo. A continuación, el túbulo distal sigue con la reabsorción de iones de sodio y cloro pero ya es poco permeable para el agua y secreta protones y potasio. Finalmente el túbulo colector recoge orina de los túbulos

distales de diversas nefronas y desemboca en el conducto papilar de Bellini interviniendo también en el balance hídrico bajo el control de la hormona anti-diurética.

Habría que destacar también el papel del aparato juxtaglomerular, encargado del mantenimiento de la presión arterial por secreción de renina, integrado por una porción del túbulo distal que entra en contacto con el glomérulo.

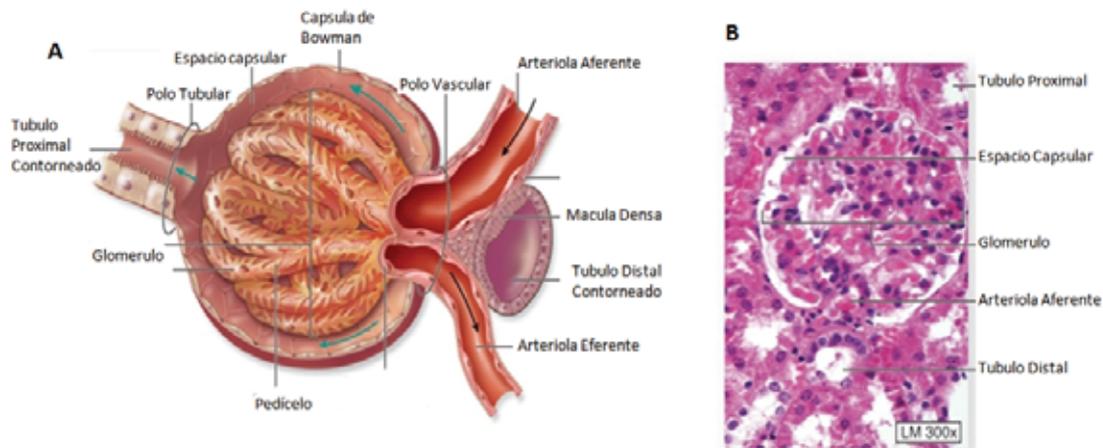


**Figura 2. Nefrona.**  
Esquema principal de una nefrona. Imagen obtenida de [http://www.cepvi.com/medicina/imagen\\_efrona2.jpg](http://www.cepvi.com/medicina/imagen_efrona2.jpg).

### 1.3.1. El Corpúsculo Renal

Los túbulos renales se inician en los corpúsculos renales. Estos, están constituidos por dos partes: el glomérulo y la cápsula glomerular o de Bowman, una cubierta membranosa que es el comienzo del túbulo proximal.

La sangre entra en el glomérulo por la arteria aferente, atraviesa la red de capilares y sale por la arteriola eferente de diámetro menor. Estas dos arteriolas entran y salen del glomérulo por el mismo punto, el polo vascular. Dentro de la cápsula, el glomérulo está revestido por una capa de células epiteliales denominadas podocitos, que forman la capa visceral. Entre ésta y la capa epitelial parietal de la cápsula de Bowman propiamente dicha, se encuentra el espacio de Bowman que tiene continuidad con la luz del túbulo proximal. Los elementos plasmáticos se filtran por los capilares glomerulares hacia el espacio de Bowman y el filtrado glomerular es conducido por el túbulo renal. La barrera de filtración entre la luz del capilar y el espacio de Bowman está formada por el endotelio capilar, la membrana basal de éste y la capa de podocitos.

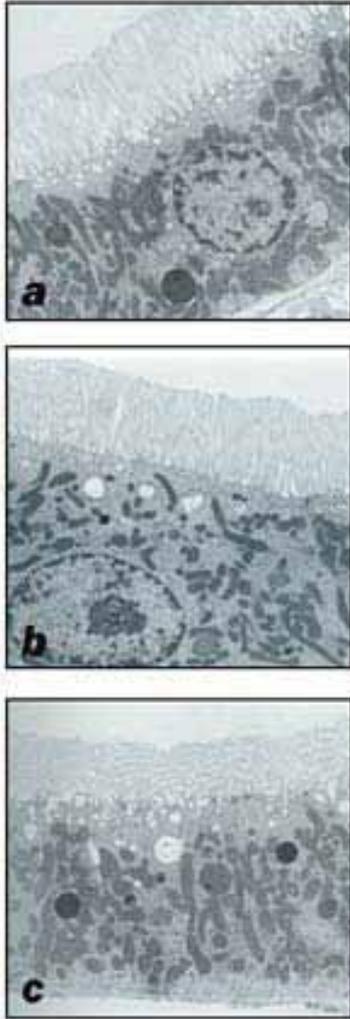


**Figura 3. Corpúsculo Renal. A.** Esquema detallado de la estructura del corpúsculo renal. **B.** Micrografía de un corte transversal de riñón donde se muestra parte del corpúsculo renal. Imagen Obtenido: [http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201\\_Mckinley/f27-6a-b\\_renal\\_corpuscl\\_c.jpg](http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_Mckinley/f27-6a-b_renal_corpuscl_c.jpg).

### 1.3.2. El Túbulo Proximal

Los túbulos renales proximales se originan en el polo urinario de los glomérulos. Consisten en largos segmentos cilíndricos de trayectoria enrollada que desembocan en el asa de Henle. Por su interior circula el filtrado glomerular que ira madurando a lo largo de su recorrido hasta convertirse en orina. Topológicamente se distinguen dos componentes: la parte inicial cortical contorneada formando la *pars convoluta*, inmediata continuación del epitelio de la capsula de Bowman, y la *pars recta* que sigue de manera rectilínea adentrándose hacia las zonas más internas en las proyecciones medulares. En el túbulo proximal de rata, ratón, conejo y ciertos simios -pero no en humanos- se pueden distinguir tres segmentos morfológicamente diferentes: S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub>. El segmento S<sub>1</sub> es la porción inicial del túbulo y transcurre en la parte contorneada constituyendo las primeras 2/3 parte. El segmento S<sub>2</sub> incluye el tercio restante y el principio de túbulo proximal recto. En segundo lugar, el segmento S<sub>3</sub> comprende el resto del túbulo proximal recto situado en el córtex interno y en la zona externa de la médula. Las características funcionales y morfológicas de las células epiteliales van variando a lo largo del túbulo de manera que en cada segmento se distingue un tipo celular propio conocido también como S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub>.

La célula tubular epitelial es cuboide y presenta una membrana apical con ribete en cepillo o *brush border* muy desarrollada. Esta altamente polarizada y su compartimentalización apical/basolateral resulta esencial para la función tubular.



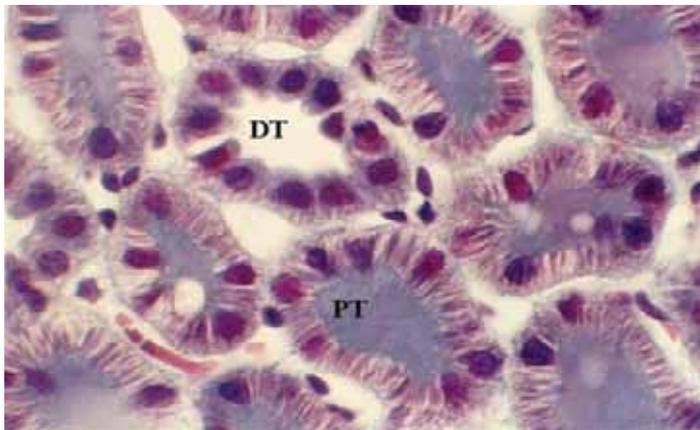
**Figura 4. Segmentos del túbulo proximal renal.** Micrografías electrónicas de los segmentos S1 (a), S2 (b) y S3 (c) del túbulo proximal renal de rata (x10.600). Adaptado y modificado de Brenner, B.M. *The Kidney*.

Las características estructurales que distinguen los tipos celulares presentes en los tres segmentos del túbulo proximal han sido descritas con detalle en rata y son extensivos en ratón (Tischer *et al.*, 1996). Las células S<sub>1</sub> presentan una amplia membrana apical del tipo ribete en cepillo que incrementa la superficie de contacto con la luz del túbulo e incrementa así su capacidad para reabsorber pequeños compuestos orgánicos del filtrado glomerular. Las microvellosidades que conforman el ribete están recubiertas por glicocálice y contienen una gran variedad de enzimas - fosfatasa alcalina, peptidasa- involucradas en la degradación de péptidos y otras sustancias en productos que pueden ser transportados al interior celular. Poseen también un aparato vacuolar y lisosomal muy desarrollado, cuya función es la endocitosis y degradación de macromoléculas de ultrafiltrado, como la albúmina o otras proteínas plasmáticas de bajo peso molecular. El núcleo es grande y se encuentra en el centro de la célula. La superficie basolateral de estas células también se amplifica por prolongaciones que se interdigitan con las prolongaciones de las células adyacentes dejando un espacio intercelular. Contienen un gran número de mitocondrias que se

pueden observar largas y tortuosas en el microscopio electrónico y se localizan en los procesos laterales próximos a la membrana plasmática. Las células S<sub>2</sub> presentan microvellosidades más cortas y menos densas que las de S<sub>1</sub>, así como una menor complejidad en las prolongaciones laterales y un menor número de mitocondrias por ser a su vez más pequeñas. En las células S<sub>3</sub>, los procesos laterales son virtualmente ausentes y se encuentra un número reducido de

mitocondrias repartidas al azar por la célula y un abundante compartimento peroxisomal que indica participación en el metabolismo lipídico.

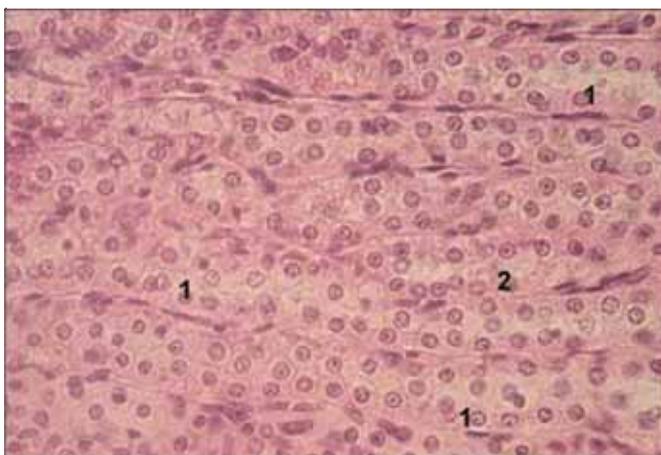
Mientras que el paso del segmento  $S_1$  a  $S_2$  es progresivo, el de  $S_2$  a  $S_3$  suele ser abrupto en especies como la rata y el ratón. A lo largo del túbulo se produce una disminución de la maquinaria de transporte y del aparato endocítico y lisosomal que responde a los cambios que padece el filtrado.



**Figura 5. El túbulo Proximal y Distal.** En esta fotografía podemos distinguir el túbulo proximal del distal, esto es debido a la tinción del ribete en cepillo con el ácido periodico Schiff (PAS). Imagen obtenida: <http://cellbio.utmb.edu/microanatomy/kidney/tubules1.jpg>.

### 1.3.3. El Asa de Henle

Es un segmento del túbulo renal en forma de asa, situado entre el túbulo proximal y el túbulo distal que penetra en la médula renal. Está formada por un primer brazo descendente, un brazo delgado ascendente un brazo grueso ascendente. El asa de Henle comienza en el córtex, recibiendo el filtrado desde el túbulo proximal, se extiende en la médula, y finalmente vuelve al cortex para terminar en el túbulo distal. Su función principal es concentrar las sales en el



**Figura 6. Asa de Henle.** Esta figura muestra los brazos gruesos ascendentes (1), y los brazos delgados descendentes (2). Imagen obtenida: <http://www.histol.chuvashia.com/images/urinary/kidney-07-1.jpg>.

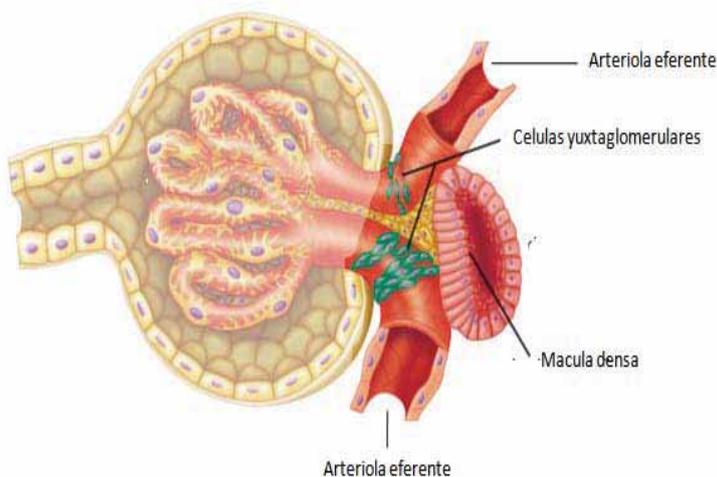
intersticio, el tejido que la recubre, reabsorbiendo alrededor de un 25 % de los iones de sodio y cloro filtrados y un 15% de agua. El brazo descendente comienza al final del segmento  $S_3$  del túbulo proximal. Los brazos descendentes poseen una baja actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, debido a esto no son capaces de un transporte activo significativo. La salida preferentemente de sodio en relación con el agua, determina una hipertonia del intersticio renal, indispensable para concentrar o diluir la orina y por tanto mantener el balance hídrico del

organismo.

### 1.3.4. El Túbulo Distal

El túbulo distal es una porción de la nefrona que se encuentra entre el asa de Henle y el tubo colector. Es el segmento final de la nefrona y se caracteriza por poseer un gran número de mitocondrias, plegamientos basales e invaginaciones de la membrana lateral. El túbulo distal está formado por tres segmentos morfológicamente diferenciados: el brazo grueso del asa de Henle, la mácula densa (localizada en el aparato yuxtaglomerular) y el túbulo distal contorneado. Este tramo de la nefrona es en el que se concentra la mayor actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase basolateral entre todos los segmentos y por ello resulta muy importante en el transporte transcelular de  $\text{Na}^+$ . Es el responsable además de la regulación de potasio, sodio, calcio y pH. La absorción de sodio es mediada por la hormona aldosterona así como por las quinasas *WNK* (*with-no-lysine=K*) que a su vez controlan también la reabsorción de cloro. Finalmente la absorción del calcio se da también en este tramo en respuesta a la hormona paratiroidea.

Al final de su recorrido el túbulo distal dirige su filtrado hacia el tubo colector, la estructura tubular del riñón que recoge orina de diferentes nefronas, confluye con otros tubos colectores y desemboca finalmente al conducto papilar de Bellini. Está formado por dos segmentos el medular y el cortical y es el responsable del mantenimiento del balance hídrico bajo el control de la hormona antidiurética. Está recubierto por un epitelio cuboideo que progresivamente se hace más bajo, no presenta ribete de cepillo y tiene un citoplasma claro. Los



**Figura 7. Aparato yuxtaglomerular.** En esta figura se puede observar los tres elementos que conforman el aparato yuxtaglomerular: macula densa, células yuxtaglomerulares, células de lasis. Imagen obtenida y modificada: <http://www.indiana.edu/~phys215/lecture/lecnotes/renal/jpax.jpg>.

segmentos del tubo colector son muy importantes para la regulación final de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ , agua y la secreción de urea.

### 1.3.5. El Aparato Yuxtaglomerular

El aparato yuxtaglomerular es una estructura microscópica en el riñón que regula la función de cada nefrona. Sus tres componentes son: las células yuxtaglomerulares, las células

de lacis y la denominada mácula densa. El aparato yuxtaglomerular se encarga principalmente de la regulación de la presión arterial a través del control del sistema renina-angiotensina (RAS) mediante la secreción de renina.

#### 1.4. La Función del Riñón

El riñón desarrolla funciones básicas y vitales para el organismo. Cada una de ellas tiene lugar en regiones concretas del órgano y principalmente se distinguen tres:

- Función endocrina: síntesis y secreción de hormonas como la eritropoyetina, la urodilatina, la renina y la vitamina D.
- Función excretora: el riñón excreta productos de desecho producidos por el metabolismo que son básicamente agua y los desechos de nitrógeno como la urea, la creatinina, el ácido úrico.
- Función homeostática: regulación del equilibrio hidroelectrico y ácido-base.

Las funciones reguladora y excretora se ejecutan mediante la formación y eliminación de una orina de composición adecuada en función de las necesidades del organismo.

El paso inicial en la formación de orina es la obtención del ultrafiltrado del plasma en el espacio de Bowman mediante presión hidrostática en los capilares glomerulares. El ultrafiltrado fluye a lo largo de los túbulos y es modificado por solutos importantes (sales de sodio, glucosa, aminoácidos) y el agua procedente de los túbulos del lumen regresa a los capilares del peri túbulo. El túbulo proximal reabsorbe de vuelta en los capilares del peri túbulo alrededor de 2/3 de  $\text{Na}^+$  y agua y casi todo el  $\text{HCO}_3^-$ , glucosa y aminoácidos filtrados y algo de albumina que se podría haber filtrado en el glomérulo. El asa de Henle inicia los procesos de concentración o dilución de orina mediante la reabsorción de sales con algo de agua, enriqueciendo en solutos el intersticio medular y lleva los solutos pobres a los túbulos distales. Los túbulos distales continúan diluyendo el fluido luminal mediante estimulación hormonal de NaCl y sales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el segmento colector, la reabsorción de agua resulta prominente solamente cuando el factor antidiurético es abundante. Los tubos colectores llevan a cabo los últimos ajustes en la composición de la orina mediante la reabsorción de agua estimulada por la hormona anti diurética, la reabsorción de urea y el transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  estimulado por la aldosterona.

La reabsorción de agua y de solutos por parte el riñón, así como la excreción de productos de desecho o tóxicos para las células y el procesamiento de elevadas cantidades de ultrafiltrado (180 l diarios en humanos) son procesos que requieren energía por lo que este órgano tiene que mantener una elevada producción energética. Existe pues una estrecha relación

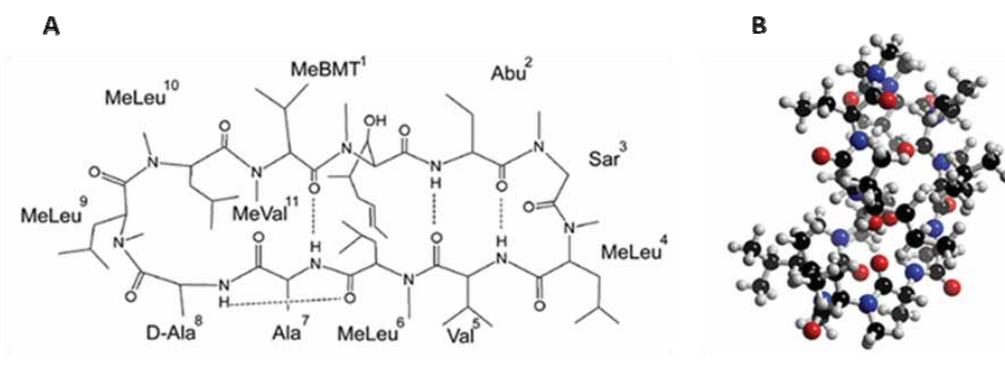
entre el transporte renal y el metabolismo, de manera que este último está acoplado a la producción de energía para los procesos metabólicos celulares.

El transporte activo de iones está mediado por una familia de ATPasas integrales de membrana que hidrolizan ATP como fuente de energía para transportar  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$  y  $Ca^{2+}$ . De entre todas ellas la ATPasa de  $Na^+/K^+$ , o bomba de sodio-potasio, es la responsable del 60%-80% del desgaste energético de las células renales. El riñón obtiene toda la energía necesaria principalmente de la fosforilación oxidativa mitocondrial utilizando como sustratos ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, lactato o glutamina; por tanto el riñón presenta un metabolismo oxidativo aeróbico y es esencialmente un órgano más gluconeogénico que glucolítico. No obstante, y como consecuencia del elevado consumo que las células del túbulo distal realizan, sólo se exporta una pequeña fracción de la glucosa sintetizada en los túbulos proximales.

## 2. LA CICLOSPORINA A

La ciclosporina A (CsA) es un péptido neutro, lipofílico y cíclico formado por 11 aminoácidos. Fue aislada por primera vez en 1976 del hongo *Tolypocladium inflatum gams* y posteriormente a su hallazgo se descubrió que era un potente agente inmunosupresor (Borel *et al.*, 1976). Esta molécula sin embargo, ejerce un gran espectro de actividades biológicas, entre las que se encuentran propiedades antiparasitarias, anti-fúngicas y anti-inflamatorias.

La ciclosporina es un undecapéptido ( $C_6H_{11}N_{11}O_{12}$ ) con un peso molecular de 1203,63 Da. Su estructura química presenta características peculiares dada la presencia de dos aminoácidos poco comunes: el ácido 3-hidroxy-4-metil-2-metilamino-6-octanoico (MeBmt), situado en la posición 1, y el ácido L-2-aminobutírico, hallado en la posición 2. La molécula



**Figura 8.** CsA. A. Los once aminoácidos que conforman CsA. B. Estructura 3Dde CsA de la casa comercial Novartis. Imágenes obtenidas: [http://www.aapsj.org/articles/aapsj0902021/aapsj0902021\\_figure1.jpg](http://www.aapsj.org/articles/aapsj0902021/aapsj0902021_figure1.jpg), <http://www.3dchem.com/imagesofmolecules/CyclosporinA.jpg>.

presenta además un 64% de enlaces peptídicos metalados (Altschuh *et al.*, 2002).

Los principales efectos terapéuticos de la CsA se deben a la inhibición de la vía de activación de los linfocitos T que produce este fármaco (Scheiber and Crabtree, 1992; Reynolds and Al-Daraji, 2002). La introducción del fármaco para uso clínico como un agente para el rechazo de órganos en 1983 ha revolucionado el campo del trasplante clínico, aumentando la supervivencia de los pacientes con trasplante de riñón, corazón, hígado, y páncreas (Bennett *et al.*, 1996, Perico *et al.*, 1996). Desafortunadamente su uso tiene efectos tóxicos secundarios tales como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hipertensión e hiperlipidemia, hecho que ha supuesto una limitación en su prescripción en pacientes trasplantados (Kahan *et al.*, 1989).

## 2.1. Activación del linfocito T e Inmunosupresión

### 2.1.1 Activación del linfocito

En la respuesta inmune al rechazo de aloinjertos, la célula CD4 desarrolla el papel principal por lo que los fármacos que previenen la función de activación del linfocito T resultan potenciales inmunosupresores (Perico *et al.*, 1997). Los linfocitos B y T se activan por unión del antígeno al linfocito juntamente con la participación de señales co-estimuladoras de otros receptores de superficie como CD28. El resultado es la activación de un gran número de vías señalizadoras que acaba originando inducción transcripcional y respuesta celular que origina en última instancia proliferación de linfocitos y liberación de citocinas (Stoddard and Flick, 1996).

Cuando el receptor de la célula T (TCR) reconoce un antígeno, se produce una agregación de varias moléculas de TCR/MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad). La co-agregación de TCRs activa una serie de tirosinas quinasas, las cuales fosforilan residuos de tirosina en proteínas del complejo CD3 y de otros complejos responsables de la activación de vías de señalización (Shaw and Dustin, 1997). Una de estas vías activa la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ) que genera mensajeros secundarios tales como diacilglicerol (DAG) y 1, 4,5 inositol trifosfato (IP $_3$ ). Mientras DAG activa PKC, IP $_3$  se une a su receptor y libera calcio desde el retículo endoplasmático. Este aumento de calcio intracelular promueve la activación de una calmodulina dependiente de la serin- fosfatasa denominada calcineurina. La calcineurina es un heterodímero que contiene una subunidad catalítica A, con un peso molecular de entre 57-59 kDa, y otra subunidad reguladora B (CanB), que tiene un peso molecular de 19 kDa. Esta fosfatasa entre muchas otras acciones, se encarga de inducir la actividad de varios factores de transcripción denominados *nuclear factor of activated T* (NFAT). En la célula T, la calcineurina activada interacciona con el dominio N conservado de diferentes miembros de la familia NFAT,

promoviendo así su defosforilación y el consecuente cambio conformacional, que desenmascara la señal de importe nuclear. De esta manera se produce así la posterior traslocación de los NFATs al núcleo, compartimento en el que permanecerán a causa de la elevación persistente de calcio intracelular y la continua actividad de la calcineurina que habiendo sido también traslocada, mantiene los factores en su estado defosforilado y previene su exporte al citoplasma (Timmerman *et al.*, 1996).

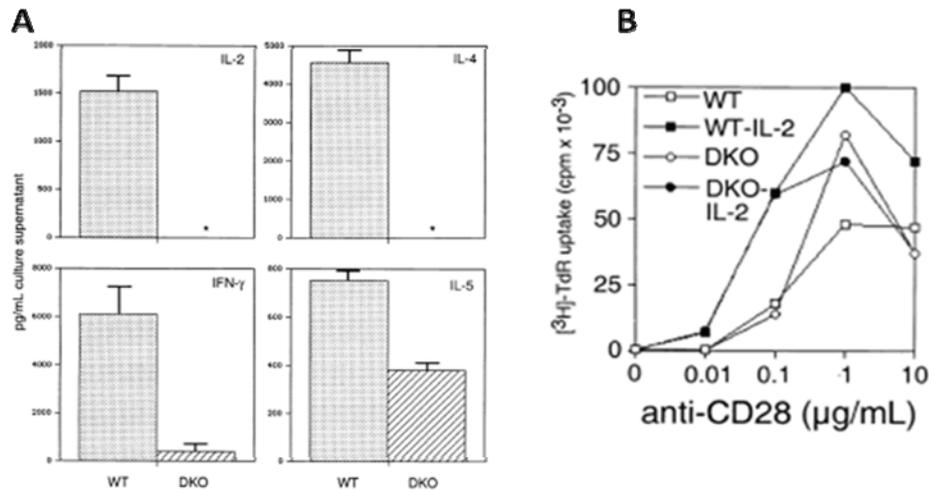
La activación de los NFATs regula una variedad de procesos inmunes tales como apoptosis, el desarrollo de la célula T y el envejecimiento del sistema inmune. En particular, algunas de las isoformas de los NFATs se encargan de regular la expresión de las interleukinas (IL) 2, 3 y 4, genes responsables de la activación del linfocito T. Algunas quinasas fosforilan los NFATs y contrarrestan su localización y activación nuclear. Algunas de estas proteínas son: caseína quinasa 1 (CK1), glicógeno-sintasa quinasa 3 (GSK3), Map quinasa p38, y Jun N-terminal quinasa (JNK) (Bears *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997; Gomez del Arco *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2004).

### 2.1.2. Inmunosupresión

El mecanismo de inmunosupresión del linfocito T producido por la ciclosporina A es muy conocido. CsA, una vez introducida en el citoplasma se une a una proteína intracelular denominada ciclofilina (Cyp), formando un complejo CsA-Cyp capaz de unir la calcineurina y provocar así la inhibición de su actividad. El nuevo complejo formado por las tres proteínas no puede defosforilar los NFATs, hecho que imposibilita la translocación de dichos factores al núcleo. El resultado final es que los NFATs no pueden transactivar genes que están involucrados en la activación de la célula T (Handschumacher *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1991).

### 2.1.3. Los NFATs

Los factores nucleares de células T activadas (NFATs) constituyen una familia de factores de transcripción que transducen señales de calcio en el sistema inmune, cardiaco, muscular y nervioso (Rao *et al.*, 1997). A nivel renal concretamente, se ha descrito su expresión especialmente elevada en células tubulares del riñón adulto (Puri *et al.*, 2004; Van Adelsberg *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2002). El defecto en la activación de estos factores en algunas familias humanas está asociado en defectos en la producción de citoquinas e inmunodeficiencia severa (Castigli *et al.*, 1993; Feske *et al.*, 1996). En modelos animales por otra parte, ratones con un doble *Knock-out* para NFAT1 y NFAT2 muestran una producción sustancialmente alterada de muchas de las citoquinas, entre las que encontramos **IL-2**, **IL-4**, **IL-10**, **IFN- $\gamma$**  y **GM-CSF**, así como de algunos receptores de la superficie celular como CD40L y CD95L (Peng *et al.*, 2001).



**Figura 9. Activación de la célula T en ratones K/O para NFAT1 y NFAT2.** (A) Células T de ratones salvajes o K/O para NFAT1/NFAT2 fueron para ver su capacidad proliferativa. (B) Células T fueron utilizadas para observar su producción de citoquinas (Peng *et al.*, 2001).

La activación de los NFATs regula una variedad de procesos inmunes tales como apoptosis, el desarrollo de la célula T y el envejecimiento del sistema inmune. En particular, algunas de sus isoformas se encargan de regular la expresión de las interleukinas (IL) 2, 3 y 4, genes responsables de la activación del linfocito T. Aunque son factores de transcripción que ejercen sus efectos por interacción directa con sus secuencias dianas a nivel de los promotores que regulan, los NFATs poseen una débil capacidad de unión a DNA. De manera que se unan a sus elementos de respuesta deben cooperar con otros factores de transcripción que residen en el núcleo tales como AP-1, NF-kB, y Oct-1 (Jain *et al.*, 1995). Así pues la combinación entre NFAT y AP-1 activa promotores como el de la IL-2.

### 2.1.3.1. NFATs en el Riñón

En la médula renal destaca por su elevada expresión NFAT5. Varias líneas de investigación sugieren que este factor está involucrado en la respuesta osmo-protectora (Woo *et al.*, 2002) puesto que su activación y translocación al núcleo se produce en el riñón durante antidiuresis, y se encuentra aparentemente sólo en las regiones externa e interna de la médula (Cha *et al.*, 2001). En este mismo sentido, ratones que carecen de NFAT5 muestran una

perturbación en la morfología y función del riñón después de nacer. Esta disfunción severa del riñón parece ser debida a la inhabilidad de las células medulares para activar la expresión de genes osmoprotectores, los cuales dependen del factor de transcripción (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2003).

Otro factor importante en el sistema renal es la isoforma NFATc1 debido a la regulación que ejerce sobre un miembro de la gran familia de los genes MMP, concretamente MT1-MMP, durante procesos de inflamación glomerular (Alfonso-Jaume *et al.*, 2004).

#### 2.1.4. La Calcineurina

La calcineurina se encuentra expresada en el riñón y su actividad fosfatasa está involucrada en muchos de los procesos biológicos que tienen lugar en este órgano. Tal y como se ha dicho anteriormente, destaca por la defosforilación que induce sobre factores de transcripción importantes en los linfocitos T como son los NFAT, las proteínas GATA y los factores potenciadores de miocitos (MEFs) (Molkentin *et al.*, 1998; Musaro *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2004). Integrada por un heterodímero, en su molécula se distingue una subunidad catalítica, calcineurina A (CNA) capaz de exhibir actividad fosfatasa incluso en ausencia de otras subunidades, y una subunidad reguladora, calcineurina B (CNB).

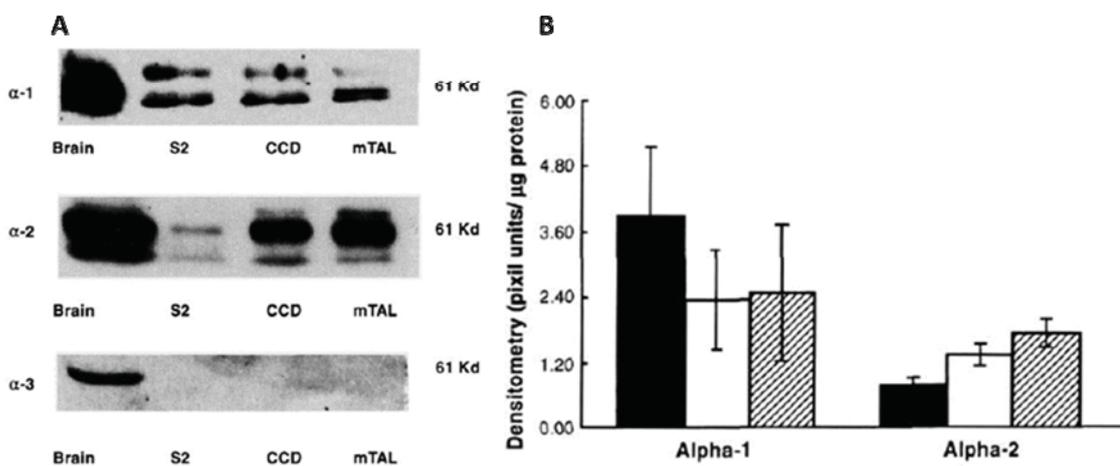
El gen de la calcineurina A está altamente conservado en diferentes especies, y codifica para un polipéptido consistente en un dominio catalítico similar a otras serinas/treoninas fosfatasas, y tres dominios reguladores c-terminales que la distinguen de otros miembros de la familia que son el dominio de la CNB, el dominio de unión a la calmodulina, y el dominio amino-terminal.

La subunidad B de la calcineurina está también altamente conservada en la evolución y comparte muchas estructuras homólogas con la calmodulina. El gen que la codifica da lugar a una proteína de 170 aminoácidos que contiene cuatro motivos *EF-hands* de unión a calcio. La calcineurina participa en desarrollo, regulación celular, homeostasis del calcio, y tráfico intracelular.

Entre las funciones diferenciales de las unidades integrantes de la calcineurina podemos destacar como la subunidad A contiene un dominio fosfatasa que media la interacción con sustratos fosforilados, mientras que la subunidad B se une a calcio y calmodulina facilitando el cambio conformacional que activa el dominio fosfatasa de la subunidad A (Rusnak *et al.*, 2000)

Varios grupos han examinado la expresión de la subunidad A de la calcineurina en el riñón. Buttini *et al.* ha examinado el mRNA de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  mediante hibridación *in*

*situ*, encontrando que tanto la  $\alpha$  como la  $\beta$  se encontraban en la médula y en el córtex. La isoforma  $\gamma$  en cambio no se ha detectado en ninguna parte del riñón. La expresión de estas isoformas ha sido también examinada en microestructuras del riñón mediante western-blot en segmentos aislados de la nefrona. Así, se ha visto como la subunidad  $\alpha$  de la calcineurina A es la más expresada en los túbulos proximales, mientras que la subunidad  $\beta$  posee una pequeña expresión. En los tubos colectores corticales en cambio, ambas han sido detectadas en igual cantidad, mientras que la isoforma  $\beta$  es la más expresada en la médula (Tumlin *et al.*, 1993, 1995).

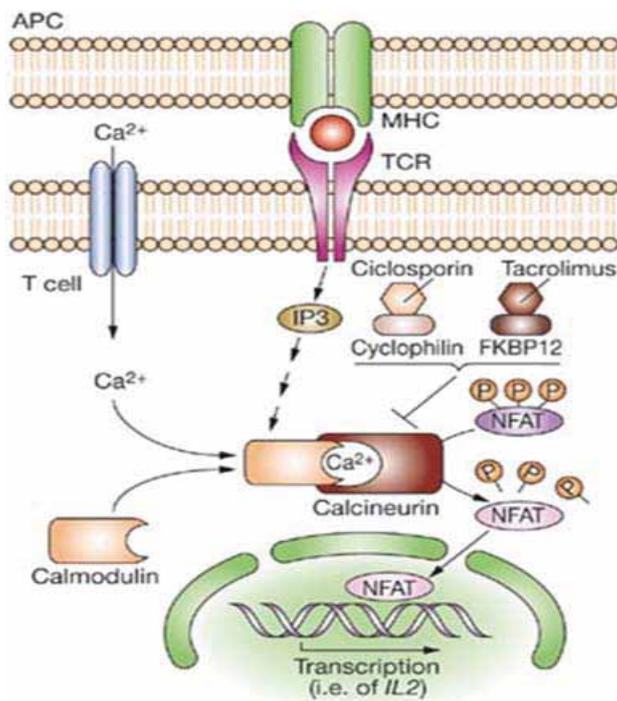


**Figura 10. Expresión de las subunidades  $\alpha$  de la calcineurina.** (A) Análisis por *western-blot* de la expresión de las subunidades  $\alpha$  de la calcineurina. Brazo ascendente del asa de Henle (mTAL), túbulo colector cortical (CCD), parte S2 del túbulo proximal (S2), cerebro (brain). (B) Expresión de las subunidades  $\alpha$  de calcineurina en la nefrona. Imagen obtenida: (Tumlin *et al.*, 1995).

Aunque algunas funciones celulares de la calcineurina han sido estudiadas en profundidad en el sistema inmune, nervioso central y el corazón, no se sabe mucho en relación al papel que la calcineurina desempeña en el riñón. Sin embargo, su importancia en este órgano es evidente puesto que se ha visto como su presencia es indispensable para un desarrollo correcto del riñón. Tendron *et al.* mostraron como la administración de la CsA a conejas embarazadas en diferentes periodos durante la gestación inducía cambios significativos en los riñones de las crías. Estos autores examinaron los efectos que producía el fármaco en los días 13-17, coincidentes con el inicio de la nefrogénesis, y en los días 18-21, coincidentes con los principios de la función renal en el desarrollo de la descendencia. Las crías nacidas que habían

sido sometidas a tratamiento poseían un reducido número de nefronas y alteraciones en la maduración del riñón (Tendron *et al.*, 2003).

Pero la mayor relevancia de la calmodulina en el riñón se manifiesta en los frecuentes efectos nefrotóxicos que poseen fármacos como la CsA y FK-506 sobre ésta y en particular sobre las isoformas  $\alpha$ - y  $\beta$ -, probables mediadoras de cambios patológicos producidos por inhibidores de la calcineurina.



**Figura 11. Mecanismos de acción de fármacos inmunosupresores.** La activación a través del TCR y de las señales coestimuladoras apropiadas (no se muestran en la figura) moviliza el calcio intracelular y activan la PKC, para finalmente activar la expresión de genes como IL-2, IL-4, IFN $\gamma$  entre otros. La presencia de CsA acompañada con ciclofilinas inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina. Figura obtenida:

<http://www.nature.com/ncpgasthep/journal/v3/n11/images/ncpgasthep061-fl.jpg>.

## 2.2. MECANISMO DE NEFROTOXICIDAD PRODUCIDA POR LA CsA

El agente inmunosupresor CsA es usado para tratar rechazo de injertos y en el tratamiento de varios trastornos autoinmunes.

### 2.2.1. Efectos agudos

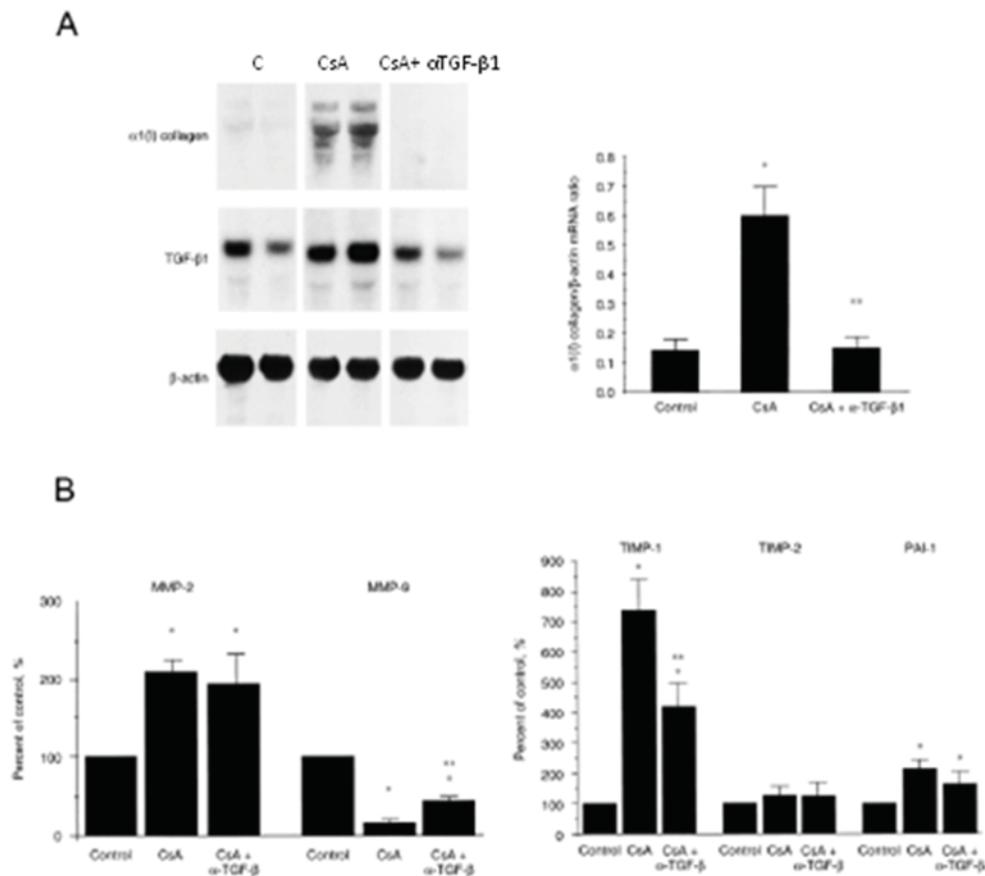
En el impacto tóxico producido por el fármaco se distinguen efectos agudos y efectos crónicos (Calne *et al.*, 2002). Los efectos agudos son funcionales, están relacionados con la

dosis utilizada y son reversibles. Durante la fase primera del tratamiento con ciclosporina en humanos, se produce vasoconstricción del sistema circulatorio hecho que suele producir un aumento de la creatinina en el suero. Otros efectos que pueden observarse son por ejemplo una reducción de la filtración glomerular, así como hipertensión, hiperkalemia y acidosis tubular o un aumento de la reabsorción de sodio y oliguria (Olyaei *et al.*, 1999). La desregulación en los niveles de vasodilatadores/vasoconstrictores que también se describe provoca reducción del flujo glomerular en plasma y una azotemia prerenal reversible que sólo ocurre a grandes dosis. La vasoconstricción producida por la CsA también provoca la activación de los nervios simpático renales, la inducción de endotelina-1 y de angiotensina II así como la reducción en la producción de óxido nítrico y un aumento de radicales libres y del calcio intracelular (Busauschina *et al.*, 2004; Bennet *et al.*, 1983). Tal y como se apuntaba anteriormente todos estos efectos son reversibles si se suspende o disminuye el tratamiento con CsA.

### 2.2.2. Efectos crónicos

Aunque el mecanismo exacto de la nefrotoxicidad producida por CsA no es totalmente conocido, se puede distinguir varios factores que están implicados en la patogénesis de la nefrotoxicidad inducida por inmunosupresores. Datos clínicos muestran que la CsA induce una nefropatía crónica y que ésta puede ocurrir independientemente de la disfunción renal aguda, de la dosis del fármaco o de su concentración en sangre. El daño crónico producido por la ciclosporina está caracterizado por una reducción del 35% al 45% de la filtración glomerular. La administración de CsA a largo plazo también causa una arteriopatía que produce como resultado una nefritis intersticial que es irreversible en la función renal mediante mecanismos aun desconocidos. Algunos estudios clínicos y experimentales implican al factor de crecimiento beta (TGF-beta) como mediador de los efectos tóxicos producidos por la CsA. De entrada la expresión de este factor se ve inducida *in vitro* e *in vivo* por el fármaco (Khanna *et al.*, 1999). En relación a esto se ha demostrado como en células del túbulo proximal de animales que han sido tratados con CsA hay un aumento en la expresión de diferentes tipos de colágeno y que este efecto se debe a un aumento en el TGF-beta renal (Wolf *et al.*, 1995). Otros autores han implicado al TGF-beta en la progresión de la enfermedad renal (Klahr *et al.*, 1995). TGF-beta es capaz de inducir en células un aumento de la matriz extracelular y una disminución de la producción de proteasas que degradan esta matriz (Massagué *et al.*, 1990). Ratas que han sido tratadas con CsA poseen un aumento de los niveles de mRNA de TGF-beta, causando un aumento en la expresión de colágeno tipo I y la proteína TIMP-1 (metaloproteinasa-1 inhibidora de tejido), y una disminución de MMP-9 (metaloproteinasa-9 de matriz). Cuando estas ratas son tratadas con anticuerpos de TGF-beta, el colágeno de tipo I es inhibido, como consecuencia los

niveles de TIMP-1 y MMP-9 son restablecidos y el desarrollo de hialinosis arteriolar es inhibida (Islam *et al.*, 2001). Por otro lado, estudios usando el inmunosupresor en un modelo de ratón muestran como los niveles del mRNA de TGF-beta, colágeno, y fibronectina disminuyen cuando se coadministra un tratamiento anti-TGF-beta (Khanna *et al.*, 2004).



**Figura 12. CsA y TGF- $\beta$ , CsA induce el aumento de la expresión del mRNA de  $\alpha$ (I)-colágeno.** El tratamiento con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  reduce su expresión. **(A)** Análisis de la expresión del mRNA de  $\alpha$ (I)-colágeno, TGF- $\beta$  y la  $\beta$ -actina de riñones de rata control, de ratas tratadas con CsA y de ratas tratadas con CsA/ $\alpha$ -TGF- $\beta$  (panel de la izquierda). El análisis cuantitativo ( $n=7$  muestras por grupo) demuestra un aumento de la relación  $\alpha$ (I)-colágeno/ $\beta$ -actina respecto el control. El tratamiento con el anticuerpo anti-TGF- $\beta$ , normaliza la expresión del colágeno. (panel de la derecha) \* $p<0.05$  vs control, \*\* $p<0.05$  vs CsA. **(B)** El tratamiento con anticuerpo  $\alpha$ -TGF- $\beta$  evita la disminución de la expresión de MMP-9 inducida por CsA (panel de la izquierda) y para el aumento de la expresión de TIMP-1 pero no de PAI, causada por CsA (panel de la derecha) (Khanna *et al.*, 2004).

Dentro de los efectos crónicos por administración de CsA cabe también destacar la fibrosis renal, patología en la que juega un importante papel el sistema renina-angiotensina. Por un lado, se ha visto como ratas tratadas con el fármaco sometidas a una dieta baja en sodio

muestran cambios histológicos similares a las lesiones nefropáticas crónicas causadas por la CsA. La repercusión a nivel fisiológico de la disminución del sodio es justamente el aumento de la actividad de la renina periférica (Shihab *et al.*, 1997). Por el otro lado, la angiotensina II es un factor de crecimiento renal que induce hiperplasia/hipertrofia dependiendo del tipo celular. Este péptido activa células tubulares y mesangiales así como también fibroblastos del intersticio, aumentando de esta forma la expresión y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Mezzano *et al.*, 2001).

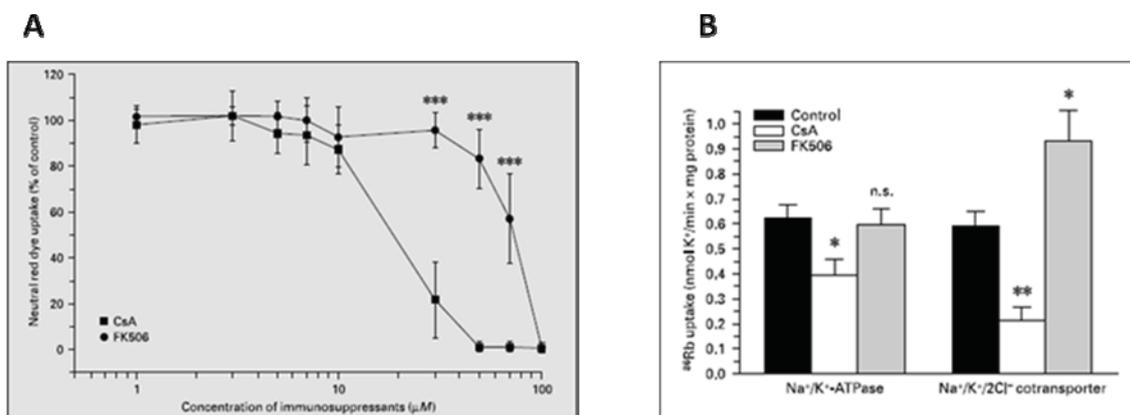
Otro de los elementos principales que se relacionan con la nefropatía crónica producida por CsA es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). A nivel experimental es fácil obtener dicha relación ya que en un modelo de rata con nefrotoxicidad producida por CsA, el fármaco parece regular la expresión de VEGF y sus receptores; este efecto además aumenta al bloquear la vía del óxido nítrico y regular así la angiotensina II (Shihab *et al.*, 2001, 2002, 2003). Adicionalmente, se ha aceptado que una mayor expresión de la angiotensina II, TGF-beta, y VEGF, asociada con una bajada en los niveles de óxido nítrico podría tener un papel muy importante en la patología renal debida a CsA.

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que la nefrotoxicidad producida por la CsA incluye la acumulación del fármaco en células epiteliales tubulares (Von Willebrand *et al.*, 1983; Suzuki *et al.*, 1987), así como la vacuolización citoplasmática y el hinchamiento del retículo endoplásmico, principalmente en el segmento S3 del túbulo proximal (Mihatsch *et al.*, 1986). También se ha descrito una fibrosis intersticial con atrofia tubular y el ensanchamiento de la membrana tubular (Myers *et al.*, 1984). Todas estas observaciones acumulan evidencias sobre los efectos directos que tiene la CsA sobre las células del túbulo proximal (Healy *et al.*, 1998). En un riñón adulto, las células tubulares están en estado quiescente y se dividen a un ritmo muy lento. La proliferación de las células del túbulo proximal es de gran importancia en la reparación celular después de producirse un daño tóxico o isquémico (Witzgall *et al.*, 1994). Diferentes grupos han demostrado que dosis bajas de CsA inducen apoptosis mientras que dosis altas del fármaco inducen necrosis (Healy *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2002). Antes de sucumbir a la muerte celular, las células tubulares tratadas con el fármaco muestran una parada en la fase G0/G1 del ciclo celular que coincide con la expresión de la proteína p53 (Lally *et al.*, 1999).

Los trastornos causados por CsA se originan por interferencia especialmente en la vía de señalización de la calcineurina-calmodulina (Clipstone *et al.*, 1994). En este sentido, hay indicios que relacionan el daño celular causado por el fármaco con la alteración del tráfico intracelular de iones. Así pues, se ha visto como la CsA aumenta el calcio intracelular, incremento que podría inducir una vasoconstricción o causar daño celular (Healy *et al.*, 1998). El fármaco también afecta el magnesio presente en el suero tal y como demuestran varios

estudios clínicos y experimentales que citan la inducción de hipomagnesemia por CsA (Burdmann *et al.*, 1994). Estudios en animales y humanos por otro lado, indican una disminución de kaliuresis y una acidificación urinaria afectada en el tratamiento con este inmunosupresor, sugiriendo que el fármaco podría interferir con el transporte de iones en la nefrona distal (Heering *et al.*, 1998; Batlle *et al.*, 1986). La relación más clara entre transporte de iones y CsA se halla en la descripción de la interacción directa de ésta con el cotransportador de  $\text{Na}^+$ -Glucosa hecho que provoca la inhibición de la actividad ATPasa renal de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , tanto en administración *in vivo* como *in vitro* (Ziegler *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1987; Tumlin *et al.*, 1993). La inhabilitación de la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  causada por la CsA podría tener una elevada relevancia patofisiológica debido a la función esencial que juega esta bomba en la homeostasis de iones y en la absorción de solutos orgánicos.

Los estudios con diferentes análogos de la CsA han evidenciado que los efectos inmunosupresores y de toxicidad no se pueden separar (Sigal and Dumont, 1992). Aunque se desconoce los mecanismos precisos que subyacen la toxicidad de la célula tubular renal, la desaparición de los efectos tóxicos patente cuando no hay inmunosupresión sugiere que ambos mecanismos funcionan en la misma vía.



**Figura 13. Efectos de CsA.** (A) Efectos de CsA y FK506 en la viabilidad de las células MDCK (células del túbulo distal y colector). (B) Efectos de CsA y FK506 en la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y en el cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ . Figura obtenida: (Akeru *et al.*, 2001).

### 2.3. OTROS INMUNOSUPRESORES

Los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar en función de sus mecanismos de acción. Así pues, podemos encontrar inhibidores de citoquinas como glucocorticoides,

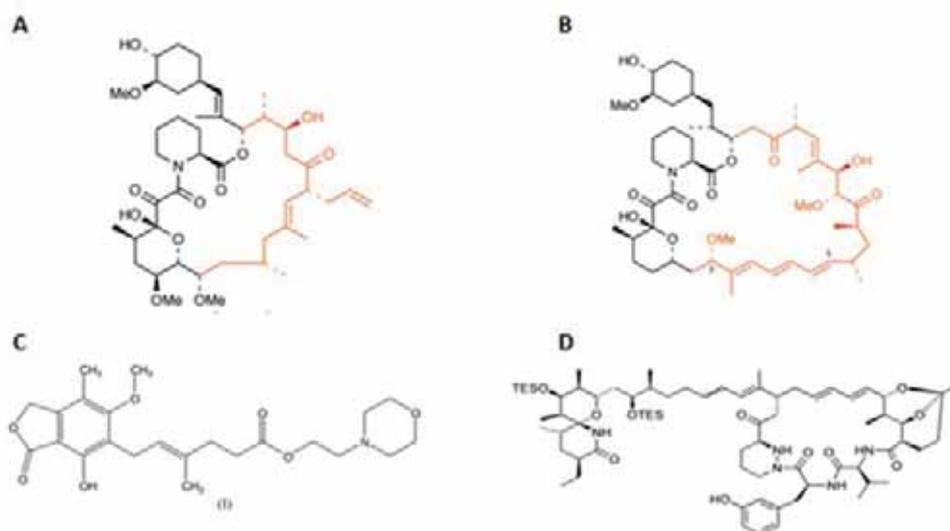
ciclosporina A, FK506 y rapamicina, o inhibidores de la síntesis de DNA como micofenolato mofetilo y azatioprina.

**2.3.1. FK-506 (tacrolimus):** las acciones inmunosupresoras de tacrolimo (TRL, FK506) fueron descritas por primera vez por Kino et al (Kino *et al.*, 1987). Varios años más tarde se descubrió que la CsA y TRL bloqueaban la señalización intracelular en linfocitos T mediante la inhibición de la fosfatasa calcineurina (Liu *et al.*, 1991). Aunque sus mecanismos de acción son similares a los de la CsA, el tacrolimo tiene una estructura completamente diferente. Además de su actividad inmunosupresora, ambos CsA y FK506 poseen acciones neuroprotectoras, pero solamente FK506 y sus derivados han mostrado claramente tener actividad neurodegenerativa (Gold *et al.*, 2000).

**2.3.2. Sirolimo (SRL):** es un nuevo inmunosupresor que tiene un mecanismo de acción diferente a la CsA y a tacrolimo. Igual que el tacrolimo, SRL se une a FKBP12. Aunque el complejo SRL-FKBP12 no actúa sobre la calcineurina, sino que inhibe el llamado *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Brown *et al.*, 1994). La función de mTOR está involucrada en una vía de señalización requerida para la progresión de células T estimuladas con IL-2 desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Schmelzle *et al.*, 2000). Después que se demostrara que SRL previene el rechazo del aloinjerto en modelos animales, el fármaco fue testado en humanos, inicialmente en combinación con CsA.

**2.3.3. Micofenolato mofetilo (MMF):** MMF activa el ácido micofenólico *in vivo* que a su vez inhibe deshidrogenasa monofosfato inosina (IMPDH), enzima encargado de la biosíntesis de purinas. El hecho que los linfocitos B y T sean más dependientes que otras células de la síntesis de nucleótidos de guanosina y deoxiguanosina, los hace especialmente vulnerables a los efectos del MMF. Este fármaco es utilizado en pacientes trasplantados en combinación con otros agentes como la CsA y los corticoesteroides (Allison *et al.*, 1996).

**2.3.4. Sanglifehrin** representa la cuarta clase de inmunosupresores que se unen a las inmunofilinas, aunque su forma de actuar difiere con todas las drogas inmunosupresoras conocidas hasta el momento (Zhang *et al.*, 2001; Zenke *et al.*, 2001). CypA no se une a este fármaco en los mismos residuos y tampoco se unirá a calcineurina por eso no estaría actuando por las mismas vías que CsA.



**Figura 14. Otros Inmunosupresores.** (A) Tacrolimus, (B) Rapamicina, (C) Sangliferina, (D) Micofenolato mofetilo. Imagen obtenida: <http://pubs.rsc.org/ej/P1/2002/b208078h-u161.gif>, <http://journals.iucr.org/e/issues/2004/12/00/dn6174scheme1.gif>, <http://www.rsc.org/ej/NP/2001/b001720p/b001720p-f3.gif>.

La CsA ha revolucionado el trasplante en medicina puesto que, aunque sus efectos beneficiosos no perduren a largo plazo, ningún otro inmunosupresor ha conseguido una mejoría similar a corto y medio plazo en el trasplante de órganos. Es por esto que durante mucho tiempo la CsA ha sido el fármaco más utilizado para prevenir el rechazo. No obstante, la toxicidad renal que produce se ha convertido en el efecto secundario más indeseado. Desgraciadamente, la reducción de la dosis de la CsA mejora los efectos secundarios a corto plazo pero no protege del rechazo del órgano trasplantado (Lloveras *et al.*, 2004; Fellström *et al.*, 2004; Ponticelli *et al.*, 2004). Esto ha dado lugar al inicio de terapias combinadas que se basan en la asociación en el tratamiento de la CsA u otros inhibidores de la calcineurina (FK506) con micofenolato mofetilo o sirolimo, con corticoesteroides o incluso con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-IL-2. Pese a los avances encontrados, aún se necesitan nuevos estudios para poder determinar cuáles son los mecanismos moleculares en los que participa la CsA para inducir el daño renal con tal de poder aplacarlos.

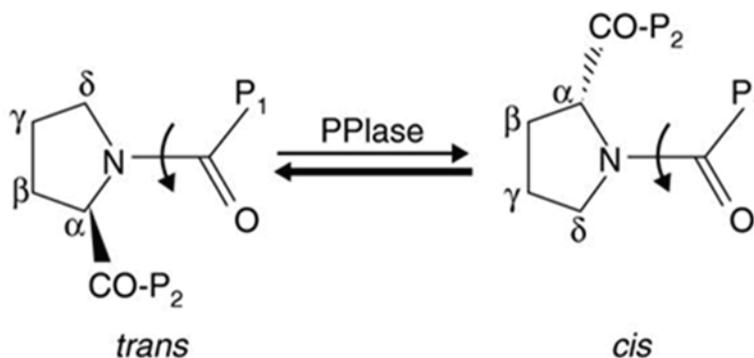
### 3. LAS INMUNOFILINAS

Las inmunofilinas constituyen una superfamilia de proteínas altamente conservadas y ubicuas que se unen a fármacos inmunosupresores de vital importancia como ciclosporina A, FK506 y rapamicina (Schreiber *et al.*, 1991; Galat *et al.*, 1993, Gothel *et al.*, 1999.). Dentro de cada grupo se observa un alto grado de conservación estructural a través de la evolución, sugiriendo un papel fundamental en las funciones celulares. Todos los miembros de esta familia poseen actividad peptidil-prolina (PPIasa), hecho que sugiere un papel importante en el plegamiento de proteínas en la célula (Schmid *et al.*, 1993). Las inmunofilinas originariamente se podían dividir en dos grupos: las ciclofilinas (Cyps), que son proteínas de unión a la ciclosporina A y las FKBP, que son proteínas de unión a FK506 y rapamicina. Recientemente, se han descubierto las parvulinas, las cuales dan lugar a un tercer grupo de inmunofilinas y se caracterizan por su unión a la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona). Todos estos fármacos inmunosupresores presentan un mecanismo de acción parecido ya que ocupan las zonas de isomerización de las prolinas en las inmunofilinas, como consecuencia, inhiben la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos de las prolinas *in vitro* (Heitman *et al.*, 1991).

#### 3.1. LAS CICLOFILINAS

Las ciclofilinas se encuentran en mamíferos, plantas, insectos, hongos y bacterias. Están conservadas estructuralmente a lo largo de la evolución y todas ellas poseen actividad Peptidil-Protil cis-trans Isomerasa (PPIasa) (Galat *et al.*, 2003; Waldmeier *et al.*, 2003). Comparten un dominio común de 109 aminoácidos denominado *cyclophilin-like domain* (CLD), rodeado por dominios que son únicos para cada miembro de la familia y que están asociados con la compartimentalización celular y especialización funcional (Marks *et al.*, 1996; Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2004).

En humanos encontramos 7 tipos de ciclofilinas – ciclofilina A (hCypA), ciclofilina B (hCypB), ciclofilina C (hCypC), ciclofilina D (hCypD), ciclofilina E (hCypE), ciclofilina 40 (hCyp40), y ciclofilina NK (hCypNK) (Galat *et al.*, 2003).



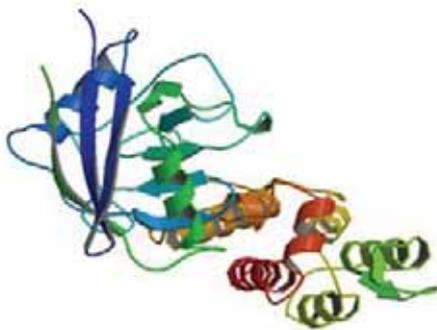
**Figura 15.**  
**Actividad PPIasa**  
**o Rotamasa.**  
 Imagen obtenida:  
<http://genomebiology.com/content/figures/gb-2005-6-7-226-1.gif>.

Protein	Domains	Size (kDa)	Localization	Mammalian ortholog
Cpr1	CLD	17	Cytoplasm and nucleus	CypA
Cpr2	SP, CLD	20	Secreted	CypB
Cpr3	CLD	20	Mitochondria	CypD
Cpr4	M, CLD, TM	33	Vacuole	CypC
Cpr5	SP, CLD, ER	23	ER	
Cpr6	CLD, TPR	45	Cytoplasm	Cyp40
Cpr7	CLD, TPR	45	Cytoplasm	Cyp40
Cpr8	SP, CLD, TM	35	Vacuole	CypC

**Figura 16. Estructuras primarias de ciclofilinas.** Abreviaciones: CLD, *cyclophilin-like domain*; M, señal de localización mitocondrial; SP, péptido señal; TM, dominio transmembrana; TPR, repetición tetratricopeptida. Imagen obtenida: (Heitman *et al.*, 2005).

### 3.1.1. CICLOFILINA A (hCypA)

La ciclofilina A fue descubierta como un ligando intracelular de la CsA en timocitos (Handschumacher *et al.*, 1984) y de manera independiente por su actividad PPIasa, en el córtex de riñón de cerdo (Fischer *et al.*, 1984). Se encuentra en todos los tejidos de mamíferos. Se ha descrito que la CypA se localiza en el citoplasma y el núcleo de la célula (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2005; Huh *et al.*, 2003). CypA tiene una estructura de barril con 8 laminas  $\beta$  antiparalelas, con 2 cadenas  $\alpha$ -helix que se encuentran a cada lado de éste. El núcleo hidrofóbico está



formado por 7 residuos aromáticos e hidrofóbicos y un bucle que se extiende desde la lisina 118 hasta la histidina 126 juntamente cuatro cadenas  $\beta$  ( $\beta$ 3- $\beta$ 6) que constituyen la zona de unión a CsA.

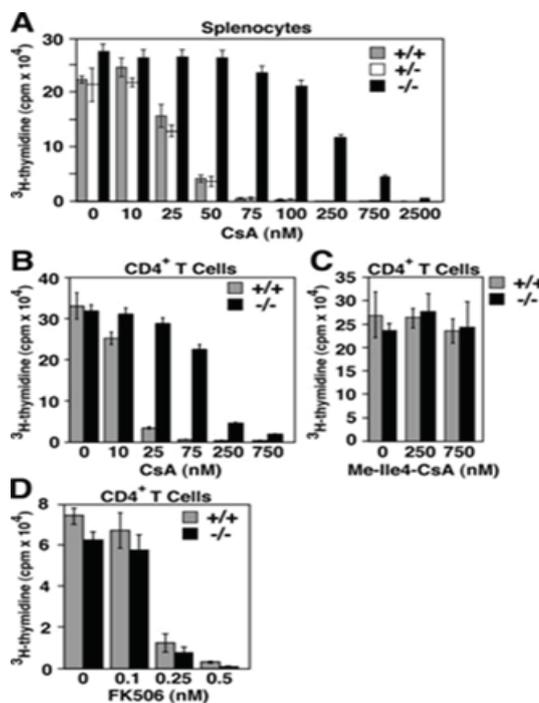
La CypA tiene un peso molecular de 18 kDa y se localiza de manera predominante en el citoplasma celular, representando un 0,3 % de la proteína total de este compartimento celular (Harding *et al.*, 1986). La ciclofilina A se encuentra a altos niveles en el riñón y dentro de éste su distribución no es uniforme ya que su presencia es mayor en las células tubulares epiteliales que en el glomérulo u otras estructuras (Marks *et al.*, 1991; Ryffel *et al.*, 1991; Le Hir *et al.*, 1995; Chiu *et al.*, 2003). La CsA se une con mucha

**Figura 17. Estructura de ciclofilina A (CypA).** Imagen obtenida: [http://en.wikipedia.org/wiki/image:PBB\\_Protein\\_PPIA\\_image.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/image:PBB_Protein_PPIA_image.jpg).

afinidad subnanomolar a CypA por medio de su región hidrofóbica y es aquí donde inhibe su actividad PPIasa (Friedman *et al.*, 1991).

La actividad PPIasa de las inmunofilinas se ha involucrado en procesos de plegamiento de proteína. La catálisis enzimática de los pasos lentos en el proceso del plegamiento proteico, como la isomerización cis/trans de las uniones peptidil-prolina, supone una ventaja ya que disminuye el riesgo de degradación proteolítica de proteínas parcialmente plegadas y evita la agregación (Fischer *et al.*, 1990). Así por ejemplo, se ha demostrado que la CypA participa en el proceso de formación de la triple hélice de colágeno I y que éste se ve ralentizado por la presencia de la CsA (Steinmann *et al.*, 1991).

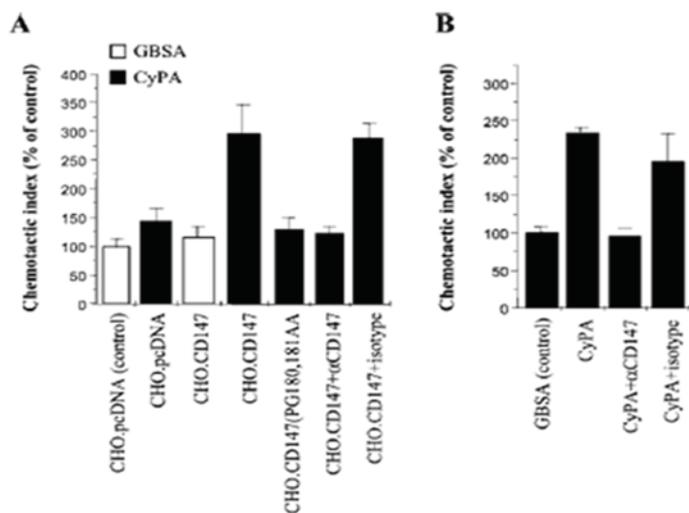
También se ha descrito en estudios con ratones transgénicos para CypA mutada para la actividad PPIasa (mutación de arginina en posición 55 por una alanina, R55A) que esta actividad es la responsable de la toxicidad renal causada por CsA. Los ratones que manifiestan la mutación cuando son tratados con CsA presentan una toxicidad renal exacerbada respecto a ratones control mientras que los ratones que sobreexpresan la CypA se produce una disminución de la nefrotoxicidad (Hong *et al.*, 2004). Anteriormente este grupo demostraba que el tratamiento con dosis bajas de CsA inducía la expresión endógena de CypA por acción de un estrés oxidativo suave y que la CypA sobreexpresada conferiría resistencia al tratamiento con dosis elevadas de CsA en mioblastos cardiacos en cultivo (Hong *et al.*, 2002). Posteriormente estudios en ratones transgénicos *knock out* para CypA demostraron que eran resistentes a inmunosupresión por CsA (Luban *et al.*, 2005).



**Figura 18.** La proliferación de células interferidas para CypA es resistente a CsA. (A) Respuestas proliferativas de PPIa<sup>+/+</sup>, PPIa<sup>+/-</sup>, PPIa<sup>-/-</sup> en esplenocitos tratados con CsA. (B) Respuestas proliferativas de PPIa<sup>+/+</sup>, PPIa<sup>-/-</sup> en células T CD4 tratadas con CsA. (C) Tratadas con metil-ile4-ciclosporina. (D) Tratadas con FK506. Imagen obtenida: (Luban *et al.*, 2005).

A parte de la actividad PPIasa, se ha encontrado que CypA tiene también actividad nucleasa gracias a su elevada similitud de secuencia y estructura con NUC18, nucleasa aislada de timocitos de rata en apoptosis (Gaido *et al.*, 1991; Montague *et al.*, 1997). Gracias a este descubrimiento se ha podido evaluar esta nueva función de las ciclofilinas, así como su posible papel en apoptosis. En el caso de CypA por ejemplo, encontramos que presenta una actividad nucleasa dependiente de calcio y magnesio que se ve bloqueada por la presencia de zinc y ácido aurintricarboxílico de manera similar a lo descrito para NUC18 (Montague *et al.*, 1994). Mediante esta función, que es independiente de la actividad PPIasa y no es inhibida en presencia de CsA (Montague *et al.*, 1997), las ciclofilinas pueden generar extremos 3'-OH en el DNA y en consecuencia son capaces de degradar una amplia variedad de sustratos de DNA llegando a generar fragmentos de 50 Kb a partir de cromatina, similares a los que se forman durante el proceso de apoptosis.

Aunque se han realizado muchos estudios para determinar las múltiples funciones intracelulares de las ciclofilinas, se ha observado que también pueden funcionar como mediadores de comunicaciones intercelulares. En este sentido se han encontrado elevados niveles de CypA en diversos fluidos biológicos en respuesta a estímulos inflamatorios como por ejemplo en sepsis severa (Tegeeder *et al.*, 1997), en infección por HIV (Endrich *et al.*, 1999), en estrés oxidativo (Jin *et al.*, 2000) y en artritis reumatoide (Billich *et al.*, 1997). Así pues, se ha encontrado CypA secretada extracelularmente durante procesos inflamatorios y en el caso de AR existe una correlación directa entre los niveles de CypA y el número de neutrófilos del líquido sinovial de los pacientes (Billich *et al.*, 1997). Esta presencia extracelular de CypA sugiere la existencia de proteínas de membrana celular capaces de interactuar con la ciclofilina y activar en consecuencia ciertas respuestas biológicas. Ha sido en experimentos enfocados a confirmar esta hipótesis donde se ha identificado la proteína CD147 como un receptor de señalización para CypA (Yurchenko *et al.*, 2002). CD147 es una glicoproteína integral de membrana de tipo I, también conocida como inductor de metaloproteinasas de la matriz EMMPRIN (*Extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer*). En la señalización inducida por la CypA a través de su receptor CD147, se ha observado que ésta necesita de la participación de glicosaminoglicanos de sulfato (GAGs) que actúan como los primeros receptores de ciclofilinas para complementar la interacción de baja afinidad entre CD147 y Cyp de células no activadas. En el dominio extracelular del receptor CD147 la prolina 180 y la glicina 181 son residuos esenciales para la señalización y la quimiotaxis inducida por CypA extracelular. También es muy importante la actividad PPIasa de la CypA, ya que mutantes para esta actividad no son capaces de iniciar la cascada de señalización (Yurchenko *et al.*, 2002, 2005). En cuanto a la vía inducida, recientemente se ha podido demostrar que la unión al receptor en presencia de GAGs activa la cascada de señalización de ERK1/2 induciendo la

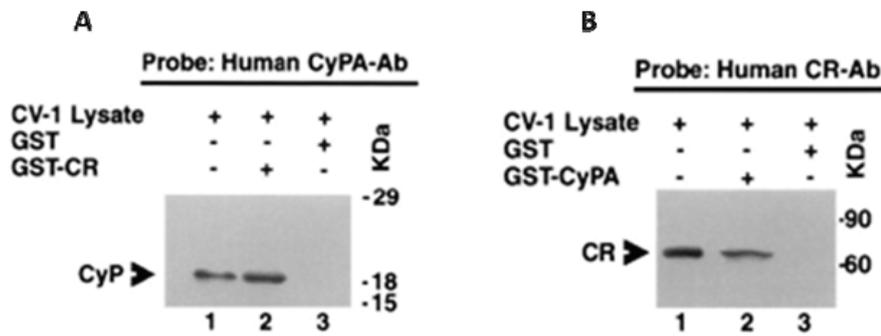


**Figura 19. CD147 es necesario para la respuesta quimiotáctica de CypA.** (A) CypA induce quimiotaxis de células CHO.CD147. 100ng/ml de CypA o BSA en solución de Gey (GBSA) fue añadido a la cámara de Boyden. (B) CD147 es necesario para quimiotaxis de neutrófilos. Imagen obtenida: (Yurchenko *et al.*, 2002)

proliferación celular (Yurchenko *et al.*, 2002) y quimiotaxis. En consecuencia, cuando las células son tratadas con anticuerpos anti-CD147 o antagonistas del receptor, se observa una disminución de la quimiotaxis sugiriendo que la unión CypA-CD147 es la responsable de la invasión celular en enfermedades como la artritis reumatoide (Zhu *et al.*, 2005).

Estudios *in vitro* demuestran que la CypA extracelular produce quimiotaxis de monocitos, neutrófilos, eosinófilos humanos y células T (Yurchenko *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1992). Además, la inyección de CypA *in vivo* provoca un reclutamiento de neutrófilos que inducen una rápida respuesta inflamatoria (Sherry *et al.*, 1991). En este sentido, cabe destacar que paralelamente, CypA se une a receptores de membrana de LT-CD4<sup>+</sup> produciendo una liberación de calcio intracelular que es la responsable de la proliferación de los linfocitos T (Sherry *et al.*, 1998).

La estimulación de ERK1/2, a causa de la CypA secretada implica una amplia variedad de procesos celulares como el crecimiento, diferenciación o proliferación celular y la síntesis de DNA (Jin *et al.*, 2000). El tratamiento de células endoteliales (EC) con CypA recombinante estimula la activación de las MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la actividad transcripcional de NF-κB y la expresión de moléculas de adhesión, sugiriendo que CypA secretada por el endotelio vascular actuaría como una citoquina inflamatoria dando lugar a la progresión de la arterosclerosis (Jin *et al.*, 2004). En esta misma dirección e indicando un posible papel multifuncional de esta ciclofilina en las enfermedades vasculares, se ha demostrado recientemente que CypA presenta un efecto mitogénico sobre diferentes líneas celulares endoteliales vasculares, alterando la expresión de varios genes (Yang *et al.*, 2005). Estos efectos que son célula-dependiente ya que se ha observado también como en cardiomiocitos, CypA ejerce un efecto completamente distinto, concretamente de protección



**Figura 20. Ensayo *pull-down* que demuestra la interacción de CypA y calreticulina. (A)** Lisado CV-1 se incuba con GST como control y GST-calreticulina (GST-CR) y con el anticuerpo de CypA. **(B)** Lisado CV-1 se incuba con GST como control y GST-CypA y con anticuerpo de calreticulina. Imagen obtenida: (Reddy *et al.*, 1999).

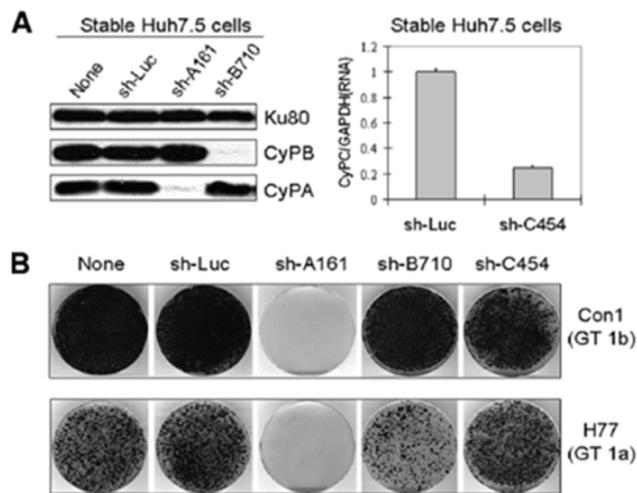
ante el estrés oxidativo gracias a la interacción y posterior activación de la proteína antioxidante Aop1 (antioxidant protein 1). Resulta interesante destacar que la adición de CsA no altera la activación de Aop1, de forma que la región de CypA responsable de la unión es diferente al lugar de interacción de la CsA (Doyle *et al.*, 1999).

Es fácil pensar que CypA también está involucrada en transducción de señales de calcio debido a que su interacción con CsA y calcineurina inhibe la actividad fosfatasa de ésta a la vez que se bloquea la señal dependiente de calcio que proviene del receptor de la célula T (TCR) impidiendo así la transcripción del linfocito T (Schreiber *et al.*, 1992). El calcio es por tanto el segundo mensajero esencial para la activación de la respuesta inmune y se ha sugerido la posible interacción de calreticulina con CypA, hecho que implicaría así la ciclofilina en esta vía de señalización (Reddy *et al.*, 1999).

Entre las muchas implicaciones funcionales que CypA exhibe, se conoce que también está involucrada en cáncer y en infección viral. A nivel oncológico se ha encontrado que CypA se halla sobreexpresada en cáncer de pulmón (Campa *et al.*, 2003). Estudios muy interesantes en este campo han mostrado como la eliminación de la expresión de CypA en células tumorales de pulmón mediante RNAi, afecta claramente la proliferación celular y la apoptosis provocando una disminución del crecimiento del tumor. En cambio, la sobreexpresión de la ciclofilina *in vivo* favorece la rápida formación del tumor (Howard *et al.*, 2005). En este mismo campo, recientemente se ha publicado la sobreexpresión de CypA y CD147 en tres líneas celulares de cáncer de páncreas y en adenocarcinomas pancreáticos humanos. Como ya se ha mencionado anteriormente, esta ciclofilina estimula la proliferación de las células activando la vía de

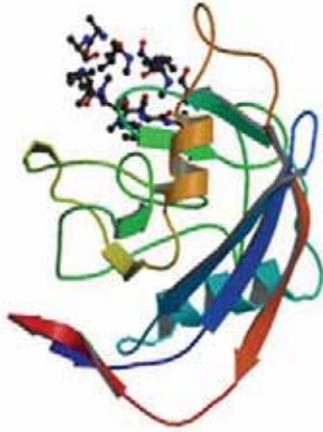
señalización de las ERk1/2 y de la quinasa p38 mediante la unión con su receptor CD147. En consecuencia, se ha visto que el bloqueo del receptor disminuye específicamente el efecto proliferativo producido por CypA (Li *et al.*, 2006).

El papel de CypA en la infección vírica por otro lado, es altamente relevante. La posible participación de las ciclofilinas humanas como cofactores celulares en la replicación del virus de la hepatitis ha sido sugerida repetidamente por varios estudios que mostraban como la ciclosporina A es efectiva para la supresión de la replicación de hepatitis C (Nakagawa *et al.*, 2004). Seguidamente, se observó una correlación entre la unión de Cyp y la actividad anti-HCV con derivados de la CsA (Watashi *et al.*, 2005). Recientemente, el grupo de Tang ha podido demostrar que la CypA es un cofactor esencial para la replicación de varios genotipos de virus de la hepatitis C constituyendo el principal mediador de la resistencia a CsA *in vitro*. Así estos autores han podido correlacionar la resistencia al fármaco con la resistencia que provoca la supresión de CypA, sino que han mostrado como la eliminación de CypA del replicón resistente en células, también elimina su resistencia (Yang *et al.*, 2008).



**Figura 21. CypA es esencial para la replicación de GT-1a y GT-1b.** (A) Muestra shRNAs dirigidos a CypA, CypB, CypC. (B) Las células (sh-A161) interferidas para CypA bloquean la replicación de GT-1a y GT-1b. Imagen obtenida: (Yang *et al.*, 2008).

En el campo de la virología sin embargo, la relación entre CypA y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) ha estado señalada desde hace varios años. CypA interacciona con la proteína Gag de la cápsida del virus y esto produce un reclutamiento en viriones nuevos de HIV (Thali *et al.*, 1994; Franke *et al.*, 1994). Esta interacción se produce en nuevas células infectadas por el virus del HIV-1 y resulta muy importante para la infección (Towers *et al.*, 2003; Kootstra *et al.*, 2003). Así pues CypA se incorpora específicamente a los nuevos viriones gracias a la interacción con Gag y se ha visto como esta incorporación resulta esencial para que se complete el ciclo infectivo (Franke *et al.*, 1994).



**Figura 22. Estructura de ciclofilina B (CypB).**

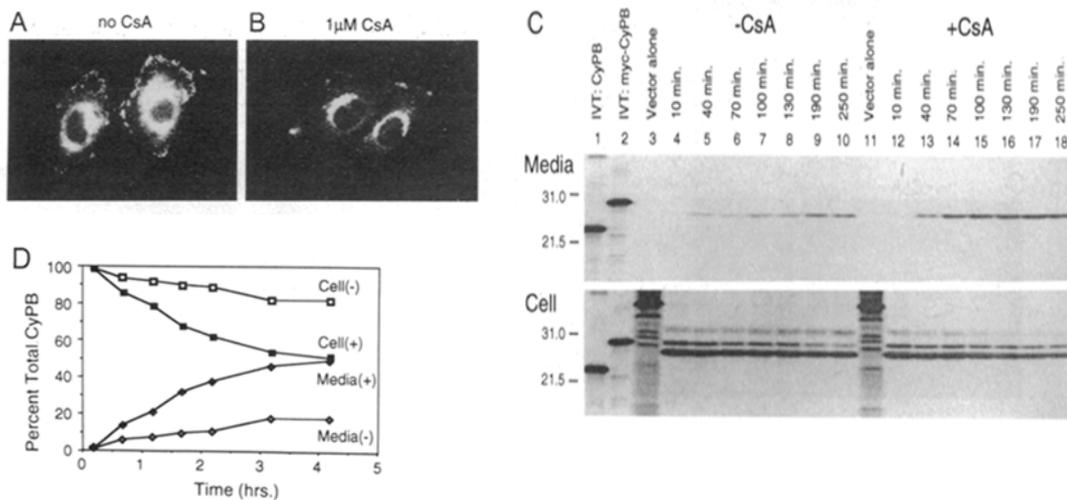
Imagen obtenida:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Image:PB\\_B\\_Protein\\_PPIB\\_image.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:PB_B_Protein_PPIB_image.jpg).

### 3.1.2. CICLOFILINA B (hCypB)

La CypB fue el segundo miembro de la familia de las ciclofilinas clonado y caracterizado (Price *et al.*, 1991). Muestra un 64% de homología con CypA y se distingue por presentar extremos N y C-terminales específicos. El extremo N-terminal presenta un péptido señal de 25 aminoácidos que dirige la proteína a la vía secretora mientras que en el extremo C-terminal se describe una señal de retención en el retículo endoplasmático (Arber *et al.*, 1992). Los 165 aminoácidos centrales contienen el dominio de unión a la CsA y el dominio peptidil-prolil cis/trans isomerasa. La estructura cristalográfica es similar a la de CypA

exceptuando dos *loops* que conectan las láminas  $\beta$  y las extensiones N y C-terminales (Mikol *et al.*, 1994).

La ciclofilina B presenta un peso molecular de 21 kDa y está distribuida en todos los tipos celulares y tejidos sanos con una elevada expresión en células de origen linfóide (Price *et al.*, 1991) y además de altos niveles en células del túbulo proximal de riñón (Kainer *et al.*, 2000). Su mRNA también se halla expresado en diferentes líneas tumorales (Gomi *et al.*, 1999). Estudios de localización subcelular demuestran que CypB en cultivos celulares se distribuye por el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, membrana plasmática y también en el medio de cultivo. También se conoce que esta ciclofilina se encuentra además en el núcleo celular gracias a una señal de localización nuclear (NLS) situada en el extremo N-terminal de la proteína madura (Le *et al.*, 1995; Ryczyn *et al.*, 2000). El tratamiento con CsA altera el tráfico de CypB por la vía secretora produciendo una disminución de la proteína en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. El fármaco pues, promueve un aumento de la tasa de secreción de la ciclofilina, fenómeno que explica el cambio de localización observado en su presencia (Price *et al.*, 1994). CypB también se ha encontrado en otros fluidos biológicos como la leche y el plasma, hecho que demuestra la existencia *in vivo* de una forma secretada (Spik *et al.*, 1991; Allain *et al.*, 1995; Mariller *et al.*, 1996; Denys *et al.*, 1998).



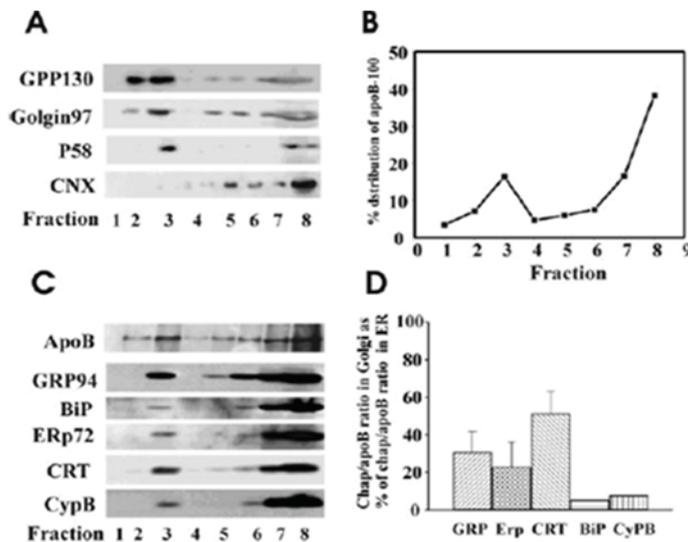
**Figura 23. CsA afecta la distribución de CypB.** (A,B) Expresión de *Myc-tagged CypB* con y sin CsA. (C) Expresión de *Myc-tagged CypB* con y sin CsA en células y medio después del tratamiento a diferentes tiempos. (D) Porcentaje total de CypB recuperado en células y medio. Figura obtenida: Price *et al.*, 1994).

Como ocurría con el primer miembro de la familia, la presencia de CypB en fluidos extracelulares sugiere la existencia de receptores celulares. La búsqueda de estas putativas proteínas ha llevado a la identificación de diferentes lugares de unión para la CypB en la membrana del linfocito T. En la superficie de ésta célula se encuentran dos grupos de receptores que constituyen dos lugares de unión a CypB. El primer grupo, en el que encontramos CD147, está constituido por receptores funcionales específicos que conducen la internalización del complejo receptor-CypB, cuya unión es interferida por la CsA y otras ciclofilinas (Allain *et al.*, 1994, 1995; Pushkarsky *et al.*, 2001; Yurchenko *et al.*, 2002). El segundo grupo hace referencia a los GAGs de la superficie del linfocito T. En ellos se da un tipo de unión específica para la CypB ya que la región N-terminal de la proteína madura es la responsable (Mariller *et al.*, 1996).

La actividad PPIasa de CypB facilita el plegamiento del procolágeno de tipo I en los primeros estadios de su traducción evitando, junto con otras proteínas residentes del retículo endoplasmático, la agregación de las cadenas nacientes. Esta asociación de CypB con el procolágeno se mantiene en las vesículas pre-Golgi sugiriendo por lo tanto que CypB participa en la exportación y secreción del colágeno (Smith *et al.*, 1995).

Las ciclofilinas, aparte de participar en el correcto plegamiento de proteínas sintetizadas *de novo*, también están implicadas en la reparación de proteínas dañadas por estrés térmico, radiación UV, cambios en el pH de la célula, tratamiento con productos oxidantes, etcétera. Es lo que conocemos con el nombre de actividad chaperona y puede ser dependiente o

independiente de la actividad PPIasa. Así la CypB, junto con otras chaperonas como GRP94, BiP y ERp72, se asocia a la reserva luminal de apolipoproteína B (ApoB) del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, manifestando los posibles papeles que desarrollan estas moléculas en el plegamiento inicial o tardío de proteínas que se dan en ambos compartimentos subcelulares (Zhang *et al.*, 2003). En apoyo a esta idea, se ha demostrado la existencia de un complejo multiproteico localizado en el retículo endoplasmático formado por varias chaperonas entre las cuales encontramos la Cyp, y que se asocia a las cadenas pesadas de la inmunoglobulina parcialmente plegadas y no ensambladas. La formación de este complejo multiproteico también se da en ausencia de síntesis de nuevas proteínas, sugiriendo que estas chaperonas se pueden unir a sustratos no plegados (Meunier *et al.*, 2002).



**Figura 24. Chaperonas moleculares asociadas con apoB que esta localizado en retículo endoplasmático y aparato de golgi.** (A) Proteínas marcadoras. (B) apoB en cada fracción fue expresada como porcentaje el total de proteína recuperada. (C) apoB luminal y chaperonas asociadas. (D) Chaperonas/apoB ratio comparando ER y Golgi. Imagen obtenida: (Zhan *et al.*, 2003).

Al igual que CypA, CypB también presenta actividad nucleasa dependiente de calcio y magnesio que se bloquea en presencia de zinc y de ácido aurintricarboxílico como la NUC18 (Montague *et al.*, 1994).

La relación de CypB con la carcinogénesis ha sido descrita en células pancreáticas humanas y en especímenes de adenocarcinoma pancreático. De esta forma se ha descrito como la expresión de su mRNA es baja en ambas células sugiriendo un papel en la patogénesis del cáncer (Mauri *et al.*, 2005).

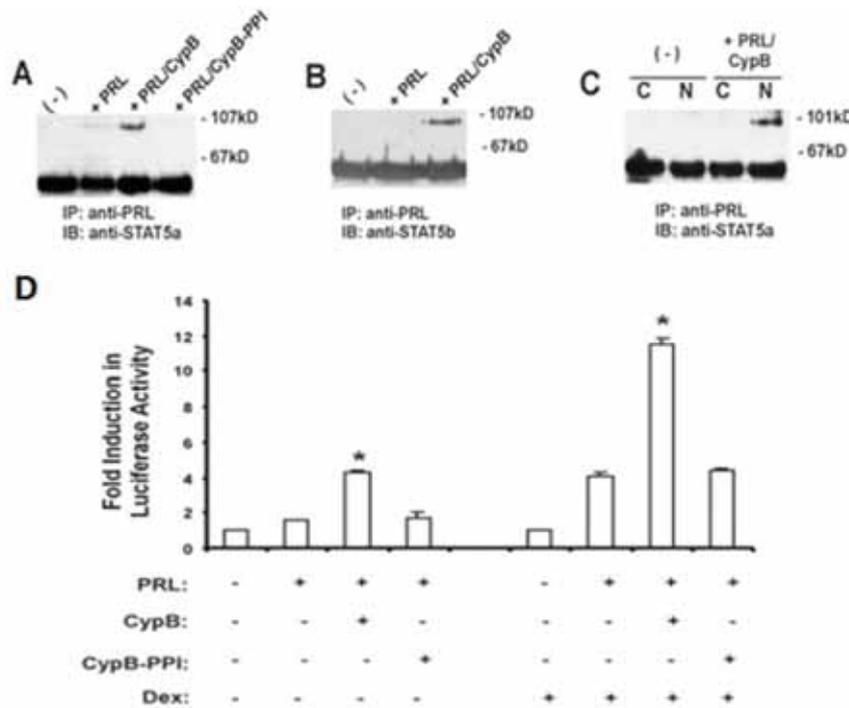
También de forma paralela al primer miembro de la familia, CypB está involucrada en procesos inflamatorios y proliferativos. Se han encontrado altos niveles de CypB en diversos fluidos biológicos en respuesta a estímulos inflamatorios como por ejemplo en sepsis severa o en infección por HIV (Tegeder *et al.*, 1997; Endrich *et al.*, 1999). En el daño renal se produce

una inflamación aguda debida, en parte debida a la secreción de los fibroblastos intersticiales de factores quimiotácticos como la CypB. Por esto dicha inmunofilina jugaría un papel importante en el reclutamiento de leucocitos inflamatorios en el intersticio (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996). Recientemente se ha demostrado que la CypB es secretada por células de cáncer de páncreas y se postula que actúa como un antígeno específico tumoral reconocido por los complejos de histocompatibilidad leucocitarios restringidos y por tumores específicos de las células T citotóxicas (Mauri *et al.*, 2005).

Por otra parte, a nivel del linfocito T tanto CypA como CypB extracelular, a través de la unión a su receptor CD147 promueven las señales de calcio responsables de la quimiotaxis. Solamente CypB con la participación de las GAGs puede aumentar la adhesión a la matriz extracelular mediante las integrinas (Allain *et al.*, 2002). También se ha descrito la interacción de CypB con las plaquetas sanguíneas vía CD147 y de manera independiente a GAGs. Esta interacción promueve la adhesión de las plaquetas, típicamente involucradas en procesos inflamatorios y de coagulación, a colágeno por vía de una entrada de calcio y la fosforilación de la cadena larga de la miosina, unión que por cierto se ve reducida por la presencia de CsA (Allain *et al.*, 1999).

Entre otras interacciones de CypB cabe destacar la prolactina, identificada mediante un ensayo de doble híbrido en levadura. La importancia de esta unión se manifiesta en el aumento de la proliferación de líneas celulares dependiente de después de la adición exógena de CypB. Este efecto está acompañado por un aumento de la retrotranslocación nuclear de la prolactina mediante la internalización vía receptor de esta última y transporte a través de las membranas del retículo endoplasmático y nuclear del complejo de forma dependiente de la señal de translocación nuclear situado en el extremo N-terminal de la CypB. (Ryeczyn *et al.*, 2000). Una vez en el núcleo, el dímero CypB-prolactina interacciona con el factor de transcripción Stat5 aumentando su capacidad de unión a DNA y promoviendo la transcripción génica dependiente de este. Cabe destacar que ésta unión es dependiente de la actividad PPIasa (Ryeczyn *et al.*, 2002). En nuestro laboratorio también se identificó a KAP (*kidney androgen regulated protein*) como otra proteína de interacción con CypB, esto nos llevó a hacer diferentes estudios de toxicidad del fármaco en células epiteliales tubulares y sus posibles efectos en KAP (Cebrian *et al.*, 2004). Dada la inhibición de la señal de calcio proveniente del receptor de la célula T (TCR9) por parte de CsA y con la intención de identificar homólogos potenciales de CsA que pudiesen regular dicha señal, se procedió a detectar proteínas de unión a CypB por técnicas de doble híbrido en levadura. Una de las proteínas identificadas fue CAML (*calcium-signal modulating cyclophilin ligand*) que actúa en respuesta a la activación de TCR y media sus efectos sobre la calcineurina produciendo una movilización de calcio en el linfocito T. CAML

aparece pues como un nuevo participante en la vía de transducción de señales de calcio implicando a CypB en ésta vía de señalización (Bram *et al.*, 1994).



**Figura 25.** Interacción entre CypB/Prolactina/Stat5a y actividad transcripcional de Stat5a. (A) CypB/PRL interacciona con Stat5a. (B) CypB/PRL interacciona con Stat5b. (C) La interacción de CypB/PRL/Stat5a ocurre en el núcleo. (D) PRL/CypB aumenta la actividad transcripcional de Stat5a. Imagen obtenida: (Ryeczyn *et al.*, 2002).

En consonancia de nuevo con CypA, CypB es también secretada por las células de la musculatura lisa vascular (VSMC) en respuesta a un breve estrés oxidativo. Como consecuencia se produce una activación de la vía de señalización de ERK1/2 quinasa que promueve la supervivencia celular. Estos datos sugieren que CypB podría actuar como mediador en respuesta de ROS (Liao *et al.*, 2000). En apoyo a esta idea, varios autores indicaron como la expresión del mRNA de CypB en el túbulo proximal contorneado esta aumentado en ratas hipertensas SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) (Iwai *et al.*, 1990; Kainer *et al.*, 2000). Se vio también como la depleción de sodio de la dieta también alteraba la expresión renal de CypB, sugiriendo que ésta podría estar implicada en la retención renal del ion (Iwai *et al.*, 1990). Posteriormente se ha podido demostrar por técnicas de doble híbrido en levadura que la CypB interacciona con el factor de inicio de elongación (eIF)-2-β. El complejo eIF es el principal regulador de la traducción al ribosoma y juega un papel importante en la respuesta celular al estrés producido por hipoxia o por depleción de ATP. Estos datos sugieren por lo tanto que el aumento de CypB en el riñón de ratas SHR podría reflejar una respuesta celular al estrés causado por el aumento de proteínas no plegadas en el retículo endoplasmático, depleción de ATP y estrés oxidativo (Kainer *et al.*, 2000).

### 3.1.3 OTRAS CICLOFILINAS

Aunque las ciclofilinas hasta ahora nombradas han sido típicamente las más estudiadas debido a su más temprano descubrimiento, cabe también destacar la importancia de otros miembros de la familia tales como:

**3.1.3.1. Ciclofilina D:** la ciclofilina D tiene un peso molecular de 22 kDa y presenta en el extremo N-terminal un péptido que dirige la proteína a la mitocondria. CypD se ha identificado en *Neurospora crassa*, en levadura, en rata y en humanos (Tropschug *et al.*, 1988; Andreeva *et al.*, 1995; Bergsma *et al.*, 1991). Mediante la técnica de *Northern blot* se ha demostrado que su mRNA se presenta en músculo, corazón, hígado, riñón y cerebro de rata (Woodfield *et al.*, 1998). CypD esta funcionalmente ligada con chaperonas moleculares tales como hsp70, hsp60, and hsp10 (Rassow *et al.*, 1995), proteínas asociadas con polipéptidos nacies en ribosomas controlando el plegamiento y ensamblaje de la síntesis de nuevas proteínas. Son además las responsables de transportar nuevas proteínas sintetizadas entre compartimentos intracelulares (Langer *et al.*, 1991; Bhattacharyya *et al.*, 1995). CypD está considerada un componente esencial de la maquinaria de plegamiento de proteínas de la mitocondria. El potencial mitocondrial de membrana está controlado por la actividad y función de los poros permeables de transición mitocondrial (MPTPs), que están asociados con daño celular y apoptosis (Crompton *et al.*, 1988) y se cree que la actividad PPIasa de CypD podría ser necesaria para cambios conformacionales asociados con la formación de MPTP (Capano *et al.*, 2002; Woodfield *et al.*, 1998). De hecho se sabe que CypD se une a la membrana mitocondrial interna mediante CsA y que el fármaco actúa como potente inhibidor selectivo de esta membrana. Otras proteínas mitocondriales involucradas en la formación del complejo MTPT y potencial mitocondrial relacionadas son las anti-apoptóticas Bcl-X1 y Bcl-2 la proapoptótica Bax. También se añade a este conjunto de proteínas ANT, VDAC, CypD y hexoquinasa. Todo ello sugiere un posible e importante papel de CypD en apoptosis (Haworth *et al.*, 1980; Halestrap *et al.*, 1990). En este mismo sentido vemos como CypD desensibiliza células HEK293 y C6 a estímulos apoptóticos, efecto protector que requiere la actividad PPIasa (Tanveer *et al.*, 1996).

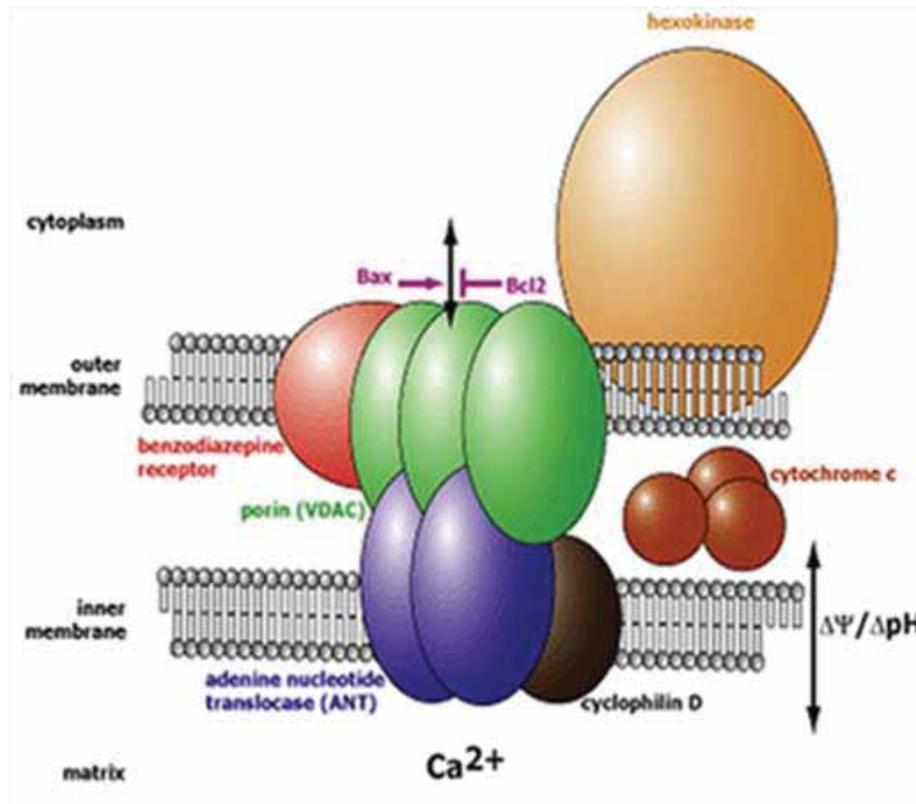


Figura 26. Localización de CypD en la membrana mitocondrial y proteínas asociadas. Imagen obtenida: <http://www.ucl.ac.uk/wibr/research/chemistry/ds/images/cyclophilinD.png>.

**3.1.3.2 Ciclofilina C:** posee una secuencia de señal amino-terminal que la dirige al retículo endoplasmático y a la vía secretora (Galat *et al.*, 2003; Kallen *et al.*, 1991). En un primer estudio de la distribución tisular de la proteína se indica que tiene cierta especificidad de expresión renal (Friedman *et al.*, 1994). Estudios posteriores, en cambio demuestran que la CypC se expresa igualmente y con la misma abundancia en otros tejidos como músculo esquelético, páncreas, corazón, pulmón y hígado (schneider *et al.*, 1994).

**3.1.3.3. Ciclofilina-40:** fue identificada en asociación con receptores de estrógeno activado (Ratajczak *et al.*, 1990, 1993). Parece tener un papel con la proteína chaperona Hsp90. Esta función se ha visto como esencial para la maquinaria de plegamiento de proteínas y para la actividad de diversas moléculas de señalización intracelular, comprendiendo desde receptores de esteroides a tirosinas quinasa reguladoras que están involucradas en ciclo celular (Duina *et al.*, 1996).

### 3.2. LAS FK506 BINDING PROTEINS (FKBP)

Las FK506-binding proteins (FKBPs) pertenecen también a la superfamilia de las peptidil prolil cis/trans isomerasas aunque no poseen ninguna similitud en sus secuencias con las ciclofilinas (Kay *et al.*, 1996; Gotherl *et al.*, 1999). FKBP han sido identificadas en muchos eucariotas desde levadura hasta humanos, tienen una función chaperona en proteínas que contienen residuos prolina (Balbach *et al.*, 1999) y se unen a FK506 o a la rapamicina (Galat *et al.*, 1993). Los diferentes miembros de la familia se denominan según su peso molecular de manera que la más pequeña es FKBP12 y la mayor FKBP135. (Galat *et al.*, 2000).

#### 3.2.1. FKBP12

Es el miembro más importante dentro de las FKBP. Posee un peso molecular de 12 kDa y fue aislada inicialmente como un receptor citoplasmático de dos fármacos inmunosupresores, FK506 y rapamicina que se unen a la misma zona de la proteína (Schreiber *et al.*, 1992). Aunque ambos fármacos causan inmunosupresión, los mecanismos que están involucrados son diferentes. En el caso de FK506 la inmunosupresión es mediada por la inhibición de activadores transcripcionales de citoquinas como IL-2, mientras que la rapamicina causa una detención directa en G1 del ciclo celular de linfocitos T (Bierer *et al.*, 1990).

Igual que el receptor citosólico de la CsA, FKBP12 podía catalizar la isomerización cis-trans de la prolina (Siekierka *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1989). La proteína representa el mínimo péptido que posee actividad cis/trans isomerasa con tan solo 10 amino ácidos definiendo el núcleo hidrofóbico. El mayor elemento estructural de FKBP12 es una lámina  $\beta$  antiparalela de cinco cadenas que forman dos giros (Galat *et al.*, 2000).



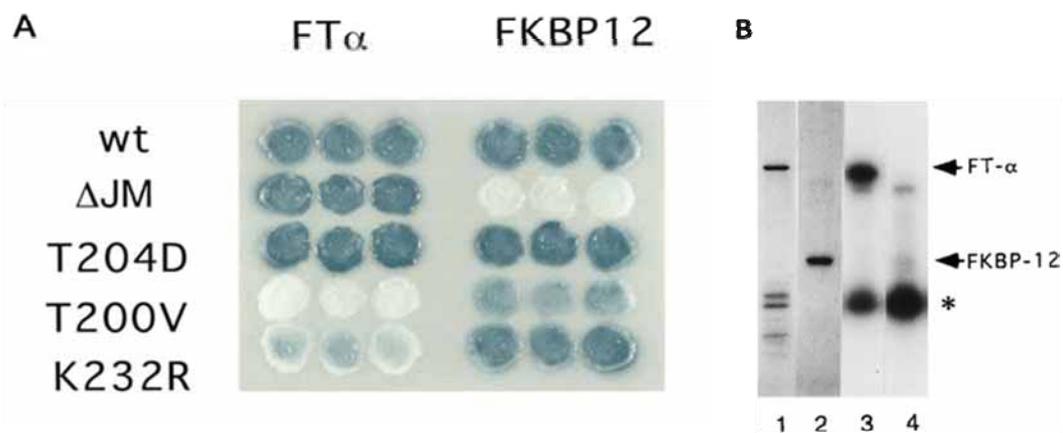
**Figura 27. Estructura de FK-Binding Protein 12 (FKBP12).**

Imagen obtenida:  
[http://www.foldeomics.org/pfd/public\\_html/images/pdb\\_images/1FKF.png](http://www.foldeomics.org/pfd/public_html/images/pdb_images/1FKF.png).

FKBP12 es un componente integral de los canales de calcio. La contracción muscular está regulada por niveles intracelulares de calcio, que a su vez está controlado por la regulación de las actividades de canales, especialmente por los que se encuentran en el retículo endo/sarcoplásmico de células musculares. En células cardiacas en cambio encontramos dos tipos de canales: el receptor de la rianodina tipo 2 (RyR2) y el receptor inositol 1, 4,5-trifosfato (IP3R2) (Brillantes *et al.*, 1992; Go *et al.*, 1995; Perez *et al.*, 1997). Varios estudios han mostrado que FKBP12 interacciona RyR1, mientras que una de sus isoformas, concretamente FKBP12.6, interacciona con RyR2. (Marks *et al.*, 2001).

De hecho FKBP12.6 es un componente integral de los canales de calcio cardiaco, los cuales forman un tetrámero con RYR/IP3R. La interacción de la proteína con RyR1/RyR2 puede bloquearse con concentraciones nanomolares de rapamicina y FK506 (Brillantes *et al.*, 1994). El mecanismo funcional por el cual FKBP12 media la regulación del canal de calcio no está del todo comprendido, aunque se cree que puede tener un papel en la regulación de conformación de la proteína.

También se ha observado una posible interacción directa de FKBP12 con la familia de los receptores TGF- $\beta$  tipo I (T $\beta$ R-I) mediante estudios realizados en un sistema de dos híbridos en levadura (Wang *et al.*, 1994; Okadome *et al.*, 1996). FKBP12 se une al dominio citoplasmático de T $\beta$ R-I inactivo en su región GS hecho que regula la zona de fosforilación de T $\beta$ R-II y posteriormente estabiliza la conformación inactiva de T $\beta$ R-I (Huse *et al.*, 1999). La interacción entre FKBP12 y T $\beta$ R-I requiere la zona activa PPIasa y esta interacción puede ser inhibida por una concentración 1 $\mu$ m de FK506 (Wang *et al.*, 1994). Recientemente se ha mostrado que la internalización de T $\beta$ R mejora cuando su unión con FKBP12 es impedida. Esto sugiere por lo tanto, que FKBP12 podría ser un regulador negativo de la endocitosis de T $\beta$ R (Yao *et al.*, 2000).



**Figura 28. Interacción entre FKBP12 y T $\beta$ R-I.** (A) Muestra la interacción mediante dobe híbrido entre FKBP12 y T $\beta$ R-I con sus diferentes mutantes. (B) Fosforilación *in vitro* de cada una de las interacciones con T $\beta$ R-I. Imagen obtenida: (Okadome *et al.*, 1996).

OBJETIVOS





## OBJETIVOS:

En nuestro grupo estamos interesados en los mecanismos que subyacen al FRA tóxico producido por ciclosporina (CsA) en el túbulo proximal. CsA es capaz de unirse a ciclofilias (Cyps) e inhibir sus funciones. Las Cyps son proteínas de función endógena desconocida, a las que se les reconoce actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa) que es inhibida por CsA. También se les atribuye roles en el plegamiento y reparación de proteínas (chaperona). El fracaso renal agudo (FRA) ocurre en el 5% de pacientes hospitalizados. De ellos, el 50% mueren y el resto se recuperan por procesos espontáneos de regeneración celular. Aunque existen marcadores diagnósticos (excreción de sodio y niveles de urea/creatinina), no existen marcadores pronósticos que permitan prever qué pacientes sobrevivirán o morirán, tras la agresión; que afecta, fundamentalmente, al endotelio vascular y al túbulo proximal. Tampoco se conocen los mecanismos moleculares que ocurren en las células agredidas ni, por tanto, como prevenir el daño.

Debido a la importancia de los principales receptores de la CsA y FK-506, nos hemos propuesto:

- Identificación de proteínas que interactúan con CypA, CypB y FKBP12 mediante la técnica de doble híbrido en levadura.
- Confirmación de las interacciones más relevantes obtenidas mediante las técnicas de *pull-down* y co-inmunoprecipitación.
- Caracterización de los posibles efectos funcionales e implicaciones fisiológicas derivadas de las interacciones confirmadas dentro del conjunto de la célula renal.
- Silenciamiento de los genes de CypA y CypB en la línea celular renal humana HK-2 mediante el uso de lentivirus.
- Producción de modelos celulares con sobreexpresión de dominantes negativos de la actividad PPIasa para CypA y CypB
- Estudio de la expresión y actividad enzimática de los complejos mitocondriales en células tratadas con CsA, células interferidas para CypA, CypB y células que sobreexpresan un dominante negativo de CypA y CypB.



MATERIALES  
MATERIALES





## 1. ANIMALES Y TEJIDOS

### 1.1. RATONES

Se han utilizado ratones machos de la cepa consanguínea C57BL/6 adquiridos al criador IFFA CREDO a la edad de 6-7 semanas que han sido estabulados a temperatura constante (22°C) en las dependencias de nuestro centro en régimen de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados con dieta estándar (PANLAB) y agua *ad libitum*.

### 1.2. Extracción de tejidos

Los animales han sido sacrificados por dislocación cervical. A continuación, se han recogido inmediatamente los riñones en condiciones libres de RNAsas y se han decapsulado antes de congelarlos todos sumergiéndolos en nitrógeno líquido. Se han conservado a -80 °C. Todos los procedimientos experimentales con animales se han realizado de acuerdo con las normativas institucionales vigentes, en cumplimiento de los requerimientos establecidos por el Gobierno Nacional y por la Unión Europea (*Real Decreto 223/1988: B.O.E. N° 256, 25/10/1990*).

## 2. LINEAS CELULARES

### CÉLULAS

En los diferentes estudios que se ha requerido el uso de células eucariotas, se han utilizado las siguientes líneas celulares de mamífero:

### 2.1. PKSV-PCT3

Línea celular epitelial inmortalizada derivada de túbulo proximal renal de ratón. Fue obtenida a partir de riñones de ratones transgénicos para el antígeno T-grande y t-pequeño del virus de simio 40 (SV40) bajo el control del promotor de piruvato quinasa de rata de los cuales se va extraer por microdissección la porción contorneada del túbulo y de donde van a establecerse las células (Cartier *et al* 1993). La sublínea PCT3 fué subclonada por dilución al límite de la línea parental PKSV-PCT y seleccionada para su uso en nuestro laboratorio (Soler *et al* 2004).

Se trata de células adherentes que crecen en monocapa y tienen la capacidad de formar *doms* después de diversos días de post-confluencia (Lacave *et al* 1993). La línea PCT fué

amablemente cedida por el Dr. Alain Vandewalle a nuestro grupo. Estas células fueron interferidas para CypA y CypB por la Dra. Puigmulé en nuestro grupo.

## **2.2. HEK293**

Línea celular renal humana, derivada a partir de riñón embrionario transformado con DNA de adenovirus humano de tipo 5 (Graham et al., 1977). Esta línea celular presenta una morfología epitelial fibroblastoide, se caracteriza especialmente por producir cantidades elevadas de proteína. Han sido amablemente cedidas por el Dr. Bruno Stieger de la Universidad de Zúrich.

## **2.3. COS-7**

Línea celular de mono, derivada a partir de la línea CV-1 por transformación con el antígeno T del virus SV-40 (Gluzman 1981). La línea parental CV-1 deriva de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Jensen et al., 1964). Ambas líneas son adherentes y de morfología fibroblástica.

## **2.4. HK-2**

Línea celular renal humana, derivada a partir de riñón normal humano. Las células se han inmortalizado por transducción de los genes E6/E7 del virus de papiloma humano 16 (HPV-16), son de morfología epitelial y crecen de forma adherente (Ryan et al, 1994).

## **3. MEDIOS DE CULTIVO**

Las líneas celulares con las que se ha trabajado han sido mantenidas y expandidas a 37° C en un incubador con atmosfera húmeda (al 5% de CO<sub>2</sub>) siguiendo los procedimientos y las prácticas estándar requeridas por el trabajo con cultivo en condiciones estériles (Davis 2002).

A continuación se describe la formulación de los diferentes medios de cultivo empleados. Todos los procedimientos de preparación han sido realizados en condiciones estériles.

Tabla 1. Medio PKSV-PCT3 Y HK-2.

Componente	Concentración	Proveedor	Referencia
<b>DMEM</b>	50% (v/v)	GIBCO	011880-028M
<b>Ham's F12</b>	50% (v/v)	GIBCO	31765-027M
<b>HEPES pH 7.4</b>	20 mM	GIBCO	03025-027M
<b>Glutamina</b>	2 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
<b>D-(+)-Glucosa</b>	12,5 mM	SIGMA	G-7021
<b>Transferrina</b>	5 µg/mL	SIGMA	T-1438
<b>Insulina</b>	5 µg/mL	SIGMA	I-6634
<b>Dexametasona</b>	50 nM	SIGMA	D-8893
<b>Triiodotironina</b>	1 nM	SIGMA	T-5516
<b>Selenato de sodio</b>	30 nM	SIGMA	S-9133
<b>EGF</b>	10 ng/mL	SIGMA	E-4127
<b>Serum fetal bovino</b>	2% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
<b>Penicilina // Estreptomicina</b>	100 U/mL 100 µg/mL	GIBCO	15240-052

Tabla 2. Medio COS-7 Y HEK293.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	PROVEEDOR	REFERENCIA
DMEM High glucose	1:1	Biological Industries	01-055-1A
Glutamina	2 mM	Biological Industries	03-020-1B
Piruvato Sódico	1% (v/v)	Biological Industries	03-042-1
Aminoácidos no esenciales	1% (v/v)	Biological Industries	01-340-1B
Serum fetal bovino	10% (v/v)	Biological Industries	10106-060
Penicilina/ Estreptomycin	100 U/ml 100 µg/ml	GibcoBRL	15240-052

#### 4. CEPAS BACTERIANAS

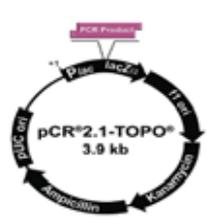
Tabla 3. Cepas bacterianas.

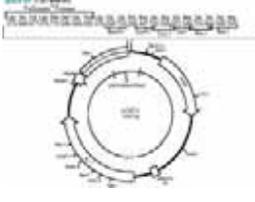
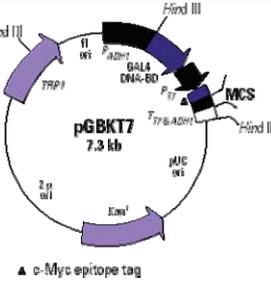
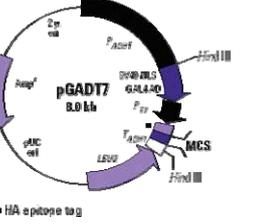
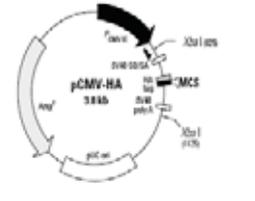
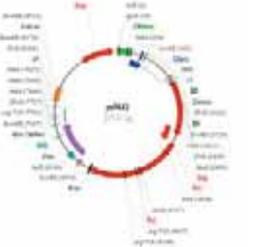
Cepa	Genotipo	Características	Proveedor
<b>TOP10</b>	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> <i>(StrR) endA1 nupG</i>	Cepa comercial optimizada para el clonaje de todo tipo de plásmidos. Presenta una elevadísima eficiencia de transformación	INVITROGEN

<b>DH5a</b>	<i>F<sup>-</sup> endA1 recA1 hsdR17 (r<sub>K</sub>m<sub>K+</sub>) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1λ<sup>-</sup></i>	Cepa deficiente en recombinasas utilizada para el crecimiento y el clonaje de plásmidos. Permite hacer selección azul-blanco en presencia de X-gal en las placas. Presenta una elevada eficiencia de transformación.	INVITROGEN
<b>BL21</b>	<i>BF dcm ompT hsdS(r<sup>B</sup>-m<sup>B</sup>-) gal λ(DE3) (pLys Cam<sup>r</sup>)</i>	Cepa utilizada para la expresión de altos niveles de proteína recombinante mediante la inducción por IPTG. Esta cepa es deficiente en proteasas. Esto favorece la estabilidad de proteínas recombinantes. Utilizada en el sistema pGEX de expresión recombinante.	STRATAGEN
<b>AH109</b>	<i>MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal180Δ LYS2::GAL1<sub>UAS</sub> -GAL<sub>TATA</sub> -HIS3 GAL2<sub>UAS</sub> GAL2<sub>TATA</sub> -ADE2 URA3::MEL1<sub>UAS</sub> -MEL1<sub>TATA</sub> - lacZ</i>	Esta cepa está diseñada para detectar interacción de proteínas en el ensayo de doble híbrido. AH109 contiene genes reporteros que solo se expresan en presencia interacción de proteínas basado en GAL4. Estos genes son: ADE2, HIS3, lacZ y MEL1.	CLONTECH

## 5. VECTORES

**Tabla 4. Mapa de los vectores utilizados.**

Nombre	Características	Mapa
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Vector de clonaje para productos de PCR mediante el método "TA". Plásmido lineal con los extremos activados para la unión covalente de Topoisomerasa I, que favorece la acomodación del DNA a clonar. Contiene múltiples lugares de restricción en el MCS para facilitar el subclonaje. Posee resistencia a ampicilina para su selección en bacterias. Es de la casa comercial INVITROGEN.	

<p>pGEX-6P-3</p>	<p>Vector de expresión en procariotas. Contiene el <i>tag</i> GST y un lugar de corte para una proteasa denominada <i>PresCission Protease</i>. Posee resistencia a ampicilina para su selección en bacterias. Es de la casa comercial AMHERSHAM.</p>	
<p>pGBKT7</p>	<p>Vector de expresión constitutiva en levadura. Da lugar a proteínas de fusión con el dominio de unión a DNA (BD) de la proteína GAL4. El gen de interés está bajo el promotor ADH1. Contiene el gen TRP1 para su selección en levadura y posee resistencia Kanamicina para su selección en bacterias. Es de la casa comercial CLONTECH.</p>	 <p>▲ c-Myc epitope tag</p>
<p>pGADT7</p>	<p>Vector de expresión constitutiva en levadura. Da lugar a proteínas de fusión con el dominio de activación (AD) de la proteína GAL4. El gen de interés se encuentra bajo el promotor ADH1. Contiene el gen LEU2 para su selección y posee resistencia a ampicilina para su selección en bacterias. Es de la casa comercial CLONTECH.</p>	 <p>■ HA epitope tag</p>
<p>pCMV-HA</p>	<p>Vectores de expresión transitoria en células de mamífero que permiten la expresión de proteínas recombinantes con el epítipo hemaglutinina (HA) en su extremo N-terminal. El promotor CMV permite la expresión constitutiva del gen de interés. Contiene resistencia a ampicilina. Es de la casa comercial CLONTECH.</p>	
<p>psPAX2</p>	<p>Vector que contiene un promotor CAG robusto para una expresión eficiente de proteínas de empaquetamiento. El promotor CAG consiste en un activador CMV y un promotor eintron de la beta actina de pollo.</p>	



pGEX-hCypBmut	Para mutagénesis dirigida sobre el constructo pGEX-hCypA.
pCMV-HA-Na/K	Procedente del vector pGADT7, digerido e inserto posteriormente ligado en pCMV-HA.
pCMV-HA-aldoB	Procedente del vector pGADT7, digerido e inserto posteriormente ligado en pCMV-HA.
pCMV-HA-protS	Procedente del vector pGADT7, digerido e inserto posteriormente ligado en pCMV-HA.
pGBKT7-ATP	Por RT-PCR a partir de RNA poliA <sup>+</sup> de riñón humano.
Hairpin-CypB	Secuencia utilizada para el silenciamiento de CypB. Diseñada y amablemente cedida por el Dr. Jeremy Luban. Universidad de Ginebra
Hairpin-CypA	Secuencia utilizada para el silenciamiento de CypA. Diseñada y amablemente cedida por el Dr. Jeremy Luban. Universidad de Ginebra
Hairpin-CypD	Secuencia utilizada para el silenciamiento de CypD. Diseñada y amablemente cedida por el Dr. Jeremy Luban. Universidad de Ginebra
Hairpin-Cyp40	Secuencia utilizada para el silenciamiento de Cyp40. Diseñada y amablemente cedida por el Dr. Jeremy Luban. Universidad de Ginebra
Hairpin-Luc	Secuencia utilizada para el silenciamiento de luciferasa. Diseñada y amablemente cedida por el Dr. Jeremy Luban. Universidad de Ginebra
mU6CypA	Constucto diseñado y realizado por la Dra. Marta Puigmulé para el silenciamiento de CypA en células murinas. Universidad de Ginebra
mU6CypB	Constucto diseñado y realizado por la Dra. Marta Puigmulé para el silenciamiento de CypA en células murinas. Universidad de Ginebra

## 7. Oligonucleótidos

Las parejas de primers empleadas en la amplificación de ácidos nucleicos se han diseñado siguiendo los parámetros necesarios para obtener unas condiciones de amplificación óptima. De manera que se ha tenido en cuenta que el porcentaje de GC se aproximase al máximo posible de 50%, que el primer no presentase complementariedad ni con el mismo ni con la pareja

correspondiente. Para el diseño se ha utilizado la web [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) (Rozen y Skaletsky, 2000) y el proveedor de los primers ha sido QUIAGEN, THERMO Y ECOGEN.

Los oligonucleotidos empleados para realizar la mutagénesis dirigida se han diseñado siguiendo las indicaciones del protocolo del kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* de STRATAGENE. Principalmente se ha contemplado la inclusión de la mutación deseada a los dos *primers* para que hibridasen con cada una de las cadenas del DNA diana, que la mutación se encontrase en el centro del oligonucleótido y que la medida fuera de alrededor de 40 bases.

**Tabla 6. Primers.**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Diana	T <sub>an</sub> (°C)	Orientación
hCypAU	GGATCCATGGTCAACCCACCGTGTTTC	BamHI	55	<i>fwd</i>
hCypAL	CTCGAGCTTATTCGAGTTGTCCACAGT	XhoI	55	<i>rev</i>
hCypBU	GGATCCATGAAGGTGCTCCTTGCC	BamHI	55	<i>fwd</i>
hCypBL	CTCGAGAAAGATGTCCCTGTGCCCTA	XhoI	55	<i>rev</i>
hFKBP12U	GGATCCATGGGAGTGCAGGTGGAACCAT	BamHI	55	<i>fwd</i>
hFKBP12L	CTCGAGGGAGGCCATTCTGTCATTCCAG	XhoI	55	<i>rev</i>
hCypAUpgb	CATATGATGGTCAACCCACCGTG	NdeI	55	<i>fwd</i>
hCypALpgb	CTGCAGCTTATTCGAGTTGTCCAC	PstI	55	<i>rev</i>
hCypBUpgb	CATATGATGAAGGTGCTCCTTGCC	NdeI	55	<i>fwd</i>
hCypBLpgb	CTGCAGAAAGATGTCCCTGTGCCCTA	PstI	55	<i>rev</i>
hFKBP12Upgb	CATATGATGGGAGTGCAGGTGGAACCAT	NdeI	55	<i>fwd</i>
hFKBP12Lpgb	CTGCAGGGAGGCCATTCTGTCATTCCAG	PstI	55	<i>rev</i>
ATPU	CATATGATGCTGTCCCGGGTGGTACT	NdeI	55	<i>fwd</i>
ATPL	CTGCAGTTACATAACTGGCTGTGCTT	PstI	55	<i>rev</i>

hCypAUR55A	GGTTCCTGCTTTACGCAATTATCCAGGGTTTAT	----	55	<i>fwd</i>
hCypALR55A	ATAAACCTGGAATAATTGCGTGAAAGCAGGAACC	----	55	<i>rev</i>
hCypBUmut	CAGCAAATTCATGCGGTAATCAAGGACGCGATGA	----	55	<i>fwd</i>
hCypBLmut	TCATCGCGTCCTTGATTACCGCATGGAATTTGCTG	----	55	<i>rev</i>
HairpinCypB	AAGAGACCAAAGATCACCCGGC	XhoI EcoRI		
HairpinCypA	TAAACTTAACTCTGCAATCCAG	XhoI EcoRI		
HairpinCypD	TATGCATAACACATCATGAGTA	XhoI EcoRI		
HairpinCyp40	TATAGGTTGCAGCTTGGCTCTA	XhoI EcoRI		
HairpinLuc	TACAAACGCTCTCATCGACAAG	XhoI EcoRI		

## 8. REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos y productos químicos utilizados han sido suministrados principalmente por las casas BOEHRINGER-MANHEIM/ROCHE, FLUKA, MERCK, PANREAC y SIGMA entre otras.

## 9. INSTRUMENTACIÓN Y APARATOS

**Tabla 7. Aparatos e instrumentos.**

CATEGORIA	APARATO	FABRICANTE	MODELO
Aparatos Grandes	Autoclave	MATACHANA	

	Máquina de gel	SCOTMAN	AF20
	Centrífugas Grandes	SORVALL	RT6000D
		SORVALL	RC5C
	Reveladora		
	Secuenciador automático	PERKIN ELMER	ABI PRISM 310 <i>Molecular analyzer</i>
Congeladores Neveras	Ultracongeladores (-80°)	REVCO	
	Nevera/congeladores (-20°)	LIEBHERR	
Cultivos	Campanas de Flujo	TELSTAR	BIO II A
		TELSTAR	AV-
	Incubador de CO <sub>2</sub>	THERMO	
	Contenedor de N <sub>2</sub>	LERY-FRANCE	BR 2100 CRYO DIFFUSION
Sistemas de Purificación de H <sub>2</sub> O	Fuente agua destilada		
	Fuente de agua bidestilada	MILLIPORE	MILLI-Q <sub>plus</sub>
Sistemas de vacío Disecación	<i>Speed-Vac</i>	SAVANT	SC100
	Secador de geles	BIO-RAD	
Centrífugas de sobretaba	Centrífuga refrigerada	EPPENDORF	4514R
		HERAEUS	SEPATECH
	Microfuga	BECKMAN	MICROFUGUE E™
		SIGMA	112
		HETTICH	EBA12
Material de Electroforesis	Cubetas	ECOGEN	(diferentes medidas)
		BIO-RAD	MINI SUB-CELL® GT

		BIO-RAD	SUB-CELL® CELL
		LIFE TECHNOLOGIES	S2
		BIO-RAD	MINIPROTEAN II
		BIO-RAD	MINIPROTEAN III
		BIO-RAD	PROTEAN® II xi CELL
	Fuentes de electroforesis	PHARMACIA	LKB-GPS 200/400
		PHARMACIA	EPS 500/400
		BIO-RAD	POWER PAC300
		CONSORT	E741
	Fuentes de Calor	Estufas	MEMEMRT
HERAEUS (37°)			
Baños de agua termostatazadores		THERMOMIX MM	
		BRAUN	
		El de cultivos	
Placas calefactoras / Agitadores magnéticos		P SELECTA	THERMOBLOCK
		THERMOLINE	NUOVA II STIR PLATE
Hornos de hibridación		HYBAID	
		ECOGEN	
Agitadores		<i>Shaker</i>	
	Agitador orbital	LUCKHAM	CM100
	Vórtex	HEIDOLPH	REAX2000
Microscopia	Microscopio Óptico	OLYMPUS	BX40
Espectrofotómetros y otros aparatos de analítica	Espectrofotómetro UV-VIS	UBIKON	
	Espectrofotómetro UV		

	Luminómetro de plaques	LABSYSTEM	LUMINOSCAN RS
Termocicladores	<i>peltier</i>	MJ RESEARCH INC.	PTC-100
	<i>block</i>	PERKIN ELMER	<i>Geneamp PCR system 2400</i>
		PERKIN ELMER	<i>Geneamp PCR system</i>





# MÉTODOS

## MÉTODOS





## 1. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 1.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

#### 1.1.1. Método de Chomczynski-Sacchi

La extracción de RNA se ha realizado siguiendo el método de tiocianato de guanidina/fenol-cloroformo (Chomczynski *et al.*, 1987) con algunas modificaciones. Las cantidades están ajustadas para procesar trozos de tejido de 200-300 mg de peso aproximadamente de un riñón de ratón adulto, de los cuales se recuperan entre 400 y 700 mg de RNA total. Para homogeneizar los tejidos se han utilizado un homogeneizador Politrón. Material y reactivos libres de RNAsas.

#### **Reactivos:**

- Solución D
- Fenol
- Cloroformo/alcohol isoamílico 49:1 (v/v)
- Acetato sódico 2 M, pH 4,0
- Alcohol isopropílico
- Etanol 70% (v/v)

#### **Procedimiento:**

1. Homogeneizar cada tejido en 4 ml de solución D
2. Pasar el homogenado a un tubo Corex® de vidrio y añadirle respetando el orden:
  - 400 ml de acetato sódico 2 M (pH 4,0)
  - Mezclar por inversión
  - 4 ml de fenol; agitar
  - 800 ml de cloroformo/alcohol isoamílico 49:1; agitar con fuerza
3. Dejar reposar en hielo 15 min
4. Centrifugar 30 min a 10.000 *rpm* (4°C); Recuperar la fase acuosa
5. Añadir 5,5 ml de alcohol isopropílico frío (a -20°C) y agitar vigorosamente
6. Incubarlo a -20°C durante un mínimo de 2h
7. Centrifugar 20 min a 10.000 *rpm* (4°C)
8. Descartar el sobrenadante y re-suspender el *pellet* en 700 ml de solución D
9. Añadir 700 ml de alcohol isopropílico frío i agitar con fuerza
10. Incubar a -20°C durante un período mínimo de 60 min
11. Centrifugar 15 min a 13.000 *g* (4°C)
12. Decantar el sobrenadante y limpiar el *pellet* de RNA con Etanol al 70% (v/v)
13. Repetir el paso número 11
14. Decantar el sobrenadante y dejar secar brevemente el *pellet*
15. Re-suspender el RNA en H<sub>2</sub>O-DEPC (entre 100-200ml) y valorar la concentración resultante en el espectrofotómetro (leer a 260 nm). Coservar RNA a -80

### 1.1.2. Extracción de RNA con el *kit RNeasy* de QUIAGEN

También se ha utilizado, a parte del método clásico de Chomzycynsky, el kit de extracción de RNA total de la casa comercial QUIAGEN. Se basa principalmente en el uso de columnas cromatográficas de afinidad que evitan la manipulación de sustancias potencialmente tóxicas, como el fenol y el cloroformo. Este *kit* representa un ahorro importante de tiempo y permite procesar un número más elevado de muestras manteniendo un elevado grado de reproducibilidad. En la extracción de RNA a partir de tejido se han usado unos 300 mg de muestra por columna y cuando el material de origen han sido células, se ha procesado una placa de 10 cm por columna. Se han seguido las instrucciones suministradas por el fabricante.

## 1.2. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

### 1.2.1. Purificación a pequeña escala de DNA plasmídico (*Miniprep*)

Para la preparación de plásmido a partir de cultivo bacteriano de *E. coli*, se ha utilizado el kit comercial *Wizard® plus SV Minipreps Purification System* de PROMEGA. A partir de 5 ml de cultivo se obtiene un rendimiento de 15-20 µg de DNA bastante puro y de calidad para ser utilizado directamente en reacciones de secuenciación automática y digestiones enzimáticas. Este *kit* se basa en el método de lisis alcalina y en la adsorción del DNA en una resina especial. Se han seguido las instrucciones suministradas por el fabricante, los pasos principales se resumen a continuación:

- Recogida y resuspensión de las células bacterianas.
- Lisis alcalina.
- Neutralización y precipitación proteica y del DNA genómico.
- Unión del DNA plásmido a la resina de la columna.
- Lavados de la columna por centrifugación.
- Elución.

### 1.2.2. Purificación a gran escala de DNA plasmídico (*Maxiprep*)

En las ocasiones en que se han requerido grandes cantidades de DNA plasmídico, por ejemplo, en digestiones o transfecciones, se ha procedido a purificar el DNA recombinante a

partir de cultivos de *E. coli* con volúmenes superiores, entre 400 y 500 ml. Entonces, se ha utilizado el kit *Nucleobond® AX-500* de MACHERY-NAGEL siguiendo el protocolo de la casa comercial.

### 1.3. PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de DNA resueltos electroforéticamente en un gel de agarosa se pueden recuperar y purificar a partir del gel para utilizarse en posteriores aplicaciones. En primer lugar se separa electroforéticamente el DNA de interés en un gel de agarosa-BrEt (mirar los apartados 2.1.1 i 2.1.2). En segundo lugar, se recorta la banda con una hoja de bisturí estéril, bajo luz ultravioleta. Para purificar el DNA de la banda de agarosa escindida se utiliza el *Agarose gel DNA extraction kit* de ROCHE, basado en la utilización de polvos de sílice que retienen adsorbido el DNA en presencia de sales caotrópicas. Se ha seguido el protocolo sugerido por el fabricante.

### 1.4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR O RT-PCR

Los productos resultantes de la amplificación per PCR o RT-PCR se han purificado separándolos de los restos de sales, *primers* y enzimas utilizando el *High Pure™ PCR product purification kit* de ROCHE. Este *kit* se basa en el uso de columnas de polímero capaz de retener el DNA en determinadas condiciones. Con este sistema se pueden purificar fragmentos de DNA entre 0,1 i 10 Kb de tamaño. Se han seguido las instrucciones indicadas por el fabricante.

## 2. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 2.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El material de electroforesis utilizado ha sido principalmente el siguiente: cubetas tipo minigel y de medida mediana de las casas comerciales B<sub>IO</sub>-R<sub>AD</sub> y E<sub>COGEN</sub>, y fuentes de electroforesis de las casas comerciales H<sub>OEFFER</sub> y B<sub>IO</sub>-R<sub>AD</sub>.

El DNA para analizar se ha diluido 1/10 en tampón de carga 10x: 50% Glicerol, 0,21% Azul de bromofenol, 0,21% *Xyleno cyanol FF* i 0,2M EDTA pH 8,0.

### 2.1.1. Electroforesis analítica

Para visualizar el resultado de digestiones de DNA y amplificación de ácidos nucleicos se ha realizado electroforesis en geles de agarosa [*agarosa estándar grado medio*, ECOGEN] preparados en tampón TAE 1x. El porcentaje de agarosa oscila entre 0,7 i 2,5% (p/v) según el tamaño de los productos a separar. Para poder visualizar el DNA mediante luz UV se incorpora al gel bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. La electroforesis se resuelve a voltajes de entre 70 i 115 V.

### 2.1.2. Electroforesis preparativa

En electroforesis donde el propósito ha sido la purificación del DNA de interés a partir del gel para a una posterior aplicación se ha utilizado agarosa de máxima pureza [*molecular biology grade agarose* de P<sub>ROMEGA</sub>]. En estos casos se trabaja con dimensiones y volúmenes de carga más grandes, entre 50 i 100 µl per pocillo, y se resuelve a voltajes más bajos, 40-60 V, durante un período de tiempo más largo.

En ambas electroforesis, las muestras a cargar se han preparado diluyéndolas 1/10 en tampón de carga (tampón de carga 10x: 50% Glicerol, 0,21% Azul de bromofenol, 0,21% Xyleno cyanol FF i 0,2M EDTA pH 8,0).

## 2.2. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La amplificación de ácidos nucleicos permite obtener una cantidad importante de DNA a partir de un ácido nucleico (ya sea RNA o DNA) además hace posible la introducción de modificaciones específicas como la adición de una diana de restricción, mutaciones puntuales o *tags* a los extremos del DNA, entre otras.

Las condiciones de amplificación dependen principalmente del fragmento a amplificar, de las características de los *primers* a utilizar y del enzima que se elija.

Los aparatos utilizados han sido: el termociclador *geneamp 2400* de P<sub>ERKIN</sub> E<sub>LMER</sub> y el *PCT-100™ Programmable Thermal controller* de MJ RESEARCH.

### 2.2.1. PCR (*P*OLYMERASE *C*HAIN *R*EACTION)

La amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR se ha convertido en un procedimiento básico en los laboratorios de biología molecular. Cada reacción de amplificación se ha de optimizar de manera individualizada, y a parte del diseño adecuado individualizado de los *primers* para cada gen o situación, se han de ajustar específicamente la temperatura de anillamiento ( $T_a$ ), el número de ciclos de la reacción y la concentración de  $Mg^{2+}$ .

Las propiedades de polimerasa utilizadas se basarán en función de la aplicación posterior que de el producto de PCR. En la mayoría de situaciones se ha utilizado *EcoTaq* d'E<sub>COGEN</sub>, mientras que en los casos que ha sido importante la fidelidad en la amplificación, se ha optado por polimerasas con actividad correctora (*proofreading*), como la *FastStart* de R<sub>OCHE</sub> o la *Pfu turbo* de S<sub>TRATAGENE</sub>.

A continuación se indican condiciones básicas de PCR aplicables como punto de partida previa a la optimización de cualquier reacción de PCR.

#### **Reactivos:**

- Enzima Taq Polimerasa con tampón correspondiente
- $MgCl_2$  50 mM
- dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 10  $\mu$ M)
- Tubos *eppendorf* para PCR de pared fina
- *Primers forward* y *reverse* 10  $\mu$ M
- $H_2O$  *mili-Q* estéril

**Procedimiento**

1. Preparar la reacción siguiente en gel:  $V_{\text{final}} = 50 \mu\text{L}$

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
<b>final</b>	

H <sub>2</sub> O <i>mili-Q</i> estéril	hasta al V final
DNA*	x $\mu\text{l}$
10x <i>Taq</i> buffer †	1x
Mg Cl <sub>2</sub>	1.5 mM
dNTPs mix 10 mM	200 $\mu\text{M}$
<i>forward primer</i> 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<i>reverse primer</i> 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<i>Eco Taq</i>	1-2,5 U

\* Las cantidades de DNA varían según se trate de DNA genómico (25-100ng) o DNA plasmídico (0,1-1 ng)

† Subministrado con la DNA polimerasa específica utilizada.

2. Colocar cada reacción en el termociclador y ejecutar el programa de PCR. Las condiciones de amplificación son:

94° C	5 min		
94° C	30 s	} x	30
T <sub>a</sub> #	30 s		
72° C	1 min / Kb		
72° C	5 min		
4° C	$\infty$		

# Temperatura de anillamiento, equivale a  $\sim T_m (\text{primers}) - 5^\circ$

### 2.2.2. RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION - POLYMERASE CHAIN REACTION)

La transcripción inversa-PCR o RT-PCR permite obtener un cDNA de doble cadena partiendo de un mRNA correspondiente. La técnica se divide en dos etapas, primero se produce la transcripción inversa (RT) a partir de mRNA, utilizando un *primer* anti-sentido específico o un oligonucleótido oligo-dT17 y, en segundo lugar, ocurre la amplificación por PCR de la cadena de cDNA sintetizada inicialmente. Tradicionalmente, estas dos etapas se realizaban separadamente, ahora existen *kits* comerciales que mediante formulaciones de una mezcla de

transcriptasa inversa y *Taq* polimerasa permiten realizar la síntesis de cDNA acoplada a la PCR en un único tubo, utilizando una pareja de *primers* específicos.

Se ha empleado el *kit SUPERSRIPT™ One-Step RT-PCR with PLATINUM® Taq* de INVITROGEN que consiste en una mezcla de los enzimas *SUPERSRIPT II H-Reverse Transcriptase* y *PLATINUM Taq*, una *Taq* DNA polimerasa acomplejada con un anticuerpo que inhibe la actividad polimerasa a temperatura ambiente pero que permite la recuperación de esta actividad después de la desnaturalización a 94°C durante la PCR. Esta *Hot start* automática permite incrementar la sensibilidad, la especificidad y el rendimiento de la reacción de PCR. Se han seguido las instrucciones suministradas por la casa comercial.

### 2.2.3. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida *in vitro* nos permite estudiar la relevancia de una determinada secuencia incluida en la región reguladora de un gen. Para introducir mutaciones puntuales o deleccionar DNA de doble cadena se ha utilizado el *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit* de STRATAGENE siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como DNA, se utiliza un vector plasmídico que contiene el DNA de interés y, como *primers*, dos oligonucleótidos sintéticos que contienen la mutación deseada, cada uno de ellos complementario a cada una de las cadenas opuestas del plásmido. Mediante la *Pfu Turbo DNA polymerase* se extienden los *primers* generando un nuevo plásmido de doble cadena que contiene la mutación. Para eliminar el DNA parental se añade a la mezcla el enzima de restricción *Dpn I*, endonucleasa específica de DNA metilado y hemimetilado. Así se consigue seleccionar el DNA mutado que se transforma en la cepa de bacterias *One-Shot® TOP10 de E. Coli* de la casa comercial INVITROGEN. De las colonias obtenidas se extrae DNA y se secuencia para comprobar que se ha producido la mutación pretendida.

Las condiciones de la reacción se han de ajustar en función del número de cambios que queremos introducir y del tamaño del plásmido que contiene el DNA para mutar. Las condiciones generales son:

**Reactivos**

- *Pfu Turbo polymerase* con su correspondiente tampón (S<sub>TRATAGEN</sub>)
- dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP 10 mM)
- tubos *eppendorf* de pared fina
- *Primers* mutados *forw/rev* 10 μM
- H<sub>2</sub>O *mili-Q* estéril
- DpnI 10 U / μL [R<sub>OCHE</sub>]
- One-Shot® *TOP10* [I<sub>NVITROGEN</sub>]

**Procedimiento**

1. Preparar la siguiente reacción:

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
<b>final</b>	
H <sub>2</sub> O <i>mili-Q</i> estéril	hasta 50 μl
DNA	50 ng
10x <i>Pfu buffer</i> *	1x
dNTPs mix 10 mM	250 μM
<i>forward primer</i> 10 μM	200 nM
<i>reverse primer</i> 10 μM	200 nM
<i>Pfu Turbo polymerase</i>	2,5 U

2. Colocar las reacciones en el termociclador y ejecutar el programa de PCR

95° C    30 s

95° C    30 s

55° C    1 min

68° C    2 min / Kb plásmido

} x 12 / 16 / 18 ciclos#

4° C    ∞

# 12 ciclos per mutaciones puntuales

16 ciclos per mutaciones de 2 nt

18 ciclos per mutaciones de 3 nt

3. Añadir 1 μL de enzima de restricción *DpnI* a la reacción de PCR y incubar 1 hora a 37° C
4. Transformar por choque térmico una alícuota de bacterias competentes One-Shot® *TOP10* con 2 μL de la reacción de PCR digerida
5. Sembrar todo el volumen de la transformación en placas de LB con el antibiótico adecuado para seleccionar las bacterias transformadas.

### 2.3. SECUENCIACIÓN DE DNA

Las secuencias se han realizado en el servicio interno de secuenciación del centro con el secuenciador automático *ABI PRISM 310 genetic analyser* de PERKIN ELMER BIOSYSTEMS.

Las reacciones de secuencia se han obtenido con *BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* de APPLIED BIOSYSTEMS y se han optimizado en el termociclador PERKIN ELMER *GeneAmp PCR System 2400*.

#### Reactivos

- *Big Dye v1.1* [APPLIED BIOSYSTEMS]
- *H<sub>2</sub>O mili-Q* estéril
- *Primers* específicos 5  $\mu$ M
- Etanol 100 % y 70 % (v/v)

#### Procedimiento

##### Reacción de secuencia

1. Preparar la siguiente reacción:

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
H <sub>2</sub> O <i>mili-Q</i> estéril	hasta 20 $\mu$ l
DNA*	x $\mu$ l
<i>primer</i> 5 $\mu$ M	1 $\mu$ l
5x BD <i>buffer</i>	4 $\mu$ l
2x Dil <i>buffer</i>	10 $\mu$ l

\* Producto de PCR (200 ng); Plásmido (1  $\mu$ g)

2. Poner la reacción en el termociclador y ejecutar el siguiente programa:

96° C	2 min	
96° C	10 s	} x 25
T <sub>a</sub> #	5 s	
60 ° C	4 min	
4° C	$\infty$	

# Temperatura de anillamiento, generalmente -5°C por debajo de la T<sub>m</sub> de los *primers*

### Precipitación de la reacción de secuencia

- Añadir a la reacción:
  - H<sub>2</sub>O *mili-Q* 16 µl
  - Etanol 95% 64 µl
- Vortexar, precipitar 15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 20 min a 14000 rpm.
- Rentar el *pellet* con 250 µl de etanol al 70%.
- Dejar secar.
- Resuspender el *pellet* en 15 µl de TSR.
- Desnaturalizar 3 min a 94°C.
- Centrifugar brevemente y poner en hielo.
- Guardar a 4°C i a oscuras hasta que la muestra sea inyectada en el analizador.

## 3. DNA RECOMBINANT

### 3.1. CLONAJE Y SUBCLONAJE DE DNA

La estrategia más habitual ha sido el clonaje de productos de PCR en vectores comerciales específicos para este cometido y el posterior subclonaje del inserto en otros plásmidos de interés concreto para cada aplicación.

#### 3.1.1. Clonaje de productos de PCR

La estrategia generalmente empleada para la clonación de productos de PCR aprovecha la actividad transferasa 3' terminal que algunas polimerasas, como la Taq o la Tfl, presentan y que supone la adicción de una desoxiadenosina extra en los extremos 3' de las cadenas amplificadas. Esta característica permite que vectores comerciales que presentan una desoxitimidina protuberante en sus extremos 3' sean compatibles con los fragmentos de DNA amplificados a clonar y de esta manera incrementan notablemente la eficiencia de ligación.

Para esto se ha utilizado el vector *TOPO TA Cloning*® de INVITROGEN y básicamente se han seguido los siguientes pasos del *kit* que son:

1. Preparación del inserto para clonar.
2. Ligación del inserto en el vector de clonaje
3. Transformación de los productos de la ligación en bacterias competentes.
4. Análisis de los clones resultantes.

### ***Preparación del inserto***

Los fragmentos de DNA amplificado a clonar se han de purificar antes de realizar la ligación. Cuando en la reacción de amplificación se obtienen diferentes fragmentos de DNA, se ha resuelto electroforéticamente el producto de PCR y se ha recortado del gel la banda correspondiente al fragmento de interés. El DNA obtenido en esta banda se ha purificado siguiendo el protocolo ya descrito (mirar apartado 1.4). En los casos que se ha obtenido un producto único durante la amplificación, este ha sido purificado directamente utilizando *kits* comerciales de purificación de productos de PCR (mirar apartado 1.5).

En cualquier caso se ha comprobado la pureza y la concentración del DNA purificado mediante electroforesis en geles de agarosa (mirar apartado 2.1.1) y la medida espectrofotométrica, antes de continuar con el proceso de clonaje.

### ***Ligación del inserto en el vector pCR®2.1-TOPO®***

1. Preparar la siguiente reacción:

<b><u>Componente</u></b>	<b><u>cantidad</u></b>
H <sub>2</sub> O <i>mili-Q</i>	hasta 6 µl
Producto de PCR†	0,5-4 µl
<i>Salt solution</i> *	1 µl
<i>pCR®2.1-TOPO®</i> *#	1 µl

\* Subministrado con el *kit*. # A 10 ng/µl.

† Habría que optimizar la relación inserto(I)/vector(V); normalmente se ha utilizado la relación molar I:V

3:1. La cantidad final de inserto se ha calculado con la fórmula descrita más abajo‡.

2. Mezclar e incubar de 5 a 10 min a temperatura ambiente.

3. La ligación se puede guardar a -20 C hasta su utilización.

†

$$\frac{\text{Cantidad de V (ng) x medida del I (kb)}}{\text{medida del V}} \times \text{relación} = \text{ng de I}$$

### 3.1.2. Subclonaje de DNA

Hablamos de subclonaje cuando los insertos que se van a clonar provienen de la digestión de un constructo generado previamente que ya los contenía, es decir, cuando lo que se pretende es cambiar el inserto de plásmido debido a las diferentes propiedades que este ofrece.

El protocolo de subclonaje ha sido el siguiente:

1. Digestión del inserto y del vector.
2. Defosforilación del vector
3. Purificación del DNA, tanto del inserto como del vector.
4. Anillamiento de oligonucleótidos
5. Ligación del inserto en el vector de clonaje.
6. Transformación del producto de la ligación en bacterias competentes.
7. Identificación de las colonias recombinantes.

#### *Digestión del DNA*

Siempre que ha sido posible, para la digestión de inserto y vector se han escogido enzimas de restricción que generasen extremos protuberantes diferentes, para permitir la clonación direccional del inserto.

Las digestiones se han realizado con enzimas de restricción de la casa comercial R<sub>OCHE</sub> a una concentración aproximada d'1 U/ $\mu$ g de DNA. El protocolo utilizado ha sido:

1. Preparar la siguiente reacción:

<b>Componente</b>	<b>Concentración final</b>
H <sub>2</sub> O <i>mili-Q</i>	hasta 50 $\mu$ l
DNA	10 $\mu$ g
Enzimas <sup>#</sup>	2 U/ $\mu$ g DNA
Tampón 10x <sup>**†</sup>	1x

\*Subministrado con el enzima de restricción.

# 1 o 2 enzimas en función de si hemos podido obtener 2 dianas en cada extremo y de la compatibilidad de sus tampones.

† Si usamos 2 enzimas debemos usar el tampón más compatible con los dos.

2. Incubar la reacción *o/n* a 37° C.

3. Comprobar que la digestión se completa por electroforesis en gel de agarosa (mirar protocolo 2.1.1).
4. La digestión se puede guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

### ***Defosforilación del vector***

En los casos en que se ha digerido el vector con un solo enzima o con enzimas generadores de extremos romos o extremos cohesivos compatibles se ha defosforilado el vector para evitar que haya religación, fenómeno que disminuye la eficiencia de ligación.

Se ha empleado el enzima CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) de ROCHE se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Preparar la reacción de defosforilación:

Plásmido digerido (10  $\mu\text{g}$ )

1/10 del volumen de 10x CIAP *buffer*\*

1  $\mu\text{l}$  (1U) del enzima CIAP

2. Mezclar e incubar 60 min a  $37^{\circ}\text{C}$ .
3. Inactivar térmicamente la fosfatasa a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 min

\*Subministrado con el enzima.

### ***Purificación del DNA que se va a clonar***

Una vez digerido y defosforilado el DNA se ha purificado. Tanto para el inserto como para el vector se ha seguido el protocolo de extracción de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa (mirar apartado 1.4).

### ***Ligación entre el inserto y el vector***

Una vez estimada la concentración aproximada de DNA (a partir de la intensidad que presenta 1  $\mu\text{L}$  en un gel de agarosa después de la purificación) se calcula la cantidad molar de

vector (V) y de inserto (I) que se incluirá en la ligación. En general como relación de partida se ha utilizado una I:V de 3:1.

Para la ligación se ha empleado el *Rapid DNA Ligation kit* de R<sub>O</sub>CHE, el protocolo se detalla a continuación:

1. Preparar en un tubo:

10 µl de DNA (vector más inserto) †

en *DNA dilution buffer*\* 1x

10 µl *T4 DNA ligation buffer*\* 2x

1 µl *T4 DNA ligase*\*

\* Subministrado con el *kit*.

† Se ha de optimizar la relación inserto (I) / vector (V); normalmente se ha utilizado una relación molar I:V de 3:1. Generalmente se ha utilizado unos 100 ng de vector y la cantidad final de inserto se ha calculado con la fórmula descrita en el apartado *Ligación del inserto con el vector* del protocolo 3.1.1.

2. Incubar la reacción 5 min a temperatura ambiente.

3. Parar la reacción a -20°C o proceder con la transformación.

## 3.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Las bacterias competentes son aquellas capaces de incorporar DNA exógeno mediante su transformación. Hay cepas comerciales que ofrecen esta capacidad, como las bacterias ampliamente utilizadas en este trabajo One-Shot<sup>®</sup> TOP10 de *E. coli*, de INVITROGEN, hechas competentes químicamente y con una eficiencia de transformación de  $10^7$ - $10^8$  cfu/µg. Pero la competencia también se puede inducir en el laboratorio mediante un tratamiento de las bacterias previo a la transformación, en el cual se induce el estado transitorio que permite la adquisición de DNA.

### 3.2.1. Preparación de bacterias competentes para transformar por choque térmico

El tratamiento de las cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS con sales como el MgCl<sub>2</sub> y el CaCl<sub>2</sub> permite que se conviertan competentes por choque térmico. El protocolo seguido ha sido el siguiente:

### Reactivos

- Placas de LB-agar
- MgCl<sub>2</sub> 100 mM
- CaCl<sub>2</sub> 100 mM
- CaCl<sub>2</sub> 85 mM – glicerol 15%

### Procedimiento

1. Sembrar bacterias de la cepa de *E. coli* escogida en una placa de LB sin antibiótico y crecer *o/n* a 37°C.
2. Inocular un cultivo líquido de 3 ml de LB con una colonia aislada y crecer *o/n* a 37°C y en agitación (225 rpm).
3. Inocular 250 ml de LB con los 3 ml del cultivo crecido *o/n* en un erlenmeyer de 1 L. Incubar a 37°C en agitación (225 rpm) hasta que el cultivo alcance la fase exponencial ( $A_{595}$  0,7-0,8).
4. Centrifugar el cultivo a 4000 rpm, durante 5 min y a 4°C, descartar el sobrenadante.
5. Resuspender el *pellet* de bacterias con 50 ml de MgCl<sub>2</sub> 100 mM atemperado a 4°C.
6. Incubar las bacterias en hielo durante 30 min.
7. Centrifugar a 4000 rpm, durante 5 min. a 4°C, descartar el sobrenadante.
8. Resuspender el *pellet* de bacterias con 50 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM atemperado a 4°C.
9. Incubar las bacterias en hielo de 30 a 90 min.
10. Centrifugar a 4000 rpm, durante 5 min. a 4°C, descartar el sobrenadante.
11. Resuspender el *pellet* con 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 85 mM – 15% glicerol.
12. Repartir las bacterias resuspendidas en alícuotas de 100 o 200 µl i congelarlas rápidamente en un baño de acetona/nieve carbónica.
13. Conservar las bacterias competentes a -80°C.

### 3.2.2. Transformación por choque térmico

El choque térmico ha sido la estrategia escogida para la transformación tanto de bacterias competentes generadas en el laboratorio como de la cepa comercial *One-Shot*<sup>®</sup> *TOP10*, aunque el protocolo seguido se ha variado ligeramente tanto en un caso como en el otro.

#### Cepa BL21(DE31)pLys

1. Descongelar en hielo una alícuota de bacterias competentes.
2. Diluir 1 µl de plásmido en 19 µl de H<sub>2</sub>O *mili-Q* y añadirlo a las bacterias competentes.
3. Incubar en hielo durante 20 min.
4. Realizar el choque térmico a 42°C durante 2 min 30 seg.
5. Sembrar todo el volumen de la transformación en una placa con medio selectivo para identificar las bacterias transformantes.
6. Incubar la placa *o/n* a 37°C.

#### Cepa *One-Shot*<sup>®</sup> *TOP10*

1. Descongelar en hielo una alícuota de bacterias *One-Shot*<sup>®</sup> *TOP10*.
2. Añadir a la suspensión de bacterias 2 µl de una ligación del producto de PCR (mirar apartado 3.1.1) o bien de 2-5 µl de una ligación estándar (mirar apartado 3.1.2) y mezclar.
3. Incubar mínimo 30 min en helo.
4. Realizar el choque térmico mediante 30 s de incubación a 42°C.
5. Transferir inmediatamente la mezcla en el gel.
6. Añadir 250 µl de medio SOC previamente atemperado a 37°C.
7. Incubar a 37°C con agitación (200-225 rpm) 1 h.
8. Sembrar 100-150 µl en una placa con medio selectivo adecuado para identificar las bacterias transformantes.
9. Incubar la placa *o/n* a 37°C.

## 4. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIONES

### 4.1. CULTIVOS CELULARES

#### 4.1.1. Líneas y medios de cultivo

Las líneas celulares\* empleadas en este trabajo son de origen renal y han sido: HK-2, PCT3, 293T y COS-7. Todas las líneas celulares han sido mantenidas y expandidas a 37°C en un incubador con atmosfera húmeda (al 5% en CO<sub>2</sub>), siguiendo los procedimientos y las prácticas estándar requeridas para el trabajo con cultivos en condiciones estériles (Davis, 2002)

\* mirar apartado 1.1 de M<sub>ATERIALES</sub>

#### 4.1.2. Tripsinización

Todas las líneas con las que se ha trabajado crecen de manera adherente sobre un soporte sólido. La tripsinización se ha realizado cuando el cultivo ha alcanzado entre un 80 y un 90% de confluencia.

##### *Reactivos*

- PBS 1x estéril
- Tripsina-EDTA al 0.05% [BIOLOGICAL INDUSTRIES]
- Medio de cultivo (mirar apartado 1.2 de M<sub>ATERIALES</sub>)

##### *Procedimiento*

1. Temperar la tripsina, el PBS y el medio de cultivo a 37°C.
2. Lavar la monocapa de células con PBS 1x.
3. Retirar el PBS 1x y añadir la tripsina a las células, aproximadamente, teniendo en cuenta la relación volumen/área: 3 ml /T-25 (25 cm<sup>2</sup> de área).
4. Incubar 5 min a 37°C dentro del incubador de cultivos.
5. Neutralizar la tripsina con un volumen de medio de cultivo y traspasar las células desenganchadas a un tubo de 15 ml.
6. Centrifugar las células a 1000 rpm 5 min.
7. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* con 1-2 ml de medio.
8. Sembrar la cantidad de células deseada en una nueva placa e

incubar a 37°C en una atmosfera al 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.1.3. Recuento de células

En los casos que haya que sembrar una cantidad concreta de células, se debe determinar previamente la concentración. El protocolo para contar es el siguiente:

##### *Reactivos*

- Azul de tripán [SIGMA]
- Cámara de contaje de Neubauer

##### *Procedimiento*

1. Coger una alícuota de la suspensión celular y preparar una dilución 1:10 en azul de tripán.
2. Llenar la cámara de Neubauer con la dilución preparada, contar el número de células viables - no teñidas- en los diferentes campos y hacer el cálculo siguiente:

$$\text{núm. células/ ml} = \text{núm. células promedio de los 4 campos} \times 10 \times 10^4$$

#### 4.1.4. Conservación de células

Las células eucariotas se pueden conservar congeladas en un medio que incluye criopreservadores en nitrógeno líquido. El protocolo de congelación ha sido el siguiente:

**Reactivos**

- DMSO [SIGMA]

**Procedimiento**

1. Tripsinizar el cultivo celular que ha llegado a confluencia y resuspenderlo en 1 ml de medio, contar el número de células.
2. Añadir a un criotubo 100 µl de DMSO y enfriar en hielo hasta que este solidifique.
3. Añadir 900 µl de la suspensión celular (0,5-1x10<sup>6</sup> células totales) al criotubo que contiene el DMSO.

- Criotubos

4. Mezclar hasta que el DMSO se haya licuado, colocar el criotubo en un contenedor especial de congelación (Mr.Frosty)[NALGENE] y dejarlo *o/n* a -80°C para permitir una congelación gradual de las células.
5. Transferir el criotubo a un tanque de N<sub>2</sub> líquido

**4.1.5. Descongelación de células**

La descongelación de células ha de ser un proceso rápido que evite la pérdida de la viabilidad de las células que son descongeladas.

**Procedimiento**

1. Sacar las células congeladas del N<sub>2</sub> líquido y descongelarlas en un baño a 37°C hasta que quede nada más una pequeña porción central congelada.
2. Añadir al vial 1 ml de medio de cultivo frío (a 4°C) y mezclar bien.
3. Transferir todo a un tubo con 8 ml de medio frío (a 4°C).
4. Centrifugar 5 min a 4°C a 1000 rpm
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 1 ml de medio.
6. Sembrar la totalidad de la suspensión celular en una nueva placa de cultivo.

## 4.2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

La transfección consiste en la introducción de DNA plasmídico dentro de células eucariotas. Existen diferentes métodos fisicoquímicos para hacerlo, entre los cuales hay: la electroporación, la precipitación con fosfato cálcico o la vehiculización del DNA en vesículas lipídicas.

La transfección transitoria, concretamente, se caracteriza porque el tiempo que el DNA exógeno se mantiene en las células es corto, entre 3 y 4 días aproximadamente.

Para transfectar transitoriamente nuestras líneas celulares, se ha utilizado un método basado en liposomas, concretamente el producto LIPOFECTAMINE™ PLUS de la casa comercial INVITROGEN. Se trata de una mezcla liposómica (3:1) del lípido policatiónico 2,3-dioleiloxi-N-[2(sperminecarboxamido)etil]-N,N'-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetat (DOSPA) y el lípido neutro dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El reactivo PLUS se acompleja con el DNA favoreciendo su empaquetamiento con los liposomas y produciendo así el aumento del rendimiento de la transfección.

Para los experimentos de ShRNA con virus, transfectamos las células con el método de fosfato de calcio que se explica más abajo.

El porcentaje de células que incorporan el material genético externo en la transfección transitoria es habitualmente reducido, aunque depende de la línea celular utilizada. En la línea PCT3 el porcentaje de transfección, después de la optimización de las condiciones de trabajo, es de un 30%.

### *Reactivos*

- Reactivo LIPOFECTAMINE™ PLUS [INVITROGEN]
- Reactivo PLUS [INVITROGEN]
- Medio OPTI-MEM [GIBCO]
- PBS 1x

### *Procedimiento*

1. El día previo a la transfección, sembrar el número adecuado de células para obtener aproximadamente un 60% de confluencia en el momento de la transfección ( $T_{AULA}$  9).
2. Preparar la solución A diluyendo el DNA en el volumen adecuado de medio OPTI-MEM y añadirle la cantidad correspondiente de reactivo P<sub>LUS</sub>. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
3. Preparar la solución B diluyendo el reactivo LIPOFECTAMINE en OPTI-MEM.
4. Combinar la mezcla de DNA-P<sub>LUS</sub> con el reactivo LIPOFECTAMINE preparado en el paso anterior. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
5. Lavar las células con PBS 1x atemperado a 37°C.
6. Añadir a la mezcla final de transfección el volumen necesario de OPTI-MEM para llegar al volumen final de transfección ( $T_{AULA}$  9), y distribuirlo bien por toda la placa.
7. Incubar las células con los complejos DNA/lípidos durante 3 h en el incubador de cultivos (37°C i 5% CO<sub>2</sub>).
8. Lavar las células con PBS 1x.
9. Mantener las células con medio completo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
10. Mirar la expresión del DNA exógeno, normalmente a las 24-48 h post-transfección.

#### **4.2.1. Transfección con Fosfato de Calcio**

##### *Reactivos*

- CaCl<sub>2</sub> 2.5M (peso molecular: 147)
- HEBS2X (Hepes, NaCl, NaHPO<sub>4</sub>, Dextrosa)
- Placas de 6 pocillos
- Medio para células HEK293

### *Procedimiento*

1. Añadir en un eppendorf: 10µg del vector que contiene el hairpin de RNA, 7µg de *packaging*, 3,5µg *envelope*. Añadir hasta 450µl de agua + 50µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M + 500 µl de Hebs2x.
2. Hebs2x debería añadirse a gotas.
3. Dejamos precipitar durante 20 min.
4. Añadir a las células HEK293.
5. Esperar entre 6-8 horas.
6. Lavar las células con PBS 1X.
7. Añadir 10 ml de medio para células HEK293.

## 5. PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS

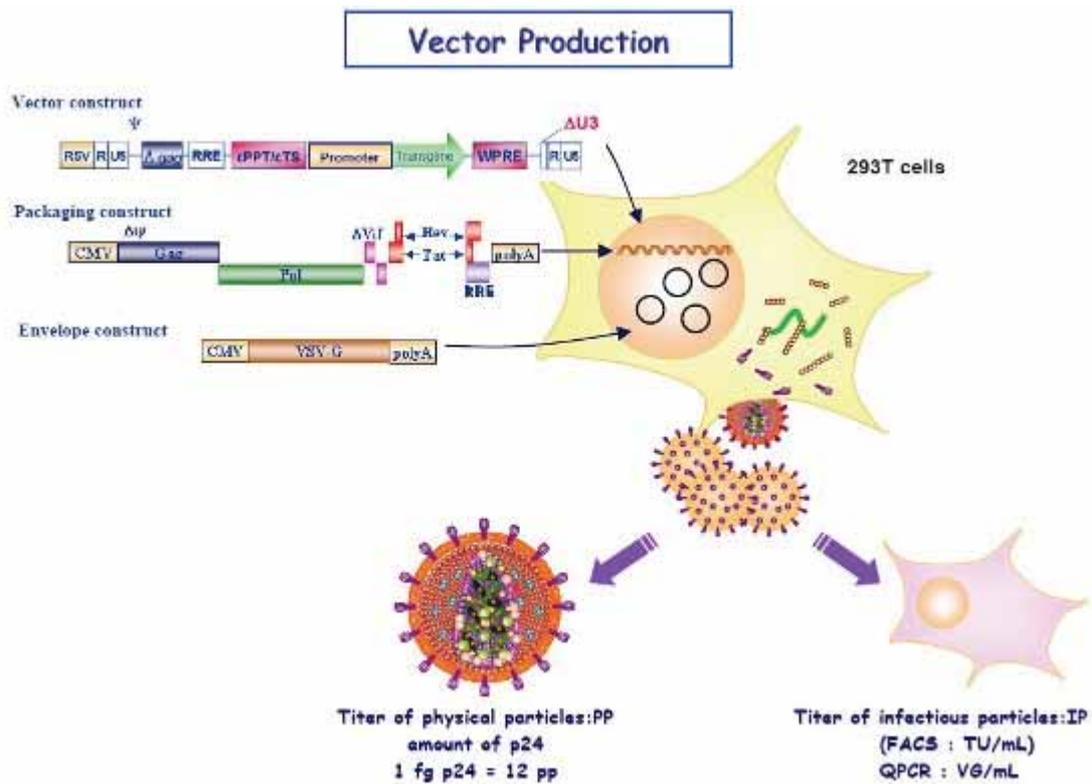
La producción de lentivirus se ha utilizado para el silenciamiento de CypA, CypB, CypD y Cyp40. Los vectores lentivirales integran y expresan establemente transgenes tanto en células que se dividen como células que no se dividen, abriendo así posibilidades para la investigación básica en el tratamiento genético de enfermedades humanas. Las partículas lentivirales se generan co-expresando los elementos del empaquetamiento del virión y el vector genómico en una célula que se usa como productora del virus. Las células utilizadas son células embrionarias renales humanas 293T. En nuestro caso utilizamos vectores basados en el virus del HIV-1 que contienen componentes enzimáticos del virión. Los vectores utilizados son pAPM, psPAX, pMD2G y están descritos en la tabla 4 de materiales. En la siguiente figura se muestra esquemáticamente como funciona el sistema de producción de virus.

**Reactivos**

- CaCl<sub>2</sub> 2.5M (peso molecular: 147)
- HEBS2X (Hepes, NaCl, NaHPO<sub>4</sub>, Dextrosa)
- Placas de 6 pocillos
- Medio para células HEK293
- Medio para células HK-2

**Procedimiento**

1. Día 1. Sembrar 3 millones de células HEK293 por cada placa de 10 cm.
2. Día 2. Por la mañana transfectar



Med Plac						
24 pocillos	60000	0.4	4	1	25	0,250
6 pocillos	250000	2	6	4	100	1
60 mm	650000	5	8	12	250	2,5
100 mm	1,5x10 <sup>6</sup>	12	20	30	750	6

- con el método de fosfato de calcio.
3. Día 3. Preparar las células HK-2 para titulación: 50000 células por cada placa de 6 pocillos.
  4. Día 4. Recuperar el sobrenadante de las placas de 10 cm transfectadas.
  5. Filtrar el sobrenadante con un filtro 0,45 $\mu$ .
  6. Mantener 100 $\mu$ l para la titulación.
  7. Centrifugar el resto durante 1 hora y media a 4° a 26000 rpm.
  8. Resuspender el virus en 1 ml de medio de las células HK-2 y dejar en hielo durante 30 min.
  9. Añadir en las células HK-2 10 $\mu$ l del virus del paso anterior.
  10. Día 8. Después de 4 días de infección, proceder a la titulación de estas. En nuestro caso añadimos puromicina a 2 $\mu$ g/ml ya que estábamos haciendo una infección estable.

**T<sub>ABLA</sub> 8.** Cantidades y volúmenes de transfección

## 6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

### 6.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para determinar determinar y caracterizar el tejido renal de ratón y concretamente de las células del túbulo proximal ha sido necesaria la obtención de extractos proteicos.

#### 6.1.1. Extracción de proteínas totales a partir de cultivo celular

##### *Reactivos*

- Tampón de lisis RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS]
- Inhibidores de proteasas: leupeptina 5 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml y PMSF 200 mM.
- Inhibidores de fosfatasa: ortovanadato de sodio 250 mM y fluoruro de sodio 1M
- PBS 1x

### ***Procedimiento***

1. Suplementar el tampón de lisis con los inhibidores de proteasas y fosfatasas en el momento de utilizarlo en las siguientes concentraciones:
  - leupeptina 1 µg/ml
  - aprotinina 5 µg/ml
  - PMSF 2 mM
  - Na<sub>3</sub>OV<sub>4</sub> 1 mM
  - NaF 10 mM
2. Descartar el medio de cultivo y lavar las células tres veces con PBS 1x frío.
3. Añadir el volumen adecuado de tampón de lisis frío a la placa (500 µl / placa de 6 cm de diámetro) y rascar las células, sobre hielo, para desprenderlas de la placa.
4. Transferir las células parcialmente lisadas a un *eppendorf* y pasarlas por una jeringa de 21G x 20 en hielo 5 veces.
5. Mantener el lisado en hielo durante 30 min para permitir una lisis completa.
6. Centrifugar durante 30 min a 4°C y 15000 rpm. El sobrenadante se considera el lisado total en condiciones nativas.
7. Alicuotar el lisado y guardar a -80°C.

#### **6.1.2. Extracción de proteínas totales a partir de tejido**

Para la obtención de extractos proteicos totales a partir de tejido hemos aplicado el mismo método basado en el tampón de extracción RIPA y hemos partido de tejido recién extraído o bien conservado a -80° C hasta su utilización. El tejido utilizado en este trabajo ha sido riñón de ratón, el cual tiene que ser decapsulado antes de ser congelado y utilizado. Para hacer extractos totales hemos partido de unos 100 mg, equivale aproximadamente a la totalidad de un riñón de ratón adulto.

### ***Reactivos***

- Tampón de lisis RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS]

- Inhibidores de proteasas y fosfatasa (mirar apartado 5.1.1)

### ***Procedimiento***

1. Añadir los inhibidores de proteasas y fosfatasa tal y como se describen en el apartado 5.1.1
2. Homogeneizar el tejido a 4°C con 500 µl de tampón de lisis para cada 200 mg de tejido en un homogeneizador.
3. Transferir el lisado en un *eppendorf* y pasarlo por una jeringa de 21Gx20 en hielo 10 veces.
4. Incubar el lisado 30 min en hielo.
5. Centrifugar a 15000 rpm durante 30 min a 4°C y recuperar el sobrenadante que se considera el lisado total en condiciones nativas.
6. Alicuotar el lisado y guardarlo a -80°C.

## **7. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS *IN VITRO*: TRADUCCIÓN *IN VITRO* MEDIANTE RETICULOCITOS DE CONEJO**

Este método de expresión de proteínas se basa en el uso de extractos comerciales lisados de reticulocitos de conejo que contienen toda la maquinaria celular y elementos necesarios para realizar la transcripción reversa y la traducción simultánea de los transcritos generados en un sistema exógeno y artificial en un tubo incubado a 30° C.

El proceso de síntesis *in vitro* de proteínas se realiza en tres etapas esenciales. En primer lugar se debe clonar el cDNA de la proteína de interés en un vector adecuado que dispone del promotor viral T3/T7 que dirige la transcripción. A partir de este molde, la transcriptasa reversa viral presente en los lisados sintetizará los cRNAs correspondientes. Finalmente tendrá lugar la traducción de los transcritos generados en polipéptidos que incorporaran metionina marcada con azufre-35 añadida en el cóctel. Esto nos permitirá testar la eficiencia de la reacción al resolver el extracto en un gel de acrilamida y exponerlo en un film donde serán visibles las bandas radioactivas de los péptidos sintetizados.

### ***Reactivos***

- *kit* TnT [P<sub>ROMEGA</sub>]
- Redivue L-[<sup>35</sup>S]Metionina (300 mCi/mmol) [A<sub>MERSHAM</sub>]
- Material para minigeles de acrilamida

### Procedimiento

1. Conlleva la siguiente reacción:

#### Cantidad

#### Componente

H <sub>2</sub> O <i>nuclease free</i> *	hasta 50 µl
plásmido cDNA 1µg/µl	1 µl
[ <sup>35</sup> S]-Metionina #	2 µl
lisado de reticulocito*	40 µl

# En los casos que la finalidad de la expresión es el uso de la proteína en ensayos de EMSA, se usa Metionina no marcada, suministrada con el *kit*

\* Subministrados con el kit

2. Incubar 90 min a 30°C
3. Analizar los resultados de la traducción en un gel de acrilamida/SDS-PAGE:
  - i) Cargar 5 ml de cada muestra (diluida 1/5 en tampón de carga)

- ii) Correr el gel, fijarlo 30 min en tampón de fijación:

Metanol al 50% (v/v)

Ácido acético al 10% (v/v)

- iii) Incubar 10 min en salicilato sódico 1M (solución fluorográfica)

- iv) Incubar el gel 5 min en la siguiente solución:

Metanol al 7% (v/v)

Ácido acético al 7% (v/v)

Glicerol al 1% (v/v)

- v) Secar el gel sobre papel Whatman 3MM 1-2h a 80°C sometido a vacío
4. Exponer el gel seco en un film de rayos X K<sub>ODAK</sub> a -70°C. Revelar a las 6-24 h

## 8. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

### 8.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

#### 8.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la técnica analítica empleada para separar proteínas. SDS-PAGE permite separar las proteínas concretamente en función de su peso molecular. Por un lado, la mezcla de acrilamida/bis-acrilamida forma una red compleja en polimerizar, a través de la cual han de migrar las proteínas cuando se les aplica un campo eléctrico; por otro lado la presencia de SDS, detergente anfipático que desnatura las proteínas y les confiere una densidad de carga global negativa, permite separarlas principalmente según su peso molecular.

Hemos empleado el sistema de electroforesis *mini-PROTEAN II* de B<sub>IO</sub>-R<sub>AD</sub> y hemos confeccionado los geles entre 10 i 15 % de acrilamida en función del peso molecular de las proteínas que se iban a resolver.

### **Reactivos**

- Tampón de carga o de *Laemmli* 3x\*
- Tampón de electroforesis \*
- Tinción azul de *Coomassie* \*
- Solución para desteñir al 10% de ácido acético

\*(mirar A<sub>NNEXO</sub>)

### **Procedimiento**

1. Preparar los geles de poliacrilamida (tabla 9).
2. Preparar las muestras de proteína diluyéndolas en tampón de carga 3x, hervirlas 5 min y mantenerlas en hielo.
3. Montar los geles en la cubeta de electroforesis, cubrir con el tampón de electroforesis y cargar las muestras de proteína en los pocillos.
4. Correr las muestras con un amperaje constante, 20 mA / gel, durante 1 h o hasta que salga el frente.
5. Teñir los geles durante 10 min con la tinción azul de *Coomassie*.
6. Desteñir los geles con 10% de ácido acético hasta observar bandas discretas en el gel.

**TABLA 9.** Volúmenes necesarios para la preparación de 2 geles de acrilamida

Gel Separador			
Componentes	Porcentaje de acrilamida		
	10%	12%	15%
30% acril/0,8 bis	5 ml	6 ml	7,5 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	3'75 ml	3'75 ml	3'75 ml
H <sub>2</sub> O	6'25 ml	5'25 ml	3'75 ml
10% PA	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

### 8.1.2. Electrotransferencia de proteínas: *Western Blot*

Una vez separadas por SDS-PAGE, las proteínas pueden ser transferidas a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) o de nilón mediante una segunda electroforesis realizada en poco tiempo y con alto voltaje en dirección hacia el eje mayor del gel. De esta manera las proteínas quedan adheridas en la membrana en la misma posición y orden que ocupaban en el gel de acrilamida.

La presencia de proteínas se revela con anticuerpos específicos de las proteínas de interés y con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa o fosfatasa alcalina, biotina, etc.

Se ha utilizado el *Mini Trans Blot-Cell* de la casa comercial B<sub>IO</sub>-R<sub>AD</sub>.

#### Reactivos

- Tampón de transferencia (ver anexo)
- Metanol
- H<sub>2</sub>O destilada
- Membranas *WESTRAN<sup>®</sup>PVDF*

Gel Concentrador	
Componentes	Cantidad
30% acril/0,8 bis	0,65 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	3,05 ml
10% PA	0,025 ml
TEMED	0,01 ml

[SCHLEICHER &amp; SCHUELL]

**Procedimiento**

1. Después de la electroforesis, equilibrar los geles en tampón de transferencia.
2. Activar la membrana WESTRAN<sup>®</sup> PVDF sumergiéndola en metanol durante 5 s.
3. Lavarla con agua destilada 3 veces.
4. Equilibrar la membrana en tampón de transferencia.
5. Montar la transferencia siguiendo las instrucciones del aparato y transferir a 400 mA durante 90 min.
6. Desmontar la transferencia y proceder a la inmunodetección

**8.1.3. Inmunodetección****Reactivos**

- Leche en polvo desnatada
- BSA
- Tween-20
- PBS 1x (ver anexo)
- Anticuerpo primario y secundario (*T<sub>ABLA</sub> 5*)
- StreptABComplex/HRP [D<sub>AKO</sub>]
- ECL Plus [A<sub>MERSHAM</sub>]

**Procedimiento**

1. Bloquear la membrana 1 hora a temperatura ambiente con 5% de leche desnatada y 0,1% Tween-20 en PBS 1x.
2. Incubar con el anticuerpo primario con 1% de leche desnatada y 0,1% Tween-20 en PBS 1x durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Lavar la membrana con 0,1% Tween-20 en PBS 1x durante 10 min; repetir hasta un total de 3 veces.

4. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Lavar la membrana con 0,1% Tween-20 en PBS 1x durante 10 min; repetir 2 veces más.
6. Revelar mediante el sistema de detección ECL Plus siguiendo las instrucciones del fabricante.

***Procedimiento 2: inmunodetección de proteínas de fusión con HA***

1. Bloquear la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con 1% BSA en PBS 1x.
2. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-HA a 0,2 µg/ml en solución de bloqueo.
3. Lavar la membrana durante 10 min con 0,1% Tween-20 en PBS 1x, repetir dos veces más.
4. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario anti-rat, diluido 1:2000 en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Lavar la membrana durante 10 min con 0,1% Tween-20 en PBS 1x, repetir dos veces más.
6. Revelar mediante el sistema de detección ECL Plus siguiendo las instrucciones del fabricante.

***Procedimiento 3: inmunodetección de proteínas de fusión con GST***

1. Bloquear la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con 1% BSA en PBS 1x.
2. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-GST a 0,1 µg/ml en solución de bloqueo.
3. Lavar la membrana durante 10 min con 0,1% Tween-20 en PBS 1x, repetir dos veces más.

4. Revelar mediante el sistema de detección ECL Plus siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 9. INMUNOPRECIPITACIÓN

Los protocolos de inmunoprecipitación se fundamentan en la capacidad de alguna clase de anticuerpos que cuando son añadidos a lisados celulares o homogenados tisulares forman complejos antígeno-anticuerpo. Estos complejos se precipitan por reacción con una fase sólida inmunoabsorbente formada, habitualmente, por un segundo anticuerpo unido a una resina insoluble (Sepharosa) o bien, por proteínas (proteína A o G de gran afinidad para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas) unidas también a Sepharosa. Una vez sedimentadas por centrifugación, los complejos se lavan y resuspenden para su análisis por SDS-PAGE.

Las inmunoprecipitaciones hechas en homogenados de tejido se han llevado a cabo con 500 µg de extracto de proteínas obtenidos con el tampón lisis RIPA. En el caso de cultivos celulares, la cantidad de extracto de proteínas utilizadas dependerá del protocolo concreto que se vaya a utilizar.

### *Reactivos*

- Tampón de lisis
- Proteína G-Sepharose (SIGMA)
- Tampón de carga o de Laemmli 3x (mirar anexo)

### *Procedimiento para la inmunoprecipitación con anti-CypA, anti-CypB, and anti-Na/K-β*

1. Llevar el extracto de proteínas a inmunoprecipitar a un volumen final de 500 µl con tampón de lisis.
2. Preaclarar el extracto añadiendo 5 µl de serum preimmune con 25 µl de proteína G-Sepharose al 50% en

- tampón de lisis\* e incubar 1 hora a 4°C en el agitador orbital.
3. Centrifugar 1 min a 4°C y 14000 rpm, recuperar el sobrenadante.
  4. Si se trata de una inmunoprecipitación a partir de homogenado de riñón, repetir los pasos 2 y 3 hasta un total de 8 veces.
  5. Añadir 5 µl de anticuerpo (CypA, CypB, Na/K βsubunit) al extracto e incubar o/n a 4°C en el agitador orbital.
  6. Añadir 50 µl de proteína G-Sepharose al 50% en tampón de lisis e incubar 1 hora a 4°C en el agitador orbital.
  7. Precipitar la resina centrifugando 1 min a 4°C y 14000 rpm, descartar el sobrenadante.
  8. Lavar la resina con 500 µl de tampón de lisis.
  9. Repetir los pasos 7 y 8 hasta un total de cuatro veces.
  10. Finalmente resuspender la resina en tampón de carga y resolver por SDS-PAGE o congelar a -80°C.
- \*antes de comenzar la inmunoprecipitación hay que equilibrar la proteína G-Sepharose haciendo 4 lavados con el tampón de lisis utilizado en la extracción de proteínas.

#### ***Procedimiento para la inmunoprecipitación con anti-HA***

1. Llevar el extracto de proteínas a inmunoprecipitar a un volumen final de 500 µl con tampón de lisis.
  2. Preaclara el extracto añadiendo 5 µl de serum preimmune con 25 µl de proteína G-Sepharose al 50% en tampón de lisis\* e incubar 1 hora a 4°C en el agitador orbital.
  3. Centrifugar 1 min a 4°C y 14000 rpm, recuperar el sobrenadante.
  4. Añadir el anticuerpo anti-HA al extracto a una concentración de 2 µg/ml e incubar o/n a 4°C en el agitador orbital.
  5. Añadir 50 µl de proteína G-Sepharose al 50% en tampón de lisis e incubar 3 horas a 4°C en el agitador orbital.
  6. Lavar la resina con 500 µl de tampón de lisis.
  7. Precipitar la resina centrifugando 1 min a 4°C y 14000 rpm, descartar el sobrenadante.
  8. Repetir los pasos 6 y 7 hasta un total de cuatro veces.
  9. Finalmente resuspender la resina en tampón de carga y resolver por SDS-PAGE o congelar a -80°C.
- \*antes de comenzar la inmunoprecipitación hay que equilibrar la proteína G-Sepharose haciendo 4 lavados con el tampón de lisis utilizado en la extracción de proteínas.

## 10. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Las inmunodetecciones se han llevado a cabo sobre células, previamente transfectadas, y con anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluorocromos para permitir la visualización de las proteínas de interés por microscopía confocal. La microscopía de fluorescencia confocal permite la obtención de imágenes de finas secciones ópticas muy útiles a la hora de localizar moléculas en 2 ó 3 dimensiones permitiendo reconstrucciones tridimensionales, en los estudios de colocalización de proteínas, en las medidas de concentración de iones intracelulares, en el estudio del transporte intracelular, etcétera.

Las células se han de sembrar sobre cubre objetos en placas de 24 pocillos y la inmunodetección se ha realizado entre 24 y 48 horas después de sembrar o tratar con CsA. Se ha utilizado dos protocolos de inmunocitoquímica. Las imágenes han sido captadas en el servicio de microscopía confocal de la Unitat Científico-Tècnica de support (UCTS) de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron con un sistema de Microscopía Confocal Invertida Leica DMIRB.

### 10.1. Sistema de fijación con alcohol

El metanol además de actuar como fijador, también permeabiliza las células, evitando así la incubación con algún tipo de detergente.

#### *Reactivos:*

- Metanol -20°C
- PBS 1x (mirar anexo)
- BSA
- Anticuerpo primario y secundario (mirar tabla)

### ***Procedimiento***

1. Lavar las células con PBS 1x frío para eliminar los restos del medio de cultivo.
2. Fijar las células con metanol a -20°C durante 4 min.
3. Lavar 3 min con PBS 1x, repetir dos veces más.
4. Bloquear las uniones inespecíficas con 1% BSA en PBS 1x durante 30 min a temperatura ambiente.
5. Incubar las células con el anticuerpo primario a la concentración indicada\* durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Lavar las células 5 min con PBS 1x hasta un total de tres veces.
7. Incubar las células con el anticuerpo secundario a la concentración indicada\* durante 1 hora a temperatura ambiente y a oscuras.
8. Lavar las células 5 min con PBS 1x hasta un total de tres veces.
9. Opcionalmente se pueden teñir los núcleos usando Hoechst.
10. Lavar las células 5 min con PBS 1x hasta un total de tres veces.
11. Montar las células con *SlowFade™ antifade kit* y mantenerlas a 4°C y a oscuras hasta el momento de visualizarlas en el microscopio.
12. \*Tanto lo anticuerpos primarios como los secundarios se han diluido en la solución de bloqueo. Mirar las concentraciones de trabajo en la tabla 11.

### **10.2. Sistema de fijación con paraformaldehído (PFA)**

La preservación de algunos antígenos después de la fijación con metanol no es óptima. Por este motivo optamos por una fijación menos agresiva como el uso de PFA. En esos casos ha sido necesario un paso posterior de permeabilización, en el que se ha usado el detergente Tritón X-100.

#### ***Reactivos***

- PFA 4%
- Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) 50 mM
- Tritón X-100 0,1%
- PBS 1x (mirar anexo)
- BSA

- Anticuerpo primario y secundario (Tabla 11)

### *Procedimiento*

1. Lavar las células con PBS 1x frío para eliminar los restos del medio de cultivo.
2. Fijar las células con PFA 4% a temperatura ambiente durante 30 min.
3. Lavar las células con PBS 1x.
4. Incubar las células con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear los grupos aldehído.
5. Lavar las células con PBS 1x.
6. Permeabilizar las células con Tritón X-100 0,1% durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Lavar las células con PBS 1x.
8. Bloquear las uniones inespecíficas con 1% BSA en PBS 1x durante 30 min a temperatura ambiente.
9. Incubar las células con el anticuerpo primario a la concentración indicada\* durante 1 hora a temperatura ambiente.
10. Lavar las células 5 min con PBS 1x hasta un total de tres veces.
11. Incubar las células con el anticuerpo secundario a la concentración indicada\* durante 1 hora a temperatura ambiente y a oscuras.
12. Lavar las células 5 min con PBS 1x hasta un total de tres veces.
13. Opcionalmente se pueden teñir los núcleos usando Hoechst.
14. Montar las células con *SlowFade™ antifade kit* y mantenerlas a 4°C y a oscuras hasta el momento de visualizarlas en el microscopio.

\*Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se han diluido en la solución de bloqueo. Mirar las concentraciones de trabajo en la tabla 11.

## 11. ENSAYO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

Las interacciones proteína-proteína se dan en una gran variedad de procesos biológicos como la replicación, la transcripción, la secreción, la transducción de señales y el metabolismo.

Por este motivo se han desarrollado una gran variedad de aproximaciones metodológicas para determinar la interacción entre dos o más proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*. En este trabajo se han utilizado principalmente tres tipos de ensayo, doble híbrido en levadura, *pull-down* y co-inmunoprecipitación en extractos celulares.

### 11.1. ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA

A pesar de existir diferentes metodologías para detectar la interacción entre dos proteínas, el sistema de doble híbrido en levadura permite la rápida identificación de proteínas que interaccionan con una proteína dada en un sistema *in vivo*. En este trabajo experimental se ha utilizado este ensayo para identificar proteínas capaces de interaccionar con ciclofilina A, ciclofilina B y FKBP12. Hemos utilizado el sistema *Matchmaker™ Two-Hybrid Library Construction & Screening Kit* de *clontech*. Este sistema se basa en la capacidad de separar, un activador transcripcional en dos dominios independientes, el dominio de unión a DNA (BD) y el dominio de activación transcripcional (AD). En este sistema se generan híbridos del BD de la proteína GAL4 de levadura con la proteína problema o *bait* (X), y híbridos de la AD de GAL4 con las proteínas de una librería (Y). Ninguno de estos híbridos es capaz por sí solo de iniciar la transcripción de los genes reporteros en levadura en ausencia de interacción con otra proteína híbrida. Cuando la proteína X se expresa en levadura, el BD de GAL4 se une a la región reguladora del gen reportero, pero en esta unión no es suficiente para activar la transcripción. Cuando la proteína Y se expresa en levadura, el AD de GAL4 puede unirse a otros componentes de la maquinaria de la transcripción, pero como no se localiza en la región reguladora tampoco puede activar la transcripción del gen reportero. En cambio, cuando hay una interacción específica entre X y Y, tanto el BD y el AD de GAL4 se localizan en la región reguladora permitiendo la transcripción de los genes reporteros. En el sistema *Matchmaker™ Two-Hybrid* los genes reporteros son ADE2, HIS3, and MEL1.

#### 11.1.1. Transformación de levaduras competentes

Las levaduras de igual forma que las bacterias pueden incorporar DNA exógeno mediante el proceso conocido como transformación. Para transformar las levaduras hemos seguido el protocolo de la casa comercial (Clontech).

**Reactivos**

- Medio YPDA\*
- Medio SD libre de adenina, histidina, leucina y triptófano
- Placas de medio SD libre de adenina, histidina, leucina y triptófano
- Medio DO\*
- Tampón TE 1x\*
- Acetato de litio (LiAc) 10x\*
- PEG3350 50%
- DMSO 100%
- DNA de esperma de salmón 10 mg/ml
- \*(miraranexo)

**Procedimiento**

1. Inocular 1 ml of YPDA con dos o tres colonias de la cepa de levadura AH109 conservada en glicerol a -80° que ha sido posteriormente sembrada en placas de YPDA, crecer *o/n* a 30°C en agitación.
2. Transferir las células a un erlenmeyer que contiene 50 ml de YPDA.
3. Incubar a 30°C durante 16-18h en agitación (250 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria ( $OD_{600} > 1.5$ ).
4. Transferir cultivo suficiente en 300 ml de YPDA (suficiente para producir  $OD_{600} = 0.2-0.3$ ).
5. Incubar a 30°C durante 3 h con agitación (230-270 rpm). La  $OD_{600}$  tiene que estar 0.1 y 0.5.
6. Poner las células en tubos de 50 ml y centrifugar a 1000 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Deshacerse del sobrenadante y resuspender el pellet celular vortexando en 50 ml de TE o agua.
8. Centrifugar las células a 1000 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
9. Deshacerse del sobrenadante.
10. Resuspender el pellet celular en 1.5 ml de 1xTE/LiAc recién preparado.
11. Preparar 10 ml de solución PEG/LiAc.
12. Añadir a un tubo, 60 µg de DNA-BD/bait, 30 µg de AD/library, 2 mg DNA de esperma de salmón 10 mg/ml.
13. Añadir 1 ml de células competentes de levadura y mezclar bien.
14. Añadir 6 ml de solución PEG/LiAc y vortexar a alta velocidad.
15. Incubar a 30°C durante 30 min con agitación (200 rpm).

16. Añadir 700 µl de DMSO y mezclar por inversión con cuidado.
17. Choque térmico durante 15 min a 42°C en un baño.
18. Enfriar las células en hielo durante 1-2 min.
19. Centrifugar las células a temperatura ambiente durante 5 min a 1000 x g.
20. Quitar el sobrenadante.
21. Resuspender las células en 1 ml de 1xTE.
22. Sembrar transformaciones en placas con medio selectivo -Leu y -Trp para los controles y medio selectivo -Ade/-His/-Leu/-Trp para la interacción. Dejar crecer a 30°C durante 4 o 5 días.
23. Una vez obtenemos colonias, aislamos el DNA para posteriormente secuenciar e identificar el nombre del cDNA de la proteína que ha interactuado con nuestra proteína cebo.

## 11.2. ENSAYO DE *PULL-DOWN*

Esta técnica se ha utilizado para confirmar la interacción de las proteínas que hemos obtenido en el ensayo de doble híbrido. En primer lugar ha sido necesario la expresión y purificación de las proteínas recombinantes GST-hCypA, GST-hCypB, GST-FKBP12 utilizando un sistema de expresión procariota. El *pull-down* con GST-hCypA, GST-hCypB, GST-FKBP12 se ha realizado en extractos de células previamente transfectadas con los vectores de expresión para las proteínas obtenidas en los ensayos de doble híbrido.

### 11.2.1. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS GST-hCypA, GST-hCypB, GST-FKBP12

La expresión de una proteína recombinante en un sistema procariota permite la sobreexpresión y también la fácil purificación de grandes cantidades de la proteína de interés. Para la expresión de las proteínas hCypA, hCypB, FKBP12 se ha escogido el sistema pGEX de la casa *Amherham*. Estos plásmidos ofrecen el método más eficiente para purificar proteínas de fusión con GST. Las proteínas de fusión con GST fueron construidas por inserción de un gen en la zona de clonaje múltiple del vector pGEX-6P-1. La expresión de estos vectores está bajo el control del promotor *tac*, este promotor es inducido por el análogo de la lactosa isopropyl β-D

thiogalactoside (IPTG). Todos los vectores están contruidos con un gen interno *lacI<sup>q</sup>*. El producto del gen *lacI<sup>q</sup>* es una proteína represora que se une a la región operadora del promotor *tac*, previniendo así la expresión hasta que se haya inducido con IPTG, todo esto mantiene un control sobre la expresión del inserto.

### Reactivos

- Bulk Glutathione Sepharose 4B preparada al 50%
- PBS 1x
- Medio 2x YTA
- IPTG 100mM
- Tampón de elución Tris-HCl 50mM, glutathione reducido 10mM, pH 8

### Procedimiento

1. Trasformar por choque térmico 1  $\mu$ l del plásmido pGEX-proteína cebo en 100  $\mu$ l de la cepa BL21 (DE3)pLys competente.
2. Sembrar todo el volumen de la transformación en una placa LB + Ampicilina a 50 $\mu$ g/ml e incubar a 37°C.
3. Crecer *o/n* a 225 rpm y a 37°C 4 colonias aisladas en 4 ml de LB + Amp cada una de ellas.
4. Inocular 500 ml de LB +Amp con los 16 ml de cultivo *o/n* y crecer a 37°C y 225 rpm hasta que el cultivo alcance una OD<sub>600</sub> de 0,6-0,8.
5. Inducir la expresión de la proteína recombinante añadiendo IPTG al cultivo a una concentración final de 1 mM. Crecer durante unas 5 horas más.
6. Centrifugar el cultivo a 7700 x g durante 10 min a 4°C para sedimentar las células.
7. Deshacerse del sobrenadante y coloca las células en hielo.
8. Resuspender el pellet celular añadiendo 50  $\mu$ l de PBS 1x por cada ml de cultivo.
9. Sonicar el pellet celular con pequeños golpes.
10. Añadir 20% Triton X-100 hasta conseguir una concentración final de 1%. Mezclar suavemente durante 30 min para solubilizar la proteína de fusión.
11. Centrifugar a 12000 x g durante 10 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
12. Conservar a 4 °C, seguir con el protocolo de purificación.

### 11.3. PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Las proteínas de fusión a GST son purificadas de lisados de bacterianos mediante cromatografía de afinidad, inmovilizando glutathione a una matriz de sefarosa. Cuando añadimos el lisado bacteriano a esta matriz, la proteína de fusión se une a su ligando, mediante lavados se remueven todas las impurezas. Finalmente se recupera la proteína eluyéndola en glutathione reducido. Para ello hemos utilizado columnas de la casa Amhersham GSTrap FF 1 ml.

#### *Reactivos*

- Tampón de unión PBS 1 x
- Tampón de elución 50 mM Tris-HCl 10mM glutathione reducido, pH 8

#### *Procedimiento*

1. Rellenar una jeringuilla con tampón de unión.
2. Conectar la columna a la jeringuilla usando el adaptador. Evitar introducir aire en la columna.
3. Sacar el tapón de la columna.
4. Equilibrar la columna con 5 volúmenes de tampón de unión.
5. Añadir la muestra que estaba conservada a 4°C usando la jeringuilla. Mantener el flujo a 0,2-1 ml/min.
6. Lavar la columna con 5-10 volúmenes de tampón de unión. Mantener el caudal a 1-2 ml/min.
7. Eluir la proteína de fusión con 5-10 volúmenes de tampón de elución. Mantener el mismo caudal que en el paso 6.
8. Recoger el eluido y testar la presencia de la proteína, tanto de los eluidos como del resto de los pasos previos, por SDS-PAGE.

### 11.4. ENSAYO PULL-DOWN

**Reactivos**

- Tampón de lisis RIPA
- Tampón de elución 50 mM Tris-HCl 10mM glutathione reducido, pH 8.0
- Bulk Glutathione Sepharose 4B preparada al 50%

**Procedimiento**

1. Preaclerar el lisado celular. Incubar el lisado celular con 50  $\mu$ l de glutathione sepharose al 50 % y 25  $\mu$ g de GST durante 2 horas a 4°C en un agitador orbital.
2. Centrifugar la mezcla a máxima velocidad durante 2 min a 4°C.
3. Preparar dos tubos, cada uno de ellos conteniendo la misma cantidad del lisado preaclerado y 50  $\mu$ l de Glutathione Sepharose.
4. A 1 tubo añadirle 10  $\mu$ g de proteína GST, y al otro 10  $\mu$ g de proteína fusionada a GST.
5. Incubar los tubos durante 2 horas a 4°C en un rotor, y centrifugar las muestras a velocidad máxima durante 2 min.
6. Guardar los sobrenadantes a 4°C en nuevos tubos. Estos tubos se analizarán posteriormente por SDS-PAGE.
7. Lavar las bolas de sefarosa cuatro veces con 1 ml de tampón de lisis frio. Centrifugar los tubos a velocidad máxima durante 1 min y descartar el sobrenadante.
8. Analizar las bolas de sefarosa por SDS-PAGE.
9. Finalmente comprobamos el resultado por *western-blot*.

**12. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS****NA<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa**

Para los ensayos de actividad utilizamos la línea celular HK-2. Estas células fueron sembradas a confluencia y tratadas en placas de 10 cm. El método de lisis fue el mismo descrito en la sección de materiales 6.1.1., aunque esta vez el pellet celular obtenido después de una primera centrifugación fue pasado de nuevo por una jeringa de 21G x 20 en hielo 5 veces y centrifugado 30 min a 4°. El sobrenadante obtenido fue utilizado para el ensayo de actividad Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa

### ***Reactivos***

- Tampón de incubación: Tris-base 50mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, EDTA 5mM, KCl 90 mM, pH 7,6
- Tampón de incubación + Ouabaina 0,7 mM
- Tampón de incubación + p-nitrofenilfosfato 12mM
- Tampón de incubación + Ouabaina + p-nitrofenilfosfato 12 mM
- Acido tricloroacético 30%

### ***Procedimiento***

1. Preparar dos series de eppendorfs. Unos serán para la valoración total, los otros para la valoración con ouabaina.
2. Preincubar 50µl de la muestra (una concentración aproximada de 1mg/ml) a 37°C durante 30 min y agitación con 0,5 ml de tampón total. Hacer lo mismo pero con el tampón total que contiene ouabaina. (se deberían hacer triplicados).
3. Añadir 0,5 ml p-nitrofenilfosfato 12mM +- ouabaina a su tubo correspondiente (se debería añadir con intervalos de 10 sec).
4. Una vez añadido incubar la reacción 30 min a 37°C y con agitación.
5. Parar la reacción añadiendo acido tricloroacético a 30%.
6. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 min.
7. Recuperar el sobrenadante de los tubos y trasladarlo a otro tubo.
8. Añadir 2 ml de Tris-base 1 M a cada tubo.
9. Leer en el espectrofotómetro a 410nm.
10. Los cálculos se muestran en el apartado de resultados.

### 13. BLUE NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

*Blue Native* es un método efectivo para subfraccionar las proteínas mitocondriales en sus complejos nativos. La electroforesis se realiza en geles en gradiente de poliacrilamida en una o dos dimensiones. Se puede utilizar para detectar alteraciones en los complejos mitocondriales ya puede ser por mutaciones en sus subunidades, mutaciones en factores de ensamblaje o depleción mitocondrial. Este tipo de análisis se puede llevar a cabo en muestras de biopsias, plaquetas y fibroblastos de pacientes con enfermedades mitocondriales.

#### *Reactivos*

- Tampón Gel I (BN): ácido aminocaproico 1,5M, Bis-Tris 150mM, pH 7
- Tampón cátodo A: Bis-Tris 15mM, Tricina 50mM, Serva Blue G-250 0.02%, pH 7
- Tampón cátodo B: Bis-Tris 15mM, Tricina 50mM, pH 7
- Tampón ánodo: Bis-Tris 50mM, pH 7
- Acrilamida/Bis: solución al 40% 29:1 (3,3% C)
- Tampón de muestra: ácido aminocaproico 750nM, Tricina 50mM, EDTA 0,5mM, Serva Blue G-250 0,02%, pH 7
- Bis-Tris 500mM
- Ácido aminocaproico 2M
- Persulfato de amonio 10%
- TEMED
- Digitonina 4mg/ml
- Lauryl/maltosida/n-Dodecyl  $\beta$ -D-maltosida 10%
- AC/BT: ácido aminocaproico 2M: Tampón Gel I (BN) (1:1)
- PBS
- Agua Bidestilada

#### 13.1. Preparación geles Blue Native

1. Para 5 geles de BN-PAGE, preparar 30 ml de cada solución de acrilamida necesaria para formar un gradiente del 4-15% y mantener en frío.

2. Lavar el formador de gradiente y rellenar el tubo con agua bi-distilada.
3. Remover el agua del sandwich gel.
4. Insertar la aguja del formador de gradiente en el sandwich.
5. Añadir APS y TEMED a la solución de los geles.
6. Cerrar la conexión entre los compartimentos del formador de gradientes.
7. Rellenar un compartimento con 25 ml de solución al 4% y el otro con 23 ml de solución al 15% de poliacrilamida.
8. Encender el mezclador para que la mosca empiece a girar dentro del formador de gradiente.
9. Abrir la conexión entre ambos compartimentos y rellenar el sandwich con la solución.
10. Dejar los geles que se polimericen.
11. En caso de guardar los geles rellenar con agua y cubrir con plástico, la solución del gel concentrador se añadirá el día que vayamos a resolver los geles con las muestras.

**TABLA 10.** Volúmenes necesarios para la preparación de geles para *blue-native*.

Gel Separador		
Componentes	Porcentaje de acrilamida	
	4%	15%
40% acril/bis	3 ml	11,25 ml
3xGel Buffer I (BN)	10 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O	17 ml	x ml
10% PA	0,18 ml	0,105 ml
TEMED	0,018 ml	0,01 ml

**Procedimiento**

1. Crecer células en placa P10 hasta una confluencia del 90%.

Gel Concentrador (4%)	
Componentes	Cantidad
40% acril/bis	0,50 ml
3xGel Buffer (BN)	1,67 ml
H <sub>2</sub> O	2,83 ml
10% PA	0,055 ml
TEMED	0,0055 ml

2. Lavar las células dos veces con

- PBS 1X a temperatura ambiente para remover el medio.
3. Tripsinizar las células. Añadir 9 ml de medio a las células para inhibir la tripsina y centrifugar para recuperar el pellet celular.
  4. Lavar dos veces con PBS 1X mediante resuspensión.
  5. Resuspender las células en 100  $\mu$ l de pBS frío y transferir las células a un tubo a 4°C.
  6. Añadir 100  $\mu$ l de Digitonina (4mg/ml en PBS).
  7. Vortexar e incubar en hielo durante 10 min.
  8. Diluir la digitonina añadiendo 1 ml de PBS frío y centrifugar a 10000 g durante 10 min a 4°C.
  9. Aspirar el sobrenadante y lavar el pellet mitocondrial dos veces con PBS frío.
  10. Guardar los pellets mitocondriales a -80°C. El siguiente paso será la solubilización de proteínas mitocondriales para BN-PAGE.
  11. Resuspender el pellet mitocondrial en 100  $\mu$ l de AC/BT.
  12. Añadir 20  $\mu$ l de Laurylmalosido al 10% y solubiliza las proteínas mitocondriales vortexando e incubando durante 5 min. Centrifugar durante 30 min a 10000 x g a 4°C.
  13. Transferir la suspensión mitocondrial a un nuevo eppendorf. Usar 10 $\mu$ l para cuantificar la proteína con el kit *Pierce Micro BCA Protein Assay*.
  14. Añadir 10  $\mu$ l de tampón de muestra Blue Native a la suspensión mitocondrial a 4°C.
  15. Cargar los pocillos del gel con las muestras lo antes posible (50-100 $\mu$ g/pocillo).
  16. Resolver el gel a 30 V durante 30 min para el *stacking*.
  17. Resolver el gel a 80 V durante 90 min para la separación + la tinción. Cambiar el tampón cátodo A por B después de que el gel se haya resuelto por la mitad.
  18. Seguir resolviendo el gel a 80 V durante 60 min pero con el tampón de cátodo sin tinte.
  19. Transferir el gel para ver resultado por *Western-Blot* o para realizar los ensayos enzimáticos en gel.

## 14. ENSAYOS ENZIMÁTICOS EN GEL:

#### 14.1. COMPLEJO I CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

##### *Reactivos y Procedimiento*

- Tris-HCl 2mM, pH 7.4.
- NADH 0,1 mg/ml.
- NTB (NitroTetrazolium Blue) 2mg/ml.
- Incubar la fracción del gel que pertenece al complejo I con los reactivos indicados anteriormente.
- Después de 2 horas de incubación, se debería empezar a observar el resultado de la reacción.
- Escanear el gel.

#### 14.2. COMPLEJO IV CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

##### *Reactivos y procedimiento*

1. 3,3'-diamidobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 5mg disuelto en 9 ml de tampón de fosfato (0,05 M, pH 7,4).
2. Catalasa 1nM (20 µg/ml).
3. Citocromo C 10 mg.
4. Sucrosa 750 mg.
5. Incubar la fracción del gel que pertenece al complejo IV con los reactivos indicados anteriormente.
6. Después de 1 día se debería empezar a observar el resultado de la reacción.
7. Escanear el gel.

#### 14.3. COMPLEJO V CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

##### *Reactivos y procedimiento*

1. Tris 35 mM. pH 7,8
2. Glicina 270 mM.
3. MgSO<sub>4</sub> 14 mM.
4. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,2 %.
5. ATP 8 mM.
6. Incubar la fracción del gel que pertenece al complejo V con los reactivos indicados anteriormente.
7. Después de 1 día se debería empezar a observar el resultado de la reacción.
8. Escanear el gel.

**T<sub>ABLA</sub> 11.** Anticuerpos empleados en la inmunodetección para WB.

Anticuerpo	Origen	Proveedor / Referencia	CONDICIONES DE WESTERN		
			Concentración	Tiempo de Incubación	
PRIMARIO	Anti-HA	rata	ROCHE 1 867 423	1 µg/ml	1 h
	Anti-CI-39	ratón	MOLECULAR PROBES A21344	0,5 µg/ml	1 h
	Anti-CII-70	ratón	MOLECULAR PROBES A11142	0,1 µg/ml	1 h
	Anti-CIII-CoreII	ratón	MOLECULAR PROBES A11143	0,4 µg/ml	1 h
	Anti-CIV-Va	ratón	MOLECULAR PROBES A21363	2 µg/ml	1 h
	Anti-CV-α	ratón	MOLECULAR PROBES A21350	0,5 µg/ml	1 h
	Anti-CypB	conejo	AFFINITY BIOREAGENTS PA1-027	1 µg/ml	1 h
	Anti-Na/K	conejo	Santa Cruz Sc-25709	1:200	1 h
	Anti-actina	conejo	SIGMA A-5060	1:1000	1 h
	Anti-CypB	cabra	Santa Cruz Sc-20361 <sub>21</sub>	1:200	1 h

	Anti-CypA	conejo	UPSTATE BIOTECHNOLOGY 12-301	1:2000	1 h
SECUNDARIO	Anti-mouse	conejo	DAKO PO260	1:2000	1 h
	Anti-mouse	cabra	MOLECULAR PROBES G21040	1:2000	1 h
	Anti-rabbit	cabra	DAKO P0048	1:5000	1 h
	Anti-rabbit TRITC	cabra	SIGMA T 5268	1:300	1h
	Anti-goat FITC	conejo	SIGMA F 7367	1:300	1 h

## ANEXO: COMPOSICIÓN DE TAMPONES Y MEDIOS

TABLA 12. Tampones y medios.

TAMPONES GENERALES			
NOMBRE	COMPOSICIÓN		COMENTARIOS
PBS 1x	NaCl	137 mM	Autoclavar
	KCl	2,5 mM	
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM	
TE 1x	Tris HCl pH 8	10 mM	Autoclavar
	EDTA	1 mM	
TAE 1x	Tris base	40 mM	Ajustar el pH a 8,1 Autoclavar
	Ácido acético	2 mM	
	EDTA	0,2 mM	
TBE 1x	Tris base	89 mM	Autoclavar
	Ácido bórico	89 mM	
	EDTA	2 mM	
H <sub>2</sub> O-DEPC	DEPC	0,1 % (v/v)	Agitar intensamente y dejar actuar <i>o/n.</i> Autoclavar para inactivar el DEPC
Solución D	Tiocianat de Guanidina	4M	Preparar en H <sub>2</sub> O-DEPC. Guardar a 4°C; antes de utilizar añadir β-Mercaptoetanol fresco (7,2 µl / ml solución D)
	Citrato sódico, pH 7,0	25 mM	
		0,5 % (v/v)	
	N-Lauril		

	Sarcosina		
<b>TAMPONES PARA SDS-PAGE Y WESTERN BLOT</b>			
NOMBRE	COMPOSICIÓN	COMENTARIOS	
TRIS-HCl 4x pH 6,8	Tris- HCl pH 6,8 SDS	0,5 M 0,4 % (w/v)	Filtrar el Tris-HCl con filtro 0,45 µm antes de añadir SDS. Conservar a 4°C
TRIS-HCl 4x pH 8,8	Tris- HCl pH 8,8 SDS	1,5 M 0,4 % (w/v)	Filtrar el Tris-HCl con filtro 0,45 µm antes de añadir SDS. Conservar a 4°C
TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 5 X	Tris base Glicina SDS	125 mM 0,96 M 0,5 % (w/v)	Conservar a 4°C
TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 3 X	Tris base Glicina SDS	172 mM 1,32 M 11,8 mM	Conservar a 4°C
AZUL DE COOMASSIE	Metanol Ácido acético Azul de Coomassie	40 % (v/v) 7 % (v/v) 0,025 % (w/v)	Conservar a RT
TAMPÓN LAEMMLI	Tris- HCl pH 6,8 Glicerol SDS β-	188 mM 30 % (v/v)	Conservar a RT

	Mercaptoetanol	6 % (v/v)	
	Azul de bromofenol	15 % (v/v)	
		0,02 % (w/v)	
<b>MEDIOS PARA BACTERIAS</b>			
NOMBRE	COMPOSICIÓN		COMENTARIOS
MEDIO LB (1LITRO)	Triptona [D <sub>IFCO</sub> ] Extracto de levadura NaCl	10 g 10 g 5 g	Ajustar el pH a 7,5 con NaOH y autoclavar
LB AGAR (1LITRO)	Medio LB pH 7,5 Agar	1 l 15 g	Autoclavar. Dejar enfriar hasta ~50 °C y añadir, si procede, el antibiótico de selección. Distribuir en placas y dejar solidificar. Conservar a 4 °C
AMPICILINA	Ampicilina [G <sub>IBCO</sub> ]	50 mg/ml	Diluir la Amp en H <sub>2</sub> O <i>mili-Q</i> estéril. Alicuotar y conservar a -20°C
KANAMICINA	Kanamicina [S <sub>IGMA</sub> ]	100 mg/ml	Diluir la kan en H <sub>2</sub> O <i>mili-Q</i> estéril. Conservar a -20°C



RESULTADOS  
RESULTADOS

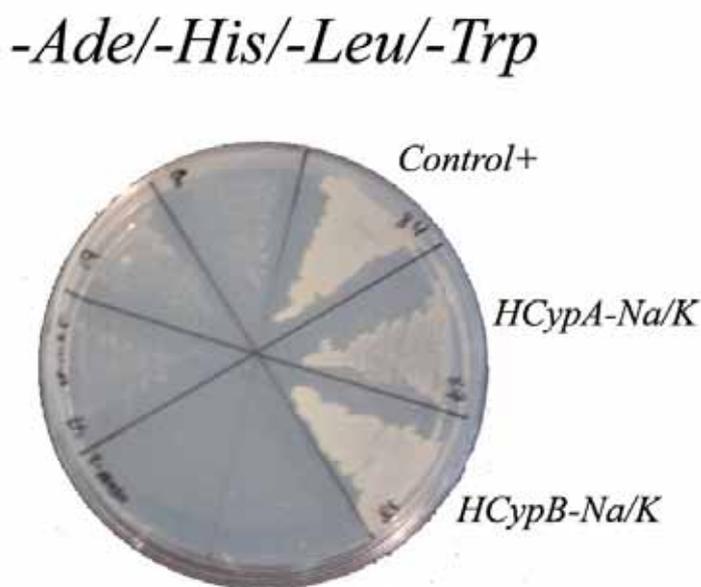




## 1. INTERACCIONES PARA CypA, CypB Y FKBP12 MEDIANTE ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO

Toda proteína ejerce su función a través de interacciones con otras moléculas. La interacción específica de una proteína de función desconocida con otra de función conocida proporciona una evidencia inequívoca de la participación de la primera en la ruta conocida, aunque inicialmente no se deduzca en qué sentido se ejerce esta participación. Una de las técnicas más idóneas para determinar interacciones en casos como éste es la técnica del doble híbrido en levadura (Fields and Song, 1989; Daniel and Reynolds, 1995). Hemos aplicado este sistema con el fin de identificar interacciones moleculares con CypA, CypB y FKBP12. Para ello, utilizamos una librería de cDNA de riñón humano clonada en el vector pADT7 (*Pretansformed Human Kidney Matchmaker cDNA Library, clontech, 638834*). Primeramente, amplificamos el cDNA de cada inmunofilina mediante RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*). El RNA utilizado provenía de biopsias de riñón humano y fue cedido amablemente por la Dra. Maya Vila. El siguiente paso fue la ligación de cada cDNA en el vector de expresión de levadura pGBKT7. Simultáneamente, preparamos un escalado de nuestra librería de riñón humano. Una vez tuvimos ambos DNAs preparados (pGBKT7-proteína cebo, pADT7-cDNA-librería), cotransformamos los vectores en células de levadura pertenecientes a la cepa AH109 que, como ya se ha detallado en materiales y métodos, contiene tres marcadores de selección que reducen la posibilidad de falsos positivos. Después de la cotransformación, las células de levadura fueron cultivadas en diferentes placas. Como controles positivos de transformación se utilizaron dos placas que contenían medios selectivos, uno deficiente en leucina y el otro deficiente en triptófano. Las placas donde se ensayaron las interacciones en cambio, eran deficientes en adenina, histidina, leucina y triptófano. Cualquier colonia que encontrásemos en estas placas sería un clon positivo en el que el dominio de activación y el dominio de unión de la GAL4 habrían entrado en contacto. Uno de los problemas que esta técnica tiene, es que muchas veces aparecen falsos positivos. Para evitar que esto suceda se crecen los clones obtenidos en placas que son deficientes para los aminoácidos antes mencionados con diferentes concentraciones de aminotriazol (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ). Este compuesto se encarga de eliminar la expresión basal de la histidina reduciendo los falsos clones positivos. En nuestro caso solamente elegimos los clones que habían crecido a una concentración de aminotriazol 10  $\mu\text{M}$ .

Los ensayos de doble híbrido fueron repetidos tres veces para cada inmunofilina. Después de hacer una selección rigurosa con aminotriazol obtuvimos 5 clones para CypA, 3 clones para CypB y 12 clones para FKBP12. En la figura 30 se muestra el resultado de uno de los clones que presentaban interacción con CypA y CypB.



**Figura 30. Imagen de un clon positivo resultante tras la cotransformación en la cepa de levadura AH109.** Placa deficiente en adenina, histidina, leucina y triptófano. El control + pertenece a la interacción ya conocida entre SV40T y p53). HCypA-Na/K y HCypB-Na/K corresponde a la nueva interacción encontrada entre cada una de las ciclofilinas y la subunidad beta de la bomba sodio/potasio ATPasa.

Con el fin de aislar los plásmidos portadores de los cDNAs que codifican para proteínas que interaccionan en este ensayo con CypA, CypB y FKBP12, se extrajo el DNA plasmídico de cada clon positivo. La digestión con dos enzimas de restricción permitió conocer el tamaño aproximado de los insertos de cDNA que osciló entre 600 bp y 2 Kb.

El siguiente paso a seguir fue secuenciar los correspondientes insertos y cotejarlos con los bancos de datos de secuencias. Las identidades que obtuvimos están indicadas en las siguientes tablas.

### 1.1. Identificación de las interacciones con Ciclofilina A

**Tabla 13. Interacciones con CypA.**

CLON (INTERACCION CypA)	CARACTERISTICAS	NUMERO DE ACESO
Subunidad $\beta$ de la bomba Na/Ktransporting beta 1 polypeptide (ATPIBI)	Gen que codifica para la subunidad beta de la bomba de Na/K.	BC000006
Aldolase B (fructose-biphosphate (ALDOB))	Gen que codifica el enzima glicolitico fructosa-1,6-bifosfato aldolasa.	NM_000035
Histone-deacetylase (HDAC2)	Gen que pertenece a la familia de las histonas deacetilasas.	NM_001527
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Gen codifica a un miembro de la familia de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.	NM_004563
Protein S	Gen que codifica para la proteína S.	NM_000313

En la tabla 13 se puede observar los nombres de las diferentes proteínas que interaccionaban con CypA en ingles tal y como se encuentran en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) juntamente con su número de acceso.

Las cinco proteínas de interacción con CypA identificadas en este ensayo tienen una elevada relevancia. En primer lugar, encontramos que aldolasa B es un enzima glicolítico tetramérico que cataliza la conversión reversible de la fructosa-1, 6-bifosfato a gliceraldehido 3-fosfato y a dihidroxiacetonafofato. Esta proteína se encuentra únicamente expresada en riñón y hígado donde ejerce una función sumamente importante dado que defectos en su estructura causan intolerancia hereditaria a la fructosa.

Otra de las proteínas que obtuvimos en estos ensayos fue la histona deacetilasa 2. Es uno de los componentes de una gran familia integrada por moléculas que actúan formando grandes complejos multiproteicos y son responsables de la deacetilación de residuos de lisina en la región N-terminal del núcleo de las histonas (H2A, H2B, H3, y H4). HDAC2 se halla también conformando complejos represores transcripcionales en asociación con otras proteínas entre las que destaca YY1 (factor de transcripción *Yin Yang 1*). Por todo ello HDAC2 tiene un importante papel en regulación transcripcional, progresión del ciclo celular y eventos de desarrollo.

Dentro de las interacciones con CypA encontramos también la proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 2 (PCK2). Este enzima presenta una forma mayoritaria mitocondrial que cataliza la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato en presencia de GTP, aunque también se ha descrito una forma citosólica. PCK2 es fundamental en la gluconeogénesis del hígado y esta constitutivamente expresada y no modulada por hormonas como la insulina y glucagon que regulan la forma citosólica.

Una de las proteínas que nos llamo especialmente la atención es la proteína S. Esta glicoproteína plasmática dependiente de la vitamina K es sintetizada en el hígado. Una vez en el torrente sanguíneo se encuentra en dos formas: una libre y otra acomplejada a la proteína C4b, uno de los elementos de la convertasa C5. Su función principal y mejor caracterizada está implicada en la vía de la anticoagulación. La proteína S es un cofactor de la proteína C que inactiva los factores Va y VIIIa y solamente la forma libre tiene actividad de co-factor. Además puede unirse a fosfolípidos negativamente cargados por vía del dominio carboxilado GLA. Esta propiedad le permite su participación en la eliminación de células apoptóticas. La patología más importante relacionada es la deficiencia de proteína S, la cual incrementa el riesgo de trombosis.

**1.2. Identificación de las interacciones con Ciclofilina B**

**Tabla 14. Interacciones con CypB.**

CLON (INTERACCION CypB)	CARACTERISTICAS	NUMERO DE ACCESO
Subunidad β de la bomba Na/Ktransporting beta 1 polypeptide (ATPIBI)	Gen que codifica para la subunidad beta de la bomba de Na/K.	BC000006
ATP synthase subunit B1 (ATP5F1)	Gen que codifica para la subunidad b del canal de protones mitocondrial.	NM_001688
Prostate tumor overexpressed gene 1 (PTOV)	Gen que codifica para la proteína PTOV-1, la cual esta sobreexpresada en cáncer de próstata.	BC015172

En la tabla 14 se pueden observar el nombre de las proteínas que interaccionan con CypB. Entre ellas, la subunidad beta de la bomba de sodio/potasio (Subunidad β de la bomba Na/K) suscitó un especial interés, debido a que su interacción se producía tanto con CypB como CypA. Esta proteína pertenece a la familia Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasas de cadena beta y en

concreto a la subfamilia de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasas. La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es una proteína integrada en la membrana responsable del establecimiento y mantenimiento de los gradientes electroquímicos de iones de Na y K a través ésta. Estos gradientes son esenciales para la osmoregulación, para el transporte de sodio acoplado a moléculas orgánicas e inorgánicas y para la excitabilidad del nervio y del músculo. El enzima está compuesto por dos subunidades, una gran subunidad catalítica (alfa) y una subunidad pequeña glicoproteica (beta). La subunidad beta regula, mediante ensamblaje de heterodimeros de alfa y beta, el numero de bombas de sodio transportados a la membrana plasmática.

Siguiendo con la familia de las ATPasas, la subunidad b de la ATP sintasa mitocondrial fue también otro interactador de la proteína CypB. Las ATP sintasas mitocondriales catalizan la síntesis de ATP, utilizando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial durante la fosforilación oxidativa. Este enzima está compuesto por dos complejos que poseen varias subunidades y que están relacionados entre sí: el complejo F1 que es el núcleo catalítico soluble y el componente de membrana Fo que comprende el canal de protones. La porción catalítica de la ATP sintasa mitocondrial consiste en 5 subunidades diferentes (alfa, beta, gama, delta, y épsilon) ensambladas con una estequiometria de 3 alfas, 3 betas, y un único representante de las tres restantes. El canal de protones posee nueve subunidades (a, b, c, d, e, f, g, F6 y F8). El cDNA que encontramos en los ensayos de doble híbrido codifica la subunidad b del canal de protones (ATP5F1).

La tercera y última proteína que apareció en los ensayos con CypB fue PTOV1, interesante gen sobreexpresado en tumores de próstata. Es una proteína mitogénica que se encuentra entre el núcleo y el citoplasma dependiendo del estadio del ciclo celular. La molécula consiste en dos dominios homólogos organizados en tándem.

Subunidad β de la bomba Subunidad β de la bomba Na/Ky ATP5F1 fueron sometidas a ensayos de pull-down y co-inmunoprecipitación con el fin de confirmar su interacción con CypB, una vez estas proteínas fueron positivamente confirmadas, se llevaron a cabo ensayos funcionales.

**1.3. Identificación de las interacciones con FKBP12**

**Tabla 15. Interacciones con FKBP12.**

CLON INTERACCION (FKBP12)	CARACTERISTICAS	NUMERO DE ACESO
ATPase H <sup>+</sup> transporting lysosomal V1 (ATP6V1E1)	Gen que codifica un componente de la ATPasa vacuolar. Enzima que media la	NM_001039367

	acidificación de órganos intracelulares eucariotas.	
TatD DNase domain containing 1 (TATDN1)	Gen altamente expresado en carcinoma hepático.	NM_032026
Sterol-C5-desaturase (SC5DL)	Gen que codifica un enzima implicado en la biosíntesis de colesterol.	NM_001024956
Pleckstrin homology domain	Gen que estimula el intercambio de nucleótidos guanil mediante GTPasa de la familia Rho.	BC073907
Family with sequence similarity 13 (FAM13A1)	Secuencia similar a RhoGAP (GTPase-activator protein for Rho-like GTPases).	NM_001015045
U-box domain containing 5 (UBOX5)		NM_199415
GATA binding protein 3 (GATA3)	Gen que codifica para el factor de transcripción GATA3.	NM_001002295
Succinate dehydrogenase complex, subunit A flavoprotein (Fp)	Gen que codifica para la subunidad catalítica de succinato-ubiquinona reductasa. Uno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.	BC001380
Inositol polyphosphate-5-phosphatase	Gen que codifica una proteína asociada a la membrana. Esta proteína pertenece al tipo I inositol 1, 4, 5-triphosphate (InsP3) 5-phosphatase.	BC062300
Ferritin	Gen que codifica la subunidad pesada de la ferritina. Es la proteína que se encarga del mayor almacenamiento de hierro en células procariotas y eucariotas.	BC105802
Dimethylglycine dehydrogenase (DMGDH)	Gen que codifica un enzima involucrado en el catabolismo de la colina, catalizando la dimetilación oxidativa de dimetilglicina para formar sarcosina.	NM_013391
PDX1 gene for lipoyl-containing component X	Gen que codifica el componente X del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH).	AJ298105
Parvin alpha (PARVA)	Gen que codifica para la protein PARVA. Pertenece a la familia de las parvinas.	NM_018222
DEAD box polypeptide 17	Gen que codifica para una de las proteínas de	NM_006386

		la familia DEAD box. Son RNA helicasas putativas.	
Aflatoxin B1-aldehyde reductase		Gen que codifica una proteína de la familia de las Aldo-keto reductasas. Estas proteínas están involucradas en la detoxificación de aldehídos y cetonas.	AF040639

De todos los ensayos de doble híbrido realizados con inmunofilinas, FKBP12 fue la proteína con la que aparecieron más interacciones. En la tabla 15 se pueden observar el nombre de los cDNAs identificados. Los resultados obtenidos para esta proteína están pendientes de confirmación debido a que el resto de experimentos que realizamos y que constituyen el cuerpo de este trabajo, fueron llevados a cabo con las proteínas Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/Ky ATP5F1. Trabajos que están siendo llevados a cabo actualmente en nuestro laboratorio van dirigidos a la confirmación de estas interacciones. Entre las interacciones me gustaría destacar y dar un breve resumen de las que nos han parecido más relevantes.

Entre las interacciones encontradas con FKBP12 aparecen PARVA y Ferritina. La primera pertenece a la familia de las parvinas que son proteínas de unión a actina asociadas con contactos focales. La segunda es la mayor proteína de almacenamiento de hierro en procariotas y eucariotas en un estado soluble y no tóxico. La ferritina está compuesta por 24 subunidades de cadena pesada y ligera y la variación en la composición de las subunidades podría afectar los niveles de absorción y liberación de hierro en diferentes tejidos. Defectos en ambas proteínas están asociados con varias enfermedades neurodegenerativas.

Otra de las interacciones con FKBP12 fue Inositol polifosfato-5-fosfatasa la cual ha sido descrita ya anteriormente como interactante de esta inmunofilina, hecho que refuerza la validez de los demás resultados obtenidos en estos ensayos. Esta proteína está asociada a la membrana y es del tipo I inositol 1, 4, 5-trifosfato (InsP3) 5-fosfatasa, integrado por fosfatasa que hidrolizan Ins (1, 4, 5) P3, el cual moviliza calcio intracelular y actúa como un segundo mensajero mediando respuestas celulares a varios estímulos.

También apareció otra proteína mitocondrial, la flavoproteína, subunidad catalítica de la succinato-ubiquinona oxidoreductasa, perteneciente al complejo II de la cadena respiratoria. Este complejo está compuesto por cuatro subunidades localizadas en la membrana interna mitocondrial. Mutaciones aparecidas en este gen han sido asociadas con una forma de deficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial denominada síndrome de Leigh.

La subunidad E1 de la ATPasa de hidrogeno es la ultima proteína que me gustaría destacar. Pertenece a la familia de las ATPasas y se encuentra lisosomas. Se trata de un enzima formado por varias subunidades y está involucrado en la acidificación de procesos intracelulares como pueden ser la “clasificación de proteínas” (*protein sorting*), activación cimógena, endocitosis de receptores, y generación de vesículas de gradiente de protones. El dominio V1 consiste en tres A, tres B, y dos subunidades G, como también de cada una de las siguientes subunidades C, D, E, F, y H. Este dominio contiene la zona catalítica de ATP.

A pesar la unión observada en *Saccharomyces cerevisiae*, los datos de levadura no permiten concluir que las interacciones encontradas sean reales y acontezcan *in vivo*. Para demostrarlas hay que llevar a cabo otros ensayos que nos permitan confirmar los resultados obtenidos previamente en ensayos de doble híbrido. Para ello realizamos ensayos de *pull-down* y Co-inmunoprecipitación. Estos ensayos fueron llevados a cabo para la subunidad beta de sodio/potasio, subunidad b1 de la ATPasa mitocondrial, proteína S, aldolasa B.

El resto de las interacciones y como ya he dicho anteriormente están pendientes de confirmación. El resto de trabajo de esta tesis se centra sobre todo con Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/Ky ATP5F1.

## 2. ENSAYOS DE PULL-DOWN

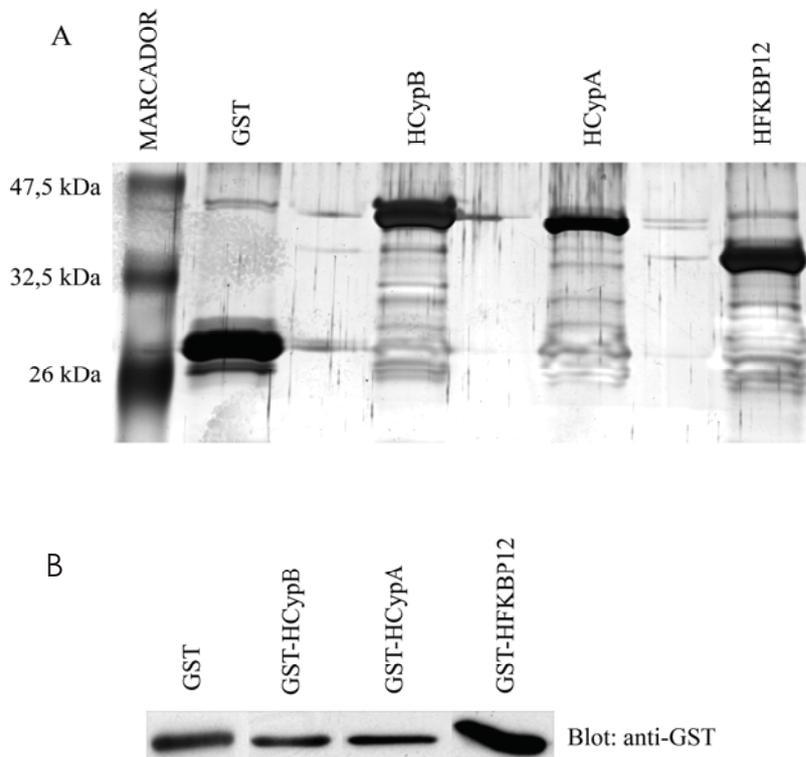
Este ensayo nos permite observar la interacción entre dos proteínas *in vitro* y fue desarrollado sobre las siguientes interacciones:

- CypA-Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K $\beta$
- CypA-Protein S
- CypA-Aldolase B
- CypB-Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K $\beta$
- CypB-ATP5F1

Para llevar a cabo estos experimentos, hicimos la construcción pGEX-CypA, pGEX-CypB, pGEX-FKBP12. El vector pGEX contiene la secuencia codificante para la glutatión S transferasa, que se expresará fusionada a la proteína de interés clonada en el vector, generando

por tanto un *tag* GST. El cDNA de cada inmunofilina fue ligado en el vector pGEX siguiendo los pasos indicados en Materiales y Métodos. Cuando tuvimos todos los constructos, procedimos a expresar en bacteria cada una de estas proteínas recombinantes. Como control para el ensayo expresamos GST sola. La expresión fue satisfactoria permitiéndonos purificar altos niveles de proteína recombinante que luego utilizamos para los ensayos de *pull-down*.

En la figura 31A se muestra la sobreexpresión de cada uno de nuestros constructos y de la GST sola. Para confirmar que la expresión es de la proteína correcta, realizamos un *western-blot* utilizando el anticuerpo anti-GST (ver Materiales y Métodos)(fig. 30B).

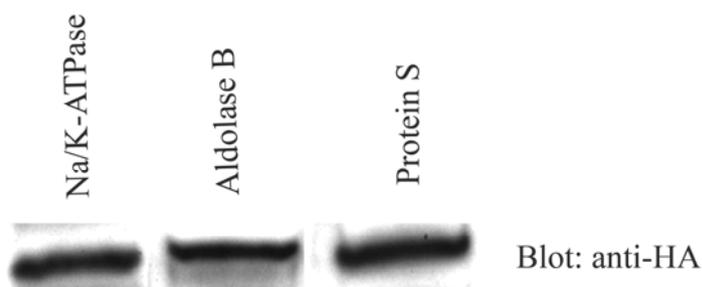


**Figura 31. Expresión de GST y proteínas recombinantes.** A, gel teñido con comassie para observar la expresión de cada uno de los constructos. El peso molecular de las proteínas recombinantes es la suma del peso molecular de GST y el de la inmunofilina correspondiente. B, *Western-Blot* para esos constructos utilizando el anticuerpo anti-GST.

El cDNA correspondiente a cada una de las proteínas que habían mostrado interacción en el ensayo de doble híbrido de las interacciones, fue ligado en un vector de expresión en mamíferos (pCMV-HA) para poder obtener una cantidad suficiente de proteína. Una vez ligado,

transfectamos estos cDNAs en células Cos7, que permiten una alta eficiencia de transfección y son utilizadas habitualmente para expresar proteínas en mamífero. Después de 48 horas lisamos las células transfectadas y analizamos el lisado por *Western-Blot* para comprobar que nuestras células expresaban correctamente la proteína transfectada.

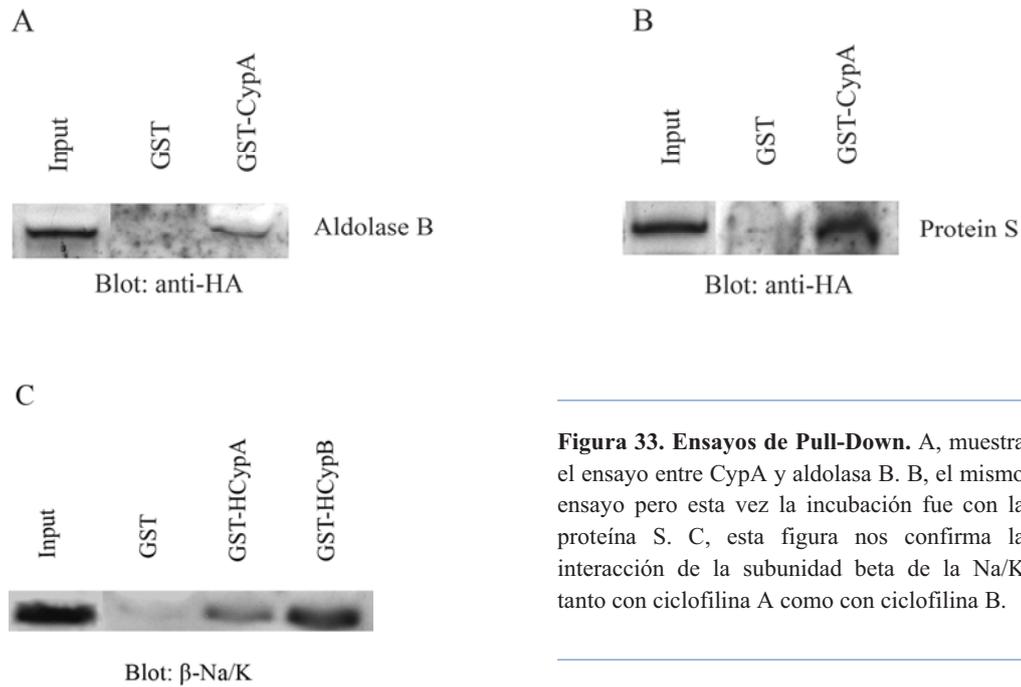
En la figura 32 podemos observar la expresión para la subunidad beta de la bomba Na/K, para aldolasa B y para proteína S en células Cos7 que han sido previamente transfectadas con los constructos pCMV y cada uno de los cDNAs antes indicados.



**Figura 32.** Expresión de la subunidad beta de Na/k, aldolasa B y proteína S en células Cos7. Para ver la expresión de estas tres proteínas utilizamos el anticuerpo anti-HA ya que el vector pCMV-HA contiene este *tag*.

Una vez tuvimos tanto las proteínas cebo como las proteínas expresadas en el sistema celular, realizamos el ensayo de *pull-down in vitro*. Para ello incubamos la proteína cebo (GST-inmunofilina) con cada una de las proteínas que habían sido expresadas en células Cos7. Por otro lado como control incubamos simultáneamente GST con dicha proteína. El resultado fue analizado más tarde por *Western Blot*. En el caso que alguna de las proteínas expresadas presentase interacción con GST (control) no se podría confirmar en consecuencia la interacción con la proteína problema, deduciendo entonces que la proteína aparecida como interactante en los ensayos de doble híbrido presentaría afinidad para cualquier residuo. Este sería el caso por tanto de un falso positivo.

En la figura 33 hallamos la interacción tanto de CypA como de CypB con la subunidad beta de la bomba Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/Ky las interacciones de CypA con aldolasa B y proteína S mediante ensayos de *pull-down*.



**Figura 33. Ensayos de Pull-Down.** A, muestra el ensayo entre CypA y aldolasa B. B, el mismo ensayo pero esta vez la incubación fue con la proteína S. C, esta figura nos confirma la interacción de la subunidad beta de la Na/K tanto con ciclofilina A como con ciclofilina B.

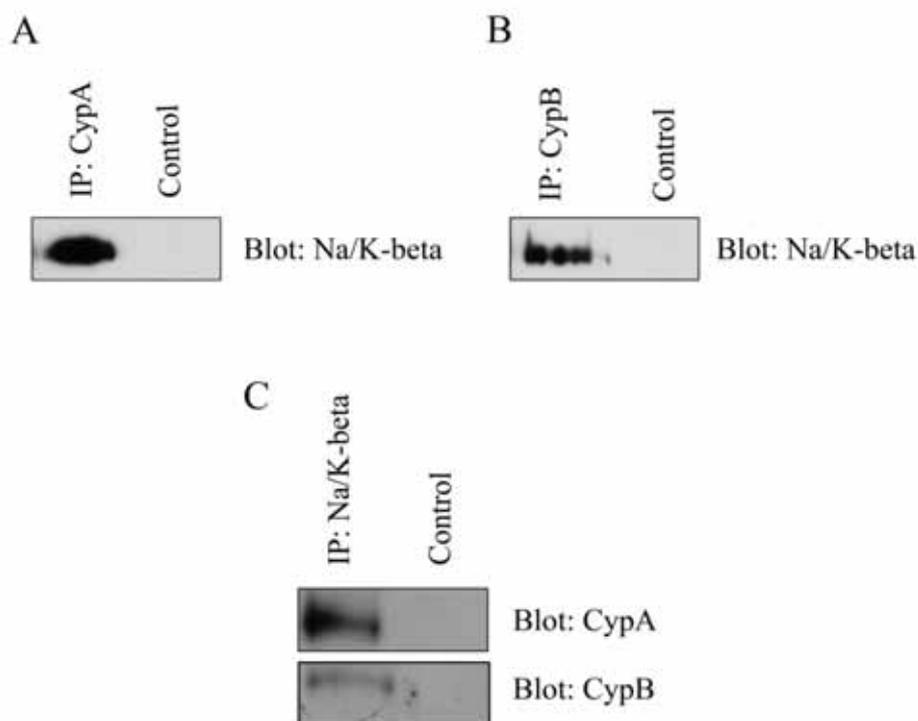
### 3. ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Tras confirmar algunas de las interacciones aparecidas tanto para CypA como CypB y haciendo un repaso de la literatura al respecto, decidimos hacer estudios funcionales de la interacción entre dichas ciclofilinas y la subunidad beta de la bomba Na/K. Aunque ya habíamos confirmado la interacción con los ensayos de *pull-down*, decidimos reconfirmar estas interacciones en experimentos *in vivo* de co-inmunoprecipitación. Este ensayo es el más utilizado para confirmar y detectar interacciones proteína-proteína, especialmente cuando se realiza con proteínas endógenas. Por un lado la técnica de inmunoprecipitación (IP) permite aislar un antígeno de un extracto celular utilizando un anticuerpo específico contra éste. La co-inmunoprecipitación es una variación de la IP y sirve para identificar proteínas que interactúan entre si, como por ejemplo formando dímeros. Al inmunoprecipitar una de las proteínas que forman el dímero (o que interactúan), la que actúa de antígeno arrastra a la otra. Este dímero, una vez unido al anticuerpo específico, se separa mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína G (que se une específicamente a los anticuerpos) acoplada a resina de sefarosa por centrifugación. Finalmente se analiza el resultado mediante un *western-blot*.

Estos ensayos se llevaron a cabo en células HK-2 (ver Materiales). Utilizamos anticuerpos para cada inmunofilina (CypA, CypB) y para la subunidad beta de la bomba sodio/potasio (Na/K). Extractos de proteína celular fueron incubados durante tres horas con bolas de sefarosa recubiertas con proteína G con el fin de eliminar proteínas inespecíficas que se unen a ella (*preclearing*). El sobrenadante obtenido en el paso anterior fue incubado durante

~12 horas a 4°C con el anticuerpo que procediese, y de nuevo con proteína G. El resultado de esta incubación fue analizado finalmente mediante la técnica de *western-blot*.

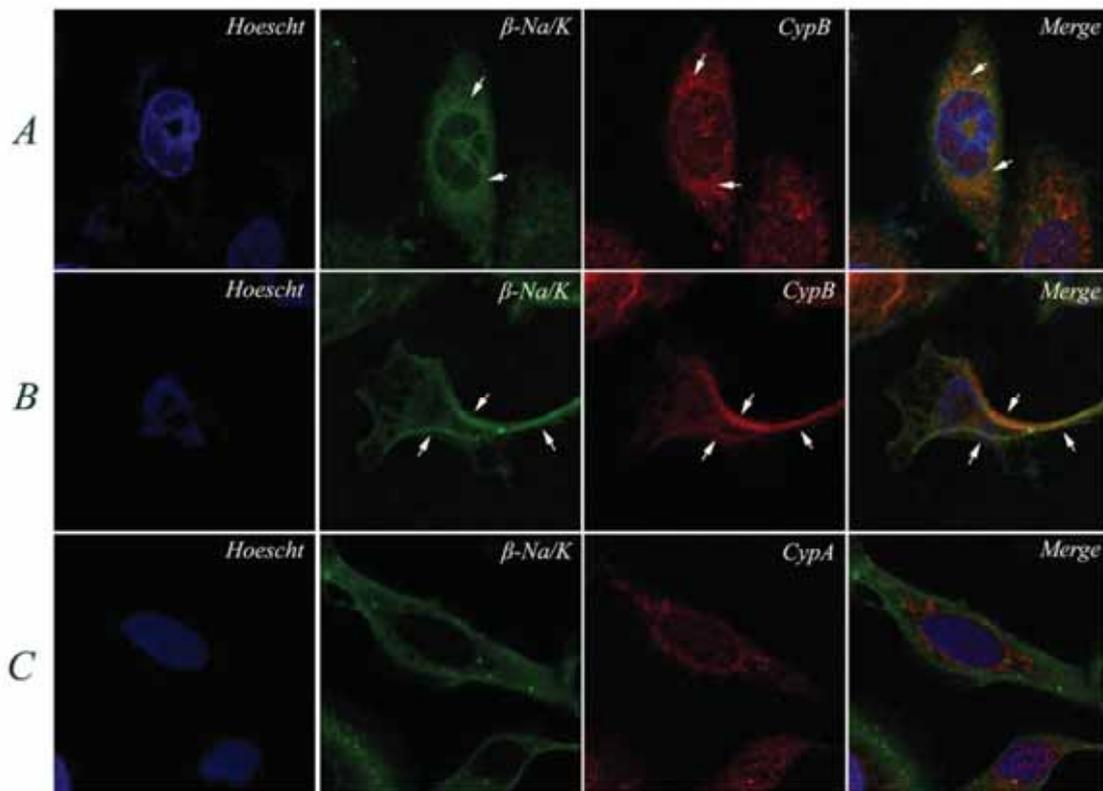
La figura 34 muestra el resultado obtenido en estos ensayos donde se puede observar que tanto CypA como CypB interactúan a nivel endógeno con la subunidad beta de la bomba Na/K.



**Figura 34. Co-inmunoprecipitación.** A, B, interacción entre CypA y CypB con Na/K, usamos anti-CypA y anti-CypB para inmunoprecipitar esta inmunofilina, anti-Na/K- $\beta$  fue utilizado en el *Western-Blot* para ver la interacción. C, en este caso usamos anti- Na/K- $\beta$  para inmunoprecipitar esta proteína, anti-CypA y anti-CypB fue utilizado en el *Western-Blot* para ver las interacciones.

#### 4. CO-LOCALIZACIÓN DE CypB, CypA Y LA SUBUNIDAD $\beta$ DE LA BOMBA Na/K

Para que una interacción sea biológicamente funcional requiere que las proteínas colocalicen en algún lugar de la célula. Después de confirmar la interacción de estas proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*, investigamos por técnicas de doble inmunofluorescencia la localización de CypB, CypA y la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K en células de riñón HK-2. Estas células fueron fijadas por el método de PFA 4 % descrito en Materiales y Métodos. Tras ser fijadas y bloqueadas con BSA 2 % en PBS 1X, incubamos por separado los anticuerpos primarios para cada una de estas dos proteínas durante 1 hora y a temperatura ambiente, seguido por tres lavados con PBS 1X e incubadas de nuevo con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo de espectro de absorción/emisión distinto (TRITC, FITC) (Materiales y Métodos).



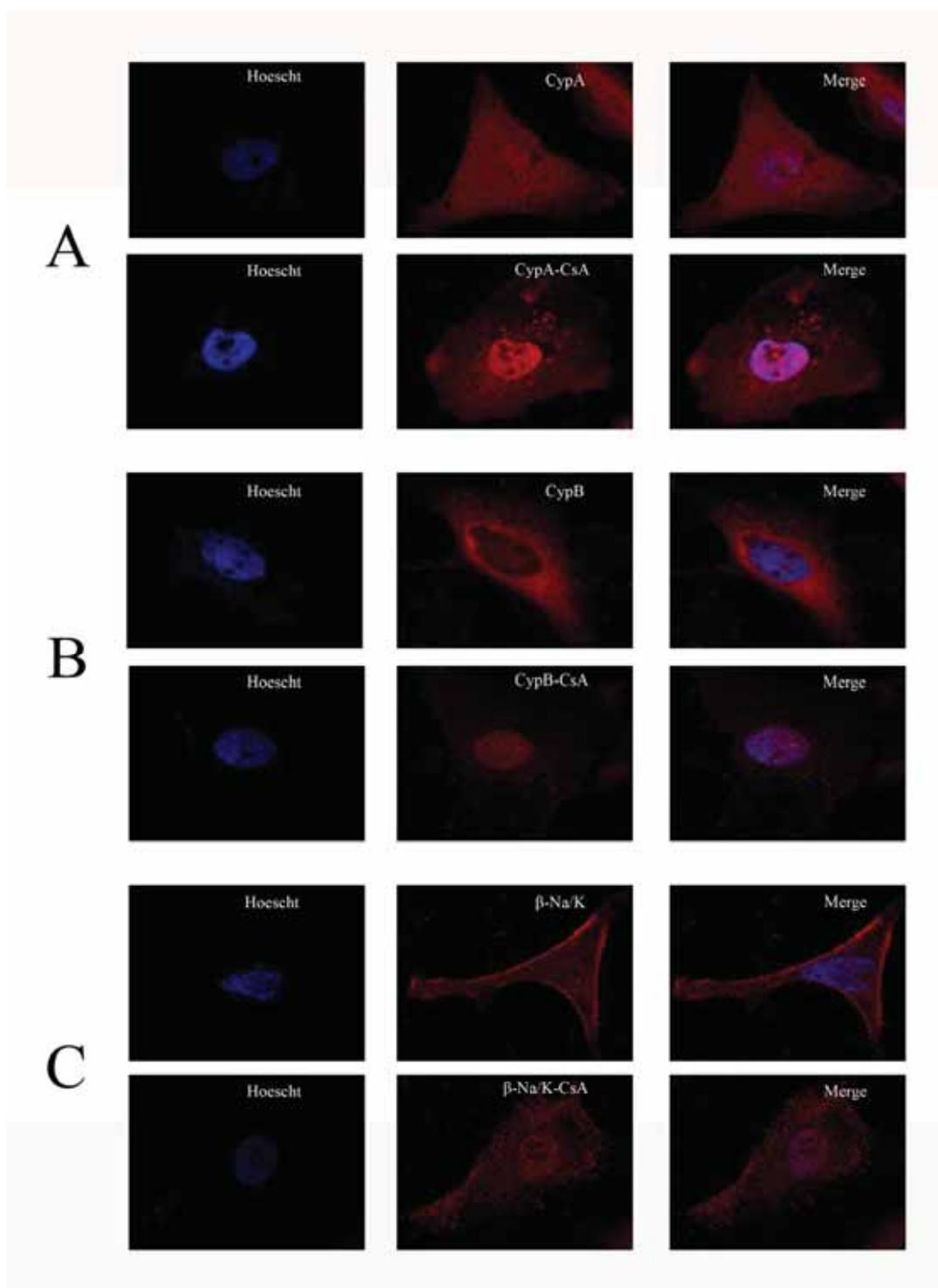
**Figura 35. Co-localización.** A, doble marcaje para CypB y Na/K, las flechas indican una posible localización en el retículo endoplasmático. B, doble marcaje de CypB y Na/K, las flechas indican una posible localización en la membrana. C, doble marcaje entre CypA y Na/K mostrando que estas dos proteínas no colocalizan.

La figura 35 muestra los experimentos de co-localización entre las proteínas CypB y Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K respectivamente. En la figura A se puede observar como en el caso de CypB, se detecta co-localización con la Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K a nivel del retículo endoplasmático, hecho muy significativo ya que CypB está localizada principalmente en este compartimento, mientras que la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K solo se encuentra en este orgánulo en la fase final de síntesis y plegamiento; una vez plegada correctamente, es enviada a la membrana plasmática donde ejerce su función reguladora. También podemos observar en la figura B que estas dos proteínas co-localizarían en la membrana. Este resultado tiene también gran relevancia y requiere una más honda exploración ya que mientras que la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K es una proteína de membrana, CypB por lo contrario es principalmente reticular y solo se ha descrito su localización en la membrana plasmática de forma marginal. En la figura C se observa el doble marcaje entre CypA y Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K, experimento que indica que estas dos proteínas no co-localizarían entre sí. Mientras que CypA muestra una clara localización citoplasmática, la Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K estaría localizada principalmente en la membrana (como ya hemos visto anteriormente). Esta falta de co-localización entre ambas proteínas dificulta en mayor medida la interpretación de la interacción previamente detectada. Experimentos adicionales de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) podrían aclarar si estas proteínas realmente interaccionan ya que se trata método mucho más preciso a la hora de confirmar la localización y la interacción entre proteínas.

## **5. LOCALIZACIÓN DE CypA, CypB Y LA SUBUNIDAD $\beta$ DE LA BOMBA Na/K EN CÉLULAS HK-2 TRATADAS Y SIN TRATAR CON CsA**

Una vez comprobada la interacción entre estas proteínas, decidimos ensayar estudios funcionales y determinar qué efectos a nivel de localización e interacción producía la adición de ciclosporina A (CsA). De esta forma pretendíamos observar si los efectos tóxicos del fármaco, observados en pacientes trasplantados podían tener consecuencias funcionales en relación a estas proteínas con las interacciones detectadas hasta el momento.

Lo primero que quisimos observar fue si se producían cambios en la localización de estas tres proteínas en presencia del inmunosupresor. En la literatura está descrito que ciclosporina A (receptor de ambas inmunofilinas) afecta a la localización de CypA y CypB, concretamente se ha descrito la secreción de ambas proteínas al medio celular en respuesta al tratamiento con CsA. En consecuencia, decidimos tratar las células HK-2 con CsA a 10  $\mu$ M, mínima concentración que produce efectos tóxicos en nuestras células (Tesis de la Dra. Marta Puigmulé y manuscrito sometido a publicación) y realizar seguidamente experimentos de inmunofluorescencia que nos permitiesen observar la localización de ambas inmunofilinas.



**Figura 36. Localización de CypA, CypB y Na/K-β.** A. Localización de CypA en células HK-2 tratadas con y sin CsA 10 μM. B. Localización de CypB en células HK-2 tratadas con y sin CsA 10 μM. C. Localización de Na/K-β en células HK-2 tratadas con y sin CsA 10 μM.

Tal y como se puede observar en la figura 36, en células no tratadas con CsA, CypA se encuentra en el citoplasma y en el núcleo, como ya ha sido previamente descrito. CypB a su vez, se hallaba localizada en el retículo endoplasmático. Por último, pudimos ver como la subunidad beta de Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K estaba localizada principalmente en la membrana plasmática, aunque también se podía observar un pequeño marcaje reticular. Al someter estas células al tratamiento con CsA observamos que tanto CypA, como CypB, como la propia Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K perdían su localización habitual. En el caso de CypA y CypB, observamos una clara y mayoritaria localización nuclear, que es total para CypB. Para la Subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K nos encontramos con una total deslocalización de la proteína que pasaba de la membrana al núcleo y citoplasma celular.

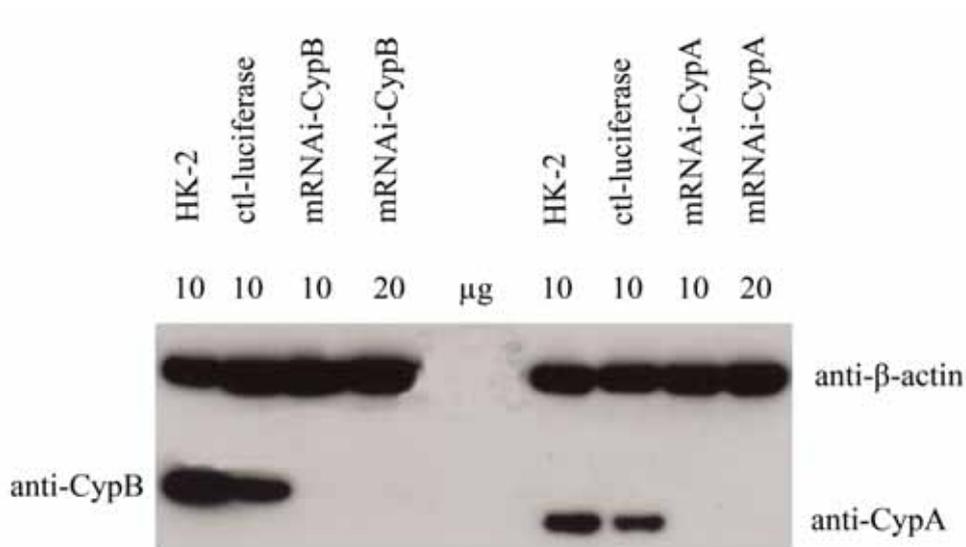
## 6. INTERFERENCIA PARA CICLOFILINA B Y CICLOFILINA A

El término RNA de interferencia (RNAi) se utilizó por primera vez en 1998 por Fire y colaboradores para describir el bloqueo de expresión génica observado al introducir en el interior de *C. elegans* una doble cadena de RNA (*double strand RNA*, dsRNA). Posteriormente el RNAi fue observado y ampliamente estudiado en insectos (Kennerdell J.R. et al., 1998) y en ratones (Svoboda P. et al., 2000). La función natural del RNAi y del silenciamiento génico post transcripcional es la protección del genoma versus la invasión de virus o transposones. La degradación específica del RNA mensajero (mRNA) prevé/evita la replicación del virus y/o del transposon (Elbashir S.M. et al., 2001).

A pesar de encontrarse numerosos estudios de silenciamiento génico producido por la dsRNA en embriones de ratón y en algunas células de mamífero, su utilidad en la mayoría de cultivos de células de mamífero es limitada debido a que la introducción de dsRNA en el interior de las células desencadena respuestas inespecíficas como la síntesis del Interferon (Elbashir S.M. et al., 2002). En el año 2000, Zamore P.D. y colaboradores descubrieron que la introducción de moléculas de doble cadena de RNA de longitud entre 21-23 nucleótidos (*small interference RNA*, siRNA) en el interior de células de mamífero producía el silenciamiento génico sin desencadenar repuestas inespecíficas. Estas moléculas de siRNA se unen a un complejo ribonucleoproteico llamado RISC (*RNA induced silencing complex*) que dirigido por los siRNA reconoce el mRNA que contiene la secuencia homóloga, dando lugar a la eliminación total o parcial del gen (Bernstein E. et al., 2001).

Debido a nuestro interés por los mecanismos moleculares en qué las ciclofilinas están involucradas, se procedió a la eliminación de la expresión génica de la ciclofilina A y de la ciclofilina B mediante RNAi (tesis doctoral de la Dra. Puigmulé). Dado que la interferencia fue completa en este modelo y a través de una colaboración con el Dr. Jeremy Luban, procedimos a utilizar vectores lentivirales producidos en su laboratorio para el silenciamiento de estas ciclofilinas. El grupo del Dr. Luban ha diseñado todos los vectores y construcciones necesarias para llevar a cabo el silenciamiento de CypA y CypB mediante vectores de interferencia que codifican para una doble cadena anillada en forma de horquilla (*hairpin*) específica para cada una de ellas y por infección con lentivirus. Para la interferencia de cada ciclofilina se utilizaron tres vectores distintos: el vector pMD2G que codifica para la cápside del virus (*envelope*), el vector psPAX2 que codifica para las proteínas virales que dirigen el empaquetamiento (*packaging*) y finalmente el vector pAPM que contiene la secuencia en *hairpin* específico de la proteína que se desea silenciar (ver Materiales y Métodos). Estos tres vectores fueron co-transfectados en células 293T para la producción de lentivirus. Dos días después de la transfección el medio que contiene estos lentivirus fue titulado e inmediatamente después las células HK-2 fueron infectadas. El vector pAPM contiene una resistencia para el antibiótico puromicina, así que después de 5 días post-infección, se añadió el antibiótico a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  para seleccionar las células que contenían el *hairpin* integrado en el genoma. A los diez días de la selección con puromicina, se analizó la expresión de proteína CypA y CypB de las células interferidas mediante *western-blot*. En la figura 37 se puede apreciar como la infección y posterior selección de células HK-2 interferidas para cada inmunofilina ha permitido el silenciamiento del 100 % de cada una de ellas.

Cabe destacar el hecho que las células establemente interferidas para estas inmunofilinas constituyen una potente herramienta que permitirá la realización de posteriores ensayos funcionales.



**Figura 37. mRNAi para CypB y CypA.** Esta figura nos muestra la interferencia producida en CypB y CypA. Como control usamos las mismas células interferidas con luciferasa. En este blot podemos haber analizado 10  $\mu$ g de cada lisado y en el caso de las interferidas hemos analizado 10 y 20  $\mu$ g. El anticuerpo control utilizado es la  $\beta$ -actina.

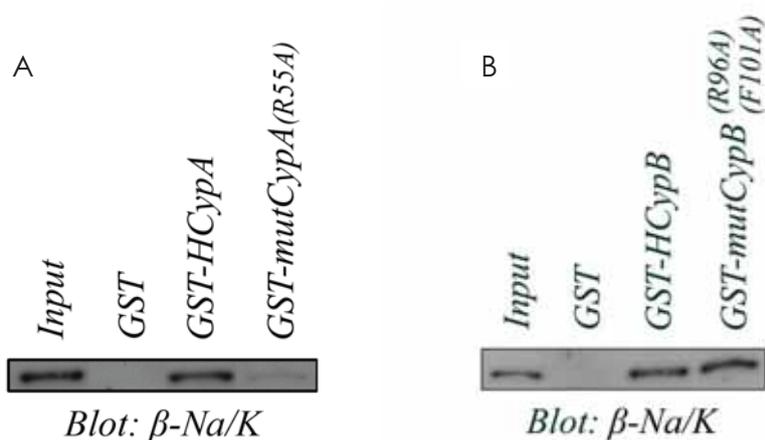
## 7. La interacción entre CypA, CypB con la Subunidad $\beta$ de la bomba Na/K podría estar mediada por la actividad PPIasa

Dada la importancia de la actividad PPIasa de la ciclofilina A y ciclofilina B, nos propusimos mutar los residuos que intervienen en esta actividad para ver si eran los responsables de las interacciones. En la literatura se halla ampliamente descrito que la mutación R55A en CypA elimina su actividad PPIasa, mientras que en el caso de CypB encontramos que las mutaciones R96A y F101A causan una disminución de esta actividad. En consecuencia, decidimos mutar esos residuos en estas dos inmunofilinas y hacer ensayos de *pull-down* para cerciorarnos de su implicación en la interacción con la subunidad beta de Na/K.

Mediante mutagénesis dirigida inducimos el cambio alanina por arginina en el residuo 55 de CypA y el cambio alanina por arginina y fenilalanina por alanina en los residuos 96 y 101

de CypB a nivel de sus vectores de expresión en bacteria (pGEX-6p-1-CypA y pGEX-6p-1-CypB respectivamente). Seguidamente se expresaron sendos mutantes en bacteria y tras su purificación fueron utilizados en ensayos de *pull-down* contra la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K que había sido expresada en células de mamífero Cos-7.

En la figura 38 podemos observar que el residuo mutado R55A parece tener una implicación directa en la interacción de CypA con la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K, ya que el mutante presenta una plausible pérdida de la interacción. En cambio, los residuos R96A y F101A parecen no tener ninguna implicación sobre la interacción de CypB con subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K puesto que ésta se da también en el mutante.

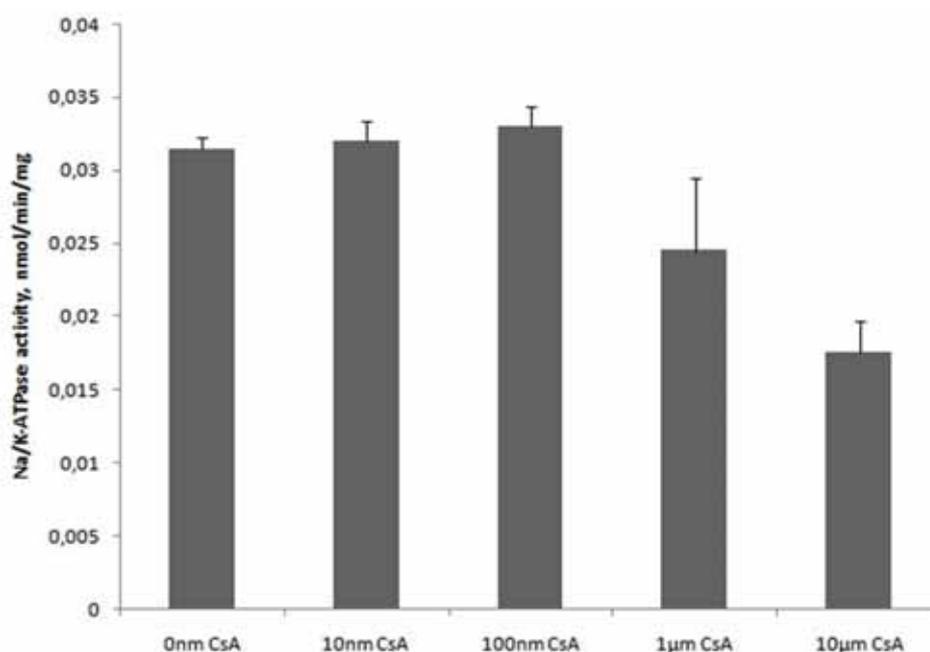


**Figura 38. Pull-down con los residuos mutados de CypA y CypB.** A. Ensayo de *pull-down* entre CypA con la mutación R55A y Na/K- $\beta$ . B. Ensayo de *pull-down* entre CypB con las mutaciones R96A y F101A y Na/k- $\beta$ .

## 8. Actividad enzimática de la subunidad $\beta$ de la bomba Na/K

Se ha descrito que la actividad de la bomba Na/K se ve reducida en células renales que han sido tratadas previamente con ciclosporina A (Tumlin JA et al 1994). Teniendo en cuenta este sugerente dato, creímos sumamente interesante determinar la actividad enzimática de la bomba Na/K y las repercusiones que sobre ella tiene el tratamiento con CsA. Lo primero que

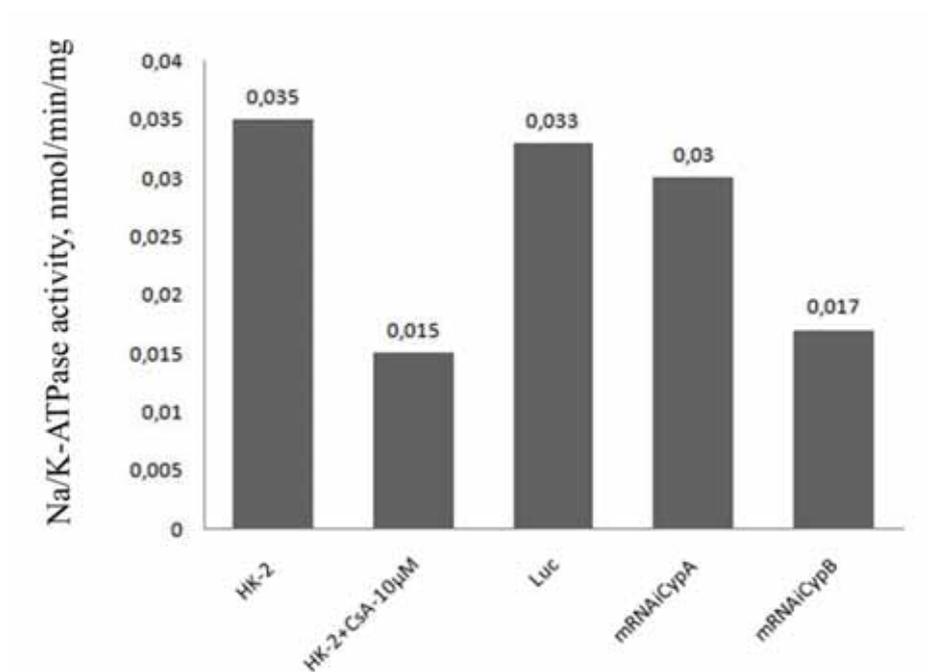
realizamos fue un tratamiento de las células HK-2, nuestro modelo *in vitro* de células del túbulo proximal renal humano con CsA 10  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. A continuación, las células fueron lisadas y se extrajeron las proteínas de membrana mediante un protocolo específico de purificación (ver Métodos) teniendo en cuenta por lo tanto que es en dicha fracción donde debe hallarse la subunidad  $\beta$  al ejercer su función en la membrana plasmática. La actividad de la bomba sodio potasio fue estimada basándonos en la medida de la hidrólisis del compuesto p-nitrofenol fosfato. De esta forma pudimos observar como en nuestras células la actividad sodio potasio disminuía significativamente a dosis de 10  $\mu\text{M}$  de CsA. Cabe sin embargo destacar que esta disminución en la actividad fue observada a partir de la dosis 1  $\mu\text{M}$  (Figura 39).



**Figura 39. Actividad Na/K-ATPase1.** La actividad ATPasa fue medida utilizando el método de hidrólisis de p-nitrofenol. Células HK-2 fueron tratadas con diferentes dosis de CsA (0 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Los extractos proteicos fueron analizados para la actividad enzimática de Na/K.

Paralelamente decidimos también mirar la actividad ATPasa en las células que habían sido establemente interferidas para CypA y CypB. Fue especialmente interesante comprobar que los clones con ciclofilina B silenciada, presentaban una mengua significativa de la actividad Na/K. Este dato probaría que CypB tendría una relación directa con la Subunidad  $\beta$  de la bomba

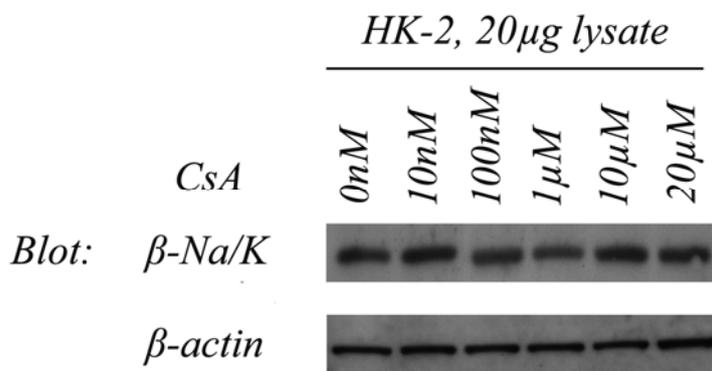
Na/K y confirmaría al mismo tiempo que su interacción con CypB posee un papel importante en la función renal en la patología inducida por los efectos nefrotóxicos de CsA. La siguiente gráfica nos muestra el descenso de la actividad en las diferentes situaciones.



**Figura 40. Actividad Na/K-ATPase2.** La actividad ATPasa fue medida utilizando el método de hidrólisis de p-nitrofenol. La actividad Na/K-ATPasa fue medida en células HK-2, células HK-2 tratadas con CsA 10 µM, células interferidas para la luciferasa, células interferidas para CypA y células interferidas para CypB.

Dentro de este mismo grupo de ensayos, pudimos observar como el tratamiento de las células HK-2 con ciclosporina A presentaban también una marcada disminución de la actividad Na/K-ATPasa. Puesto que CypA y CypB son receptores de este fármaco y que sus efectos inmunosupresores vienen mediados por la unión CsA-Ciclofilinas, decidimos ver si la expresión de la Subunidad β de la bomba Na/K bajaba en estas células después de tratarlas con CsA. Para ello analizamos por *western-blot* los extractos proteicos utilizados en los ensayos de actividad Na/K-ATPasa.

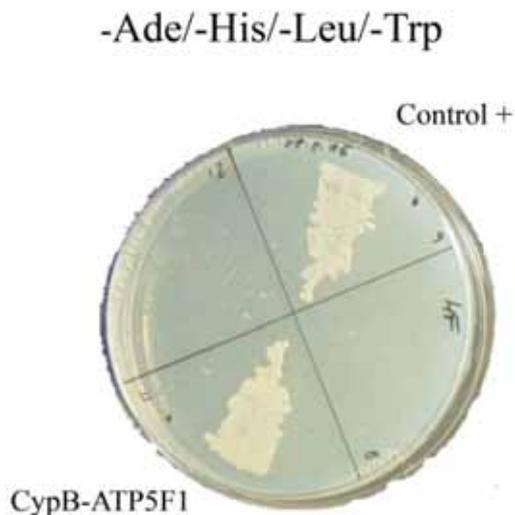
En la figura 41 podemos observar el resultado de dicho experimento el cual mostró la ausencia de cambios de expresión de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K en ninguna de las concentraciones de CsA ensayadas. Como control de carga, se utilizó la beta actina. Estos resultados indican que es la actividad del enzima la que está afectada por el fármaco y que ello depende, como ha sido demostrado, de la interferencia de CypB.



**Figura 41. Expresión de Na/K- $\beta$ .** Los lisados de proteínas de células HK-2 tratadas con CsA a dosis de 0 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M fue analizado mediante un *western-blot*. La beta actina fue utilizada como control del experimento.

## 9. CypB INTERACCIONA CON LA SUBUNIDAD b1 DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL

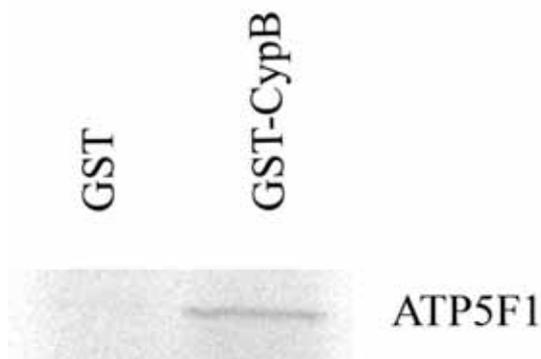
Otro de los resultados de los ensayos de doble híbrido que también llamó especialmente nuestra atención fué la subunidad b1 de la ATP sintetasa mitocondrial (ATP5F1). Se trata de una de las subunidades que conforman el complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial y resulta especialmente sugerente la detección de su interacción con la ciclofilina B (figura 42) al hayarse descritos múltiples efectos tóxicos de la CsA en la mitocondria.



**Figura 42. Interacción entre CypB y ATP5F1 en los ensayos de doble híbrido.** Placa con medio de crecimiento para levadura deficiente en adenina, histidina, leucina y triptófano. El control + pertenece a la interacción ya conocida entre SV40T y p53). CypB-ATP5F1 corresponde a la nueva interacción encontrada entre la ciclofilina B y la subunidad b1 de la ATP sintasa mitocondrial.

De nuevo, esta interacción requería experimentos adicionales de confirmación. De manera que, como ocurrió en las interacciones previamente descritas, procedimos a corroborar este resultado mediante ensayos de *pull-down*. En el caso de la ATP5F1, la expresión fue realizada en un sistema de transcripción y traducción *in vitro* en reticulocito de conejo (ver Métodos). En este sistema la proteína queda marcada radioactivamente con metionina- $S^{35}$  que es incorporada al péptido sintetizado. El procedimiento de los ensayos de *pull-down* fue el descrito anteriormente.

En la figura 43 podemos observar el resultado de la incubación de la proteína ATP5F con la proteína de fusión GST-CypB expresada en bacteria.



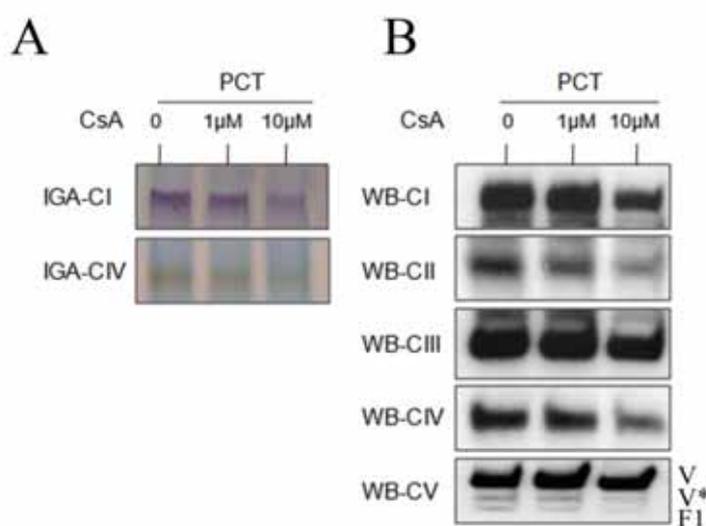
**Figura 43. Ensayo de Pull-Down para confirmar la interacción entre CypB y ATP5F1.** Como se observa en la figura la interacción queda confirmada ya que la ATP5F1 interacciona con el constructo GST-CypB y no con la GST sola. En este ensayo no se usa ningún anticuerpo anti-ATP5F1 ya que esta proteína estaba marcada radiactivamente.

## CsA AFECTA A LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES VIA CICLOFILINA

Una vez demostrada la interacción, realizamos un estudio exhaustivo de la literatura en busca de una posible conexión previamente descrita entre la ciclosporina y las ciclofilinas dentro del contexto de la fisiología mitocondrial. Encontramos varios artículos en los que se describe la afectación de la actividad del complejo I y II de la cadena respiratoria mitocondrial por ciclosporina así como también la disminución de ATP mitocondrial en respuesta al tratamiento con el fármaco (De la Cruz Rodríguez L. et al., 2007).

Estos datos nos llevaron a diseñar varios experimentos que nos permitieran observar un posible efecto de CsA en este compartimento dentro del contexto de líneas celulares renales. En primer lugar, procedimos a tratar con el fármaco células PCT-3, células PCT-3 establemente interferidas para CypA y CypB (líneas establecidas por la Dra. Marta Puigmulé), células Cos7 transitoriamente transfectadas con una forma dominante negativa para ciclofilina A (mutación R55A) y células Cos7 transitoriamente transfectadas con una forma dominante negativa para ciclofilina B (mutaciones R96A y F101A). Las dosis de CsA utilizadas fueron 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y el tratamiento se aplicó durante 24 horas. Pasada la incubación, tripsinizamos las células

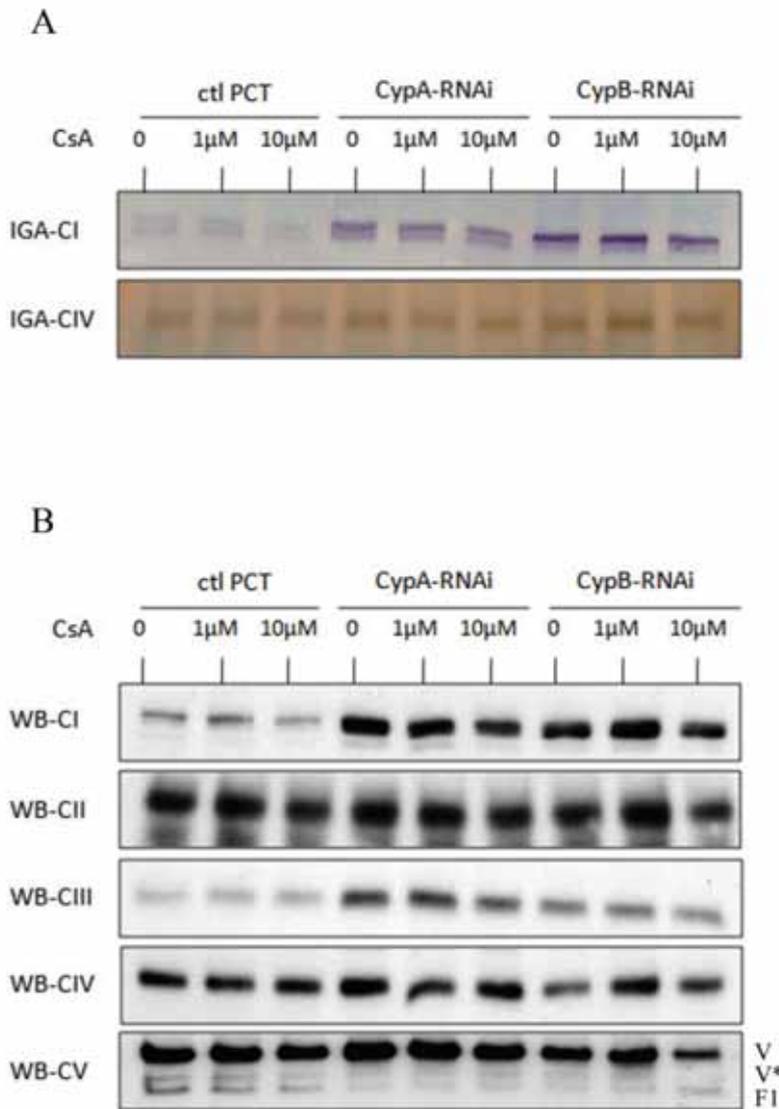
y las congelamos para poder realizar los experimentos de *BLUE-NATIVE-SDS-PAGE*. Estos estudios se llevaron a cabo en el Hospital 12 de Octubre de Madrid bajo la supervisión de la Dra. Cristina Ugalde. Los experimentos se basan en la separación electroforética en condiciones nativas (sin desnaturalizar) de los 5 complejos mitocondriales para seguidamente poder analizar la actividad enzimática en gel de cada uno de ellos por separado. Paralelamente, se realiza la transferencia de dichos complejos mitocondriales a una membrana de nitrocelulosa para poder determinar la expresión de cada uno de estos complejos mediante *western-blot*. En la figura 40 se muestran los ensayos enzimáticos de los complejos I, IV y la expresión de cada complejo en células PCT-3 tratadas a diferentes dosis de CsA.



**Figura 44. *BLUE-NATIVE-SDS-PAGE* en PCT3.** A. Actividad enzimática del complejo I (IGA-CI) y del complejo IV (IGA-CIV) en células PCT-3 tratadas con CsA (0 μM, 1 μM, 10 μM). B. Expresión en células tratadas con CsA de los cinco complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

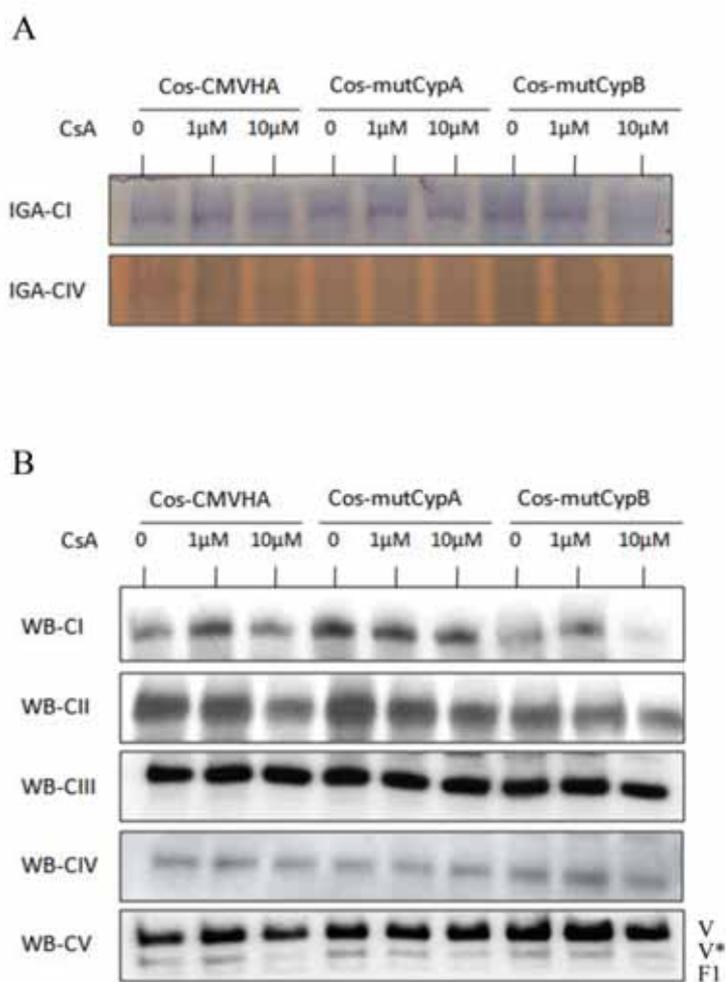
En esta figura se puede observar en A que la actividad enzimática del complejo I y del complejo IV disminuiría significativamente en células que han sido tratadas con CsA a 10 μM. En B tenemos la expresión de cada uno de los complejos mitocondriales. Así se puede observar que la expresión tanto del complejo I, II, IV en células que han sido tratadas con CsA a 10 μM disminuye significativamente, así mismo existe una leve disminución en la expresión de los complejos III y V.

El siguiente paso fue aplicar estos experimentos a células PCT-3 interferidas para CypA y células PCT-3 interferidas para CypB. De nuevo se sometieron las células al tratamiento con CsA a las mismas dosis utilizadas en los ensayos anteriores y posteriormente se realizaron experimentos de actividad enzimática y expresión de los complejos mitocondriales. La figura 41 muestra los resultados de estos experimentos.



**Figura 45. BLUE-NATIVE-SDS-PAGE en células silenciadas para CypA y CypB.** A, células PCT-3 con el vector vacío (ctl PCT), interferidas para CypA (CypA-RNAi) e interferidas para CypB (CypB-RNAi) fueron tratadas con diferentes dosis de CsA (0 μM, 1 μM, 10 μM). En esta figura se muestra las actividades enzimáticas del complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial. B, las proteínas de cada complejo fueron analizadas por *western-blot* en estas células tratadas con CsA.

En la figura 45 A se puede observar como la actividad del complejo I esta aumentada tanto en las células que han sido interferidas para CypA como células que han sido interferidas para CypB. Este aumento en la actividad también correlaciona con la expresión de proteína de dicho complejo. Ocurre lo mismo para el complejo III de la cadena respiratoria. En este caso no podíamos analizar la actividad enzimática del complejo, pero se pudo observar que la expresión está claramente aumentada tanto en células interferidas para CypA como en células interferidas para CypB. Todos estos resultados se compararon siempre con las células control que contenían el vector vacío. En el caso del complejo V y a diferencia de lo que ocurría para los complejos I y III, en la células interferidas no se observó ningún cambio en la expresión de proteína. Parece existir un leve incremento de actividad enzimática del complejo IV en las células interferidas que no va acompañado de un incremento en la expresión de proteína.



**Figura 46. BLUE-NATIVE-SDS-PAGE en células mutadas para CypA y CypB.** A, células PCT-3 con el vector vacío (ctl PCT), sobreexpresadas con el dominante negativo de CypA (Cos-mutCypA) y expresadas con el dominante negativo de CypB (Cos-mutCypB) fueron tratadas con diferentes dosis de CsA (0 μM, 1 μM, 10 μM). En esta figura se muestra las actividades enzimáticas del complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial. B, las proteínas de cada complejo fueron analizadas por *western-blot* en estas células tratadas con CsA.

Una vez comprobados los sustanciales cambios tanto a nivel de actividad como de proteína de alguno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en células que carecían de ciclofilina A o B, decidimos indagar cuál era su causa. Para ello nos propusimos realizar estos mismos experimentos en células Cos7 que habían sido transfectadas previamente con un dominante negativo de la actividad PPIasa de CypA y en células Cos7 que habían sido transfectadas previamente con un dominante negativo de la actividad PPIasa de CypB. Estos dominantes negativos se construyeron tal y como previamente se ha explicado mediante mutación del residuo 55 en el caso de CypA (R55A) y de los residuos 96 y 101 para CypB (R96A-F101A). Los mutantes fueron clonados correctamente en un plásmido de expresión en mamíferos (pCMV-HA) y fueron transfectados en células Cos7 utilizando como control el vector vacío. 24 horas después de la transfección, las células fueron tratadas con CsA a las dosis habituales en nuestros ensayos. Las células fueron tripsinizadas y congeladas 24 horas después del tratamiento y posteriormente utilizadas en los experimentos de *blue-native*.

En la figura 42 A se pueden observar los resultados de los ensayos de *blue-native*. En ellos podemos apreciar cambios en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Este cambio ocurre en las células tanto sin tratar como tratadas con CsA a 10  $\mu$ M y que presentan sobreexpresión del dominante negativo de la ciclofilina B. Podemos observar claramente una disminución en la actividad enzimática que además se correlaciona con la expresión de proteína de este complejo. Ni el complejo IV ni el V muestran ninguna variación. Estos mismos experimentos serán realizados en las células renales HK-2 que han sido interferidas tanto para CypA como para CypB.



# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN



Nuestro laboratorio ha estado interesado tradicionalmente en estudiar los mecanismos moleculares de la acción androgénica en el riñón, tejido que, especialmente en ratón, presenta una marcada inducción génica en respuesta a los andrógenos. Entre los genes sometidos a esta regulación hormonal y con una expresión prácticamente exclusiva del túbulo renal nos encontramos a la *Kidney Androgen-regulated Protein*, el estudio de la cual ha centrado parte del trabajo llevado a cabo en nuestro grupo (Solé et al., 1994; Solé et al., 1996; Ouar et al., 1998; Cebrián et al., 2001; Soler et al., 2004). Estudios de dos híbridos en levadura demuestran que la proteína KAP interacciona con CypB, receptor del fármaco inmunosupresor CsA. La proteína KAP disminuye notablemente en ratones que han sido tratados con CsA y su expresión controlada en un sistema celular de túbulo proximal renal, reduce de forma significativa la toxicidad producida por la CsA (Cebrián C. et al., 2001).

La aparición de esta interacción y los efectos causados por CsA sobre KAP resultaron sin duda altamente relevantes por lo que nuestro grupo empezó a interesarse significativamente en el papel que ejercían los inmunosupresores CsA y FK-506 sobre el daño renal mediante sus receptores intracelulares, las inmunofilinas. Hipotetizando que este daño renal no sólo es causado por la inhibición de la calcineurina como se había postulado.

Las inmunofilinas fueron descubiertas originalmente como receptores de una familia de inmunosupresores en los que se incluye ciclosporina, FK506 y rapamicina. Estos fármacos suprimen la reacción inmune y son usados clínicamente para prevenir el rechazo del injerto durante el trasplante de órganos (Schreiber, 1991; Kunz and Hall, 1993). Dichas proteínas han sido descritas en todos los eucariotas desde levadura, pasando por animales e incluso en plantas y están implicadas en procesos celulares fundamentales (Luan S. et al., 1998). En este trabajo nos hemos dedicado al estudio de la familia de las ciclofilinas y de las *FK-binding proteins*. Los diferentes miembros de cada familia poseen una homología conservada entre sí a lo largo de la evolución. A parte de su acción inmunosupresora, las inmunofilinas se caracterizan por poseer actividad peptidol-prolyl-cis-trans isomerasa, consistente en la catalización de cis a trans de los enlaces peptídicos prolina (Rosen and Schreiber, 1992).

El alto nivel de conservación y distribución ubicua de las inmunofilinas en diferentes organismos y compartimentos subcelulares sugiere que estas proteínas participan en procesos celulares cruciales. Debido a su importancia significativa en este trabajo hemos intentado elucidar algunos de los mecanismos en los que podrían estar implicadas algunas de estas proteínas. Por todo esto realizamos experimentos de doble híbrido con la intención de identificar proteínas de interacción con la ciclofilina B, ciclofilina A y FKBP12. Una vez halladas sendas interacciones, realizamos ensayos funcionales sobre dichas proteínas que serán discutidos a continuación en detalle.

## 1. INTERACCIONES ENCONTRADAS PARA HCypB-HCypA-FKBP12

El principal objetivo de este trabajo y en el que hemos dedicado mayor tiempo ha sido la identificación de proteínas del riñón que interactúan con ciclofilina A, ciclofilina B y FKBP12. Después de varios ensayos de doble híbrido se obtuvieron un número de proteínas que interactuaban con cada inmunofilina. En estos resultados logramos identificar varias proteínas de interacción sobre las cuales y tras su vinculación a procesos celulares en los que también estaba involucrado alguno de los fármacos inmunosupresores, decidimos centrar posteriormente nuestros experimentos. Algunas de estas interacciones serán discutidas a continuación.

En el caso de la CypA, se identificaron 5 proteínas de interacción mediante ensayos de dos híbridos en levadura. Tres de estas proteínas fueron posteriormente confirmadas mediante ensayos de *pull-down*.

Entre ellas destacamos aldolasa B, enzima que desarrolla un papel muy importante en las vías de la glicolisis y gluconeogénesis. Se encarga de catalizar la interconversión de la fructosa-1, 6-bifosfato a gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (Morse and Horecker, 1968). Hay tres formas de aldolasas y la B en particular se encuentra en el hígado y en el riñón (Eagles and Iqbal, 1973). Las aldolasas son tetrámeros compuestos por idénticas subunidades con un peso molecular de 39.500 daltons. Se ha descrito que esta proteína se localiza en la periferia nuclear en células de riñón (Saéz et al., 1996). La regulación de glicolisis y gluconeogénesis es extremadamente importante en órganos y tejidos, sobre todo en el hígado y en el córtex renal, donde la glicolisis estaría localizada en el túbulo distal y la gluconeogénesis en el túbulo proximal (Sasse et al., 1975; Schmidt et al., 1975). Debido a la intervención de aldolasa B en procesos metabólicos y especialmente a su alta abundancia en el riñón, creemos que esta proteína podría estar involucrada en algunos de los efectos producidos por CsA y que su interacción con CypA podría intervenir en estos efectos.

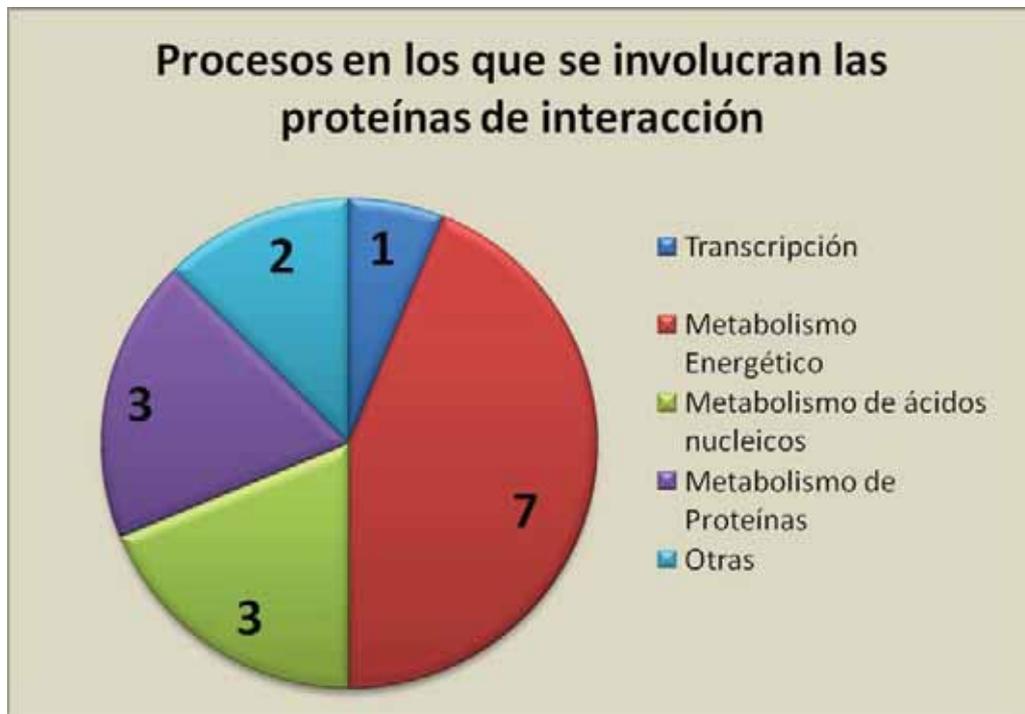
Otra de las proteínas de interacción que encontramos con CypA fue la proteína S. Se trata de una glicoproteína que presenta un peso molecular de aproximadamente 70 kDa. En humanos esta proteína es sintetizada mayoritariamente por hepatocitos, pero también por megacariocitos, células endoteliales, osteoblastos y células del músculo liso (Lundwall A et al., 1979; Dahlbäck et al., 1991). Su función biológica más importante es la inactivación proteolítica de factores Va y VIIIa que son a su vez cofactores involucrados en la cascada de la coagulación. Por todo esto, la proteína S tiene un papel muy importante en la generación de la

trombina y en el control de la actividad procoagulante. En este sentido, se la ha relacionado con el síndrome nefrótico, síndrome que está asociado a un aumento de tromboembolismo tanto en niños como en adultos (Abella et al., 1994; Rabelink et al., 1994). En pacientes que padecen este síndrome se hallan grandes niveles de proteína C y también de su cofactor, la proteína S. El hecho que uno de los efectos encontrados en pacientes tratados con CsA sea la glomerulonefritis membranosa sugiere que quizás un estudio más detallado de la interacción entre CypA y la proteína S podría desvelar una factible involucración de la ciclofilina en algunos de los efectos producidos por la CsA a este nivel.

Siguiendo con otra de las interacciones encontradas para CypA, encontramos la deacetilasa 2, HDAC2 (*Histone Deacetylase 2*). HDAC es una familia de proteínas altamente conservadas durante la evolución (Gray et al., 2001). Se dividen en diferentes clases y en concreto la clase I de esta familia comprende HDAC1, -2, -3 y -8, proteínas similares al regulador transcripcional de levadura Rpd3p asociadas a corepresores transcripcionales tales como Sin3 y NCoR (Bertos NR et al., 2001; Fischle W et al., 2001). En la literatura se ha descrito que CypA y Ess1 interaccionan y regulan el silenciamiento del complejo de histonas deacetilasas Sin3-Rpd3 en levaduras y mamíferos (Arevalo-Rodriguez M., et al; 2000). Todo esto nos hace pensar que quizás la interacción entre HDAC2 y CypA encontrada en nuestros ensayos de doble híbrido debería ser estudiada funcionalmente. De esta manera podríamos elucidar algunos de los mecanismos involucrados en la toxicidad producida por CsA sobre todo si tenemos en cuenta que la inhibición de la actividad PPIasa por este inmunosupresor podría estar afectando al complejo HDAC provocando así la inhibición de la transcripción de genes importantes y su consecuente silenciamiento y un retraso en el ciclo celular. En concreto, HDAC2 ha sido relacionada con el óxido nítrico (NO), señalizador celular con un papel muy importante en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos en el riñón. El óxido nítrico es producido en células glomerulares mesangiales mediante la vía del NO sintasa (iNOS) juntamente con otras citoquinas y quemoquinas especialmente cuando son activadas por un estímulo inmunológico o inflamatorio, momento en el que llegan a generar grandes cantidades de NO. Este exceso en la producción de NO causa diferentes formas de daño glomerular y tubular (Furusu A et al., 1998; Narita I et al., 1995). Uno de los efectos del inmunosupresor CsA es justamente la producción de NO causando de esta forma un efecto en el daño glomerular y tubular

En el caso de FKBP12, obtuvimos 16 proteínas de interacción mediante ensayos de doble híbrido. No sería coherente describir ni entrar en detalle con ninguna de las proteínas de estos ensayos puesto que, por el momento, carecen de ensayos de confirmación. De hecho, dicho trabajo está siendo desarrollado actualmente por otros miembros de nuestro laboratorio. A modo esquemático, hemos agrupado las proteínas obtenidas en función del proceso celular en el que están involucradas indicando así en que procesos podría estar involucrada esta proteína. Es así como podemos observar que la mayor parte de los interactores para FKBP12 se corresponden con efectores del metabolismo energético. En este sentido, cabe destacar que el principal orgánulo donde tiene lugar la producción y administración de energía es el compartimento mitocondrial y es más que sugerente la posible relación con los efectos nefrotóxicos que los inmunosupresores suelen producir a este nivel. En segundo lugar nos encontramos con dos grupos mayoritarios de interactores integrados por efectores del metabolismo de ácidos nucleicos, de nuevo encontrados mayoritariamente en funciones a nivel mitocondrial, y por elementos del metabolismo de proteínas, interacciones racionalmente lógicas si tenemos en cuenta que FKBP12 tiene un papel principal como chaperona.

**TABLA 16. Procesos moleculares.**



De las proteínas de interacción que obtuvimos con CypB y CypA, nos llamó la atención la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K y la subunidad b1 de la ATP sintasa mitocondrial. Para la primera de ellas obtuvimos interacción tanto con CypB como con CypA para la segunda solo con CypB. Revisando la literatura vimos que ambas proteínas podrían estar vinculadas a algunos de los efectos tóxicos causados por CsA. Debido a su importancia decidimos primeramente confirmar *in vitro* e *in vivo* estas interacciones y después realizar sendos experimentos funcionales.

En los siguientes apartados discutiré los resultados obtenidos así como también explicaré la razón que nos llevó a realizar estos experimentos.

## **2. Na/K- $\beta$ INTERACCIONA CON CypB Y CypA EN ENSAYOS DE DOBLE HIBRIDO**

La interacción más relevante y reveladora que obtuvimos en los ensayos de doble híbrido, no sólo por su importancia en la célula sino por su funcionalidad en células del riñón, fue la subunidad beta de la bomba sodio/potasio ATPasa (Na/K-ATPase). Se trata de uno de los principales transportadores de membrana celular responsable del mantenimiento electroquímico y de transporte de Na y K a través de la membrana plasmática. En la célula, esta bomba está bajo el control de hormonas y varios factores de crecimiento que regulan a corto y largo plazo de la actividad de la bomba (Verry et al., 1995; Ewart et al., 1995; Rossier et al., 1987; Rozengurt et al., 1981; Moolenaar et al., 1986). El enzima es un heterodímero que consiste en una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , para las cuales se han identificado tres subtipos diferentes (Mercer et al., 1986; Shull et al., 1986; Hara et al., 1987; Malik et al., 1996). La subunidad  $\alpha$  es la encargada de la catálisis de la actividad enzimática mientras que la subunidad  $\beta$  está involucrada en la maduración estructural y en el correcto direccionamiento del heterodímero a la membrana plasmática (Geering et al., 1989, 1991, 1996). La figura 33 nos muestra el resultado obtenido para los ensayos de interacción con CypB y CypA. Tras observar que esta proteína interaccionaba con ambas ciclofilinas decidimos inicialmente confirmar *in vitro* la interacción mediante ensayos de *pull-down* (figura 33). El resultado positivo de estos ensayos nos permitió avanzar un paso más, pasando a corroborar de manera concluyente la interacción *in vivo* mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (figura 34). La confirmación de la interacción entre la subunidad beta de la bomba sodio/potasio y ambas ciclofilinas, nos incitó a investigar el posible significado funcional de esta. Para ello intentamos determinar la posible involucración de la actividad PPIasa en la interacción entre la subunidad de la bomba y cada

ciclofilina. La actividad PPIasa de las ciclofilinas está conservada en todos los enzimas de la familia y se encarga de catalizar la interconversión de enlaces cis a enlaces trans de los enlaces peptídicos de las prolinas (Fischer G. et al., 1984). La isomerización espontánea de los enlaces peptidil-prolina requiere energía y es además un proceso lento, particularmente a bajas temperaturas. Las ciclofilinas estabilizan el estado de transición de cis a trans y aceleran la isomerización, proceso que resulta importante en el plegamiento y en el ensamblaje de multidominios de proteínas (Gothel SF. Et al., 1999). Los aminoácidos involucradas en esta actividad enzimática han sido descritos y están conservados entre varios miembros de la familia como es el caso de CypA, CypB y CypC (Bukrinsky M et al., 2002). Uno de los residuos más importantes y que parecen tener un papel muy importante en la actividad enzimática es la arginina 55. Ratones transgénicos que contienen una mutación en este residuo (R55A) son menos resistentes a la nefrotoxicidad producida por la CsA (Kim SS. et al., 2004). Estos ratones muestran un desarrollo normal sin anomalías aparentes, pero la toxicidad producida por CsA es más elevada en comparación con los ratones *wild-type*. También se ha visto que roedores que contienen dicha mutación exhiben una menor esperanza de vida. Otros autores demostraron a su vez que CsA bloquea la actividad PPIasa retardando significativamente la maduración del colágeno (Steinmann B. et al., 1991). Además del plegamiento de proteínas, esta actividad tiene importantes implicaciones en diversos procesos celulares como tráfico intracelular (Uittenbogaard Y. et al., 1998), transducción de señales (Brazin KN. Et al., 2002), regulación del ciclo celular (Zander K. et al., 2003), regulación de la transcripción (Krummrei U. et al., 1995), diferenciación (Nahreini P. et al., 2001) y mantenimiento de la estabilidad de complejos multi-proteicos (Hamilton GS. Et al., 1998).

Tras la revisión de todos estos datos y antecedentes, en este trabajo, creímos oportuno mutar el residuo 55 mediante la sustitución de Arginina por Alanina para la CypA y los residuos 96 y 101 mediante la sustitución de arginina y felanina por dos alaninas en el caso de CypB. Seguidamente realizamos los ensayos de *pull-down* con las versiones mutadas de ambas ciclofilinas (figura 38). El resultado de estos experimentos nos permitió observar que la mutación inducida en CypA tiene una repercusión palpable en la interacción, que pasa a ser indetectable a nivel de *pull-down*, mientras que las mutaciones provocadas en la CypB no tendrían ningún efecto significativo en la interacción de esta ciclofilina con la subunidad  $\beta$  de la bomba. Por todo esto, podríamos deducir que es el residuo 55 el que estaría involucrado en la interacción de la CypA y la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K- $\beta$ , pero para poder cerciorarnos totalmente y para poder afirmarlo taxativamente sería necesario realizar un mapeo más extenso sobre la interacción entre estas proteínas. En el caso de CypB también se deberían hacer experimentos adicionales mutando otros residuos involucrados en la actividad PPIasa e incluso mutando dominios activos de esta proteína, que nos permitirían concluir cual es el domino

exacto de la interacción. Es necesario recalcar que racionalmente, sería más factible la interacción de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K- $\beta$  en el caso de CypB, que en el de CypA. La razón que induciría tal idea, sería el hecho que la subunidad beta de la Na/K-ATPasa madura y se sintetiza en el retículo endoplasmático, compartimento donde habitualmente se encuentra ciclofilina B. También hemos visto que la subunidad  $\beta$  de la bomba contiene varias prolinas justo en el dominio de la proteína que se encuentra en el lumen del retículo endoplasmático, coincidiendo de nuevo con la localización natural de CypB. Es por todo esto que creemos que la interacción *in vivo* con CypA sería menos factible, y racionalmente más difícil de concebir, ya que esta última se halla normalmente en el citoplasma y en el núcleo por lo que la posibilidad de coincidencia espacial e interacción sería más complicada. Reforzando nuestra idea, el dominio de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K- $\beta$  perteneciente al lumen en el retículo endoplasmático es a su vez el dominio extracelular una vez se encuentra en la membrana plasmática. Estudios de *Fluorescence Resonance Transfer Electron* (FRET) podrían decirnos exactamente donde se halla la coincidencia espacial entre estas proteínas. Para explicar la interacción entre CypA y la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K podríamos decir que es posible que ésta se dé en un dominio homólogo entre ciclofilinas y que por eso al realizar ensayos de *pull-down* y co-inmunoprecipitación se recupere esta proteína en los eluidos de los ensayos con CypA. Sin embargo también cabe la posibilidad de que CypB y CypA pudiesen estar involucradas en el direccionamiento correcto de la proteína a la membrana plasmática. Como ya he dicho anteriormente habría que hacer varios ensayos para poder dilucidar algunas preguntas aun pendientes de esclarecer sobre esta interacción.

### **3. Na/K- $\beta$ COLOCALIZA CON CypB EN EL RETICULO ENDOPLASMATICO Y LA MEMBRANA**

Otro de los experimentos realizados para confirmar *in vivo* las interacciones entre CypA y CypB con la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K fue determinar la posible co-localización de estas proteínas en las células. La localización de cada una de estas proteínas ha sido descrita en varios compartimentos celulares. En el caso de CypA ésta se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo celular (Huh WK. Et al., 2003; Arevalo-rodriguez M. et al., 2005), mientras que ciclofilina B contiene un péptido señal amino-terminal que la dirige a la vía secretora de proteínas del retículo endoplasmático (Galat A. et al., 2003; Dornan J. et al., 2003). Finalmente la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K, se encuentra localizada tanto en el retículo endoplasmático como en la membrana plasmática (Weber P. et al., 1998). En nuestro laboratorio realizamos

experimentos de co-localización para las interacciones de CypB- subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K y CypA-subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K utilizando los anticuerpos correspondientes. En la figura 35 se puede observar la co-localización existente entre CypB y Na/K- $\beta$  tanto en el retículo como en la membrana plasmática. En el caso de CypA no pudimos observar co-localización entre ambas proteínas. Este resultado refuerza aún más nuestra idea sobre una posible falsa interacción, ya que como se ha indicado previamente se podría decir que resulta difícil de creer la interacción entre CypA y Na/K- $\beta$  debido a la localización de CypA. En el caso de CypB, estos experimentos nos confirmarían el resultado positivo inicial que habíamos visto anteriormente *in vitro*.

Una vez observamos que las interacciones obtenidas por la técnica de doble híbrido se confirmaron por técnicas alternativas y tras revisar la literatura al respecto, empezamos a pensar en realizar experimentos funcionales. En este sentido, se ha descrito que la administración de CsA reduce el grado de filtración glomerular mediante vasoconstricción arteriolar y resistencia vascular (Sutherland D. et al., 1984; Dieperink H. et al., 1986). También se ha descrito que este inmunosupresor causa hipercalcemia y acidosis metabólica. Cuando la CsA es administrada a voluntarios sanos, se ha visto que hay una reducción significativa en la excreción de sodio y potasio (Weir MR. Et al., 1990). Se ha postulado además que la hipercalcemia causada por CsA podría ser una consecuencia de secreción afectada por potasio, debido a la inhibición en la actividad de la Na/K-ATPasa en los segmentos de la nefrona (Tumlin J. et al., 1993). Todos estos hallazgos descritos anteriormente por otros autores, nos hicieron pensar en la posibilidad de que esta inhibición en la actividad producida por CsA podría estar mediada por la inhibición de alguno de los receptores del inmunosupresor. Por este motivo decidimos primeramente mirar la localización de estas proteínas en células del túbulo proximal renal (HK-2) una vez tratadas con CsA.

#### **4. LA LOCALIZACIÓN DE CypB, CypA Y Na/K- $\beta$ ESTÁ AFECTADA EN CÉLULAS HK-2 QUE HAN SIDO TRATADAS CON EL INMUNOSUPRESOR CsA**

Células HK-2 tratadas con CsA 10  $\mu$ M durante 24 horas fueron utilizados en experimentos de localización. Los resultados obtenidos nos llamaron mucho la atención ya que vimos que en los tres casos la localización de las proteínas estaba afectada en células que habían sido tratadas con CsA. Como ya ha sido explicado CypB es una proteína que se localiza principalmente en el retículo endoplasmático. En nuestro caso, cuando las células eran tratadas

con CsA pudimos observar que la proteína perdía su expresión en este compartimento y encontrándose mayoritariamente en el núcleo. El complejo formado por CsA-CypB se postula que forma parte de la vía secretora posiblemente funcionando como una chaperona para proteínas de membrana y de exporte celular (Price E. et al., 1994). También se ha descrito que CypB recombinante degrada el DNA plasmídico dependiendo de calcio o magnesio (Nagata T. et al., 2000). Estos autores sugieren que CypB podría degradar el DNA cromosómico en el núcleo como también el DNA plasmidico en timocitos (Nagata T. et al., 2000). Los resultados por tanto nos muestran que la ciclofilina podría encontrarse en el núcleo en algún estadio, localización sugerida por la descripción del dominio aminoacídico de la proteína que exhibe actividad nucleasa.

El mismo resultado fue encontrado para CypA. En principio no nos resultó especialmente sorprendente porque esta proteína se encuentra descrita tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. De todas formas, es interesante resaltar que al tratar las células con CsA la proteína pasa a tener una localización mayoritariamente nuclear. Para ambas ciclofilinas ocurriría lo mismo, podríamos decir que CsA induciría no solo la secreción de estas proteínas fuera de la célula sino que por alguna razón además promovería su translocación al núcleo. Sería necesario diseñar experimentos adicionales en los que pudiésemos obtener más información sobre este cambio de localización tan sugerente.

Finalmente el resultado que nos pareció más interesante y que obviamente apoya los resultados obtenidos anteriormente es la pérdida de localización de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K en células que han sido tratadas con CsA. En la figura 36 se puede observar que en condiciones normales esta proteína se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática, mientras que en el caso de células que han sido tratadas con CsA dicha localización desaparece. Este resultado nos está mostrando claramente que el inmunosupresor CsA tiene un efecto claro sobre la localización de la proteína. A la vista de nuestros resultados se podría hipotetizar que el cambio de compartimento podría estar causado por el acomplejamiento a CsA o por la pérdida de localización de CypB en el retículo endoplasmático.

## **5. EL INMUNOSUPRESOR CsA AFECTA LA ACTIVIDAD Na/K-ATPasa EN CÉLULAS HK-2**

Tras ver el efecto del inmunosupresor en la localización de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K, quisimos ver si este cambio podría tener una repercusión directa en la actividad del

enzima en las células derivadas del túbulo proximal renal HK-2. En la figura 39 se puede observar que a dosis de 10  $\mu\text{M}$ , la actividad enzimática en estas células disminuye significativamente hasta un 56% aproximadamente, confirmándose así el efecto del fármaco sobre dicha actividad. Estos resultados confirmaron los previamente descritos en otros tipos celulares renales. Para ver si la expresión de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K estaba también afectada en las células que habían sido tratadas con CsA, hicimos un *western-blot* y pudimos observar como los niveles de la proteína no variaban y que por tanto CsA no afectaba a los niveles de la proteína sino a su actividad. En este sentido, encontramos como Tumlin *et al.* han descrito que ratas tratadas con CsA presentan una disminución de la actividad Na/K-ATPasa en el túbulo colector y el brazo grueso ascendente medular (Tumlin JA. *Et al.*, 1993). Estudios adicionales refuerzan este efecto sobre la actividad Na/K-ATPase por parte del fármaco inmunosupresor. Células MDCK, C7 y C11 fueron tratadas con CsA 8 $\mu\text{M}$  durante dos días y se pudo observar como la actividad disminuía significativamente aunque la expresión de la subunidad  $\beta$  del heterodímero se mantenía intacta (Deppe CE. *Et al.*, 1997). Estos mismos resultados fueron también descritos en células epiteliales renales bovinas. Al no encontrar ningún cambio a nivel de expresión de proteína o de mRNA, estos autores sugieren que la disminución en la actividad podría estar causada por eventos post-traducionales (Ferrer-Martínez A. *et al.*, 1996).

Pero dadas las interacciones obtenidas previamente entre CypB, CypA y la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K y sobre todo teniendo en cuenta los efectos vistos sobre la localización de esta proteína de membrana, nos propusimos determinar la actividad enzimática de la bomba en células interferidas para CypB y CypA. Todos los experimentos de interferencia fueron realizados en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Ginebra, en el laboratorio del Dr. Luban. En la figura 37 se puede observar la interferencia de ambas proteínas en células que fueron establemente interferidas y posteriormente utilizadas en los experimentos de actividad Na/K-ATPasa. Así pues, pudimos ver como las células interferidas para CypB y las células tratadas con CsA presentaban una marcada disminución en la actividad enzimática de la bomba de Na/K (figura 40). En cambio, en células control o las interferidas para CypA no pudimos apreciar ningún cambio significativo. Todo esto apoyaría nuestros resultados previos y podríamos concluir que la bajada de la actividad ATPasa en células tratadas con CsA es debida a CypB.

Como ya es conocido, CsA se une a su receptor CypB acelerando el tráfico de este por la vía secretora (Price E. *et al.*, 1994). Una de nuestras hipótesis para estos resultados es que CypB estaría involucrada en los últimos pasos de síntesis de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K en el retículo endoplasmático y que ésta a su vez conduciría la bomba a la membrana plasmática actuando como una chaperona. Una vez en allí, Na/K- $\beta$  se uniría a la subunidad Na/K- $\alpha$

formando así un heterodímero funcional en la membrana plasmática (la bomba Na/K). Debido a que CypB es secretada y pierde su localización reticular cuando las células han sido tratadas con CsA, esta no podría finalizar correctamente el plegamiento de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K, así como tampoco podría dirigirla hacia la membrana, impidiendo de esta manera la formación de la bomba Na/K e inhibiendo por tanto la actividad ATPasa. En las células interferidas para CypB ocurriría algo similar, la única diferencia es que en estas células CypB no sería secretada sino que simplemente al hallarse prácticamente inexistente, no podría ejercer su función celular. Otra hipótesis podría involucrar a la actividad PPIasa de las ciclofilinas, fundamental para el plegamiento de un gran número de proteínas celulares. Al inhibir esta actividad mediante tratamiento con CsA, la ciclofilina pierde una de sus principales funciones en la célula. Al no poder plegar correctamente la subunidad  $\alpha$ , ésta adoptaría una conformación aberrante que provocaría la pérdida de su funcionalidad e impediría la formación correcta de la bomba Na/K, por lo que la actividad Na/K-ATPasa celular total disminuiría.

Es necesario destacar que es más que factible la existencia de factores adicionales implicados en la formación de la subunidad beta. De no ser así, el tratamiento con CsA y sus efectos sobre las ciclofilinas provocarían una ausencia total de actividad de la bomba Na/K y una consecuente muerte celular rápida. Sin embargo, nuestros resultados podrían explicar la acidosis metabólica y la hipercalcemia producida por el inmunosupresor CsA.

## **6. CypB INTERACCIONA CON LA SUBUNIDAD B1 DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL (ATP5F1) EN ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO**

La otra interacción para la que realizamos ensayos funcionales debido a su gran importancia y relevancia fue la ATP sintasa mitocondrial (ATP5F1). Esta proteína pertenece a la familia de las ATP sintasas cuya principal función es la catalización de la síntesis de ATP. Está formada por dos complejos integrados por varias subunidades: el núcleo catalítico soluble (F1) y el componente de membrana (Fo) que comprende el canal de protones. La porción catalítica consiste en 5 subunidades distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\Delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) ensambladas con una estequiometría de 3 alfas, 3 betas y una representante de las otras 3. El canal de protones contiene 9 subunidades (a, b, c, d, e, f, g, F6 y F8). La interacción entre CypB y la ATP sintasa mitocondrial fue primeramente encontrada mediante nuestros ensayos de doble híbrido.

Mediante ensayos de *pull-down* pudimos efectivamente confirmar esta interacción (figura 43). Llegados a este punto era sumamente interesante realizar ensayos que pudiesen

orientarnos sobre el significado funcional de dicha interacción. Para ello, decidimos llevar a cabo experimentos de *blue-native* tal y como se describe en el apartado de Resultados.

## 7. EFECTOS DE CsA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

Los experimentos fueron realizados en la línea celular HK-2, las cuales fueron tratadas a diferentes dosis de CsA durante 24 horas. Decidimos utilizar este fármaco porque sus receptores son las ciclofilinas y debido al potente impacto que ejerce sobre la mitocondria.

Se ha descrito que CsA añadida en el medio celular a dosis de 100 ng/ml – concentración dentro del rango encontrado en la sangre de pacientes sometidos al tratamiento de este fármaco- reduce un 20% las concentraciones de ATP y un 40% el metabolismo mitocondrial de la glucosa (Serkova N. et al., 1996; Christians U et al., 2004). También se ha demostrado que la nefrotoxicidad inducida por CsA se debe, al menos en parte, a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Parra T. et al., 1998; Wang C. et al., 1994). Los mecanismos moleculares por los que este fármaco produce ROS no son conocidos, pero se ha considerado que su formación podría verse favorecida por la acción del inmunosupresor sobre sistemas como el citocromo P450, NADPH oxidasa o xantina oxidasa o bien como consecuencia de la disminución de los sistemas antioxidantes intracelulares (Jeon SH. Et al., 2005). Dado que una de las fuentes fisiológicas principales de ROS son las mitocondrias es fácil pensar en un posible papel de estos orgánulos en la nefrotoxicidad producida por CsA. De hecho, en condiciones normales, se estima que el 1-2 % del oxígeno de la cadena respiratoria se convierte en  $O_2^{-25}$ . Las mitocondrias disponen, no obstante, de un complejo sistema de antioxidantes capaces de detoxificar  $ROS^{-25}$ . Entre ellos se encuentran enzimas (como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa, la glutatión reductasa o la glutatión NADP transhidrogenasa) y otras moléculas de menor tamaño (como glutatión, NAD(P)H, o las vitaminas E y C) que combinadas constituyen un eficaz sistema antioxidante (Turrens JF. Et al., 1997). La acción de estos componentes está integrada de forma que el  $O_2$  liberado en la cadena respiratoria es metabolizado por la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD-Mn) a peróxido de hidrogeno y éste a su vez es detoxificado por la glutatión peroxidasa intra y/o extramitocondrial. La glutatión peroxidasa se mantiene reducida gracias al glutatión que a su vez es reducido por la NADH y NAD(P)H por la NADP-transhidrogenasa (Chance B. et al., 1979; Radi R. et al., 1991). Se ha demostrado que CsA produce un aumento de la producción mitocondrial de  $O_2^-$  y que este aumento es paralelo al descenso de NADPH, molécula fundamental en el

mantenimiento del estado reducido del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y cuyo descenso está relacionado con diferentes modelos de muerte celular (Nieminen AL. Et al., 1997; Shiino A. et al., 1998). Experimentos realizados en mitocondrias aisladas han sugerido que el descenso de NADPH podría ser secundario a la oxidación de enzimas involucrados en su síntesis como la deshidrogenasa o citrato sintasa mitocondriales (Galindo MF. Et al., 2003). El aumento de  $O_2^-$  también ha sido descrito por otros autores en células tubulares y endoteliales (Jeon SH. Et al., 2005; Raymod MA. Et al. 2003). Las consecuencias del aumento de  $O_2^-$  pueden ser muy nocivas para la célula, ya que es altamente reactivo y puede oxidar con mucha facilidad moléculas adyacentes (Kowaltowski AJ. Et al., 1999). Por otro lado y siguiendo con este importante orgánulo celular, encontramos que la cardiolipina (CL) es el principal lípido constituyente de la membrana interna mitocondrial y contribuye a la estabilización de la misma a través de sus interacciones con las proteínas y los complejos de la cadena respiratoria (Gómez B. et al., 1999; Schagger H. et al., 2002). Su alto contenido en ácidos grasos insaturados y su proximidad a los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial la hacen particularmente susceptible al daño oxidativo por ROS (Daum G. et al., 1985; Liu J. et al., 2003). Se ha demostrado que la CsA altera la emisión de fluorescencia de NAO (*oxidation of cardiolipin of inner mitochondrial membrane*), sustrato que se une de forma específica a la CL, sugiriendo la oxidación de la misma (Perez J. et al., 2007). Estos mismos autores observaron un aumento del porcentaje de células con alto contenido de cardiolipina oxidada y deducen que este hecho podría tener consecuencias trascendentales sobre la fisiología y estructura mitocondriales (Perez J. et al., 2007). Uno de los efectos más precoces deriva de que la CL oxidada se une con menos afinidad al citocromo c, propiciando la liberación del mismo al espacio intermembrana mitocondrial (Kagan VE. et al., 2004).

Justamente, otro de los efectos producidos por CsA es un aumento de la liberación del citocromo c mitocondrial al citosol, sugiriendo que produce una apertura del denominado *poro de transición* de permeabilidad mitocondrial (PTPM) (Roy MK. Et al., 2006). Se postula que el poro de transición mitocondrial (PTM) está formado por ANT (*adenine nucleotide translocator protein*), VDAC (*voltage dependent anion channel*), ciclofilina D (CypD) y otras proteínas tales como el receptor periférico de la benzodiazepina, creatinina quinasa, hexoquinasa II, Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) y Bax (*Bcl-2 associated protein*). Se cree que el poro está formado por un grupo de proteínas desplegadas las cuales serían finalmente plegadas y ordenadas por chaperonas en las que se incluiría CypD (He and Lemasters, 2002). Esta ciclofilina se une al poro de transición y a su vez es requerida para la regulación de calcio en este poro. La CsA ha sido descrita como un inhibidor de este poro y se cree que ello sería a través de su receptor mitocondrial CypD.

Como ya he indicado anteriormente uno de los efectos de CsA es la aparición de estrés oxidativo. Este estrés podría estar causado por los efectos negativos del inmunosupresor en la mitocondria, aunque también se ha vinculado de forma significativa a otro orgánulo celular muy importante como es el retículo endoplasmático.

El retículo endoplasmático es el orgánulo donde se pliegan correctamente y se oligomerizan las proteínas de membrana y de secreción. Cuando las células están expuestas a estreses tales como la inanición de glucosa, inhibición de la glicosilación de proteínas, perturbación en la homeostasis de calcio o la privación de oxígeno, entonces las proteínas que no han sido correctamente plegadas se acumulan en el retículo endoplasmático y la respuesta de las células eucariotas puede darse a nivel de inducción transcripcional, atenuación de la traducción y la degradación (Mori *et al.*, 2000). Se ha descrito que existe una gran conexión directa o indirecta entre el estrés del retículo endoplasmático y las propiedades mitocondriales (Hori O., *et al.*, 2007). Estos autores han observado que cuando el retículo endoplasmático está sometido a estrés, la expresión y ensamblaje del complejo citocromo c oxidasa está perturbado mientras que chaperonas dependientes de ATP mitocondrial son inducidas, al menos para intentar mejorar el ensamblaje de estos complejos e intentar sostener la función mitocondrial (Hori O. *et al.*, 2007).

La interacción encontrada entre CypB y la subunidad b1 de la ATP sintasa mitocondrial en nuestros ensayos de doble híbrido nos hicieron pensar en la posibilidad de una relación directa entre una chaperona reticular (CypB) y una proteína mitocondrial. Nos pusimos en contacto con el grupo de Enfermedades Mitocondriales dirigido por la Dra. Ugalde en el Hospital 12 de Octubre de Madrid. Su grupo tiene una vasta experiencia en el estudio de enfermedades mitocondriales con una dilatada experiencia en la técnica de *blue-native*. Como ya he explicado anteriormente en el apartado de Resultados esta técnica permite separar los complejos mitocondriales en un gel de acrilamida en condiciones nativas, y por consiguiente se puede observar la expresión de cada complejo mediante *western-blot* y realizar ensayos de actividad enzimática en el propio gel. En nuestro laboratorio diseñamos una serie de experimentos que consistían en el tratamiento de CsA con diferentes dosis (1 y 10  $\mu$ M) en células PCT3, células PCT3 que habían sido interferidas para CypA y CypB (tesis de la Dra. Marta Puigmulé de este laboratorio) y células Cos-7 que habían sido transfectadas transitoriamente con mutantes de la actividad PPIasa de CypA (R55A) y CypB (R96A-F101A). En el caso de las células PCT3 que habían sido tratadas con el inmunosupresor (figura 45B) pudimos observar que tanto el complejo I, el complejo CII y el complejo IV tienen una expresión disminuida significativa; en el caso del complejo II se puede decir que esta bajada ya empieza a ser notable a la concentración 1  $\mu$ M de CsA. Aunque en menor medida, los complejos III y V muestran un declive en la expresión en células que han sido tratadas con CsA

a 10  $\mu$ M. Para los ensayos de actividad enzimática, pudimos observar una clara bajada de la actividad tanto en el complejo I como en el complejo IV mitocondrial. Estos resultados sugerían que este inmunosupresor estaba afectando a complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, apoyando resultados ya descritos por otros autores. El grupo de Klaus *et al.* había descrito previamente que la CsA inhibía la síntesis de ATP en mitocondrias renales (Klaus *et al.*, 1985). Otros investigadores han observado como este inmunosupresor afecta los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial en el hígado de ratas tratadas crónicamente (120 días) con dosis de entre 5 mg a 20 mg por kg por día (Cruz Rodríguez L. *et al.*, 2007). Nuestra intención era ver si estos efectos observados en la mitocondria después de tratar con este inmunosupresor estaban directamente relacionados con alguno de sus receptores (CypA, CypB), concretamente por el segundo debido a su interacción con la subunidad b1 de la ATP sintasa mitocondrial (complejo V). En los resultados obtenidos para las células interferidas para estas dos ciclofilinas y tratadas con diferentes dosis de CsA podemos observar que la actividad enzimática del CI y en menor grado la del complejo IV están aumentadas respecto al control. Este aumento ocurre tanto en las células con CypA-RNAi como en las células con CypB-RNAi, produciéndose en mayor grado en el último caso. A nivel de expresión de proteína se puede observar que hay una sobreexpresión del complejo I y una bajada de expresión del complejo V en la interferencia de CypB pero no en la de CypA, datos que coincidirían y podrían explicar los resultados encontrados para sus respectivas actividades. En estos ensayos también pudimos observar que la expresión del complejo III está aumentada principalmente en la interferencia para CypA y en menor grado para la interferencia de CypB (figura 39B). Esto nos hace pensar que es posible que haya también una relación directa entre la ciclofilina A y la mitocondria. Un estudio más desarrollado podría elucidar la relación funcional entre CypA y el complejo III.

Por último los resultados obtenidos para la sobreexpresión de los mutantes de la actividad PPIasa de cada ciclofilina mostraron que solo la expresión y actividad del complejo I bajaba para la CypB mutada con respecto al control y al mutante de CypA. En todos los casos ensayados siempre observamos dicha bajada solamente en el complejo I.

Cabe destacar que todos estos resultados refuerzan claramente los efectos que han sido previamente observados en células y tejidos tratados con CsA. Sin embargo es la primera vez que se relaciona directamente -por medio de una interacción o interfiriendo estas ciclofilinas- a estas dos proteínas, localizadas en diferentes orgánulos, con la mitocondria. Hay que decir que dentro de la misma familia encontramos CypD, una ciclofilina específica de mitocondria, y que sería muy interesante estudiar directamente el silenciamiento de ésta en células renales para analizar la posible afectación de los complejos de la cadena respiratoria. También me gustaría destacar que en el laboratorio estamos actualmente realizando estos experimentos en células HK-2 interferidas para CypA, CypB (Figura 46) y CypD. La ventaja que en este caso presentan

estas interferencias es el silenciamiento total de cada una de las proteínas mediante el sistema de infección retroviral y uso de *hairpin*, hecho que creemos debería darnos resultados incluso más significativos que los presentados en este trabajo. Es razonable pensar que uno de los orgánulos más altamente afectados por el inmunosupresor CsA es la mitocondria y que se debería profundizar más en el estudio de sus receptores (ciclofilinas) y este orgánulo en concreto.

Para finalizar me gustaría incidir en que los resultados encontrados en nuestro laboratorio, ponen en evidencia que los efectos tóxicos causados por la CsA podrían estar causados por sus receptores (ciclofilinas). Esto se contradice con lo que hasta ahora se ha creído, es decir que todos los efectos se debían a la inhibición de la calcineurina en el túbulo proximal. Pensamos que la actividad PPIasa de estas proteínas tiene un papel muy importante tanto a nivel de estructura en la síntesis de otras proteínas como a nivel de direccionamiento de éstas a otros compartimentos. En este trabajo pensamos que se han elucidado algunos de los mecanismos causantes de los efectos tóxicos producidos por este fármaco aunque sin embargo, hay que destacar la interacción de CsA con sus receptores estaría inhibiendo muchos otros procesos moleculares que han de ser estudiados todavía. Creemos que la pérdida de localización de la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K debida al inmunosupresor y la inhibición de su actividad podrían estar causadas por un mal plegamiento de la proteína, ya que el inmunosupresor CsA interacciona con CypB perdiendo ésta su localización reticular impidiendo de esta forma su función tanto de chaperona como de plegamiento. Esto conllevaría a que CypB no podría ejercer su función reguladora y la bomba de Na/K no podría ejercer su función homeostática. Por consiguiente la interacción entre CypB y la subunidad  $\beta$  de la bomba Na/K podría explicar los efectos de hipercalcemia encontrados en pacientes que han sido tratados con el inmunosupresor CsA. Por otro lado también pensamos que quizás el inmunosupresor CsA inhiba la función de plegamiento y chaperona de las ciclofilinas, impidiendo así tanto el plegamiento correcto y el direccionamiento de algunas proteínas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, como la consecuente formación de algunos complejos y su posterior función mitocondrial.

CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES :

- CypA interacciona con la subunidad beta de la bomba sodio/potasio, con aldolasa B y con la proteína S tal y como demuestran ensayos de doble híbrido y *pull-down*.
- CypB interacciona con la subunidad beta de la bomba sodio/potasio y la ATP sintetasa b1 mitocondrial tal como demuestran ensayos de doble híbrido, *pull-down* y co-inmunoprecipitación.
- CypB colocaliza en el retículo endoplasmático con Na/K- $\beta$  de la línea celular del túbulo proximal renal humano HK-2.
- El tratamiento de células HK-2 con el fármaco CsA a dosis de 10 $\mu$ M provoca una deslocalización de CypA, CypB y Na/K- $\beta$ .
- La actividad enzimática Na/K-ATPasa disminuye significativamente en células tratadas con CsA y esta disminución es comparable a la que presentan células interferidas para CypB.
- El fármaco CsA perturba la expresión y la actividad de diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, dicha perturbación involucraría también a CypA y CypB, por lo que los efectos mitocondriales producidos por CsA no solo estarían mediados por la ciclofilina mitocondrial CypD.
- Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que las ciclofilinas estarían involucradas en los efectos nefrotóxicos que produce CsA. Los efectos nefrotóxicos causados por el tratamiento con CsA estarían mediados por vías alternativas a la clásicamente descrita, como es la inhibición de la calcineurina. Dichas vías estarían integradas por nuevos efectores tales como Na/K-ATPasa, ATP sintetasa, así como otras putativas dianas que en el futuro serán estudiadas.



BIBLIOGRAFÍA  
BIBLIOGRAFÍA





## A

- Abella, N., F. Schelcher, et al. (1994). "Flow cytometric analysis of bovine CD4 and CD8 lymphocytes: influence of blood sampling and processing methods." Res Vet Sci **57**(2): 163-71.
- Aker, S., P. Heering, et al. (2001). "Different effects of cyclosporine a and FK506 on potassium transport systems in MDCK cells." Exp Nephrol **9**(5): 332-40.
- Albani, J. R., M. Carpentier, et al. (2008). "Fluorescence characterization of the hydrophobic pocket of cyclophilin B." J Fluoresc **18**(1): 75-85.
- Alessiani, M., U. Cillo, et al. (1993). "Adverse effects of FK 506 overdosage after liver transplantation." Transplant Proc **25**(1 Pt 1): 628-34.
- Alfonso-Jaume, M. A., R. Mahimkar, et al. (2004). "Co-operative interactions between NFAT (nuclear factor of activated T cells) c1 and the zinc finger transcription factors Sp1/Sp3 and Egr-1 regulate MT1-MMP (membrane type 1 matrix metalloproteinase) transcription by glomerular mesangial cells." Biochem J **380**(Pt 3): 735-47.
- Allain, F., C. Boutillon, et al. (1995). "Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies." J Immunol Methods **178**(1): 113-20.
- Allain, F., A. Denys, et al. (1994). "Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line." J Biol Chem **269**(24): 16537-40.
- Allain, F., S. Durieux, et al. (1999). "Cyclophilin B binding to platelets supports calcium-dependent adhesion to collagen." Blood **94**(3): 976-83.
- Allain, F., C. Vanpouille, et al. (2002). "Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2714-9.
- Allison, A. C. and E. M. Eugui (1996). "Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF)." Clin Transplant **10**(1 Pt 2): 77-84.
- Altschuh, D. (2002). "Cyclosporin A as a model antigen: immunochemical and structural studies." J Mol Recognit **15**(5): 277-85.
- Anderson, R., M. J. Smit, et al. (1993). "Lysophospholipid-mediated inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-adenosine triphosphatase is a possible mechanism of immunosuppressive activity of cyclosporin A." Mol Pharmacol **44**(3): 605-14.
- Andreeva, L., A. Tanveer, et al. (1995). "Evidence for the involvement of a membrane-associated cyclosporin-A-binding protein in the Ca<sup>(2+)</sup>-activated inner membrane pore of heart mitochondria." Eur J Biochem **230**(3): 1125-32.
- Ansari, H., G. Greco, et al. (2002). "Cyclophilin A peptidyl-prolyl isomerase activity promotes ZPR1 nuclear export." Mol Cell Biol **22**(20): 6993-7003.
- Aragno, M., J. C. Cutrin, et al. (2003). "Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone." Kidney Int **64**(3): 836-43.
- Arber, S., K. H. Krause, et al. (1992). "s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin." J Cell Biol **116**(1): 113-25.
- Arevalo-Rodriguez, M., M. E. Cardenas, et al. (2000). "Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase." Embo J **19**(14): 3739-49.
- Arevalo-Rodriguez, M. and J. Heitman (2005). "Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryot Cell **4**(1): 17-29.
- Arevalo-Rodriguez, M., X. Pan, et al. (2004). "FKBP12 controls aspartate pathway flux in *Saccharomyces cerevisiae* to prevent toxic intermediate accumulation." Eukaryot Cell **3**(5): 1287-96.
- Arora, K., W. M. Gwinn, et al. (2005). "Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses." J Immunol **175**(1): 517-22.

## B

- Bagrov, Y. Y., N. B. Manusova, et al. (2005). "Endogenous digitalis-like ligands and Na/K-ATPase inhibition in experimental diabetes mellitus." Front Biosci **10**: 2257-62.
- Bakker, R. C., C. van Kooten, et al. (2002). "Renal tubular epithelial cell death and cyclosporin A." Nephrol Dial Transplant **17**(7): 1181-8.
- Balbach, J., C. Steegborn, et al. (1999). "A protein folding intermediate of ribonuclease T1 characterized at high resolution by 1D and 2D real-time NMR spectroscopy." J Mol Biol **285**(2): 829-42.
- Bambrick, L. L., K. Chandrasekaran, et al. (2006). "Cyclosporin A increases mitochondrial calcium uptake capacity in cortical astrocytes but not cerebellar granule neurons." J Bioenerg Biomembr **38**(1): 43-7.
- Basso, E., L. Fante, et al. (2005). "Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D." J Biol Chem **280**(19): 18558-61.
- Batlle, D. C., C. Gutterman, et al. (1986). "Effect of short-term cyclosporine A administration on urinary acidification." Clin Nephrol **25 Suppl 1**: S62-9.
- Beals, C. R., C. M. Sheridan, et al. (1997). "Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3." Science **275**(5308): 1930-4.
- Bennett, W. M. and J. P. Pulliam (1983). "Cyclosporine nephrotoxicity." Ann Intern Med **99**(6): 851-4.
- Benziane, B., S. Demaretz, et al. (2007). "NKCC2 surface expression in mammalian cells: down-regulation by novel interaction with aldolase B." J Biol Chem **282**(46): 33817-30.
- Bergsma, D. J., C. Eder, et al. (1991). "The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms." J Biol Chem **266**(34): 23204-14.
- Bers, D. M. and S. Despa (2006). "Cardiac myocytes Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> regulation in normal and failing hearts." J Pharmacol Sci **100**(5): 315-22.
- Berthoux, L., S. Sebastian, et al. (2005). "Cyclophilin A is required for TRIM5 $\alpha$ -mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14849-53.
- Bertos, N. R., A. H. Wang, et al. (2001). "Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation." Biochem Cell Biol **79**(3): 243-52.
- Bhattacharyya, T., A. N. Karnezis, et al. (1995). "Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70." J Biol Chem **270**(4): 1705-10.
- Bierer, B. E., S. L. Schreiber, et al. (1990). "Mechanisms of immunosuppression by FK506. Preservation of T cell transmembrane signal transduction." Transplantation **49**(6): 1168-70.
- Billich, A., G. Winkler, et al. (1997). "Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis." J Exp Med **185**(5): 975-80.
- Blair, J. T., A. W. Thomson, et al. (1982). "Toxicity of the immune suppressant cyclosporin A in the rat." J Pathol **138**(2): 163-78.
- Borel, J. F., C. Feurer, et al. (1976). "Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent." Agents Actions **6**(4): 468-75.
- Braaten, D. and J. Luban (2001). "Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells." Embo J **20**(6): 1300-9.
- Bram, R. J. and G. R. Crabtree (1994). "Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein." Nature **371**(6495): 355-8.
- Brazin, K. N., R. J. Mallis, et al. (2002). "Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1899-904.
- Breil, M. and P. Chariot (1999). "Muscle disorders associated with cyclosporine treatment." Muscle Nerve **22**(12): 1631-6.

- Breiman, A. and I. Camus (2002). "The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development." Transgenic Res **11**(4): 321-35.
- Brillantes, A. B., K. Ondrias, et al. (1994). "Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein." Cell **77**(4): 513-23.
- Brillantes, A. M., P. Allen, et al. (1992). "Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy." Circ Res **71**(1): 18-26.
- Brown, C. R., D. Y. Cui, et al. (2001). "Cyclophilin A mediates Vid22p function in the import of fructose-1,6-bisphosphatase into Vid vesicles." J Biol Chem **276**(51): 48017-26.
- Brown, E. J., M. W. Albers, et al. (1994). "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex." Nature **369**(6483): 756-8.
- Bukrinsky, M. I. (2002). "Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications." Trends Immunol **23**(7): 323-5.
- Burdmann, E. A., T. F. Andoh, et al. (1994). "Effects of oral magnesium supplementation on acute experimental cyclosporin nephrotoxicity." Nephrol Dial Transplant **9**(1): 16-21.
- Busauschina, A., P. Schnuelle, et al. (2004). "Cyclosporine nephrotoxicity." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 229S-233S.
- C**
- Calne, R. (2004). "Cyclosporine as a milestone in immunosuppression." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 13S-15S.
- Cameron, A. M., F. C. Nucifora, Jr., et al. (1997). "FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain." J Biol Chem **272**(44): 27582-8.
- Campa, M. J., M. Z. Wang, et al. (2003). "Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer." Cancer Res **63**(7): 1652-6.
- Cande, C., N. Vahsen, et al. (2004). "AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis." Oncogene **23**(8): 1514-21.
- Capano, M., S. Virji, et al. (2002). "Cyclophilin-A is involved in excitotoxin-induced caspase activation in rat neuronal B50 cells." Biochem J **363**(Pt 1): 29-36.
- Capasso, G., C. Rosati, et al. (1990). "The beneficial effect of atrial natriuretic peptide on cyclosporine nephrotoxicity." Am J Hypertens **3**(3): 204-10.
- Cardenas, M. E., E. Lim, et al. (1995). "Mutations that perturb cyclophilin A ligand binding pocket confer cyclosporin A resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **270**(36): 20997-1002.
- Carvalho da Costa, M., I. de Castro, et al. (2003). "Cyclosporin A tubular effects contribute to nephrotoxicity: role for Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions." Nephrol Dial Transplant **18**(11): 2262-8.
- Castigli, E., T. A. Chatila, et al. (1993). "A protein of the AP-1 family is a component of nuclear factor of activated T cells." J Immunol **150**(8 Pt 1): 3284-90.
- Castilho, R. F., O. Hansson, et al. (2000). "FK506 and cyclosporin A enhance the survival of cultured and grafted rat embryonic dopamine neurons." Exp Neurol **164**(1): 94-101.
- Castro, A. P., T. M. Carvalho, et al. (2003). "Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles." J Virol **77**(16): 9052-68.
- Cebrian, C., C. Areste, et al. (2001). "Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells." J Biol Chem **276**(31): 29410-9.
- Cha, J. H., S. K. Woo, et al. (2001). "Hydration status affects nuclear distribution of transcription factor tonicity responsive enhancer binding

- protein in rat kidney." J Am Soc Nephrol **12**(11): 2221-30.
- Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.
- Chelu, M. G., C. I. Danila, et al. (2004). "Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins." Trends Cardiovasc Med **14**(6): 227-34.
- Chen, S., M. Zhang, et al. (2008). "Oligo-microarray analysis reveals the role of cyclophilin A in drug resistance." Cancer Chemother Pharmacol **61**(3): 459-69.
- Chen, Z. J., M. Vetter, et al. (2004). "Cyclophilin A functions as an endogenous inhibitor for membrane-bound guanylate cyclase-A." Hypertension **44**(6): 963-8.
- Chiu, R., O. Rey, et al. (2003). "Effects of altered expression and localization of cyclophilin A on differentiation of p19 embryonic carcinoma cells." Cell Mol Neurobiol **23**(6): 929-43.
- Choi, K. J., Y. J. Piao, et al. (2007). "Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death." Cancer Res **67**(8): 3654-62.
- Chow, C. W., M. Rincon, et al. (1997). "Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway." Science **278**(5343): 1638-41.
- Chow, D. C. and J. G. Forte (1995). "Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases." J Exp Biol **198**(Pt 1): 1-17.
- Clarke, S. J., G. P. McStay, et al. (2002). "Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A." J Biol Chem **277**(38): 34793-9.
- Clipstone, N. A., D. F. Fiorentino, et al. (1994). "Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes." J Biol Chem **269**(42): 26431-7.
- Colgan, J., M. Asmal, et al. (2004). "Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in I $\kappa$ k." Immunity **21**(2): 189-201.
- Colgan, J., M. Asmal, et al. (2005). "Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine." J Immunol **174**(10): 6030-8.
- Colley, N. J., E. K. Baker, et al. (1991). "The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway." Cell **67**(2): 255-63.
- Cox, T. M. (1994). "Aldolase B and fructose intolerance." Faseb J **8**(1): 62-71.
- Crabtree, G. R. (2001). "Calcium, calcineurin, and the control of transcription." J Biol Chem **276**(4): 2313-6.
- Crompton, M., H. Ellinger, et al. (1988). "Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress." Biochem J **255**(1): 357-60.

## D

- Dahlback, B. (1991). "Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system." Thromb Haemost **66**(1): 49-61.
- Daum, G. (1985). "Lipids of mitochondria." Biochim Biophys Acta **822**(1): 1-42.
- De Ceuninck, F., F. Allain, et al. (2003). "High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: possible role as a proinflammatory mediator in arthritis." Arthritis Rheum **48**(8): 2197-206.
- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, et al. (2005). "Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes." Lab Invest **85**(1): 154-9.
- Demetris, A. J., B. Banner, et al. (1991). "Histopathology of human renal allograft rejection under FK 506: a comparison with cyclosporine." Transplant Proc **23**(1 Pt 2): 944-6.
- Demeule, M., A. Laplante, et al. (2000). "Association of cyclophilin A with renal brush border

- membranes: redistribution by cyclosporine A." Kidney Int **57**(4): 1590-8.
- Denys, A., F. Allain, et al. (1998). "Enhancing the effect of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of cyclosporine." Transplantation **65**(8): 1076-84.
- Deppe, C. E., P. J. Heering, et al. (2002). "Cyclosporine a and FK506 inhibit transcriptional activity of the human mineralocorticoid receptor: a cell-based model to investigate partial aldosterone resistance in kidney transplantation." Endocrinology **143**(5): 1932-41.
- Dieperink, H., P. P. Leyssac, et al. (1986). "Glomerulotubular function in cyclosporine A treated rats." Clin Nephrol **25 Suppl 1**: S70-4.
- Distant, D. A. and T. A. Gonwa (1993). "The kidney in liver transplantation." J Am Soc Nephrol **4**(2): 129-36.
- Dolinski, K., S. Muir, et al. (1997). "All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13093-8.
- Dolinski, K., C. Scholz, et al. (1997). "Functions of FKBP12 and mitochondrial cyclophilin active site residues in vitro and in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **8**(11): 2267-80.
- Doyle, V., S. Virji, et al. (1999). "Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress." Biochem J **341 ( Pt 1)**: 127-32.
- DuBell, W. H., W. J. Lederer, et al. (2000). "K(+) currents responsible for repolarization in mouse ventricle and their modulation by FK-506 and rapamycin." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(3): H886-97.
- Dubois, S., W. Shou, et al. (2003). "Distinct pathways involving the FK506-binding proteins 12 and 12.6 underlie IL-2-versus IL-15-mediated proliferation of T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14169-74.
- Duina, A. A., J. A. Marsh, et al. (1996). "Identification of two CyP-40-like cyclophilins in *Saccharomyces cerevisiae*, one of which is required for normal growth." Yeast **12**(10): 943-52.
- Dunn, C. J., A. J. Wagstaff, et al. (2001). "Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)I in organ transplantation." Drugs **61**(13): 1957-2016.
- ## E
- Eagles, P. A. and M. Iqbal (1973). "A comparative study of aldolase from human muscle and liver." Biochem J **133**(3): 429-39.
- Edwards, S. R. and T. J. Wandless (2007). "The rapamycin-binding domain of the protein kinase mammalian target of rapamycin is a destabilizing domain." J Biol Chem **282**(18): 13395-401.
- Endrich, M. M., P. Gehrig, et al. (1999). "Maturation-induced conformational changes of HIV-1 capsid protein and identification of two high affinity sites for cyclophilins in the C-terminal domain." J Biol Chem **274**(9): 5326-32.
- Esnault, S., Z. J. Shen, et al. (2006). "The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA stability in T lymphocytes." J Immunol **177**(10): 6999-7006.
- Etzkorn, F. A., Z. Y. Chang, et al. (1994). "Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of calcineurin by the cyclophilin.cyclosporin A complex." Biochemistry **33**(9): 2380-8.
- Ewart, H. S. and A. Klip (1995). "Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity." Am J Physiol **269**(2 Pt 1): C295-311.
- ## F
- Fejzo, J., F. A. Etzkorn, et al. (1994). "The mutant *Escherichia coli* F112W cyclophilin binds cyclosporin A in nearly identical

- conformation as human cyclophilin." Biochemistry **33**(19): 5711-20.
- Fellstrom, B. (2004). "Cyclosporine nephrotoxicity." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 220S-223S.
- Fernandes, F., D. S. Poole, et al. (2007). "Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B." Hepatology **46**(4): 1026-33.
- Ferrari, P., M. Ferrandi, et al. (2003). "Antihypertensive compounds that modulate the Na-K pump." Ann N Y Acad Sci **986**: 694-701.
- Ferrer-Martinez, A., A. Felipe, et al. (1996). "Effects of cyclosporine A on Na,K-ATPase expression in the renal epithelial cell line NBL-1." Kidney Int **50**(5): 1483-9.
- Ferrer-Martinez, A., A. Felipe, et al. (1999). "Lack of effect of clinical doses of cyclosporin A on erythrocyte Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity." Clin Sci (Lond) **97**(3): 283-90.
- Fesik, S. W., R. T. Gampe, Jr., et al. (1990). "Isotope-edited NMR of cyclosporin A bound to cyclophilin: evidence for a trans 9,10 amide bond." Science **250**(4986): 1406-9.
- Feske, S., J. M. Muller, et al. (1996). "Severe combined immunodeficiency due to defective binding of the nuclear factor of activated T cells in T lymphocytes of two male siblings." Eur J Immunol **26**(9): 2119-26.
- Fischer, G., H. Bang, et al. (1984). "[Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]." Biomed Biochim Acta **43**(10): 1101-11.
- Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, et al. (1989). "Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins." Nature **337**(6206): 476-8.
- Fischle, W., V. Kiermer, et al. (2001). "The emerging role of class II histone deacetylases." Biochem Cell Biol **79**(3): 337-48.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, et al. (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 359-62.
- Friedman, J., I. Weissman, et al. (1994). "An analysis of the expression of cyclophilin C reveals tissue restriction and an intriguing pattern in the mouse kidney." Am J Pathol **144**(6): 1247-56.
- Furusu, A., M. Miyazaki, et al. (1998). "Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis." Kidney Int **53**(6): 1760-8.
- ## G
- Gaido, M. L. and J. A. Cidlowski (1991). "Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B." J Biol Chem **266**(28): 18580-5.
- Galat, A. (1993). "Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins." Eur J Biochem **216**(3): 689-707.
- Galat, A. (2000). "Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes." Eur J Biochem **267**(16): 4945-59.
- Galat, A. (2003). "Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions." Curr Top Med Chem **3**(12): 1315-47.
- Galigniana, M. D., Y. Morishima, et al. (2004). "Cyclophilin-A is bound through its peptidylprolyl isomerase domain to the cytoplasmic dynein motor protein complex." J Biol Chem **279**(53): 55754-9.
- Galindo, M. F., J. Jordan, et al. (2003). "Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria." Br J Pharmacol **139**(4): 797-804.
- Garrett-Engele, P., B. Moilanen, et al. (1995). "Calcineurin, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase." Mol Cell Biol **15**(8): 4103-14.
- Garvin, J. L. and P. A. Ortiz (2003). "The role of reactive oxygen species in the regulation of

- tubular function." Acta Physiol Scand **179**(3): 225-32.
- Gary-Gouy, H., A. Sainz-Perez, et al. (2006). "Cyclosporin-A inhibits ERK phosphorylation in B cells by modulating the binding of Raf protein to Bcl2." Biochem Biophys Res Commun **344**(1): 134-9.
- Gaspari, F., M. F. Anedda, et al. (1997). "Prediction of cyclosporine area under the curve using a three-point sampling strategy after Neoral administration." J Am Soc Nephrol **8**(4): 647-52.
- Geering, K. (1991). "The functional role of the beta-subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase." FEBS Lett **285**(2): 189-93.
- Geering, K., A. Beggah, et al. (1996). "Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH2 terminus of the beta subunit with the alpha subunit." J Cell Biol **133**(6): 1193-204.
- Go, L. O., M. C. Moschella, et al. (1995). "Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure." J Clin Invest **95**(2): 888-94.
- Gold, B. G. (2000). "Neuroimmunophilin ligands: evaluation of their therapeutic potential for the treatment of neurological disorders." Expert Opin Investig Drugs **9**(10): 2331-42.
- Gomez, B., Jr. and N. C. Robinson (1999). "Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1." Biochemistry **38**(28): 9031-8.
- Gomez del Arco, P., S. Martinez-Martinez, et al. (2000). "A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp." J Biol Chem **275**(18): 13872-8.
- Gomi, S., M. Nakao, et al. (1999). "A cyclophilin B gene encodes antigenic epitopes recognized by HLA-A24-restricted and tumor-specific CTLs." J Immunol **163**(9): 4994-5004.
- Gonzalez-Cuadrado, S., C. Bustos, et al. (1996). "Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis." Clin Exp Immunol **106**(3): 518-22.
- Gothel, S. F. and M. A. Marahiel (1999). "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts." Cell Mol Life Sci **55**(3): 423-36.
- Gray, S. G. and T. J. Ekstrom (2001). "The human histone deacetylase family." Exp Cell Res **262**(2): 75-83.
- Grimm, S. and D. Brdiczka (2007). "The permeability transition pore in cell death." Apoptosis **12**(5): 841-55.
- Grinyo, J. M. and J. M. Cruzado (2004). "Cyclosporine nephrotoxicity." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 240S-242S.
- ## H
- Haendler, B., R. Hofer-Warbinek, et al. (1987). "Complementary DNA for human T-cell cyclophilin." Embo J **6**(4): 947-50.
- Haines, T. H. and N. A. Dencher (2002). "Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation." FEBS Lett **528**(1-3): 35-9.
- Hamilton, G. S. and J. P. Steiner (1998). "Immunophilins: beyond immunosuppression." J Med Chem **41**(26): 5119-43.
- Handschumacher, R. E., M. W. Harding, et al. (1984). "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A." Science **226**(4674): 544-7.
- Hanoulle, X., A. Melchior, et al. (2007). "Structural and functional characterization of the interaction between cyclophilin B and a heparin-derived oligosaccharide." J Biol Chem **282**(47): 34148-58.
- Hara, N., M. Tsuchiya, et al. (1987). "ADP-ribosylation of Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase in vitro suppresses the enzyme activity." Biochem Biophys Res Commun **148**(3): 989-94.
- Harding, M. W., A. Galat, et al. (1989). "A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase." Nature **341**(6244): 758-60.

- Harding, M. W., R. E. Handschumacher, et al. (1986). "Isolation and amino acid sequence of cyclophilin." J Biol Chem **261**(18): 8547-55.
- He, L. and J. J. Lemasters (2002). "Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?" FEBS Lett **512**(1-3): 1-7.
- Healy, E., M. Dempsey, et al. (1998). "Apoptosis and necrosis: mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line." Kidney Int **54**(6): 1955-66.
- Heering, P., K. Ivens, et al. (1998). "Distal tubular acidosis induced by FK506." Clin Transplant **12**(5): 465-71.
- Heitman, J., N. R. Movva, et al. (1991). "FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1948-52.
- Helekar, S. A. and J. Patrick (1997). "Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5432-7.
- Hesselink, D. A., P. J. Smak Gregoor, et al. (2004). "The use of cyclosporine in renal transplantation." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 99S-106S.
- Hong, F., J. Lee, et al. (2004). "Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity." Biochem Biophys Res Commun **316**(4): 1073-80.
- Hong, F., J. Lee, et al. (2002). "Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity." Faseb J **16**(12): 1633-5.
- Hori, O., F. Ichinoda, et al. (2002). "Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease." J Cell Biol **157**(7): 1151-60.
- Horowitz, D. S., E. J. Lee, et al. (2002). "A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing." Embo J **21**(3): 470-80.
- Howard, B. A., R. Furumai, et al. (2005). "Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth in vivo." Cancer Res **65**(19): 8853-60.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, et al. (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." Nature **425**(6959): 686-91.
- Huse, M., Y. G. Chen, et al. (1999). "Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12." Cell **96**(3): 425-36.
- Husi, H., M. A. Luyten, et al. (1994). "Mapping of the immunophilin-immunosuppressant site of interaction on calcineurin." J Biol Chem **269**(19): 14199-204.
- I**
- Ishii, N., K. Watashi, et al. (2006). "Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication." J Virol **80**(9): 4510-20.
- Islam, M., J. F. Burke, Jr., et al. (2001). "Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction." Kidney Int **59**(2): 498-506.
- Ivery, M. T. (2000). "Immunophilins: switched on protein binding domains?" Med Res Rev **20**(6): 452-84.
- Iwai, N. and T. Inagami (1990). "Molecular cloning of a complementary DNA to rat cyclophilin-like protein mRNA." Kidney Int **37**(6): 1460-5.
- J**
- Jain, J., C. Loh, et al. (1995). "Transcriptional regulation of the IL-2 gene." Curr Opin Immunol **7**(3): 333-42.
- Jeon, S. H., Y. J. Piao, et al. (2005). "Prednisolone suppresses cyclosporin A-induced apoptosis but not cell cycle arrest in MDCK cells." Arch Biochem Biophys **435**(2): 382-92.

- Jin, Z. G., A. O. Lungu, et al. (2004). "Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1186-91.
- Jin, Z. G., M. G. Melaragno, et al. (2000). "Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress." Circ Res **87**(9): 789-96.
- Joseph, J. D., E. S. Yeh, et al. (2003). "The peptidyl-prolyl isomerase Pin1." Prog Cell Cycle Res **5**: 477-87.
- Josephine, A., G. Amudha, et al. (2007). "Oxidative and nitrosative stress mediated renal cellular damage induced by cyclosporine A: role of sulphated polysaccharides." Biol Pharm Bull **30**(7): 1254-9.
- Joshi, M. S., M. W. Julian, et al. (2006). "Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia." Am J Respir Crit Care Med **173**(9): 999-1007.
- K**
- Kagan, V. E., G. G. Borisenko, et al. (2004). "Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine." Free Radic Biol Med **37**(12): 1963-85.
- Kahan, B. D. (1989). "The impact of cyclosporine on the practice of renal transplantation." Transplant Proc **21**(3 Suppl 1): 63-9.
- Kainer, D. B. and P. A. Doris (2000). "Cyclophilin B expression in renal proximal tubules of hypertensive rats." Hypertension **35**(4): 958-64.
- Kallen, J., C. Spitzfaden, et al. (1991). "Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy." Nature **353**(6341): 276-9.
- Kamel, K. S., J. H. Ethier, et al. (1992). "Studies to determine the basis for hyperkalemia in recipients of a renal transplant who are treated with cyclosporine." J Am Soc Nephrol **2**(8): 1279-84.
- Kay, J. E. (1996). "Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases." Biochem J **314** ( Pt 2): 361-85.
- Ke, H. and Q. Huai (2003). "Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants." Biochem Biophys Res Commun **311**(4): 1095-102.
- Ke, H., D. Mayrose, et al. (1993). "Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3324-8.
- Ke, H., Y. Zhao, et al. (1993). "Crystal structure of murine cyclophilin C complexed with immunosuppressive drug cyclosporin A." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11850-4.
- Ke, H. M., L. D. Zydowsky, et al. (1991). "Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9483-7.
- Khanna, A. K., V. R. Cairns, et al. (1999). "Transforming growth factor (TGF)-beta mimics and anti-TGF-beta antibody abrogates the in vivo effects of cyclosporine: demonstration of a direct role of TGF-beta in immunosuppression and nephrotoxicity of cyclosporine." Transplantation **67**(6): 882-9.
- Khanna, A. K., M. S. Plummer, et al. (2004). "Anti-transforming growth factor antibody at low but not high doses limits cyclosporine-mediated nephrotoxicity without altering rat cardiac allograft survival: potential of therapeutic applications." Circulation **110**(25): 3822-9.
- Kim, H., W. J. Kim, et al. (2005). "Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages." Clin Immunol **116**(3): 217-24.
- Kim, H. J., K. H. Chong, et al. (2004). "Identification of cyclophilin A as a CD99-binding protein by yeast two-hybrid screening." Immunol Lett **95**(2): 155-9.
- Kino, T., N. Inamura, et al. (1987). "Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro." Transplant Proc **19**(5 Suppl 6): 36-9.
- Klahr, S., S. Ishidoya, et al. (1995). "Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy." Am J Kidney Dis **26**(1): 141-6.

- Klappa, P., R. B. Freedman, et al. (1995). "Protein disulphide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation." Eur J Biochem **232**(3): 755-64.
- Knepper, M. A., G. H. Kim, et al. (2003). "Renal tubule sodium transporter abundance profiling in rat kidney: response to aldosterone and variations in NaCl intake." Ann N Y Acad Sci **986**: 562-9.
- Kootstra, N. A., C. Munk, et al. (2003). "Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1298-303.
- Koster, J. C., G. Blanco, et al. (1995). "A cytoplasmic region of the Na,K-ATPase alpha-subunit is necessary for specific alpha/alpha association." J Biol Chem **270**(24): 14332-9.
- Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, et al. (2001). "Mitochondrial permeability transition and oxidative stress." FEBS Lett **495**(1-2): 12-5.
- Kowaltowski, A. J. and A. E. Vercesi (1999). "Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress." Free Radic Biol Med **26**(3-4): 463-71.
- Krummrei, U., R. Bang, et al. (1995). "Cyclophilin-A is a zinc-dependent DNA binding protein in macrophages." FEBS Lett **371**(1): 47-51.
- Kunz, J. and M. N. Hall (1993). "Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression." Trends Biochem Sci **18**(9): 334-8.
- L**
- Lally, C., E. Healy, et al. (1999). "Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells." Kidney Int **56**(4): 1254-7.
- Lane-Guermonprez, L., Y. Morot-Gaudry-Talarmain, et al. (2005). "Synapsin associates with cyclophilin B in an ATP- and cyclosporin A-dependent manner." J Neurochem **93**(6): 1401-11.
- Langer, T. and W. Neupert (1991). "Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins." Curr Top Microbiol Immunol **167**: 3-30.
- Laughery, M. D., M. L. Todd, et al. (2003). "Mutational analysis of alpha-beta subunit interactions in the delivery of Na,K-ATPase heterodimers to the plasma membrane." J Biol Chem **278**(37): 34794-803.
- Le Hir, M., Q. Su, et al. (1995). "In situ detection of cyclosporin A: evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins." Lab Invest **73**(5): 727-33.
- Lea, J. P., J. M. Sands, et al. (1994). "Evidence that the inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by FK506 involves calcineurin." Kidney Int **46**(3): 647-52.
- Lee, M. and J. Park (2006). "Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression." Mol Cells **22**(1): 1-7.
- Leis, J. A., L. K. Bekar, et al. (2005). "Potassium homeostasis in the ischemic brain." Glia **50**(4): 407-16.
- Li, C., G. Crambert, et al. (2003). "Na,K-ATPase alpha-beta subunit interactions in the transmembrane domain." Ann N Y Acad Sci **986**: 226-8.
- Li, C., S. W. Lim, et al. (2004). "Chronic cyclosporine nephrotoxicity: new insights and preventive strategies." Yonsei Med J **45**(6): 1004-16.
- Li, M., Q. Zhai, et al. (2006). "Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147." Cancer **106**(10): 2284-94.
- Liang, M., J. Tian, et al. (2007). "Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase." J Biol Chem **282**(14): 10585-93.
- Liao, D. F., Z. G. Jin, et al. (2000). "Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **275**(1): 189-96.
- Lin, T. Y. and M. Emerman (2006). "Cyclophilin A interacts with diverse lentiviral capsids." Retrovirology **3**: 70.

- Liu, J. (2005). "Ouabain-induced endocytosis and signal transduction of the Na/K-ATPase." Front Biosci **10**: 2056-63.
- Liu, J., Q. Dai, et al. (2003). "Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response." Mol Cancer Res **1**(12): 892-902.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., et al. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." Cell **66**(4): 807-15.
- Liu, J., M. Liang, et al. (2005). "Ouabain-induced endocytosis of the plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells requires caveolin-1." Kidney Int **67**(5): 1844-54.
- Liu, Y., J. Jiang, et al. (2006). "A fluorescence polarization-based assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerase cyclophilin A." Anal Biochem **356**(1): 100-7.
- Lloveras, J. (2004). "Use of cyclosporine in renal transplantation." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 107S-113S.
- Lopez-Rodriguez, C., C. L. Antos, et al. (2004). "Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2392-7.
- Lorenz, M. C. and J. Heitman (1995). "TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin." J Biol Chem **270**(46): 27531-7.
- Luban, J. (2007). "Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **81**(3): 1054-61.
- M**
- Malik, N., V. A. Canfield, et al. (1996). "Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit." J Biol Chem **271**(37): 22754-8.
- Marakhova, II, A. E. Ivanova, et al. (1999). "Functional expression of the Na/K pump is controlled via a cyclosporin A-sensitive signalling pathway in activated human lymphocytes." FEBS Lett **456**(2): 285-9.
- Marakhova, I., I. Karitskaya, et al. (2005). "Interleukin-2-dependent regulation of Na/K pump in human lymphocytes." FEBS Lett **579**(13): 2773-80.
- Mardini, M., A. S. Mihailidou, et al. (2001). "Cyclosporine and FK506 differentially regulate the sarcolemmal Na(+)-K(+) pump." J Pharmacol Exp Ther **297**(2): 804-10.
- Mariller, C., F. Allain, et al. (1996). "Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form." Biochim Biophys Acta **1293**(1): 31-8.
- Marks, A. R. (1996). "Cellular functions of immunophilins." Physiol Rev **76**(3): 631-49.
- Marks, A. R. (2001). "Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death." J Mol Cell Cardiol **33**(4): 615-24.
- Marks, W. H., M. W. Harding, et al. (1991). "The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues." Transplantation **52**(2): 340-5.
- Marques-Santos, L. F., V. M. Coqueiro, et al. (2006). "Cyclosporin A does not protect the disruption of the inner mitochondrial membrane potential induced by potassium ionophores in intact K562 cells." Cell Biol Int **30**(3): 197-204.
- Massague, J. (1990). "Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors." J Biol Chem **265**(35): 21393-6.
- Matsuda, S. and S. Koyasu (2000). "Mechanisms of action of cyclosporine." Immunopharmacology **47**(2-3): 119-25.
- Matsumori, Y., S. M. Hong, et al. (2005). "Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **25**(7): 899-910.
- Mauri, P., A. Scarpa, et al. (2005). "Identification of proteins released by pancreatic cancer cells by multidimensional protein identification technology: a strategy for identification of novel cancer markers." Faseb J **19**(9): 1125-7.

- McDonough, A. A., K. Geering, et al. (1990). "The sodium pump needs its beta subunit." Faseb J **4**(6): 1598-605.
- Melchior, A., A. Denys, et al. (2008). "Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases." Exp Cell Res **314**(3): 616-28.
- Mercer, R. W., J. W. Schneider, et al. (1986). "Rat-brain Na,K-ATPase beta-chain gene: primary structure, tissue-specific expression, and amplification in ouabain-resistant HeLa C+ cells." Mol Cell Biol **6**(11): 3884-90.
- Meseguer, A. and J. F. Catterall (1987). "Mouse kidney androgen-regulated protein messenger ribonucleic acid is expressed in the proximal convoluted tubules." Mol Endocrinol **1**(8): 535-41.
- Meseguer, A. and J. F. Catterall (1990). "Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control." Mol Endocrinol **4**(8): 1240-8.
- Meseguer, A. and J. F. Catterall (1992). "Effects of pituitary hormones on the cell-specific expression of the KAP gene." Mol Cell Endocrinol **89**(1-2): 153-62.
- Meseguer, A., C. S. Watson, et al. (1989). "Nucleotide sequence of kidney androgen-regulated protein mRNA and its cell-specific expression in Tfm/Y mice." Mol Endocrinol **3**(6): 962-7.
- Meunier, L., Y. K. Usherwood, et al. (2002). "A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins." Mol Biol Cell **13**(12): 4456-69.
- Mezzano, S. A., M. Ruiz-Ortega, et al. (2001). "Angiotensin II and renal fibrosis." Hypertension **38**(3 Pt 2): 635-8.
- Mihatsch, M. J., G. Thiel, et al. (1986). "Brief review of the morphology of cyclosporin nephropathy." Contrib Nephrol **51**: 156-61.
- Mikol, V., J. Kallen, et al. (1993). "X-ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 Å resolution." J Mol Biol **234**(4): 1119-30.
- Mikol, V., J. Kallen, et al. (1994). "The X-ray structure of (MeBm2f)1-cyclosporin complexed with cyclophilin A provides an explanation for its anomalously high immunosuppressive activity." Protein Eng **7**(5): 597-603.
- Mikol, V., J. Kallen, et al. (1994). "X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex: comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5183-6.
- Mita, M. M., A. Mita, et al. (2003). "The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer." Cancer Biol Ther **2**(4 Suppl 1): S169-77.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, et al. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell **93**(2): 215-28.
- Montague, J. W., M. L. Gaido, et al. (1994). "A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity." J Biol Chem **269**(29): 18877-80.
- Montague, J. W., F. M. Hughes, Jr., et al. (1997). "Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis." J Biol Chem **272**(10): 6677-84.
- Moolenaar, W. H., L. H. Defize, et al. (1986). "Ionic signalling by growth factor receptors." J Exp Biol **124**: 359-73.
- Morris, S. M., Jr., D. Kepka-Lenhart, et al. (1992). "Specific disruption of renal function and gene transcription by cyclosporin A." J Biol Chem **267**(19): 13768-71.
- Morse, D. E. and B. L. Horecker (1968). "The mechanism of action of aldolases." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **31**: 125-81.
- Munzer, J. S., S. E. Daly, et al. (1994). "Tissue- and isoform-specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase." J Biol Chem **269**(24): 16668-76.

Musaro, A., K. J. McCullagh, et al. (1999). "IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1." Nature **400**(6744): 581-5.

Myers, B. D., J. Ross, et al. (1984). "Cyclosporine-associated chronic nephropathy." N Engl J Med **311**(11): 699-705.

## N

Nagata, T., H. Kishi, et al. (2000). "Possible involvement of cyclophilin B and caspase-activated deoxyribonuclease in the induction of chromosomal DNA degradation in TCR-stimulated thymocytes." J Immunol **165**(8): 4281-9.

Nahreini, P., A. R. Hovland, et al. (2001). "Effects of altered cyclophilin A expression on growth and differentiation of human and mouse neuronal cells." Cell Mol Neurobiol **21**(1): 65-79.

Nakagawa, M., N. Sakamoto, et al. (2004). "Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A." Biochem Biophys Res Commun **313**(1): 42-7.

Narita, I., W. A. Border, et al. (1995). "Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis." Lab Invest **72**(1): 17-24.

Nieminen, A. L., A. M. Byrne, et al. (1997). "Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species." Am J Physiol **272**(4 Pt 1): C1286-94.

Nisole, S., C. Lynch, et al. (2004). "A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13324-8.

## O

Obata, Y., K. Yamamoto, et al. (2005). "Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3." J Biol Chem **280**(18): 18355-60.

Okadome, T., E. Oeda, et al. (1996). "Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth

factor-beta type I receptor in vivo." J Biol Chem **271**(36): 21687-90.

Okamura, H., C. Garcia-Rodriguez, et al. (2004). "A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1." Mol Cell Biol **24**(10): 4184-95.

Olyaei, A. J., A. M. de Mattos, et al. (1999). "Immunosuppressant-induced nephropathy: pathophysiology, incidence and management." Drug Saf **21**(6): 471-88.

Ou, W. B., W. Luo, et al. (2001). "Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding." Protein Sci **10**(11): 2346-53.

Ouar, Z., E. Sole, et al. (1998). "Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immortalized mouse proximal tubule cells. Technical note." Kidney Int **53**(1): 59-66.

## P

Pan, F., Z. Ye, et al. (2004). "Myocyte enhancer factor 2 mediates calcium-dependent transcription of the interleukin-2 gene in T lymphocytes: a calcium signaling module that is distinct from but collaborates with the nuclear factor of activated T cells (NFAT)." J Biol Chem **279**(15): 14477-80.

Pap, T. (2005). "Cyclophilins in rheumatoid arthritis--stepping into an undiscovered country?" Clin Immunol **116**(3): 199-201.

Paradies, G., G. Petrosillo, et al. (2002). "Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage." Gene **286**(1): 135-41.

Parra, T., G. de Arriba, et al. (1998). "Cyclosporine A nephrotoxicity: role of thromboxane and reactive oxygen species." J Lab Clin Med **131**(1): 63-70.

Parra, T., G. de Arriba, et al. (1998). "Cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats: effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity." Transplantation **66**(10): 1325-9.

Peng, S. L., A. J. Gerth, et al. (2001). "NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation." Immunity **14**(1): 13-20.

- Perez de Hornedo, J., G. de Arriba, et al. (2007). "[Cyclosporin A causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in renal tubular cells]." *Nefrologia* **27**(5): 565-73.
- Perez, P. J., J. Ramos-Franco, et al. (1997). "Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes." *J Biol Chem* **272**(38): 23961-9.
- Perico, N., A. Detcheva, et al. (1996). "Cyclosporine induces glomerulosclerosis: three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant." *Kidney Int* **49**(5): 1283-8.
- Periyasamy, S. M., J. Liu, et al. (2005). "Salt loading induces redistribution of the plasmalemmal Na/K-ATPase in proximal tubule cells." *Kidney Int* **67**(5): 1868-77.
- Pflugl, G., J. Kallen, et al. (1993). "X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex." *Nature* **361**(6407): 91-4.
- Ponticelli, C., A. Tarantino, et al. (2004). "From cyclosporine to the future." *Transplant Proc* **36**(2 Suppl): 557S-560S.
- Price, E. R., M. Jin, et al. (1994). "Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 3931-5.
- Price, E. R., L. D. Zydowsky, et al. (1991). "Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(5): 1903-7.
- Puri, S., B. S. Magenheimer, et al. (2004). "Polycystin-1 activates the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway." *J Biol Chem* **279**(53): 55455-64.
- Pushkarsky, T., V. Yurchenko, et al. (2007). "CD147 stimulates HIV-1 infection in a signal-independent fashion." *Biochem Biophys Res Commun* **363**(3): 495-9.
- Pushkarsky, T., G. Zybarth, et al. (2001). "CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6360-5.
- Qiu, J., Z. Tu, et al. (2006). "Interference of cyclosporine on glucose metabolism: potential role in chronic transplantation kidney fibrosis." *Transplant Proc* **38**(7): 2065-8.

## R

- Rabelink, T. J., J. J. Zwaginga, et al. (1994). "Thrombosis and hemostasis in renal disease." *Kidney Int* **46**(2): 287-96.
- Radi, R., J. F. Turrens, et al. (1991). "Detection of catalase in rat heart mitochondria." *J Biol Chem* **266**(32): 22028-34.
- Rajasekaran, S. A., J. Gopal, et al. (2003). "Expression of Na,K-ATPase beta-subunit in transformed MDCK cells increases the translation of the Na,K-ATPase alpha-subunit." *Ann N Y Acad Sci* **986**: 652-4.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 707-47.
- Rassow, J., K. Mohrs, et al. (1995). "Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2654-62.
- Ratajczak, T., A. Carrello, et al. (1993). "The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59)." *J Biol Chem* **268**(18): 13187-92.
- Ratajczak, T., J. Hlaing, et al. (1990). "Isolation of untransformed bovine estrogen receptor without molybdate stabilization." *J Steroid Biochem* **35**(5): 543-53.
- Raymond, M. A., L. Mollica, et al. (2003). "Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D." *Faseb J* **17**(3): 515-7.
- Reddy, P. A. and C. D. Atreya (1999). "Identification of simian cyclophilin A as a calreticulin-binding protein in yeast two-hybrid screen and demonstration of cyclophilin A interaction with calreticulin." *Int J Biol Macromol* **25**(4): 345-51.

## Q

- Reinhardt, J., A. V. Grishin, et al. (2000). "Differential localization of human nongastric H(+)-K(+)-ATPase ATP1AL1 in polarized renal epithelial cells." Am J Physiol Renal Physiol **279**(3): F417-25.
- Reynolds, N. J. and W. I. Al-Daraji (2002). "Calcineurin inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and applications in dermatology." Clin Exp Dermatol **27**(7): 555-61.
- Rezende, S. M., R. E. Simmonds, et al. (2004). "Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex." Blood **103**(4): 1192-201.
- Riede, U. N., H. Uhl, et al. (1975). "[The fructose induced "glycogenesis". I. Ultrastructural and morphometric analysis of rat hepatocytes 7 days after fructose overload (author's transl)]." Beitr Pathol **154**(1): 63-82.
- Rivard, C. J., N. E. Almeida, et al. (2005). "The gamma subunit of Na/K-ATPase: an exceptional, small transmembrane protein." Front Biosci **10**: 2604-10.
- Robida, J. M., H. B. Nelson, et al. (2007). "Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro." J Virol **81**(11): 5829-40.
- Rodriguez, L. C., C. R. Araujo, et al. (2007). "Hepatotoxic effect of cyclosporin A in the mitochondrial respiratory chain." J Appl Toxicol **27**(4): 310-7.
- Roy, M. K., M. Takenaka, et al. (2006). "Apoptosis, necrosis and cell proliferation-inhibition by cyclosporine A in U937 cells (a human monocytic cell line)." Pharmacol Res **53**(3): 293-302.
- Rozengurt, E. (1980). "Stimulation of Na influx, Na-K pump activity and DNA synthesis in quiescent cultured cells." Adv Enzyme Regul **19**: 61-85.
- Rusnak, F. and P. Mertz (2000). "Calcineurin: form and function." Physiol Rev **80**(4): 1483-521.
- Rycyzyn, M. A. and C. V. Clevenger (2002). "The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6790-5.
- Rycyzyn, M. A., S. C. Reilly, et al. (2000). "Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation." Mol Endocrinol **14**(8): 1175-86.
- Ryffel, B., G. Woerly, et al. (1991). "Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues." Immunology **72**(3): 399-404.
- ## S
- Saba, H., I. Batinic-Haberle, et al. (2007). "Manganese porphyrin reduces renal injury and mitochondrial damage during ischemia/reperfusion." Free Radic Biol Med **42**(10): 1571-8.
- Saez, D. E. and J. C. Slebe (2000). "Subcellular localization of aldolase B." J Cell Biochem **78**(1): 62-72.
- Saini, M. and M. J. Potash (2006). "Novel activities of cyclophilin A and cyclosporin A during HIV-1 infection of primary lymphocytes and macrophages." J Immunol **177**(1): 443-9.
- Sarro, E., O. Tornavaca, et al. (2008). "Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death." Kidney Int **73**(1): 77-85.
- Sayah, D. M. and J. Luban (2004). "Selection for loss of Ref1 activity in human cells releases human immunodeficiency virus type 1 from cyclophilin A dependence during infection." J Virol **78**(21): 12066-70.
- Schagger, H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 154-9.
- Schiene-Fischer, C. and C. Yu (2001). "Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases." FEBS Lett **495**(1-2): 1-6.
- Schmelzle, T. and M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." Cell **103**(2): 253-62.

- Schmid, F. X. (1993). "Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions." Annu Rev Biophys Biomol Struct **22**: 123-42.
- Schmidt, U., U. C. Dubach, et al. (1975). "Metabolic patterns in various structures of the rat nephron. The distribution of enzymes of carbohydrate metabolism." Curr Probl Clin Biochem **4**: 22-32.
- Schneider, H., N. Charara, et al. (1994). "Human cyclophilin C: primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins." Biochemistry **33**(27): 8218-24.
- Schreiber, S. L. and G. R. Crabtree (1992). "The mechanism of action of cyclosporin A and FK506." Immunol Today **13**(4): 136-42.
- Schreiber, S. L., J. Liu, et al. (1991). "Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways." Transplant Proc **23**(6): 2839-44.
- Sebastian, S., E. Sokolskaja, et al. (2006). "Arsenic counteracts human immunodeficiency virus type 1 restriction by various TRIM5 orthologues in a cell type-dependent manner." J Virol **80**(4): 2051-4.
- Sehgal, S. N. (1998). "Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression." Clin Biochem **31**(5): 335-40.
- Serkova, N., A. Brand, et al. (1996). "Evaluation of the effects of immunosuppressants on neuronal and glial cells in vitro by multinuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochim Biophys Acta **1314**(1-2): 93-104.
- Serkova, N., J. Klawitter, et al. (2003). "Organ-specific response to inhibition of mitochondrial metabolism by cyclosporine in the rat." Transpl Int **16**(10): 748-55.
- Serkova, N. J., U. Christians, et al. (2004). "Biochemical mechanisms of cyclosporine neurotoxicity." Mol Interv **4**(2): 97-107.
- Shaw, A. S. and M. L. Dustin (1997). "Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation." Immunity **6**(4): 361-9.
- Sherry, B. and A. Cerami (1991). "Small cytokine superfamily." Curr Opin Immunol **3**(1): 56-60.
- Sherry, B., G. Zybarth, et al. (1998). "Role of cyclophilin A in the uptake of HIV-1 by macrophages and T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1758-63.
- Shihab, F. S., T. F. Andoh, et al. (1997). "Sodium depletion enhances fibrosis and the expression of TGF-beta1 and matrix proteins in experimental chronic cyclosporine nephropathy." Am J Kidney Dis **30**(1): 71-81.
- Shihab, F. S., W. M. Bennett, et al. (2003). "Nitric oxide modulates vascular endothelial growth factor and receptors in chronic cyclosporine nephrotoxicity." Kidney Int **63**(2): 522-33.
- Shihab, F. S., W. M. Bennett, et al. (2001). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity." Transplantation **72**(1): 164-8.
- Shihab, F. S., W. M. Bennett, et al. (2002). "Pirfenidone treatment decreases transforming growth factor-beta1 and matrix proteins and ameliorates fibrosis in chronic cyclosporine nephrotoxicity." Am J Transplant **2**(2): 111-9.
- Shiino, A., M. Matsuda, et al. (1998). "Poor recovery of mitochondrial redox state in CA1 after transient forebrain ischemia in gerbils." Stroke **29**(11): 2421-4; discussion 2425.
- Shull, G. E., J. Greeb, et al. (1986). "Molecular cloning of three distinct forms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit from rat brain." Biochemistry **25**(25): 8125-32.
- Siekierka, J. J., S. H. Hung, et al. (1989). "A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin." Nature **341**(6244): 755-7.
- Sigal, N. H., F. Dumont, et al. (1991). "Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A?" J Exp Med **173**(3): 619-28.

- Sigal, N. H. and F. J. Dumont (1992). "Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction." Annu Rev Immunol **10**: 519-60.
- Skou, J. C. (1990). "The fourth Datta lecture. The energy coupled exchange of Na<sup>+</sup> for K<sup>+</sup> across the cell membrane. The Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-pump." FEBS Lett **268**(2): 314-24.
- Smith, T., L. R. Ferreira, et al. (1995). "Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate vesicles. A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **270**(31): 18323-8.
- Sokolskaja, E., L. Berthou, et al. (2006). "Cyclophilin A and TRIM5 $\alpha$  independently regulate human immunodeficiency virus type 1 infectivity in human cells." J Virol **80**(6): 2855-62.
- Sokolskaja, E. and J. Luban (2006). "Cyclophilin, TRIM5, and innate immunity to HIV-1." Curr Opin Microbiol **9**(4): 404-8.
- Sokolskaja, E., D. M. Sayah, et al. (2004). "Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity." J Virol **78**(23): 12800-8.
- Sole, E., R. Calvo, et al. (1994). "Thyroid hormone controls the cell-specific expression of the kidney androgen-regulated protein gene in S3 mouse kidney cells." Endocrinology **135**(5): 2120-9.
- Sole, E., R. Calvo, et al. (1996). "Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney." Mol Cell Endocrinol **119**(2): 147-59.
- Soler, M., O. Tornavaca, et al. (2002). "Hormone-specific regulation of the kidney androgen-regulated gene promoter in cultured mouse renal proximal-tubule cells." Biochem J **366**(Pt 3): 757-66.
- Somarelli, J. A. and R. J. Herrera (2007). "Evolution of the 12 kDa FK506-binding protein gene." Biol Cell **99**(6): 311-21.
- Spik, G., B. Haendler, et al. (1991). "A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP)." J Biol Chem **266**(17): 10735-8.
- Steinmann, B., P. Bruckner, et al. (1991). "Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase." J Biol Chem **266**(2): 1299-303.
- Stoddard, B. L. and K. E. Flick (1996). "Calcineurin-immunosuppressor complexes." Curr Opin Struct Biol **6**(6): 770-5.
- Sugi, K., M. W. Musch, et al. (2001). "Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by interferon gamma down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function." Gastroenterology **120**(6): 1393-403.
- Sutherland, D. E., M. Strand, et al. (1984). "Comparison of azathioprine-antilymphocyte globulin versus cyclosporine in renal transplantation." Am J Kidney Dis **3**(6): 456-61.
- Suzuki, S., T. Oka, et al. (1987). "Biochemical mechanisms underlying cyclosporine-induced nephrotoxicity. Effect of concomitant administration of prednisolone." Transplantation **44**(3): 363-8.
- ## T
- Tabata, Y., K. Takano, et al. (2007). "Vaticanol B, a resveratrol tetramer, regulates endoplasmic reticulum stress and inflammation." Am J Physiol Cell Physiol **293**(1): C411-8.
- Takeuchi, H., A. Buckler-White, et al. (2007). "Vif counteracts a cyclophilin A-imposed inhibition of simian immunodeficiency viruses in human cells." J Virol **81**(15): 8080-90.
- Takeyasu, K., T. Kawase, et al. (2003). "Intermolecular Interaction between Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit and glycogen phosphorylase." Ann N Y Acad Sci **986**: 522-4.
- Tanveer, A., S. Virji, et al. (1996). "Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress." Eur J Biochem **238**(1): 166-72.
- Tegeeder, I., A. Schumacher, et al. (1997). "Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis." J Clin Immunol **17**(5): 380-6.

- Teixido, N., M. Soler, et al. (2006). "CCAAT/enhancer binding protein-mediated role of thyroid hormone in the developmental expression of the kidney androgen-regulated protein gene in proximal convoluted tubules." Mol Endocrinol **20**(2): 389-404.
- Tendron, A., S. Decramer, et al. (2003). "Cyclosporin A administration during pregnancy induces a permanent nephron deficit in young rabbits." J Am Soc Nephrol **14**(12): 3188-96.
- Thali, M., A. Bukovsky, et al. (1994). "Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 363-5.
- Theriault, Y., T. M. Logan, et al. (1993). "Solution structure of the cyclosporin A/cyclophilin complex by NMR." Nature **361**(6407): 88-91.
- Timmerman, L. A., N. A. Clipstone, et al. (1996). "Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression." Nature **383**(6603): 837-40.
- Towers, G. J., T. Hatzioannou, et al. (2003). "Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors." Nat Med **9**(9): 1138-43.
- Tropschug, M., D. W. Nicholson, et al. (1988). "Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa*. One gene codes for both the cytosolic and mitochondrial forms." J Biol Chem **263**(28): 14433-40.
- Tumlin, J. A. and J. M. Sands (1993). "Nephron segment-specific inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by cyclosporin A." Kidney Int **43**(1): 246-51.
- Tumlin, J. A., J. T. Someren, et al. (1995). "Expression of calcineurin activity and alpha-subunit isoforms in specific segments of the rat nephron." Am J Physiol **269**(4 Pt 2): F558-63.
- Turrens, J. F. (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain." Biosci Rep **17**(1): 3-8.
- Uhlen, P. (2003). "Visualization of Na,K-ATPase interacting proteins using FRET technique." Ann N Y Acad Sci **986**: 514-8.
- Uittenbogaard, A., Y. Ying, et al. (1998). "Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking." J Biol Chem **273**(11): 6525-32.

## V

- Vagin, O., E. Tokhtaeva, et al. (2006). "The role of the beta1 subunit of the Na,K-ATPase and its glycosylation in cell-cell adhesion." J Biol Chem **281**(51): 39573-87.
- Vallet, V., M. Bens, et al. (1995). "Transcription factors and aldolase B gene expression in microdissected renal proximal tubules and derived cell lines." Exp Cell Res **216**(2): 363-70.
- Van Acker, K., G. Bultynck, et al. (2004). "The 12 kDa FK506-binding protein, FKBP12, modulates the Ca<sup>2+</sup>-flux properties of the type-3 ryanodine receptor." J Cell Sci **117**(Pt 7): 1129-37.
- van Adelsberg, J. S. (1999). "The role of the polycystins in kidney development." Pediatr Nephrol **13**(5): 454-9.
- Vaulont, S., N. Puzenat, et al. (1989). "Proteins binding to the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. A unique combination of known factors." J Mol Biol **209**(2): 205-19.
- Verdonck, F., P. G. Volders, et al. (2003). "Intracellular Na<sup>+</sup> and altered Na<sup>+</sup> transport mechanisms in cardiac hypertrophy and failure." J Mol Cell Cardiol **35**(1): 5-25.
- Vetter, M., Z. J. Chen, et al. (2003). "Cyclosporin A disrupts bradykinin signaling through superoxide." Hypertension **41**(5): 1136-42.
- Vitko, S. and O. Viklicky (2004). "Cyclosporine renal dysfunction." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 243S-247S.
- von Willebrand, E. and P. Hayry (1983). "Cyclosporin-A deposits in renal allografts." Lancet **2**(8343): 189-92.

## U

## W

- Waldmeier, P. C., J. J. Feldtrauer, et al. (2002). "Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811." Mol Pharmacol **62**(1): 22-9.
- Waldmeier, P. C., K. Zimmermann, et al. (2003). "Cyclophilin D as a drug target." Curr Med Chem **10**(16): 1485-506.
- Walker, J. E., R. Lutter, et al. (1991). "Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria." Biochemistry **30**(22): 5369-78.
- Wang, C. and A. K. Salahudeen (1994). "Cyclosporine nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant-inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo." Transplantation **58**(8): 940-6.
- Wang, P. and J. Heitman (2005). "The cyclophilins." Genome Biol **6**(7): 226.
- Wang, T. and P. K. Donahoe (2004). "The immunophilin FKBP12: a molecular guardian of the TGF-beta family type I receptors." Front Biosci **9**: 619-31.
- Wang, T., P. K. Donahoe, et al. (1994). "Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12." Science **265**(5172): 674-6.
- Wang, X. J. and F. A. Etzkorn (2006). "Peptidyl-prolyl isomerase inhibitors." Biopolymers **84**(2): 125-46.
- Watanabe, S., S. Tsuruoka, et al. (2005). "Cyclosporin A produces distal renal tubular acidosis by blocking peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin." Am J Physiol Renal Physiol **288**(1): F40-7.
- Watashi, K., N. Ishii, et al. (2005). "Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase." Mol Cell **19**(1): 111-22.
- Watashi, K. and K. Shimotohno (2005). "[Current approaches for developing new anti-HCV agents and analyses of HCV replication using anti-HCV agents]." Uirusu **55**(1): 105-10.
- Watashi, K. and K. Shimotohno (2007). "Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy." Rev Med Virol **17**(4): 245-52.
- Weber, P., U. Bartsch, et al. (1998). "Na,K-ATPase subunit beta1 knock-in prevents lethality of beta2 deficiency in mice." J Neurosci **18**(22): 9192-203.
- Weir, M. R., D. K. Klassen, et al. (1990). "Acute effects of intravenous cyclosporine on blood pressure, renal hemodynamics, and urine prostaglandin production of healthy humans." Transplantation **49**(1): 41-7.
- Welling, P. A., M. Caplan, et al. (1993). "Aldosterone-mediated Na/K-ATPase expression is alpha 1 isoform specific in the renal cortical collecting duct." J Biol Chem **268**(31): 23469-76.
- Witzgall, R., D. Brown, et al. (1994). "Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells." J Clin Invest **93**(5): 2175-88.
- Wolf, G., F. Thaiss, et al. (1995). "Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells. Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects." Transplantation **60**(3): 237-41.
- Woltman, A. M., N. Schlagwein, et al. (2004). "The novel cyclophilin-binding drug sanglifhehrin A specifically affects antigen uptake receptor expression and endocytic capacity of human dendritic cells." J Immunol **172**(10): 6482-9.
- Woo, S. K., S. D. Lee, et al. (2002). "TonEBP transcriptional activator in the cellular response to increased osmolality." Pflugers Arch **444**(5): 579-85.
- Woodfield, K., A. Ruck, et al. (1998). "Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition." Biochem J **336** ( Pt 2): 287-90.
- Wu, M. S., C. W. Yang, et al. (2000). "Cyclosporine stimulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport activity

in cultured mouse medullary thick ascending limb cells." Kidney Int **58**(4): 1652-63.

## X

Xu, Q., M. C. Leiva, et al. (1992). "Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin." J Biol Chem **267**(17): 11968-71.

Xu, Q., S. Liang, et al. (1998). "Molecular characterization of a plant FKBP12 that does not mediate action of FK506 and rapamycin." Plant J **15**(4): 511-9.

## Y

Yang, F., J. M. Robotham, et al. (2008). "Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro." J Virol **82**(11): 5269-78.

Yang, H., M. Li, et al. (2005). "Effects of cyclophilin A on cell proliferation and gene expressions in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells." J Surg Res **123**(2): 312-9.

Yao, D., J. J. Dore, Jr., et al. (2000). "FKBP12 is a negative regulator of transforming growth factor-beta receptor internalization." J Biol Chem **275**(17): 13149-54.

Yao, Q., M. Li, et al. (2005). "Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems." World J Surg **29**(3): 276-80.

You, C. W., Y. H. Park, et al. (2002). "Effects of thyroxine on hyperkalemia and renal cortical Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity induced by cyclosporin A." J Korean Med Sci **17**(5): 625-32.

Younes-Ibrahim, M., M. Barnese, et al. (2003). "Inhibition of purified human kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by cyclosporine A: a possible mechanism for drug human nephrotoxicity." Ann N Y Acad Sci **986**: 633-5.

Yu, Z., W. Zhang, et al. (2002). "Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene." J Am Soc Nephrol **13**(8): 2009-17.

Yurchenko, V., T. Pushkarsky, et al. (2005). "Regulation of CD147 cell surface

expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain." J Biol Chem **280**(17): 17013-9.

Yurchenko, V., G. Zybarth, et al. (2002). "Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147." J Biol Chem **277**(25): 22959-65.

## Z

Zander, K., M. P. Sherman, et al. (2003). "Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression." J Biol Chem **278**(44): 43202-13.

Zenke, G., U. Strittmatter, et al. (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." J Immunol **166**(12): 7165-71.

Zhang, J. and H. Herscovitz (2003). "Nascent lipidated apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, calreticulin, and cyclophilin B." J Biol Chem **278**(9): 7459-68.

Zhang, L. H. and J. O. Liu (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle." J Immunol **166**(9): 5611-8.

Zhu, C., X. Wang, et al. (2007). "Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia." J Exp Med **204**(8): 1741-8.

Zhu, P., J. Ding, et al. (2005). "Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production." Arthritis Res Ther **7**(5): R1023-33.

Ziegler, K., M. Frimmer, et al. (1990). "Cyclosporin binding to a protein component of the renal Na<sup>(+)</sup>-D-glucose cotransporter." J Biol Chem **265**(6): 3270-7.

