



## **TESI DOCTORAL**



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorat: Bioquímica i Biologia Molecular. Bienni: 1996-1998

**ANÀLISI FUNCIONAL DE LA *KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN (KAP)*: INTERACCIÓ AMB CICLOFILINA B I IMPLICACIONS EN LA NEFROTOXICITAT PROVOCADA PER CICLOSPORINA A.**

Memòria presentada per Cristina Cebrian Ligeró per optar al grau de Doctora en  
Bioquímica i Biologia Molecular

Tesi Doctoral realitzada al Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia  
Molecular dels Hospitals Vall d'Hebron, sota la direcció de la Dra. Anna Meseguer Navarro

Tesi adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències,  
Universitat Autònoma de Barcelona

Tutor: Dr. Simó Schwartz Riera

La interessada:

La Directora de Tesi:

**Cristina Cebrian Ligeró**

**Dra. Anna Meseguer Navarro**

*A mis padres*

*Són moltes les persones a les quals he d'agrair el seu suport i la seva col·laboració en el desenvolupament d'aquesta tesi. En primer lloc als meus pares, per la seva paciència i el seu finançament incondicional i a fons perdut. A la meva germana, per compartir armari, ordinador i pizzes, sobre tot durant la recta final d'aquesta tesi.*

*Als meus professors, i molt especialment al Josep Molina, per la seva dedicació a l'ensenyament i la seva humanitat.*

*Al Jose Ramón, per ensenyar-me les bases de la biologia molecular, però també, i més important, per demostrar-me com ha de ser un bon company de laboratori; i al Jordi, per assistir al part de la meva primera PCR i pel seu recolçament científic i personal.*

*A l'Anna, per oferir-me un projecte atractiu, per la seva intuïció i els seus consells i per la seva exemplar fortalesa. Als antics companys de laboratori: L'Esther, la Marta, la Nati, la M<sup>a</sup> Jesús, la Yolanda, la Nuri, el Toni i l'Anna Menoyo, per ser un model a seguir a nivell investigador i personal.*

*Als veïns Jedi, l'Òscar i en David, per mantenir-se en peu malgrat les tempestes. Que la força us acompanyi en aquest nou camí que tot just comença.*

*Als companys actuals del laboratori; a la Cristina Puche per acceptar resignada les meves invasions de poiata. A la Cristina Aresté per la seva sinceritat i la seva companyonie (lèase compañerismo). A l'Olga, per ser pacient amb el relleu i per ésser una gran parella de projecte. A la Montse, per aguantar estoïcament les meves bromes i per les seves dites inaudites. A la Nuri, que tot just comença, per aportar aires nous al laboratori. A la Maya, per la seva sincera humilitat i el seu carinyo (i per aconseguir que m'acabessin agradant els cultius). A en Lluís, per continuar sent tan bona persona malgrat la nostra companyia, i pel seu envejable esperit conciliador. I també al Joan, font inesgotable de sapiència, pel seu ajut incondicional i per la seva gran vàlua personal.*

*Finalment, vull agrair als meus amics, la Colla Passigolla i associats, per la seva paciència amb aquesta bata-blanca i les seves PCR's (qué pasada!). Pels sopars al Canigó i els caps de setmana a l'Alt Empordà. I molt especialment als més veterans, la Laura i en Ferran, per entendre'm de vegades sí i de vegades no tant, però estant sempre disposats a escoltar-me.*

# ***INTRODUCCIÓN***

*No quiso desayunarse don Quijote,  
porque, como está dicho,  
dió en sustentarse de sabrosas memorias.*

## **OBJECTIUS**

*...; y así, con estos tan agradables pensamientos,  
llevado del extraño gusto que en ellos sentia,  
se dió prisa a poner en efecto lo que deseaba.*

## ***MATERIAL I MÈTODES***

*..., se armó de todas sus armas, subió sobre Rocinante, ...,  
embrazó su adarga, tomó su lanza y  
por la puerta falsa de un corral  
salió al campo con grandísimo contento y alborozo...*

## ***RESULTATS***

*La ventura va guiando nuestras cosas  
mejor de lo que acertáramos a desear;...*

## ***DISCUSSIÓ***

*A la sombra del árbol estaba, como se ha dicho,  
y allí, como moscas a la miel,  
le acudían y picaban pensamientos.*



## **CONCLUSIONS**

*-Cada día, Sancho -dijo don Quijote-,  
te vas haciendo menos simple y más discreto.*

## ***BIBLIOGRAFIA***

*Entraron dentro todos y el ama con ellos,  
y hallaron más de cien cuerpos de libros grandes,  
muy bien encuadernados y otros pequeños;...*

<b><u>1. EL RONYÓ</u></b> .....	<b>3</b>
1.1. <b>ORIGEN EMBRIONARI DEL RONYÓ</b> .....	<b>3</b>
1.2. <b>ANATOMIA DEL RONYÓ</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. <b>LA NEFRONA</b> .....	<b>6</b>
El corpuscle renal.....	8
El túbul proximal.....	9
La nansa de Henle.....	13
El túbul distal.....	15
L'aparell juxtaglomerular.....	16
El tub col·lector.....	17
1.3. <b>REGULACIÓ DE LA FUNCIÓ RENAL</b> .....	<b>17</b>
1.4. <b>EFFECTE DELS ANDRÒGENS AL RONYÓ</b> .....	<b>18</b>
<b><u>2. LA KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN (KAP)</u></b> .....	<b>19</b>
2.1. <b>EL mRNA DE KAP I LA PROTEÏNA DEDUÏDA</b> .....	<b>19</b>
2.2. <b>ESTRUCTURA DEL GEN DE LA KAP I LOCALITZACIÓ CROMOSÒMICA</b> .....	<b>20</b>
2.3. <b>HOMÒLEGS DE KAP A ALTRES ESPÈCIES</b> .....	<b>21</b>
2.4. <b>ABUNDÀNCIA I DISTRIBUCIÓ TISSULAR DE LA KAP</b> .....	<b>22</b>
2.5. <b>REGULACIÓ HORMONAL</b> .....	<b>24</b>
2.5.1. <b>EL PROMOTOR DE KAP</b> .....	<b>25</b>
2.5.2. <b>REGULACIÓ PER ANDRÒGENS I ESTRÒGENS A RONYÓ</b> .....	<b>25</b>
2.5.3. <b>REGULACIÓ PER HORMONES TIROÏDALS A RONYÓ</b> .....	<b>27</b>
2.5.4. <b>EL RATOLÍ TRANSGÈNIC KAP-HAGT</b> .....	<b>28</b>
2.5.5. <b>REGULACIÓ A ÚTER</b> .....	<b>28</b>
<b><u>3. LES CICLOFILINES</u></b> .....	<b>28</b>
3.1. <b>ACTIVITAT PEPTIDIL-PROLIL CIS-TRANS ISOMERASA (PPIASA)</b> .....	<b>30</b>
3.2. <b>LES DIFERENTS CICLOFILINES</b> .....	<b>30</b>
3.2.1. <b>CICLOFILINA A (CYPA)</b> .....	<b>30</b>
3.2.2. <b>CICLOFILINA B (CYPB)</b> .....	<b>31</b>
3.2.3. <b>CICLOFILINA C (CYPC)</b> .....	<b>32</b>
3.2.4. <b>ALTRES CICLOFILINES</b> .....	<b>33</b>

**4. LA CICLOSPORINA A.....33**

**4.1. NEFROTOXICITAT PER CSA .....35**

## 1. EL RONYÓ

Els ronyons són els òrgans principals del sistema urinari de vertebrats. Mitjançant la filtració de la sang i la formació de l'orina, aquest òrgan contribueix a l'homeostasi de l'organisme.

Entre les diferents funcions del ronyó trobem:

- Regulació de la composició iònica de la sang, de la seva osmolaritat i el seu volum; el ronyó controla la reabsorció i la pèrdua d'aigua i dels diferents ions.
- Contribució a la regulació de la pressió sanguínea, no només regulant el volum de sang sinó també amb la secreció de renina i el control de la resistència renal.
- Regulació del pH sanguini.
- Producció d'hormones. La forma activa de la vitamina D (calcitriol) que regula l'homeostasi del calci, i l'eritropoietina que estimula la producció d'eritròcits, són ambdues d'origen renal.
- Contribució a la regulació dels nivells sanguinis de glucosa, donat que el ronyó és capaç d'utilitzar precursors gluconeogènics per sintetitzar glucosa; la glucosa produïda al ronyó va a parar al corrent sanguini.
- Excreció amb l'orina de substàncies alienes o de desfeta: Amoni i urea procedents de reaccions de desaminació, bilirrubina originada en el catabolisme de l'hemoglobina, creatinina d'origen muscular, àcid úric provinent del catabolisme d'àcids nucleics i altres. També s'excreten a l'orina els fàrmacs i les toxines d'origen divers.

### 1.1. *Origen embrionari del ronyó.*

El desenvolupament embrionari del ronyó es caracteritza per la formació successiva de tres òrgans excretors embrionaris diferents: el pronefros, el mesonefros i el metanefros (Saxén, 1987 i Vize et al. 1997). El pronefros i el mesonefros són presents, només de manera transient, durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari dels mamífers, així, el ronyó definitiu es desenvolupa a partir del metanefros. En peixos i amfibis, en canvi, el pronefros és completament funcional i indispensable durant la vida larvària; a la vida adulta, el pronefros pateix un procés de regressió i apoptosi, essent funcionalment substituït pel mesonefros que esdevé el ronyó definitiu.

Tots tres ronyons comparteixen una organització estructural similar, diferint principalment en el nombre i distribució espacial de les nefrones, unitats funcionals del ronyó de vertebrats. Així, mentre el pronefros típic d'amfibis i peixos conté entre 1 i 3 nefrones, el metanefros humà pot tenir més d'un milió d'aquestes unitats funcionals.

El desenvolupament del metanefros murí s'inicia el dia 11 embrionari, quan una estructura epitelial (el primordi uretral) sobre-surt del conducte de Wolffian envaint el mesènquima metanefrític i induint la condensació de les cèl·lules d'aquest mesènquima. Aquests condensats es diferencien en cèl·lules epitelials polaritzades, formant de manera eventual les primeres nefrones. Per la seva banda, el mesènquima indueix la ramificació del primordi uretral que dóna lloc al sistema de conductes col·lectors.

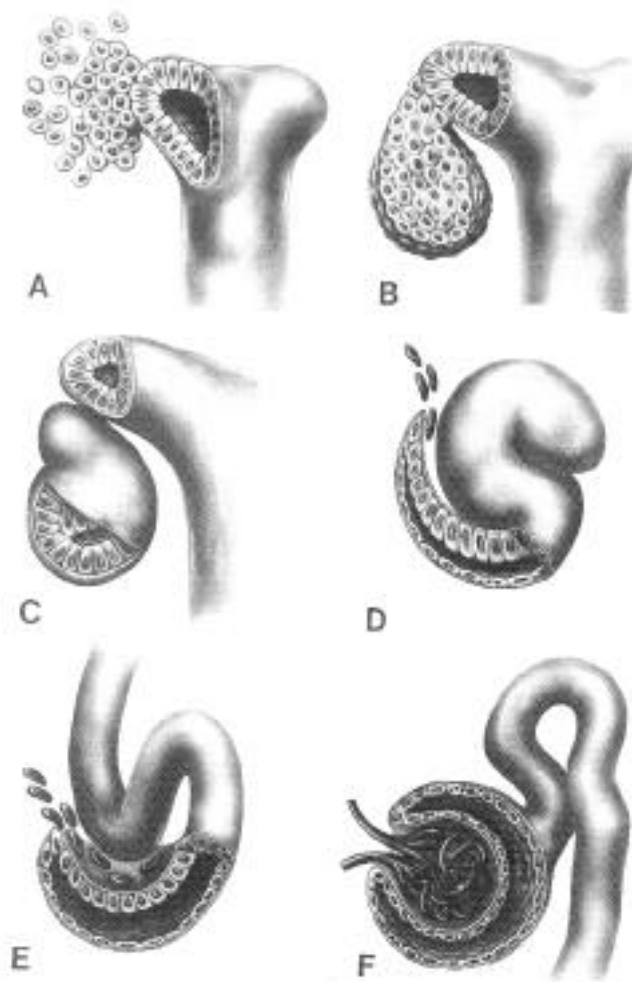


Fig. I-1: Il·lustració esquemàtica del desenvolupament inicial de la nefrona. A, el creixement del conducte de Wolffian indueix la formació del condensat cel·lular. B, el primordi uretral envia senyals que indueixen la formació dels agregats mesenquimàtics pretubulars. C i D, les cèl·lules es polaritzen i diferencien en cèl·lules epitelials. E, les cèl·lules endotelials són reclutades per formar part de la nefrona. F, glomerulogènesi.

---

Mitjançant el marcatge de cèl·lules mesenquimàtiques metanefrítiques no diferenciades s'ha pogut estudiar l'origen dels diferents tipus cel·lulars renals. Així, es troben cèl·lules procedents d'una mateixa cèl·lula progenitora a tots els segments d'una nefrona i de les seves adjacents. Només entre un 5 i un 10% de les cèl·lules d'una nefrona són originàries de la mateixa progenitora (Koseki, 1991). Això suggereix la necessitat de diferents cèl·lules mare per tal de formar una nefrona. Per altra banda, si el mesènquima metanefrític ja s'ha diferenciat, la progènie que se'n deriva queda restringida a un únic segment de la nefrona (Herzlinger, 1992).

La nefrogènesi es completa durant el període perinatal. En humans, la formació de nefrones finalitza entre la setmana 28 i la 36 de gestació. Al ratolí el desenvolupament morfològic d'aquestes nefrones immadures finalitza cap al dia 17 de la vida embrionària. En la rata, en canvi, la nefrogènesi finalitza el 8è dia de vida post-natal.

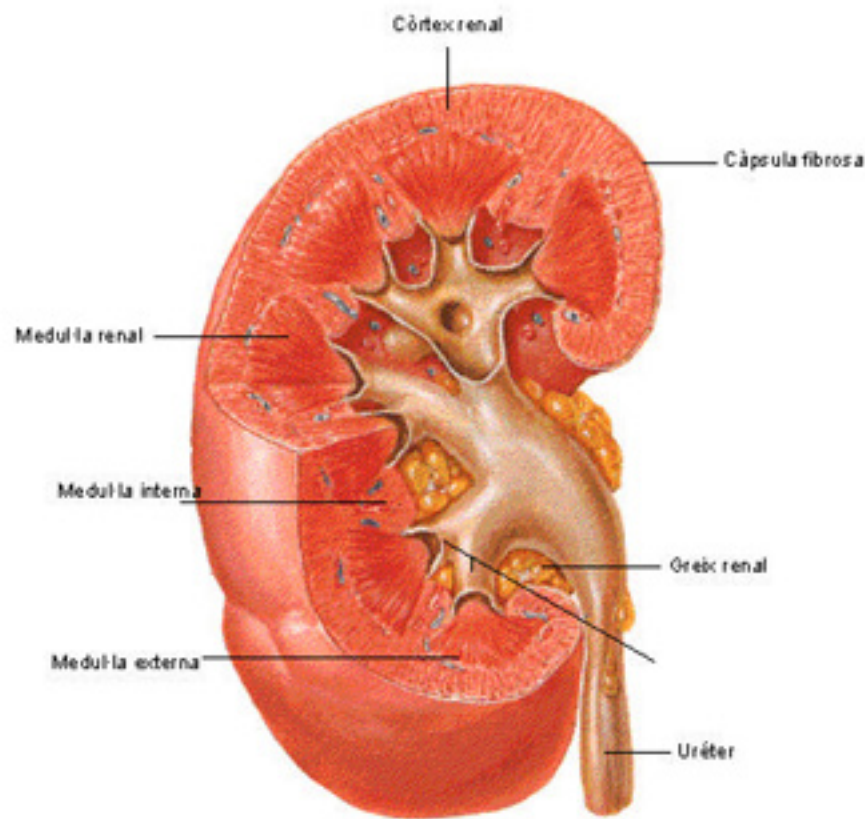
Evidències experimentals suggereixen que el nombre de nefrones està predeterminat. Així, si es realitza una nefrectomia unilateral en rates joves, el ronyó contralateral duplica la seva mida. Aquest increment de pes provocat per processos de hipertròfia i hiperplàsia no comporta, en canvi, un augment en el nombre de nefrones (Aperia, 1980).

Diversos estudis demostren que la diferenciació de les cèl·lules epitelials dels túbuls renals continua després del naixement. En el període post-natal, aquestes cèl·lules apareixen subdesenvolupades com a epiteli transportador, tant pel que fa a molècules de transportadors com als sistemes de regulació de l'esmentat transport (Evan, 1993). El ronyó humà no es considera madur fins a 1 o 2 anys després del naixement.

## **1.2. Anatomia del ronyó.**

Els ronyons de mamífer són òrgans parells retroperitoneals situats a la part posterior de l'abdomen, un a cada costat de la columna vertebral.

Una única artèria renal principal porta la sang al ronyó, ramificant-se en diversos conductes al seu interior; un cop filtrada, la sang surt del ronyó per la vena renal. Conjuntament amb l'intricat sistema vascular, hi trobem un complex sistema limfàtic així com terminacions nervioses, tot inclòs en un esquelet de teixit intersticial. En íntima connexió amb el sistema vascular trobem les unitats funcionals renals, les nefrones.



---

Fig. I-2: Il·lustració del ronyó de mamífer on s'indiquen les regions principals.

---

### 1.2.1. La nefrona

La nefrona és la unitat funcional del ronyó dels vertebrats. El nombre de nefrones varia segons les espècies; així, el ronyó humà conté al voltant d'un milió de nefrones i el de rata aproximadament 30.000. Els components essencials de la nefrona i el tub col·lector s'especifiquen a la figura I-3.

El ronyó està format per dues poblacions de nefrones, segons presentin una nansa de Henle llarga o curta. Aquesta llargada és depenent de la posició del glomèrul; així, les nefrones amb glomèruls més corticals presenten nanses de Henle curtes que es pleguen abans d'arribar a la medulla interna. En canvi, les nanses de les nefrones amb glomèruls juxtamedul·lars són més llargues i formen part de la medulla interna.



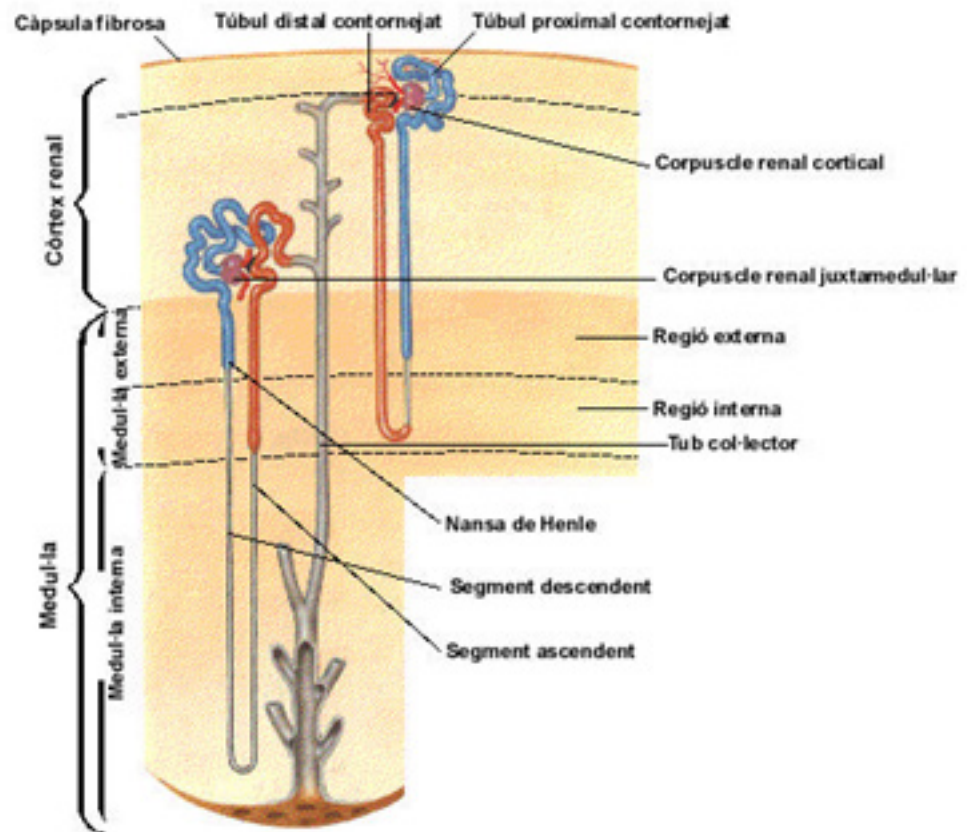


Fig. I-3: La nefrona, els diferents segments funcionals.

Segons la posició dels diferents segments de la nefrona, la zona medul·lar es divideix en:

- Medul·la interna: Conté el segment prim ascendent i descendent de la nansa de Henle així com el tub col·lector.
- Zona interna de la medul·la externa: Conté el segment prim descendent, el segment gruixut ascendent de la nansa de Henle i el tub col·lector.
- Zona externa de la medul·la externa: Conté el segment terminal de la *pars recta* del túbul proximal, la *pars recta* del túbul distal i el tub col·lector.

A la regió cortical es troben els glomèruls, els segments contornejats dels túbuls proximals i distals, la *pars recta* d'aquests túbuls i els túbuls col·lectors.

### El corpuscle renal

El corpuscle renal és responsable de la ultrafiltració del plasma. Està format per una xarxa de capil·lars (el glomèrul) rodejats per un conjunt de cèl·lules endotelials, mesangials i epitelials. La sang penetra al glomèrul per l'arteriola aferent, travessa la xarxa de capil·lars i surt per l'arteriola eferent.

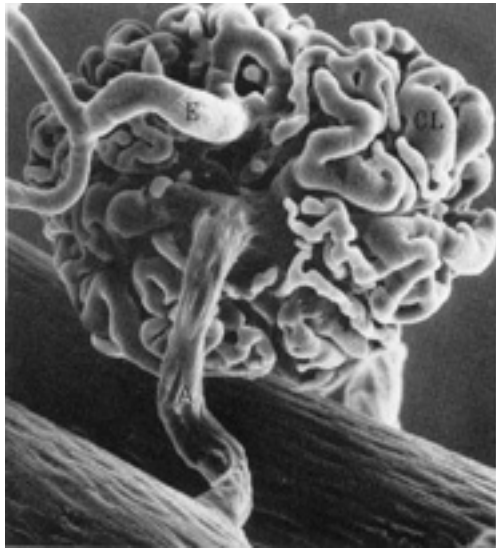


Fig. I-4: Imatge de microscopia electrònica d'un glomèrul. S'indica l'arteriola eferent (E) i l'arteriola aferent (A). (Brenner, 1996).

Les cèl·lules mesangials produeixen prostaglandines i presenten un complex sistema de microfilaments, així com activitat contràctil i fagocítica, proporcionant suport estructural a la xarxa de capil·lars glomerulars (Michael, 1980; Schlondorff, 1987; Kriz, 1990).

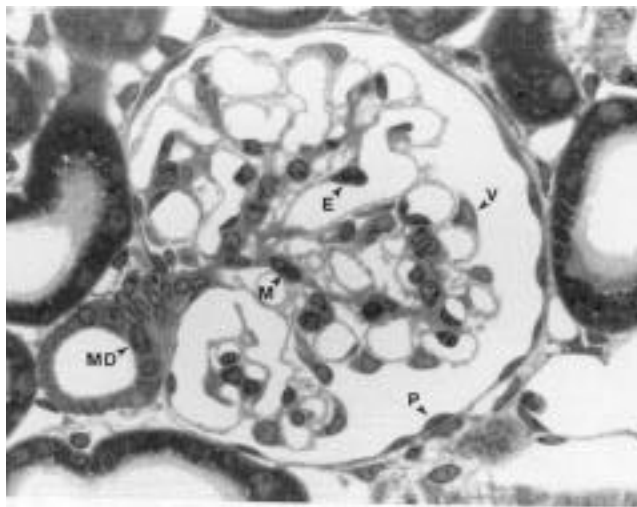


Fig. I-5: El corpuscle renal. S'indiquen les cèl·lules endotelials (E), mesangials (M), epitelials viscerals (V) i epitelials parietals (P). També es pot observar la màcula densa (veure aparell juxtglomerular). (Brenner, 1996)

La superfície de les cèl·lules endotelials està carregada negativament per la presència d'una glicoproteïna polianiònica, la podocalixina (Kerjaschki, 1984). Tanmateix, l'endoteli presenta estructura fenestrada, a manera de filtre, i representa la barrera inicial en el pas de substàncies de la sang al filtrat glomerular. Així, ni eritròcits, ni leucòcits ni plaquetes superen aquesta barrera.

Una segona barrera la constitueix la làmina basal glomerular, formada per la làmina densa, la làmina rara externa i la làmina rara interna. Aquesta membrana és una barrera selectiva tant pel que fa a la mida com a la càrrega. Per tant, la membrana basal restringeix el pas de les molècules carregades negativament així com les de mida superior a la de l'albumina (Brenner, 1977; Renke, 1977; Renke 1978).

Finalment, l'última barrera la constitueixen els podocits ramificats amb estructura de filtre laminar que embolcallen els capil·lars glomerulars. Aquest filtre cel·lular només és travessat per molècules de mida inferior a l'albumina.

Les cèl·lules epitelials parietals formen una estructura anomenada càpsula de Bowman. Aquesta càpsula engloba el glomèrul i el conjunt de cèl·lules associades i recull el filtrat glomerular prèviament al seu pas al tub proximal contornejat.

### **El túbul proximal**

Com a continuació del glomèrul trobem el túbul proximal. Una de les principals funcions del túbul proximal és la reabsorció de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , aigua, glucosa i aminoàcids. Per a tot això compta amb un epiteli polaritzat i altament especialitzat.

A nivell morfològic s'hi distingeixen tres segments:  $S_1$ ,  $S_2$  i  $S_3$  que comprenen la *pars convoluta* i la *pars recta* del túbul (Brenner, 1996).

- El segment  $S_1$  correspon a la porció inicial del túbul proximal contornejat. Les cèl·lules epitelials que el formen presenten un *brush border* alt i un sistema vacuolar i lisosomal ben desenvolupat. La membrana basolateral conté múltiples invaginacions i processos laterals i, com és característic en els epitelis implicats en processos de transport actiu, els mitocondris se situen també en aquesta regió.

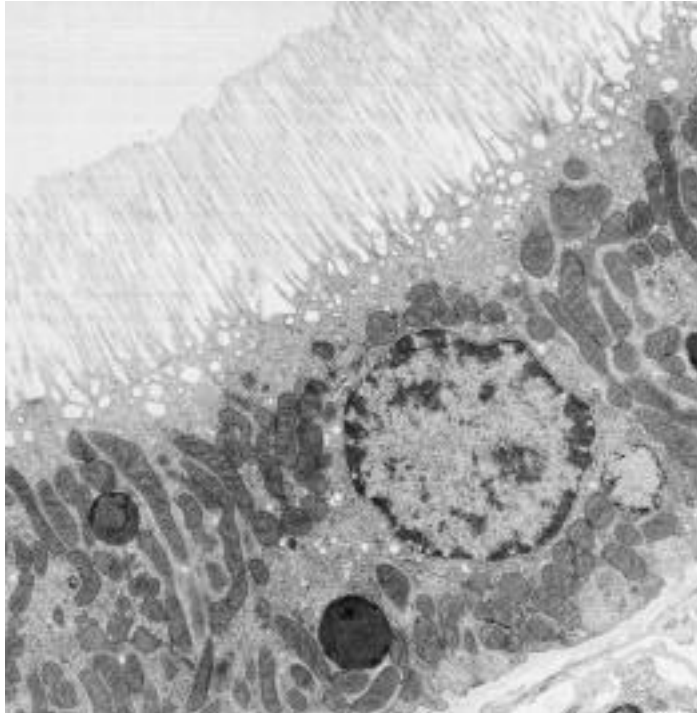


Fig. I-6: Imatge de microscopia electrònica d'una cèl·lula epitelial  $S_1$  del túbul proximal renal de rata. (Brenner, 1996)

---

- El segment  $S_2$  conté la resta del túbul proximal contornejat i la part inicial de la *pars recta*. És estructuralment similar al  $S_1$ , amb un *brush border* més curt, menys invaginacions basolaterals i mitoncodris de mida inferior.

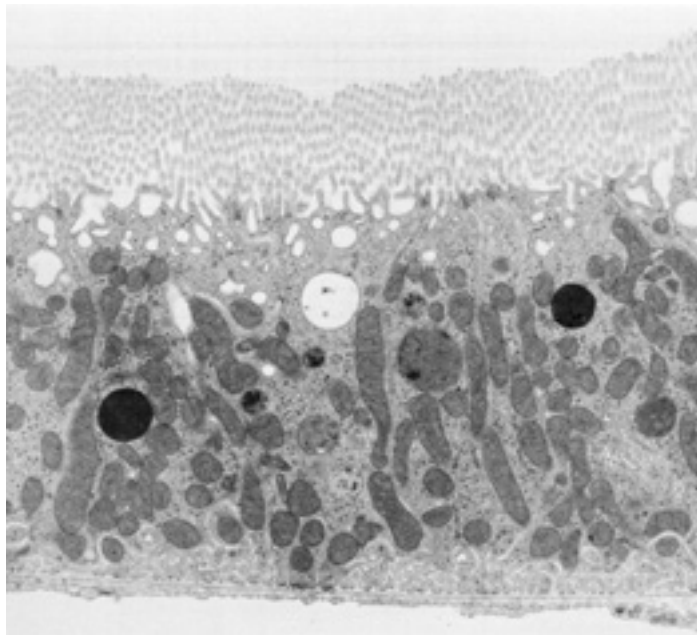


Fig. I-7: Imatge de microscopia electrònica d'una cèl·lula epitelial  $S_2$  del túbul proximal renal de rata. (Brenner, 1996)

---

- Al segment S<sub>3</sub> les invaginacions i els processos laterals són pràcticament absents, amb mitocondris petits i distribuïts aleatòriament; la mida del *brush border* és altament variable segons les espècies: llarg en rata i curt en conill. El peroxisomes, presents al llarg de tot el túbul, són especialment prominents en aquest segment.

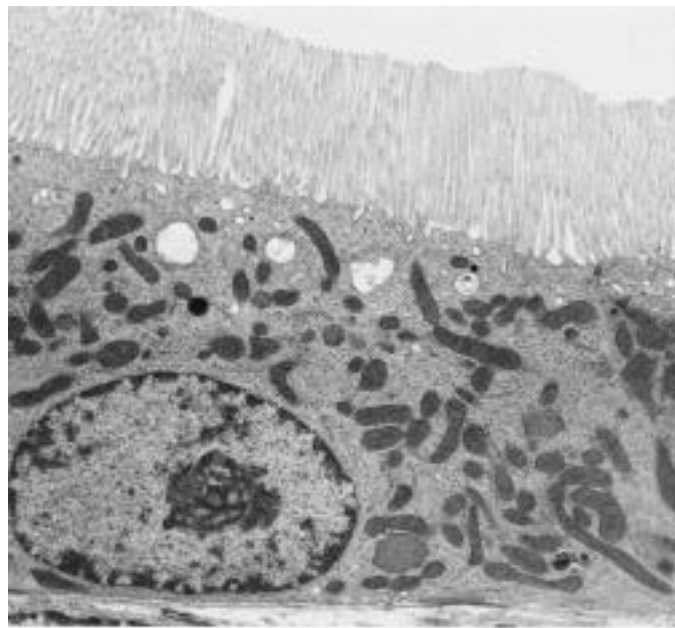


Fig. I-8: Imatge de microscopia electrònica d'una cèl·lula epitelial S<sub>3</sub> del túbul proximal renal de rata. (Brenner, 1996)

---

Com a epitelí eminentment transportador s'hi han descrit diversos sistemes de transport a nivell del túbul proximal renal; bona part d'aquests sistemes es basen en la creació d'un gradient de càrrega i/o de concentració que permet a la cèl·lula epitelial proximal la reabsorció d'ions i altres substàncies:

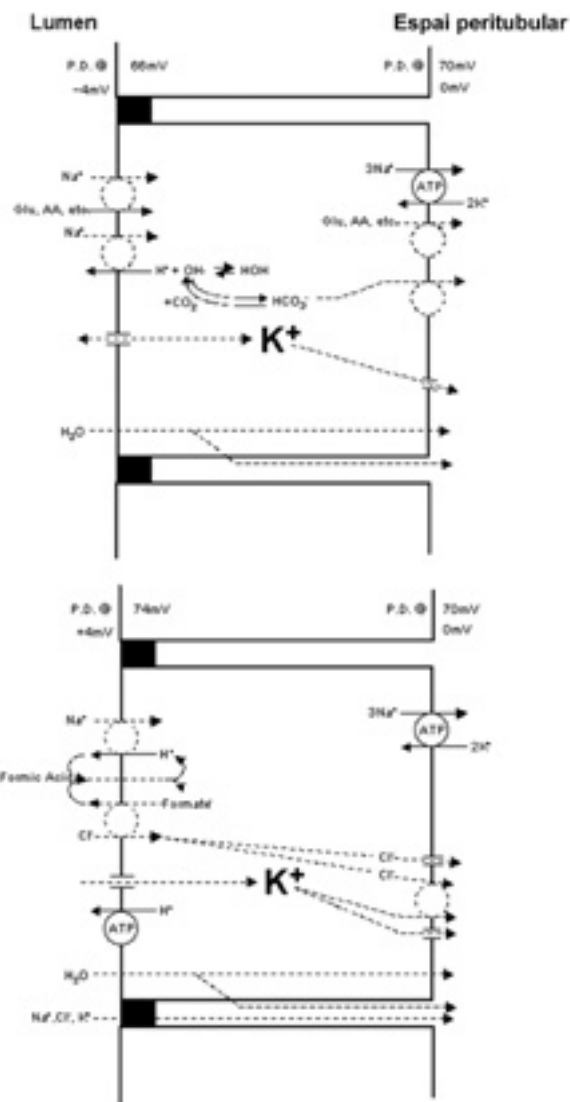


Fig. I-9: Esquema simplificat dels mecanismes de transport a nivell del túbul proximal renal.

- Intercanviadors de  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  (NHE) apicals i basolaterals: Es troben 3 tipus d'intercanviadors: el NHE1 i el NHE2 s'activen només quan el pH intracel·lular disminueix, essent inactius en condicions fisiològiques. El primer es localitza a nivell basolateral a tot el llarg de la nefrona, el segon és present a la membrana apical del túbul proximal i la nansa de Henle. Per la seva banda el NHE3 es localitza a la mebrana apical, secreta  $\text{H}^+$  a la llum tubular i està regulat per PKA, PKC, dexametasona i T3.
- Bomba apical de protons: ATPasa apical responsable del 20-35% de la reabsorció proximal de  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$ .

- Co-transportadors apicals de  $\text{Na}^+$ : Encarregats del transport de glucosa, fosfat i aminoàcids. Les cèl·lules epitelials renals transporten glucosa eficientment mitjançant el gradient creat per la bomba de  $\text{Na}^+$ . S'han descrit 2 transportadors apicals ( $\text{Na}^+$ : glucosa) SGLT1 a  $\text{S}_3$  i SGLT2 a  $\text{S}_1$ . A nivell basolateral la glucosa surt per difusió passiva facilitada o per els transportadors GLUT1 ( $\text{S}_3$ ) i GLUT2 ( $\text{S}_1$ ).
- Co-transportadors de  $\text{H}^+$  apicals: Responsables del transport de di i tripèptids a nivell de  $\text{S}_2$  i  $\text{S}_3$ , així com alguns antibiòtics.
- Bomba  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  basolateral: Constituïda per les subunitats  $\alpha$  (conté els llocs actius per a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i ATP), i  $\beta$  (subunitats reguladores). Cada una d'aquestes subunitats té diferents isoformes que es distribueixen al llarg dels segments tubulars de manera específica. Té una estequiometria de transport de 3  $\text{Na}^+$  per 2  $\text{K}^+$ , generant-se un gradient de càrrega.
- Canals de  $\text{K}^+$  basolaterals i apicals: Indispensables per al bon funcionament de la bomba de  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ .
- Co-transportadors ( $\text{HCO}_3^-$ :  $\text{Na}^+$ ) basolateral: Encarregat de mantenir el pH cel·lular, es troba ancorat al citoesquelet de manera que canvis en el volum cel·lular controlen l'exposició del transportador a la membrana.
- Intercanviador aniònic basolateral: Intercanvia anions orgànics o inorgànics excloent-hi  $\text{Cl}^-$ .
- Transportadors de  $\text{Cl}^-$  basolaterals: Per una banda el bescanviador ( $\text{Cl}^-$  x  $\text{HCO}_3^-$ ) i també el cotransportador  $\text{Cl}^-$ :  $\text{K}^+$ .
- Aquaporina 1 (apical i basolateral): Canals d'aigua.

D'aquesta manera, en el túbul proximal es dona la reabsorció del 80 % del filtrat glomerular, ja sigui mitjançant mecanismes d'absorció passius o actius.

### **La nansa de Henle**

Entre el túbul distal i el túbul proximal trobem el segment prim de la nansa de Henle. En el cas de les nefrones juxtamedul·lars, aquest segment es troba formant part de la medul·la interna i és de llargada considerable. En les nefrones corticals és molt més curt i es localitza a la regió interna de la medul·la externa.

Segons les característiques ultraestructurals i la localització de les cèl·lules d'aquest segment, s'han descrit quatre tipus diferents d'epitelis:

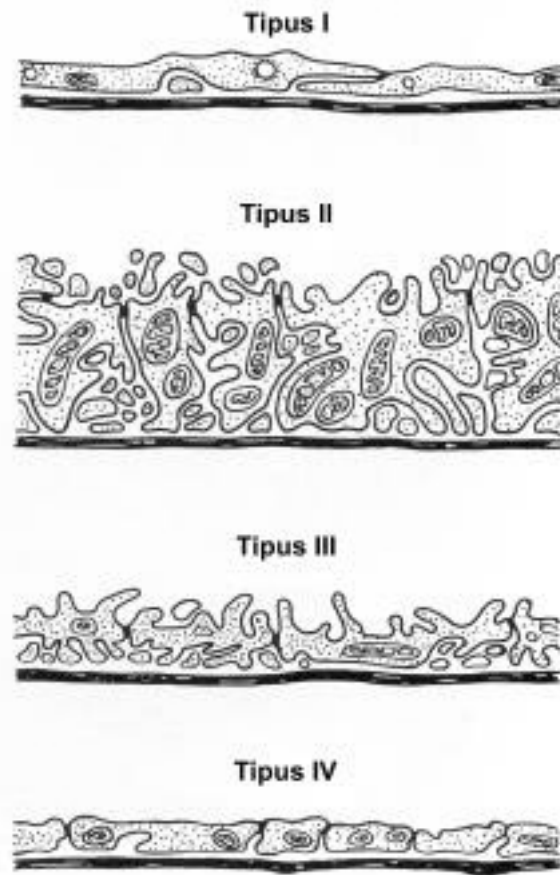


Fig. I-10: Diferents epitelis del segment prim de la nansa de Henle. (Brenner, 1996)

L'epitelí tipus I es troba exclusivament en el segment prim de la nansa de Henle de les nefrones corticals. L'epitelí tipus II forma el segment descendent de les nefrones juxtamedul·lars situat a la medul·la externa, i esdevé epitelí tipus III en entrar a la medul·la interna. Finalment l'epitelí tipus IV forma el gir de la nansa de Henle així com tot el segment prim ascendent.

El segment prim de la nansa de Henle juga un paper important en la regulació de la concentració de l'orina gràcies a la seva diferent permeabilitat a cada tram. Així, el segment descendent és permeable a l'aigua i poc permeable a  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  la qual cosa permet la concentració del fluid tubular. Per altra banda el segment ascendent és impermeable a l'aigua però molt permeable a  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  permetent que la sal difongui del túbul.



### **El túbul distal**

A nivell morfològic es diferencien tres segments al túbul distal: El segment gruixut ascendent de la nansa de Henle, la màcula densa (veure aparell juxtaglomerular) i el tubul distal contornejat.

Les cèl·lules del segment gruixut ascendent de la nansa de Henle es caracteritzen per presentar abundants invaginacions en la membrana plasmàtica basolateral, així com interdigitacions entre cèl·lules adjacents, amb nombrosos mitocondris perpendiculars a la membrana basal. Aquest segment del túbul distal està implicat en el transport actiu de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  des del lumen a l'interstici. Aquest epitelí és altament impermeable a l'aigua i la reabsorció de sals contribueix a la dilució de l'orina. L'activitat en aquest segment del túbul distal està regulada per multitud d'hormones, incloent-hi la vasopressina, l'hormona paratiroidal i calcitonina, totes elles via l'activació del sistema de l'adenilat ciclase.

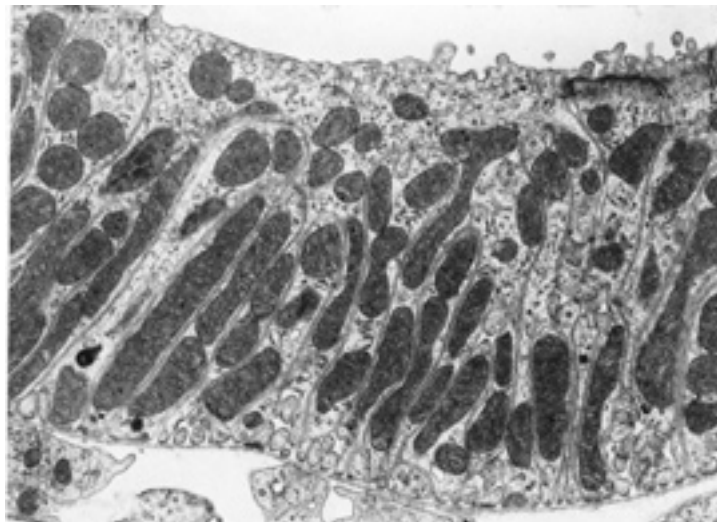


Fig. I-11: Imatge de microscopia electrònica del túbul distal. Segment gruixut ascendent. (Brenner, 1996)

---

El túbul distal contornejat està cobert de nombroses microprojeccions. Es tracta d'un epitelí ciliat amb nombroses invaginacions a la membrana basolateral i interdigitacions entre cèl·lules adjacents. Aquest segment del túbul distal presenta l'activitat  $\text{Na}^+ : \text{K}^+$  ATPàsica i  $\text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+}$  ATPàsica més elevada de tota la nefrona, proporcionant energia per al transport iònic.

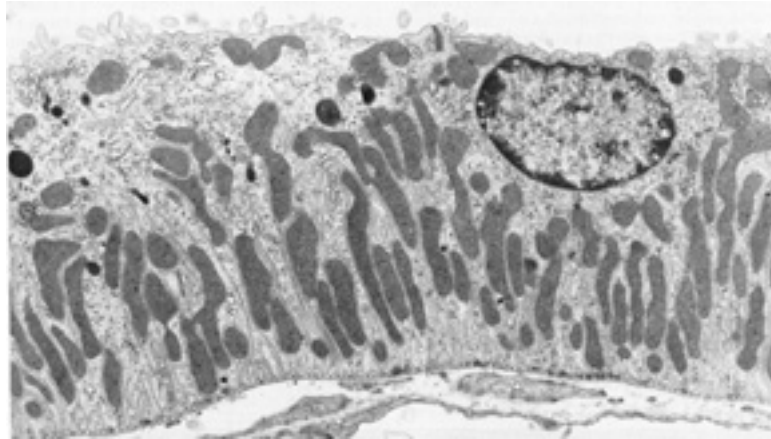


Fig. I-12: Imatge de microscopia electrònica del túbul distal contornejat. (Brenner, 1996)

---

### **L'aparell juxtaglomerular**

L'aparell juxtaglomerular representa un dels principals components del sistema renina-angiotensina. Es localitza a la regió vascular del glomèrul, on una porció del túbul distal de la nefrona entra en contacte amb el seu glomèrul parental. Així, en funció de la composició del filtrat que arriba al túbul distal, l'aparell juxtaglomerular modula l'activitat a nivell glomerular; és, doncs, un sistema d'autorregulació per a la nefrona.

Hi trobem les cèl·lules granulars juxtaglomerulars, localitzades principalment a les parets de les arterioles aferents i eferents glomerulars. Aquestes cèl·lules són responsables de la síntesi de renina i angiotensina II (Deschepper, 1986).

La porció del tub distal que forma part de l'aparell juxtaglomerular s'anomena màcula densa. Aquestes cèl·lules, però, no presenten les característiques típiques de túbul distal, ni a nivell morfològic ni a nivell funcional i exerceixen un paper senyalitzador en el control de la secreció de renina.

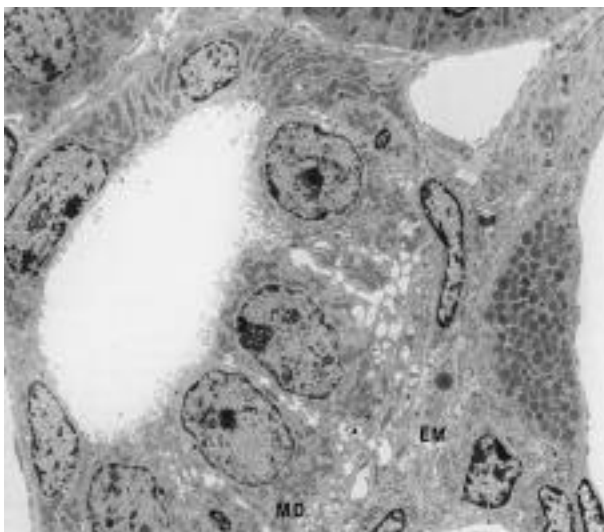


Fig. I-13: L'aparell juxtaglomerular. S'assenyalen les cèl·lules de la màcula densa (MD) i cèl·lules mesangials extraglomerulars (EM) (Brenner, 1996).

---

Aquesta secreció de renina per part de les cèl·lules granulars juxtaglomerulars respon a l'activitat nerviosa renal, la pressió arterial (i més concretament a la pressió a l'arteriola aferent) i també al balanç de sodi de l'organisme. Alguns dels factors responsables d'aquesta secreció han estat identificats, com ara neurotransmissors, angiotensina II, prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaciclina i òxid nítric; en canvi es desconeixen els mediadors del senyal pel que fa al balanç de Na<sup>+</sup>, a la pressió arterial o a un hipotètic factor de la màcula densa (Kurtz, 1999).

### **El tub col·lector**

El tub col·lector recull el filtrat del túbul distal contornejat i travessa el còrtex i la medul·la renal. Les característiques de l'epiteli varien a cada tram i així podem distingir entre el tub col·lector cortical i el medul·lar. Dos tipus cel·lulars s'han descrit al tub col·lector de mamífers: les cèl·lules principals i les cèl·lules intercalades (A i B), aquestes últimes van disminuint en nombre en avançar al llarg del túbul essent absents al segment medular intern del tub col·lector.

L'epiteli del tub col·lector és relativament impermeable a l'aigua en absència de vasopressina. Aquesta hormona es lliga a receptors específics de la membrana basolateral activant la producció de AMPc i el transport d'aigua a la membrana apical a través de canals específics de tub col·lector.

## **1.3. Regulació de la funció renal**

### **Sistema renina-angiotensina**

La renina és un enzim proteolític secretat a la sang per les cèl·lules granulars de l'aparell juxtaglomerular. Al corrent sanguini catalitza la conversió d'angiotensinogen d'origen hepàtic en angiotensina I. L'hormona convertidora d'angiotensina elimina dos aminoàcids de l'angiotensina I per donar lloc a l'angiotensina II, forma activa de l'enzim. El control de la secreció de renina està exercit per les pròpies cèl·lules granulars que detecten canvis en el volum vascular, per la màcula densa, pels nervis simpàtics renals i per la mateixa angiotensina II que inhibeix la secreció de renina per part de les cèl·lules granulars. L'angiotensina II és un vasoconstrictor potent, sobre tot a nivell de les arterioles eferents. Contreu les cèl·lules mesangials glomerulars i augmenta la reabsorció de sodi a nivell del túbul proximal.

### **Aldosterona**

Hormona produïda per la glàndula suprarenal, estimula la reabsorció de sodi en el tub col·lector i en les principals cèl·lules dels conductes col·lectors corticals. L'aldosterona exerceix el seu efecte combinant-se amb receptors intracel·lulars i estimulant la síntesi d'activadors de l'obertura de canals de  $\text{Na}^+$ . La seva secreció es regula per angiotensina II, concentració plasmàtica de  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  i hormona adrenocorticotropa.

### **Prostaglandines**

El ronyó produeix bàsicament prostaglandina  $\text{E}_2$  i prostaglandina  $\text{I}_2$  amb efectes vasodilatadors sobre les arterioles aferents, contrarestant l'efecte vasoconstrictor dels nervis renals i de l'angiotensina II. Un augment d'alguns d'aquests dos factors esmentats estimula als ronyons a sintetitzar i alliberar les prostaglandines.

### **Pèptid natriurètic auricular**

Segregat per les cèl·lules auriculars del cor, augmenta l'excreció de sodi en orina en incrementar el filtrat glomerular i inhibir la reabsorció de sodi, principalment a nivell dels túbuls col·lectors medul·lars. També pot inhibir la secreció de renina i d'aldosterona contribuint de manera indirecta a l'excreció del sodi. La seva secreció s'estimula per distensió de l'aurícula com a conseqüència d'un augment en el volum plasmàtic.

### **Nervis renals**

Estimulen la secreció de renina mitjançant la vasoconstricció de les arterioles aferents, això provoca l'estimulació dels baroreceptors renals i els receptors de la màcula densa. Per altra banda també té un efecte directe sobre la reabsorció tubular del sodi.

## **1.4. Efecte dels andrògens al ronyó**

El ronyó dels mascles és més gran que el de les femelles en moltes espècies animals. Juntament amb aquest efecte macroscòpic, els andrògens són responsables directes o indirectes d'altres diferències (morfològiques o moleculars) que donen lloc al dimorfisme sexual renal.

Les diferències de grandària del ronyó entre ratolins mascles i femelles és deguda a processos d'hiperplàsia i hipertròfia postnatals, ja que al naixement no hi ha diferències entre els dos sexes (Jean-Faucher, 1987). En canvi, el tractament de femelles

amb testosterona provoca un augment de mida del ronyó (hipertròfia) però no del nombre de cèl·lules (hiperplàsia) (Bardin, 1978).

El dimorfisme anatòmic va més enllà de les diferències de grandària. Així, s'han descrit diferències entre ratolins mascles i femelles de diverses soques pel que fa al diàmetre del glomèrul i al percentatge de corpuscles renals amb cèl·lules cuboides (Yabuki, 1999).

A nivell ultraestructural les diferències són evidents al llarg de tot el túbul proximal renal murí, però de manera més pronunciada a les cèl·lules S<sub>2</sub> i S<sub>3</sub> (Koenig, 1980). A les femelles, els mitocondris de les cèl·lules epitelials del segment S<sub>2</sub> són allargades i electrodenses. El contingut dels lisosomes és bàsicament granular i els vaquols autofàgics són relativament infreqüents; el reticle endoplàsmic i el Golgi es presenten dispersos. Als mascles, en canvi, els mitocondris del segment S<sub>2</sub> són més grans i els lisosomes més nombrosos amb el Golgi i el reticle endoplàsmic clarament més prominents.

Els andrògens exerceixen també el seu efecte a nivell renal mitjançant l'expressió diferencial de gens de diversa índole: -glucuronidasa (Bardin, 1978), ornitina decarboxilasa (Pajunen, 1982), RP2 (Berger, 1981), SA, citocrom P450 4B1, i transportadors d'anions orgànics (Melià, 1998).

## **2. LA KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN (KAP)**

La recerca de proteïnes regulades per andrògens al ronyó murí va portar a la identificació, per traducció *in vitro*, de la Kidney Androgen-regulated Protein (KAP) (Toole, 1979). Es va descriure inicialment com una proteïna de 20.000 dalton, codificada per un mRNA relativament abundant (entre el 4 i el 5% del mRNA de ronyó de ratolí mascle) que presentava un clar dimorfisme sexual en la seva expressió. Així, el màxim d'expressió es troba en mascles intactes seguits per les femelles i finalment els mascles castrats amb els nivells d'expressió més baixos. El tractament amb testosterona d'aquests dos últims grups recupera els nivells d'expressió, equiparant-los als dels mascles intactes.

### **2.1. El mRNA de KAP i la proteïna deduïda.**

El cDNA de la KAP es va obtenir a partir de mRNA de ronyó de ratolí femella (soca A/J) tractada amb testosterona (Meseguer, 1989). La seqüència de nucleòtids es detalla a la figura:

```
1 atttctttctctgttcactggttgcccttaaccctactaaagc
44 atgatgcttttcaaggctcctggatcactgtcttctgtggctctg
   M M L F K V L V I T V F C G L
89 actgtggctttcccctgtcagaattagtttcaatcaataaagaa
   T V A F P L S E L V S I N K E
134 ctacagaattcaatcattgacctaactcagtctttgaccaa
   L Q N S I I D L L N S V F D Q
179 ctgggatcatacagagggacaaaagctcctctagaggattataca
   L G S Y R G T K A P L E D Y T
224 gatgatgatttaagcactgactctgagcagatcatggacttcacg
   D D D L S T D S E Q I M D F T
269 ccagccgcaaacaaacagaattctgagttctctactgatggtgag
   P A A N K Q N S E F S T D V E
314 acagtctcctccggctttctggaagaattcactgagaacacagac
   T V S S G F L E E F T E N T D
359 atcacagtgaaaattccattagctgggaatccagtctcccctact
   I T V K I P L A G N P V S P T
404 tcttgagaagactccaactttgaaataaacctgcgactgccattc
   S *
   aggatattgtctttgtagaaaatgatataaatctaagatgctccc
   agcaaagaagaagaacgaggaagtgatcctggatgagaaatgct
   gtgccaggcattcttaagctctacccttactctgtgtgggtttaa
   gaaataaacgttcatttgaattgc
```

Fig. II-1: Seqüència nucleotídica del cDNA de la KAP i proteïna deduïda (GenBank M22810).

---

Aquest cDNA de 607 nucleòtids presenta una regió 5' no codificant de 43 nucleòtids que conté dos codons de *stop* a 5' del primer ATG, i una regió 3' no codificant de 198 nucleòtids que inclou el senyal de poliadenilació a 23 nucleòtids 5' del lloc de poliadenilació.

Els autors identifiquen, a partir de la seqüència de 121 aminoàcids deduïda del cDNA, un possible pèptid senyal que compren els residus 1-18, així com regions PEST relacionades amb degradació de proteïnes.

## **2.2. Estructura del gen de la KAP i localització cromosòmica.**

L'estructura genòmica de la KAP ha estat igualment subjecte d'estudi. Identificat com a gen de còpia única (Toole, 1979), el gen de la KAP obtingut a partir de BALB/c conté un total de 3.807 nucleòtids estructurats en 4 exons (de 120, 177, 63 i 251 nucleòtids respectivament) i 3 introns (de 1450, 126 i 1620 nucleòtids) (Niu, 1991).

S'ha especulat sobre el possible significat de la presència d'introns llargs, apuntant-se que aquests es troben en gens que codifiquen per a proteïnes de funció important, constituint regions possibles de recombinació gènica i, per tant, protegint als exons de possibles recombinacions.

Les unions entre introns i exons presenten les seqüències canòniques consens de *splicing* dels trànscrips primaris eucariòtics. El primer intró conté dos regions de DNA repetitiu (ag)<sub>33</sub> entre les posicions 674 - 739 i (gt)<sub>16</sub> entre els nucleòtids 1013-1044.

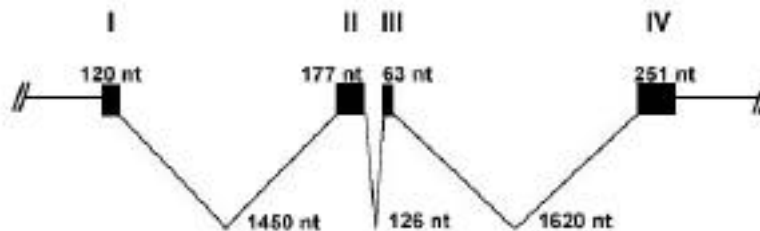


Fig. II-2: Estructura del gen de la KAP. S'assenyalen els 4 exons i els 3 introns. GenBank M63703.

L'estudi dels polimorfismes dels fragments de restricció en comparar el gen de la KAP de C57BL/6 i de BALB/c indica un elevat polimorfisme entre les dues soques (Niu, 1991).

Segons l'anàlisi de la localització cromosòmica del gen de la KAP, aquest mapa al cromosoma 6 de ratolí, entre els gens de la GAPD i Kras-2 (Melanitou, 1991), estudis posteriors discriminen una regió més petita, actualment s'ha acotat la localització del gen de la KAP a la posició 63,7 cM del cromosoma 6 de ratolí.

### 2.3. Homòlegs de KAP a altres espècies.

- Homòleg de rata: El KAP de rata (GenBank U25808) presenta una baixa homologia amb el KAP murí, com s'indica a la figura:

```

mKAP 1  MMLFVVLVITVFCGLTVAPFLSELVSIKGLQNSIIDLNSVFDQLQST
rKAP 1  MMICKVLVITVFCVLTVAFFSLDIDSINRELQDSIFDLNSTSDQFLAST

mKAP 50  RGTKALLEDYRDDLSFDSEGIQDFPAANKQSEPTDVEVSSQLEE
rKAP 51  EPSTSPEDDHTQESHLD--FQDTYSKSIQISELNGAETVSSDPLEE

mKAP 100 FENTDITVKIPLAGHPVSPTS-
rKAP 98  VEETSESTVEFPLASTTTFST
    
```

Fig. II-3: Alineament rKAP (KAP de rata) i mKAP (KAP de ratolí).

Les dues seqüències presenten un 82% d'homologia a nivell nucleotídic. L'anàlisi d'homologies a nivell aminoacídic, en canvi, revela una homologia inferior: 54% d'identitat i 67% de positius, essent la regió corresponent al pèptid senyal la que presenta més gran homologia. L'organització genòmica, en canvi, és idèntica a la de ratolí. L'expressió està igualment restringida al ronyó, on es regula pels mateixos factors hormonals que la KAP murina, i a l'úter (Niu, 1996).

- **Homòleg humà:** A finals dels anys 90, amb l'augment exponencial de seqüències introduïdes a la base de dades de *est* (*expressed sequence tags*), van aparèixer seqüències obtingudes a partir de llibreries d'expressió humanes, amb elevada homologia (98-100%) a la KAP de ratolí. Posteriorment es va advertir que hi havia indicis de que les esmentades llibreries estaven contaminades amb cDNA murí. Recentment, dues noves entrades humanes 100% homòlogues al KAP de ratolí han aparegut a la base de dades GenBank: (AF319957) *Homo sapiens FKSG22 (FKSG22) mRNA*, i (BC008576) *Homo sapiens, kidney androgen regulated protein, clone MGC:18182*. Aquestes dues seqüències són 100% homòlogues a la KAP murina, tant pel que fa a la proteïna com a la seqüència nucleotídica codificant.
- **Isoformes a ratolí :** Mitjançant traducció *in vitro* de mRNA de ronyó de ratolins de diferents espècies (Melanitou, 1992), s'ha observat l'aparició de diferents formes de la KAP caracteritzades per petites variacions en el seu pes molecular. En el cas de la soca OF1 de ratolí, apareixen dues formes amb mobilitats electroforètiques lleugerament diferents. La seqüenciació dels cDNAs obtinguts a partir d'aquesta soca, confirma la presència de dues formes de la proteïna. Aquestes dues formes al·lèliques es diferencien en 3 nucleòtids que donen lloc als dos canvis aminoacídics responsables de les diferències migratòries.

#### **2.4. Abundància i distribució tissular de la KAP.**

Des de la seva identificació (Toole, 1979) el mRNA de la KAP s'ha considerat una espècie considerablement abundant al ronyó de ratolí mascle. L'aplicació de les noves tecnologies d'anàlisi a gran escala, SAGE (*serial analysis of gene expression*), SADE (*SAGE adaptation for downsized extracts*) i comparació de perfils d'expressió



gènica (*expression profile*), han confirmat l'abundància del mRNA de KAP al ronyó murí (El-Meanawy, 2000; Virlon, 1999 i Takenaka, 1998).

Mitjançant hibridació *in situ*, Meseguer i col·laboradors (Meseguer, 1987) demostren la presència del mRNA de la KAP a les cèl·lules d'alguns túbuls corticals renals, essent negatius per a la hibridació els glomèruls, altres túbuls corticals i tots els túbuls medul·lars. Els autors utilitzen la reacció de l'àcid periòdic de Schiff per demostrar que són les cèl·lules epitelials del túbul proximal renal les que efectivament estan expressant el mRNA de la KAP.

Pel que fa a l'especificitat tissular, Toole i col·laboradors (Toole, 1979) no observen nivells d'expressió significatius a fetge, melsa, cervell, glàndula submaxilar ni a vesícula seminal. Mitjançant Northern blot no s'observa expressió de KAP a: fetge, cor, pulmó, cervell, teixit adipós bru, teixit adipós blanc, glàndula submaxil·lar, melsa, teixit esquelètic, diafragma, glàndula adrenal, aorta o testicle (Ding, 1997). La utilització de RT-PCR confirma l'absència de KAP en alguns d'aquests teixits (Cebrián, 2001) figura:

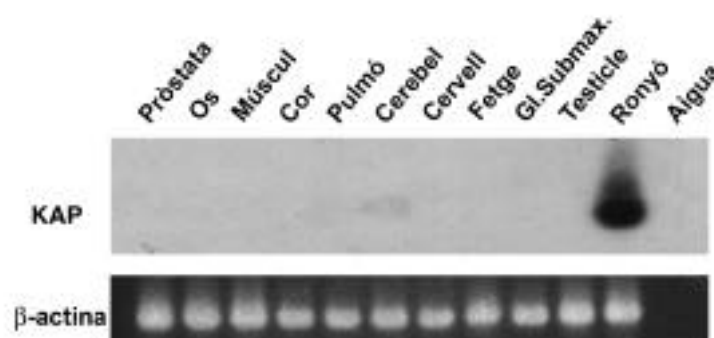


Fig. II-4: RT-PCR a partir de mRNA de diferents teixits de ratolí (C57BL/6).

L'úter és l'únic teixit extrarenal on s'ha descrit la presència del mRNA de KAP (Kasik, 1993); en el cas del ratolí, el mRNA és present única i exclusivament en els úters de femelles gestants durant els 3 dies previs al part. Això es demostra per Northern blot (Kasik, 1993) i per RT-PCR (Cebrián, 2001). No hi ha expressió de KAP a la placenta, ni tampoc a úter fora dels dies esmentats.

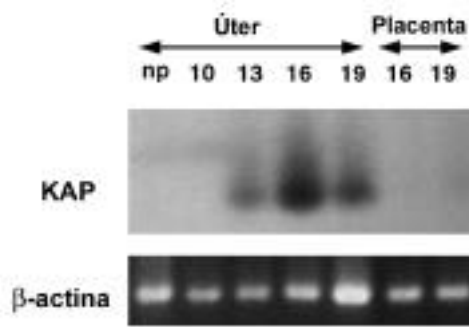


Fig. II-5: RT-PCR a partir de mRNA d'uter en diferents dies de gestació. np: no gestant.

---

En el cas de la KAP a rata, la seva presència a úter també ha estat estudiada, tant a nivell de mRNA com de proteïna (Runic, 1996). El mRNA de KAP és abundant a l'úter de rates no gestants, disminuint de manera dràstica la seva expressió a partir del dia 1 de gestació. Els autors observen un pic d'expressió el dia 5, per tornar a disminuir fent-se gairebé indetectable entre els dies 11 i 15 de gestació. A partir del dia 19 i de manera prèvia al part (dia 22) els nivells de mRNA de la KAP augmenten fins al valor inicial.

Així mateix, els autors han obtingut anticossos policlonals contra la KAP en injectar conills amb la fusió GST-KAP expressada de manera heteròloga en *E. coli*. Aquests anticossos reconeixen la KAP de rata en assaigs d'immunohistoquímica. La KAP es localitza tant a l'epiteli glandular i luminal de l'endometri com a la musculatura llisa circular i longitudinal del miometri de rata. Durant la gestació, ambdós compartiments (miometri i endometri) veuen reduït el seu contingut de KAP, principalment les cèl·lules epitelials de l'endometri (Runic, 1996).

### **2.5. Regulació hormonal.**

Tant l'especificitat tissular com la regulació per andrògens van fer de la KAP un molt bon model per estudiar els mecanismes de regulació hormonal teixit-específics. Des de la seva identificació, han estat moltes les aproximacions a l'estudi de la regulació hormonal de la KAP: diferents tractaments quirúrgics, tractaments farmacològics així com la utilització de trangènics i soques de ratolí deficientes per a una o altra hormona, han fet possible el coneixement actual de la regulació de la KAP.

### 2.5.1. El promotor de KAP.

La regió promotora de la KAP ha estat clonada i analitzada per a la presència d'elements de resposta a diferents factors de transcripció (Niu, 1991). A l'extrem 5' es troba la caixa TATAAA (nucleòtids -28 a -23) així com la seqüència CCAAC (nucleòtids -69 a -65), aquesta distribució dels elements TATA i CAAT és típica de molts gens eucariòtics que són transcrits per la RNA polimerasa II. Hi ha repeticions d'aquests elements al llarg de la seqüència de DNA, localitzats més a 5' de l'inici de transcripció, però no presenten l'orientació correcta ja sigui entre ells o respecte a l'inici de transcripció. S'han identificat altres seqüències que poden funcionar com a elements reguladors en *cis*. Entre elles es troba un element de resposta a andrògens (ARE), situat al nucleòtid -39 i solapat amb la caixa TATAAA, un possible element de resposta a hormona tiroïdal a -609, un putatiu lloc d'unió per a C/EBP a -64 i un lloc d'unió per a AP-2 a -261. També s'han descrit mitjos elements de resposta a estrògens als llocs -604 i -264.

```

-1000 taggaatttc ataaattcat tctttttaat agctgagtag tactccattg tgtagatgta
-940 ccacattttc tgtatccatt cctctgttga ggggcatcta ggttctttcc agcttctggc
-880 tattataaat aaggctgcta tgaacatagt ggagcatgtg tccttcttac cagttggggc
-820 atcttctgga tatatgcccc ggagaggtat tgctggatcc tccggtagta ctatgtccaa
-760 ttttctgagg aaccgcccaga ctgatttoca gagtggttgt acaagcctgc aatcccacca
-700 acaatggagg agtgttcctc tttctccaca tccacgccag catctgctgt cacctgaatt
-640 tttgatctta gccattctga ctataaccca gttcttggac ccattgtac agagccagca
-580 tccttggtta atgtggagtt atcaactctc aaccttcaac ctcccgtctg ggaaacgggg
-520 cgaatggct actgctaggc tactgttgag aatcacatgg tctggcactt ctagatagtt
-460 ctgcttttgc aatgagcagt tcttctactgt tctccagcaa tctgccagga tgaggactct
-400 aatgcgtaca tgaggttttt ccttagagta aaacagtcca ttttttttgg acacaaaacc
-340 atctttgggg tgcagaaaag actagctcta gcctagagga caaagaacag caatgggggt
-280 gatctggtgg agtagatgac ccctggccat tagagggtaa tgggtgctaat ggcaatgggt
-220 ggtgcaccta gtcagacttt ctactacccc agattctatt gtttctatgg ttcttagtta
-160 gtttttctta acttctctct ggggtgcatc tttaatagtt cataaaggtc cttcccaaac
-100 cctccccgc cccctttttt ttctcttoca gccaaactgtg gaaaaccacc ttcagggaga
-40 gggtacagga tgtataaaag cccaggagga ctcttttttg

```

Fig. II-6: Estructura del promotor de KAP. ARE, TRE, 1/2 ER, AP-2, C/EBP

### 2.5.2. Regulació per andrògens i estrògens a ronyó.

La KAP es va identificar en base a la seva regulació per andrògens (Toole, 1979). Mitjançant cinètiques d'hibridació, els autors assignen una concentració de mRNA de KAP en mascles BALB/c 10 vegades superior que en femelles i 200 vegades superior que en mascles castrats. Tanmateix, l'anàlisi d'una altra soca de ratolí, C57BL/6 demostra que, mentre els mascles intactes de les dues soques presenten valors semblants

de mRNA de la KAP, els castrats C57BL/6 contenen només 20 vegades menys mRNA que els mascles intactes.

Diferències dels nivells d'inducció entre soques murines s'han descrit també per a altres gens controlats per andrògens, com l'ornitina descarboxilasa (ODC) i la -glucuronidasa (Catterall, 1986; Melanitou, 1987).

El tractament de femelles i mascles castrats amb andrògens provoca un augment de l'expressió del mRNA de la KAP fins als valors descrits en mascles intactes. Aquesta inducció és evident a les 6 hores d'iniciar-se el tractament i assoleix el seu màxim a les 24 hores (Watson, 1984; Catterall, 1986). Estudis posteriors (Watson, 1988) de la taxa de síntesi del mRNA de la KAP, suggereixen una elevada estabilitat del seu mRNA, ja que la seva concentració apareix desproporcionadament elevada en comparació amb la seva taxa de síntesi; ara bé, l'estudi també demostra que l'augment en l'expressió del mRNA de KAP en resposta als andrògens és d'origen transcripcional i no degut exclusivament a l'estabilització del missatger.

Segons uns estudis inicials amb ratolins deficients per al receptor d'andrògens (Tfm), la testosterona augmenta l'expressió de la KAP en absència del seu receptor (Watson, 1984). Posteriorment es va evidenciar que no es tractava d'un efecte directe dels andrògens; al ronyó la testosterona es pot aromatitzar a estrògen i activar l'expressió de KAP en absència d'un receptor d'andrògens funcional als ratolins Tfm. La no activació de l'expressió de la KAP en utilitzar DHT (metabolit androgènic no aromatitzable) en ratolins Tmf, conjuntament amb l'activació obtinguda en tractar aquests ratolins amb -estradiol (Catterall, 1989) demostra la implicació dels estrògens en la regulació de KAP. Així, els estrògens també augmenten l'expressió de la KAP, encara que amb menor intensitat que els andrògens, en mascles, femelles i castrats (Meseguer, 1992).

La utilització de la tècnica d'hibridació *in situ* ha aportat informació valuosa per a la comprensió de la regulació hormonal de la KAP. Així s'ha demostrat (Meseguer, 1987; Meseguer, 1989) que els andrògens controlen la distribució cel·lular del mRNA de la KAP.

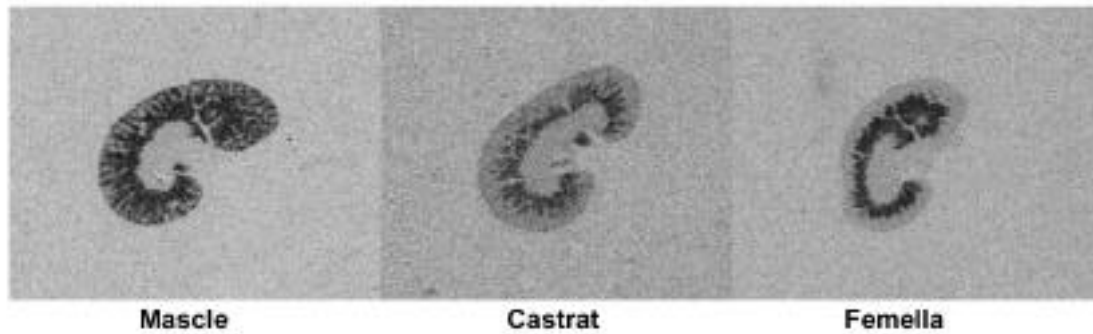


Fig. II-7: Distribució del mRNA de la KAP al ronyó de ratolí mascle, femella i castrat. Hibridació *in situ*. (Imatge cedida per la Dra. Esther Solé).

Els mascles castrats i les femelles expressen el mRNA a les cèl·lules epitelials de la regió juxtamedul·lar (zona externa de la medul·la externa, o segment  $S_3$ ). Els mascles intactes presenten, a més, un clar marcatge cortical (segment  $S_1/S_2$ ). El tractament de femelles i mascles castrats amb andrògens provoca l'aparició de senyal cortical en les hibridacions *in situ* dels ronyons d'aquests animals (Meseguer, 1990).

Els estrògens, en canvi, afecten només a l'expressió de la KAP en el segment juxtamedul·lar tant en femelles, com en mascles intactes, com en mascles castrats (Meseguer 1992).

### 2.5.3. Regulació per hormones tiroïdals a ronyó.

Si la presència d'andrògens és la responsable de l'expressió del mRNA de la KAP per part de la cèl·lula epitelial de la regió cortical, l'expressió a la regió juxtamedul·lar no és dependent d'andrògens, ja que l'extirpació de les gònades i les glàndules suprarenals no elimina l'expressió de la KAP al segment  $S_3$  (Meseguer, 1990). L'absència d'expressió a  $S_3$  en animals hipofisectomitzats (Meseguer, 1990) apunta la participació d'algun factor hipofisari. La utilització de ratolins deficientes en diferents hormones hipofisàries va indicar que l'expressió a la regió juxtamedul·lar depèn de la presència de  $T_3$ . La implicació directa de la  $T_3$  es demostra amb els assaigs amb ratolins *Hyt/Hyt* (que presenten hipotiroïdisme congènit) i amb animals tiroidectomitzats o tractats amb perclorat sòdic (impedint-se l'entrada de iode a la tiroide i la formació de  $T_3$ ). En aquests animals desapareix completament el senyal juxtamedul·lar de les femelles i els mascles castrats, recuperant-se amb el tractament amb  $T_3$  (Solé, 1994; Solé 1996).

#### **2.5.4. El ratolí transgènic KAP-HAGT.**

L'absència de línies cel·lulars renals murines que responguessin a andrògens va limitar l'anàlisi del promotor de la KAP a la generació de ratolins transgènics. Així, es va obtenir una línia de ratolins transgènics on 1542 parells de bases del promotor de la KAP dirigeixen l'expressió de l'angiotensinògen humà (Ding, 1997).

L'estudi de l'expressió del transgen en aquests ratolins demostra que el fragment de 1542 parells de bases conté la informació necessària per determinar l'especificitat tissular de l'expressió renal de KAP, així com la seva regulació per andrògens (Ding, 2001). Aquesta regulació androgènica és encara més marcada per al transgen que per a la KAP endògena; ja que en el transgènic, l'angiotensinògen humà no s'expressa ni en mascles castrats ni en femelles. Aquests resultats indiquen que els elements responsables de la regulació per hormona tiroïdal es troben fora dels 1542 parells de bases utilitzats en la construcció del transgènic.

#### **2.5.5. Regulació a úter.**

La regulació hormonal de l'expressió de la KAP a úter s'ha estudiat en el model de rata (Runic 1996), observant-se una clara dependència dels estrògens. Per una banda, els autors han avaluat els nivells de mRNA de la KAP al llarg del cicle estrogènic de la rata, identificant-se una lleugera disminució durant el diestre.

Tanmateix, els estrògens indueixen l'expressió uterina del mRNA de KAP en femelles ovariectomitzades, mentre que un inhibidor de l'acció estrogènica (tamoxifen) inhibeix l'expressió uterina, tant en femelles gestants com en no gestants.

### **3. LES CICLOFILINES**

Les ciclofilines són proteïnes ubiqües, altament conservades al llarg de l'evolució. Es troben en bacteris, fongs, plantes i vertebrats i són expressades per un ampli ventall de teixits (revisió en Göthel, 1999).

```

mCypB 1 -----MKVLFAAALIVGSSVFFLLLPGPSVANDKK---
mCypC 1 -----K---
mCypA 1 -----
mCypE 1 MATTKRVLYVGGGLAREVDDKVLHAAFIIPFGDITDIQIPLDYETERKHRGFA

mCypB 30 -----
mCypC 2 -----
mCypA 1 -----
mCypE 51 FVEFELAEDAAAAIDNMSESELFORTIRVNLAKPMRIKGGSSRPVNSDD

mCypB 30 -----KGRKVTVKVYFDLQIGD
mCypC 2 -----RGPSVTDKVPFDVREGD
mCypA 1 -----MUNPTVFPDITADD
mCypE 101 WLKKPSGKTLKRNKREERQPPKPAEAQGEPTAKKARSNPQVMDIYIGH

mCypB 47 ESVGRRVVFGLFQKTVPKTVDFVALATGKKGFGYKGRFHRRIKDFNIQG
mCypC 19 KDVGRVVIQVFNVPKTVDFVALATGKKGFGYKGRFHRRIKDFNIQG
mCypA 15 EPLGRVVFELFADKVPKTAENFRALSTGKKGFGYKGRFHRRIKDFNCGG
mCypE 151 KPAGRRQMLRSDVVFQVAAEPRCAGHREGFGYKGRFHRRIKDFNCGG

mCypB 97 GDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNGSQFFI
mCypC 49 GDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNGSQFFI
mCypA 45 GDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNGSQFFI
mCypE 201 GDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNGSQFFI

mCypB 147 STVKTQVLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDVITVDSGK
mCypC 119 GLTNPVLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDVITVDSGK
mCypA 115 CTAKTQVLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDVITVDSGK
mCypE 251 QCDATQVLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDVITVDSGK

mCypB 197 IEVERKPPFAIAKE--
mCypC 149 IDVKTPFVVEVPDW
mCypA 144 I-----
mCypE 144 I-----

```

Fig. III-1: Alineament de les ciclofilines A, B, C i E de ratolí.

```

ratoli 1 -----MKVLFAAALIVGSSVFFLLLPGPSVANDKKEKGPVTVKVIYFDL
rata 1 -----MKVLFAAALIVGSSVFFLLLPGPSVANDKKEKGPVTVKVIYFDL
home 1 MLRLSERNMKVLFAAALIVGSSVFFLLLPGPSVANDKKEKGPVTVKVIYFDL
Brosophila 1 -----NKLFLSYVVALVAGVVAIDSKGPKVTEKVFYFDL
llevat 1 -----TAKKPSGLNCHMLLFLSVNVAASDVGELIDQDDEVIQKVFYFDL

ratoli 43 QIGDESVGRVVFGLFGKTVPKTVDFVALATGKGF-GYKNSKFRHVIKD
rata 43 QIGDESVGRVVFGLFGKTVPKTVDFVALATGKGF-GYKNSKFRHVIKD
home 51 RIGDESVGRVVFGLFGKTVPKTVDFVALATGKGF-GYKNSKFRHVIKD
Brosophila 36 TIGDESVGRVVFGLFGKTVPKTVDFVALATGKGF-GYKNSKFRHVIKD
llevat 45 RIGDESVGRVVFGLFGKTVPKTVDFVALATGKGF-GYKNSKFRHVIKD

ratoli 92 FNIQGGDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNG
rata 92 FNIQGGDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNG
home 100 FNIQGGDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNG
Brosophila 85 FNIQGGDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNG
llevat 95 FNIQGGDFTRGGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGQVSMANAGKDTNG

ratoli 142 SQFFITTVKTS-WLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDV
rata 142 SQFFITTVKTS-WLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDV
home 150 SQFFITTVKTS-WLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDV
Brosophila 135 SQFFITTVKTS-WLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDV
llevat 145 SQFFITTVKTS-WLDGKRVVFGKVLGMDVVRKVVSTKTDSDRDKPLKDV

ratoli 191 IVDGKIEVEKPPFAIAKE----
rata 191 IVDGKIEVEKPPFAIAKE----
home 199 IADCKIEVEKPPFAIAKE----
Brosophila 184 IADSGITLPSSEAPVAAADATD
llevat 195 IADCGEWTPELS-----

```

Fig. III-2: Alineament de les ciclofilines B de diferents espècies.

Aquestes proteïnes es caracteritzen per presentar activitat peptidil-prolil cis-trans isomerasa, així com per ser els lligands de l'immunosupressor CsA (Schreiber, 1991).

### 3.1. Activitat Peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (PPiase):

La major part dels enllaços peptídics adopten la configuració *trans* durant la biosíntesi proteica al ribosoma; aquesta conformació és la que trobem en l'estructura nadiua de la major part dels enllaços peptídics (Ramachandran, 1968). En el cas de la prolina, en canvi, l'enllaç que precedeix a aquest aminoàcid en la cadena polipeptídica pot adoptar tant la configuració *trans* com la *cis*. La isomerització *cis-trans* d'aquest enllaç és un canvi conformacional que juga un paper important en el plegament de proteïnes (Schmid, 1978) i suposa un pas limitant en aquest procés (Brandts, 1975; Fischer, 1990; Schmid, 1993).

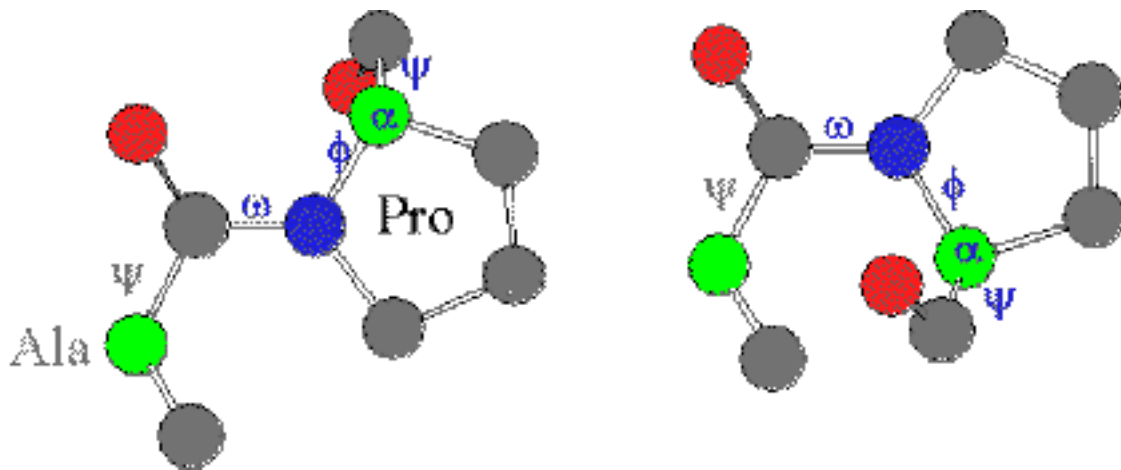


Fig. III-3: *Cis-trans* isomerització de l'enllaç peptídic.

---

L'any 1984 es va aïllar la primera peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (Fischer, 1984). Aquest enzim catalitza el gir de 180° al voltant de l'enllaç peptídic precedent a la prolina sense que hi hagi trencament de la cadena polipeptídica ni formació d'enllaços covalents. Sorprenentment, aquesta PPiase va resultar ser idèntica a la ciclofilina, descrita com a lligand de l'immunosupressor CsA.

### 3.2. Les diferents ciclofilines:

#### 3.2.1. Ciclofilina A (CyPA):

És el membre prototípic de les ciclofilines. Es va descobrir originalment com el lligand intracel·lular de la ciclosporina A (Handschumacher, 1984), i de manera



independent, per la seva activitat PPIasa (Fischer, 1984). Localitzada principalment al citoplasma, la CyPA, amb un pes molecular de 18 KDa, s'expressa abundantment a les cèl·lules de mamífer, representant fins a un 0,4 % de la fracció proteica citosòlica (Harding, 1986). Per altra banda se li han descrit fins a 4 pseudogens al genoma humà (Willenbrink, 1995).

L'anàlisi cristal·logràfica de la CyPA revela una estructura de barril amb 8 làmines i una butxaca hidrofòbica que serveix de lloc actiu per a l'activitat PPIasa, així com de lloc d'unió per a la CsA (Ke, 1991; Mikol, 1993).

Mitjançant assaigs de doble híbrid es va identificar la interacció de la CyPA amb la proteïna GAG de la càpside del virus d'immunodeficiència humana (HIV-1) (Luban, 1993), la presència de la CyPA durant l'ensamblatge dels virions ajuda a la posterior desestabilització de les càpsides necessària per a una infecció completa (Luban, 1996; Braaten, 1997; Endrich, 1999).

Tanmateix s'ha descrit la homologia de la CyPA amb una nucleasa NUC18, així com l'activitat nucleasa de la mateixa CyPA (Montague, 1994; Montague, 1997). Altres estudis apunten el requeriment de la CyPA en l'homo-oligomerització (però no hetero-oligomerització) d'alguns receptors nicotínics i de serotonina (Helekar, 1997), així com la secreció de la ciclofilina per part de la cèl·lula endotelial i com a resposta a l'estrés oxidatiu (Liao, 2000).

### 3.2.2. *Ciclofilina B (CyPB)*:

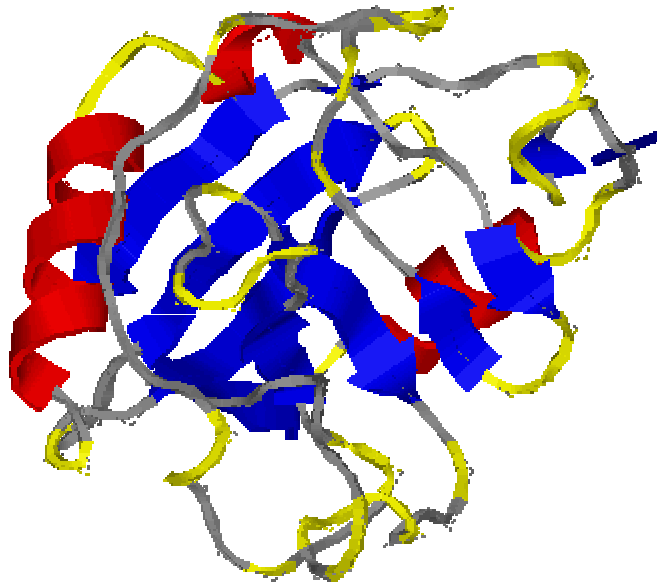
Va ser el segon membre de la família a identificar-se (Price 1991). És essencialment homòloga a la CyPA, però es caracteritza per presentar extrems amino i carboxi-terminal específics. Així a l'extrem amino-terminal trobem un pèptid senyal de 25 aminoàcids que dirigeix la proteïna a la via secretora mentre que l'extrem carboxi-terminal s'ha identificat com el responsable de la retenció de la CyPB al reticle (Arber, 1992). En cèl·lules en cultiu la proteïna es localitza principalment al reticle, al complex de Golgi, a la membrana cel·lular i també al medi de cultiu.

Per altra banda també s'ha descrit la presència de la CyPB en sèrum (Allain, 1994) i en llet (Spik, 1991; Mariler, 1996). Aquests resultats han portat a la recerca i identificació de llocs d'unió per a la CyPB a nivell de membrana de limfòcit T (Allain, 1994; Allain 1996; Denys, 1998(a); Denys, 1998(b)). Aquests llocs d'unió s'han classificat com a tipus I (depenent de receptor, porta a la internalització de la CyPB) o tipus II (interacció de la CyPB amb els glicosaminoglicans de la mebrana del limfòcit) i

no comprometen l'activitat isomerasa ni la unió amb l'immunosupressor CsA. El complex CyPB-CsA és eficientment internalitzat mitjançant receptors tipus I, la CsA s'acumula a l'interior cel·lular, el receptor es recicla a la membrana i la CyPB és degradada.

Al igual que la CyPA, també s'ha identificat la seva interacció amb la proteïna GAG del virus HIV-1, i també amb el SIV-1; en comparació amb la CyPA presenta una més alta afinitat per la proteïna vírica (Endrich, 1999).

L'anàlisi de l'estructura 3D de la CyPB confirma la homologia amb CyPA (Mikol, 1993) mentre els extrems terminals queden lluny del centres d'activitat isomerasa o d'unió a CsA.



---

Fig. III-4: Representació 3D de la ciclofilina B.

---

La CyPB s'ha implicat en processos de plegament de proteïnes específiques, així s'ha descrit la seva interacció amb procolàgen i Hsp47 (Smith 1995), prolactina (Rycyzyn, 2000) i una proteïna implicada en la mobilització del calci al limfòcit T, la CAML (Bram, 1994). Tanmateix, també se li ha descrit activitat nucleasa (Montague, 1994) i implicació en processos d'estres oxidatiu (Liao 2000)

### 3.2.3. *Ciclofilina C (CyPC):*

Al igual que la CyPB, la CyPC (23 KDa) es caracteritza per presentar extrems terminal únics, i per la presència d'un pèptid senyal amino-terminal. Un primer estudi de

la distribució tissular de la proteïna va indicar una certa especificitat d'expressió renal (Friedman, 1994; Otsuka, 1994). Estudis posteriors, en canvi, van demostrar que la CyPC s'expressa igualment i amb la mateixa abundància a altres teixits, com múscul esquelètic, pancreas, cor, pulmó i fetge (Schneider, 1994).

### 3.2.4. Altres ciclofilines:

Amb el temps s'han anat clonant diferents membres de la família de les ciclofilines de diferents espècies (Rahfeld, 1994; Hayano, 1991; Göthel, 1996). Alguns presenten localitzacions cel·lulars específiques com la CyPD, específica de mitocondri; la majoria presenten una molt baixa afinitat per la CsA i no es consideren implicats en immunosupressió. Altres han divergit prou com per especialitzar-se, com la CyP40 que forma part de receptors hormonals (Kieffer, 1993) o la ciclofilina NinaA de *Drosophila melanogaster*, responsable del correcte plegament i translocació de la rodopsina de l'ull de l'insecte (Stamnes, 1991; Collei, 1991).

## 4. LA CICLOSPORINA A

L'aïllament de la CsA a partir de cultiu del fong *Tolypocladium inflatum* i la identificació de les seves propietats immunosupressores (Borel 1976) ha tingut repercussions clíniques importants.

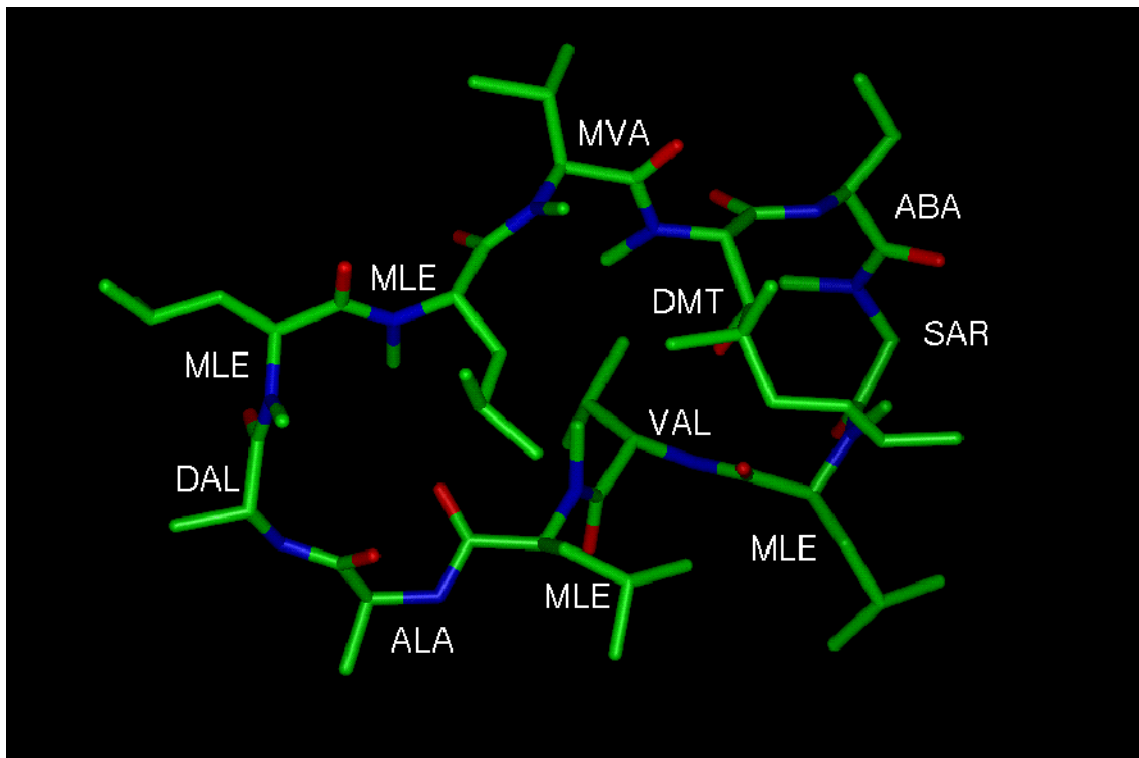


Fig. IV-1: Estructura tridimensional de l'undecapèptid immunosupressor, CsA.

Al començament dels 80s i gràcies a la CsA, entre el 70 i el 80% dels trasplantats renals toleraven a l'empelt durant el primer any; actualment aquesta percentatge és del 85-90%. La ciclosporina no només ha revolucionat el camp del trasplantament d'òrgans, sinó que també s'utilitza amb èxit en el tractament de malalties autoimmunes (Kaham, 1993).

El mecanisme pel qual la CsA exerceix el seu efecte immunosupressor sobre el limfòcit T s'esquematitza a la figura.

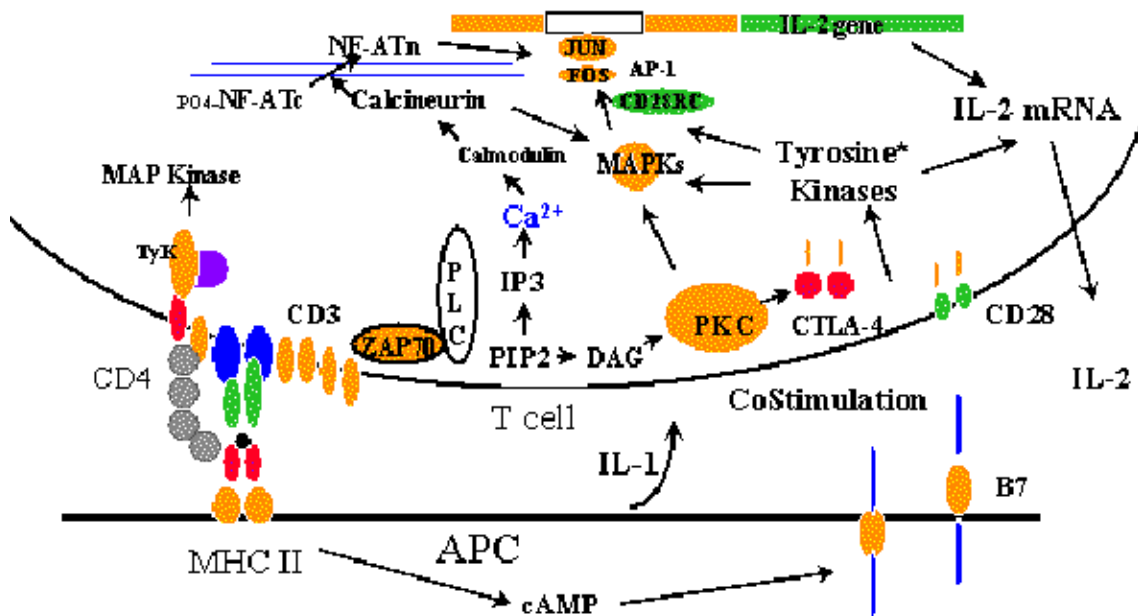


Fig. IV-2: Mecanismes d'activació del limfòcit T

L'activació del limfòcit T depèn de l'activació del receptor de cèl·lula T (TCR) i de la unió d'una molècula co-estimuladora (generalment CD28) activant-se així dues vies de senyalització independents que convergeixen en la producció de IL-2 (Revisió a Bubeck-Wardenburg, 1999; Clements, 1999).

Quan el TCR reconeix l'antigen s'activen varies vies de senyalització a través de la cua citoplasmàtica de CD3. Una d'aquestes vies porta a l'activació de la PLC, produint-se diacilglicerol (DAG) i IP3. El DAG activa la PKC mentre que l'IP3 contacta amb els receptors de membrana del reticle endoplasmàtic obrint-se els canals de calci (Weber, 1992; Gilliland, 1992; Rhee, 1997; Ebinu, 2000).

Aquest alliberament de  $\text{Ca}^{++}$  porta a l'activació tant de la calmodulina com de la kinasa dependent de calmodulina i així s'arriba a l'activació de la fosfatasa calcineurina (Revisió a Rusnak, 2000).

La calcineurina és una serin-treonin-fosfatasa que, al limfòcit T, defosforila el factor de transcripció NFAT (per *Nuclear Factor of Activated T cell*); aquesta defosforilació exposa el senyal de localització nuclear, el NFAT es trasloca a nucli i s'uneix al promotor de IL-2 (Crabtree, 1994; Jain, 1995).

Per a l'activació de l'IL-2, però, no n'hi ha prou amb l'NFAT. La unió de CD28 porta a l'activació de la IP3 kinasa que promou el pas de IP2 a IP3 activant-se les JNK kinases (Pages, 1994; Eder, 1998). La fosforilació de c-Jun i l'heterodimerització amb fos formant AP1 completa el mecanisme d'activació del limfòcit T i porta a l'expressió de l'IL2 (Jain, 1992a; Jain, 1992b; Boise, 1993; Chen, 1995).

La ciclosporina A (CsA) exerceix el seu efecte immunosupressor en unir-se a la ciclofilina i inhibint la calcineurina, impeding que defosforili el factor NFAT (Liu, 1991; Clipstone, 1993). Només el complexe CsA-CyP pot inactivar la calcineurina, i no totes les ciclofilines presenten la mateixa afinitat per CsA ni la mateixa eficiència en inhibir la fosfatasa. L'afinitat relativa de la CyPC per CsA és dues vegades inferior a la de la CyPA i aquesta és 10 vegades inferior a la de la CyPB (Schneider, 1994). Això es tradueix en una més eficient inhibició de la calcineurina per part de la CyPB (Swanson, 1992).

#### **4.1. Nefrotoxicitat per CsA**

Malgrat la seva utilitat com a immunosupressor en els trasplantaments d'òrgans i els tractaments de malalties autoimmunes, la utilització de la CsA es veu limitada pel seu principal efecte secundari: la nefrotoxicitat. Aquesta es pot presentar com a nefrotoxicitat aguda o crònica.

La nefrotoxicitat aguda apareix durant les primeres setmanes o mesos de tractament, es caracteritza per una davallada en la funció renal de manera dosi-dependent i es considera conseqüència de l'alteració dels nivells de vasoconstrictors i vasodilatadors a nivell renal (Wolf, 1995). És una patologia reversible, de manera que la reducció de la dosi recupera la funció renal.

La nefrotoxicitat crònica porta a la fallada renal irreversible així com fibrosi intersticial. Conjuntament amb alteracions en l'hemodinàmica renal, es caracteritza per presentar vacuolització citoplasmàtica, augment del volum del reticle endoplàsmic de

les cèl·lules S<sub>3</sub> del túbul proximal (Mihatsch, 1986), fibrosi intersticial i engruiximent de la membrana basal de les cèl·lules del túbul (Myers, 1984). Sovint apareix tubulopatia i hipertensió associades.

Així podem parlar dels efectes vasculars i dels efectes cel·lulars de la toxicitat per CsA, sense que s'hagi establert una relació clara entre ambdós tipus de patologia ni relacions de causalitat entre elles.

A nivell hemodinàmic s'ha descrit l'efecte del tractament amb CsA tant sobre els sistemes vasoconstrictors (eix renina-angiotensina (Lee, 1997), producció d'endotelina, sistema nerviós simpàtic, nivells d'adenosina i de tromboxà A<sub>2</sub>) com sobre els sistemes vasodilatadors (producció d'òxid nítric i sistema kalicreina-kinina) (revisió en Ader, 1998).

Els mecanismes que provoquen la fibrosi intersticial mediada per CsA no es coneixen en profunditat, però s'ha demostrat la implicació de TGF- en aquest procés així com l'efecte del tractament amb CsA sobre els nivells de TGF- (Wolf, 1995).

Entre els efectes de la CsA descrits específicament a nivell de la cèl·lula del túbul proximal renal trobem tant necrosi com apoptosi (Healy, 1998; Shihab, 1999), disminució de l'activitat gluconeogènica (Morris, 1992), alteracions en la concentració de calci lliure (Gordjani 2000) i també aturada del cicle cel·lular (Lally, 1999).

Diversos estudis amb variants no immunosupressores de la CsA, demostren que la toxicitat renal està íntimament lligada a l'efecte immunosupressor (Sigal, 1991). Encara que es desconeix el mecanisme cel·lular exacte de toxicitat a nivell de túbul renal, la desaparició dels efectes tòxics en absència d'immunosupressió suggereix que ambdós mecanismes actuen a través de la mateixa via. La diana final de la CsA, el NFAT, era considerat un factor específic del limfòcit. Posteriorment s'ha evidenciat la seva presència en teixit muscular (Hoey, 1995), així com la seva implicació en hipertròfia cardíaca (Molkentin, 1998). A nivell renal, en canvi, només s'ha identificat el mRNA de NFAT3 i NFAT4 (Hoey, 1995), sense que hi hagi evidències de la presència de la proteïna ni de la seva activitat.

Per altra banda, la calcineurina, responsable de la defosforilació del NFAT i diana directa de la CsA, sí és present al teixit renal. La calcineurina és un complex proteic heterotrimèric compost per una subunitat catalítica, una subunitat reguladora, i calmodulina (Rusnak, 2000). És principalment citoplasmàtica, però també es localitza a nucli associada amb altres proteïnes com la CK2 (Shibasaki, 1996). L'associació de la calcineurina amb el citoesquelet també ha estat descrita (Ferreira,

1993), co-localitzant en aquest compartiment amb alguns dels seus substrats, incloent-hi tau, tubulina i la proteïna associada a microtúbuls 2 (Goto, 1985; Kayyali, 1997). Al cervell, és la principal proteïna d'unió a calmodulina i té una funció essencial en la transmissió sinàptica. La calcineurina o protein fosfatasa 2B (PP2B), és única entre les serin-treonin fosfatases donada la seva dependència de calci i calmodulina (Stewart, 1982). Al ronyó de rata, l'activitat calcineurina màxima es detecta al túbul proximal, en comparació amb els altres segments de la nefrona (10 vegades superior) (Tumlin, 1995).

Es desconeix el paper fisiològic exacte de la calcineurina al ronyó però s'ha demostrat la seva implicació en la regulació basal de l'ATPasa Na/K de l'epiteli renal (Tumlin, 1993; Lea, 1994), així com en l'activació dependent de receptor d'aquesta ATPasa (Aperia, 1992; Middleton, 1993). Igualment s'ha identificat la seva implicació en senyalització via receptors adrenèrgics i dopaminèrgics, de glucocorticoides i de mineralocorticoides (Tumlin, 1997).





La Kidney Androgen-regulated Protein (KAP) es caracteritza per l'especificitat tissular de la seva expressió, l'abundància relativa del seu mRNA, i per l'absència d'homologies amb proteïnes de funció coneguda.

Amb el treball descrit en aquesta tesi s'inicia un projecte adreçat a la identificació de la funció de la Kidney Androgen-regulated Protein (KAP), així com la seva possible implicació en fisiopatologia renal.

A tal efecte, i donat el desconeixement gairebé absolut que en el seu moment es tenia de la proteïna, es van plantejar els següents objectius concrets.

- Obtenció i caracterització d'anticossos monoclonals específics contra la Kidney Androgen-regulated Protein (KAP). Assaig d'aquests anticossos per tècniques de Western blot, immunoprecipitació, immunohistoquímica i immunocitoquímica. La consecució d'aquest objectiu ens permetrà:
  - La caracterització bioquímica de la Kidney Androgen-regulated protein (KAP). Estudi de les possibles modificacions post-traduccionals de la proteïna.
  - La localització a nivell tissular i cel·lular de la KAP.
- Identificació de proteïnes que interactuin amb la KAP al ronyó murí mitjançant la tècnica del doble híbrid en llevat. Descripció de la rellevància funcional d'aquestes interaccions.
- Establiment d'un model cel·lular d'expressió controlada de la KAP, el qual permeti contrastar i verificar *ex-vivo* els resultats obtinguts al ronyó de ratolí i en el model de llevat.

---

<b>1. ANIMALS.....</b>	<b>43</b>
<b>2. LÍNIES CEL·LULARS .....</b>	<b>43</b>
<b>3. LLEVATS I BACTERIS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1. LLEVAT: .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2. BACTERI: .....</b>	<b>44</b>
<b>4. EINES BIO-INFORMÀTIQUES.....</b>	<b>44</b>
<b>5. REACTIUS QUÍMICS.....</b>	<b>44</b>
<b>6. APARELLS .....</b>	<b>45</b>
<b>7. MEDIS I TAMPONS.....</b>	<b>46</b>



## 1. ANIMALS

S'han utilitzat ratolins de la soca C57BL/6 mascles i femelles adquirits a IFFA CREDO (L'ARBESCLE, FRANCE) a les 6 setmanes d'edat. Els animals varen ser estabulats a 22 °C amb períodes de llum de 12 hores i amb aliments i aigua *ad libitum*. Els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical un cop finalitzat el tractament. Tots els experiments s'han realitzat d'acord amb l'establert per la Comunitat Europea (real decreto 223/1988: B.O.E. n° 67, 18/3/88 i B.O.E. n° 256, 25/10/90).

## 2. LÍNIES CEL·LULARS

**PKSV-PCT:** Línia cel·lular epitelial de túbul proximal renal murí, procedent de ratolí (*Mus musculus*) transgènic per als antígens T gran i t petita del virus SV40 sota el control de la regió reguladora del gen de la piruvat kinasa tipus L (L-PK) de rata i obtinguda per microdissecció de la regió contornejada proximal (Cartier, 1993, Lacave, 1993).

**CHO-AA8-LUC:** Línia cel·lular originada mitjançant una doble transfecció estable utilitzant el sistema Tet-Off. Aquestes cèl·lules expressen el gen de la luciferasa en absència de tetraciclina. La línia parental CHO prové de biòpsia d'ovari de hámster adult (*Cricetulus griseus*) i presenta característiques epitelials. Disponible a l'American Type Culture Collection (ATCC) (<http://www.atcc.org/>) amb el número CCL-61.

**MDCK:** Línia cel·lular epitelial obtinguda per S.H. Madin i N.B. Darby a partir de ronyó de femella adulta cocker spaniel (*Canis familiaris*). Disponible a l'ATCC amb el número CCL-34.

**HEK293:** Línia cel·lular epitelial derivada de cultiu primari de ronyó humà embrionari transformat amb DNA de l'adenovirus 5 humà. Disponible a l'ATCC amb el número CRL-1573.

## 3. LLEVATS I BACTERIS

### 3.1. Llevat:

**YRG-2:** *Matα ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3112 gal4-542 gal80-538 LYS2::UAS<sub>GAL1</sub>-TATA<sub>GAL1</sub>-HIS3 URA3::UAS<sub>GAL4</sub> 17MERS<sub>(x3)</sub>-TATA<sub>CYC1</sub>-lacZ.*

### 3.2. Bacteri:

**XL1-Blue MRF'**: (*mcrA*)183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>Z M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)*].

**XL0LR**: (*mcrA*)183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>Z M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*] Su<sup>-</sup> R.

**JM109**: (e14<sup>-</sup>) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 (lac-proAB)* [F' *traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Z M15*].

**DH5- $\alpha$** : F *endA1 recA1 hsdR17 (r<sub>k</sub>-m<sub>k+</sub>) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1  $\lambda$* .

**XL1-Blue**: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>Z M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)*].

## 4. EINES BIO-INFORMÀTIQUES

S'han utilitzat diferents webs i servidors, tant per a l'anàlisi de seqüències com en la predicció d'estructura. En cada cas concret s'especifica quina o quines han estat les pàgines web utilitzades. Com a paquet d'anàlisi hem fet servir l'OMIGA 2.0 de GCG (Genetic Computer Group, A subsidiary of Pharmacoepia, Inc. <http://www.gcg.com/>). Una bona compilació de bases de dades la trobem al web de biologia molecular ExpASy (Expert Protein Analysis System) <http://www.expasy.ch/>.

## 5. REACTIUS QUÍMICS

Els productes químics utilitzats provenen principalment de les cases Boehringer-Manheim-Roche (<http://www.roche.com/>), Fluka (<http://www.sigma-aldrich.com/fluka>), MERCK (<http://www.merck.com/>), Panreac (<http://www.panreac.es/>) i Sigma Chemical Co (<http://www.sigma-aldrich.com/>).

## 6. APARELLS

- *Assecador de gels:* Slab Gel Dryer SGD-4050 Savant
- *Autoclau:* MATACHANA
- *Bany:* THERMOMIX MM B. BRAUN
- *Campanes de cultius:*
  - TELSTAR BIO II-A
  - TELSTAR AV-30/70
  - TELSTAR BIO II-B
- *Centrifugues:*
  - SORVALL RT 6000 D
  - SORVALL RC5C
  - HERAEUS Sepatech
- *Congeladors i neveres:*
  - REVCO (-80)
  - LIEBHERR (-20)
- *Contenidor de nitrogen líquid:* BR2100 CRYO DIFFUSION (LERY-FRANCE)
- *Criostat:* Bright Instrument Company LTD., Huntingdon, United Kingdom.
- *Cubetes electroforesi:*
  - ECOGEN (diferents mides)
  - BIO-RAD MINI-SUB CELL GT
  - BIO-RAD SUB-CELL GT
- *Espectrofotòmetres:*
  - GeneQuant II. Pharmacia
  - Beckman DU 70
- *Estufes:*
  - MEMMERT
  - HERAEUS
- *Fonts d'electroforesi:*
  - Pharmacia LKB-GPS 200/400
  - Pharmacia EPS 500/400
  - BIO-RAD POWER PAC 300
- *Incubadors de CO<sub>2</sub>:* FORMA-SCIENTIFIC
- *Lector de plaques d'ELISA:* Anthos ht II
- *Luminòmetre:* Labsystem Luminoscan RS
- *Màquina de gel:* SCOTSMAN AF20
- *Microfugues:*
  - SIGMA 112
  - BECKMAN Microfuge E
- *Microscopi confocal:* Leica DMIRB
- *Microscopi òptic:* Olympus BX40
- *Plaques calefactores / agitadors magnètics:*
  - HEIDOLPH MR 2002
  - THERMOLYNE NUOVA II Stirplate
- *Politrón:* Politron KINEMATICA AG. LITTAU-LUZERN. Swiss
- *Reveladora:* CURIX 60. AGFA
- *Seqüenciador:* ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
- *Sistemes de purificació d'aigua:*
  - MILLI-RO MILLIPORE
  - MILLI-Q<sub>plus</sub> MILLIPORE
- *Sonicador:* SONIFIER 250 BRANSON
- *Speed-Vac:* Savant SC 100
- *Termoblock:* TEMBLOC P Selecta
- *Termocicladors:*
  - GeneAmp PCR System. Perkin Elmer 2400
  - GeneAmp PCR System. Perkin Elmer 9600
  - PTC-100 MJ Research, Inc
- *Vòrtex:* HEIDOLPH REAX 2000

## 7. MEDIS I TAMPONS

### ▪ 20 x MOPS

0,4 M MOPS  
0,1 M Acetat sòdic  
0,01 M EDTA

Ajustar a pH 7,0

Esterilitzar per filtració.

### ▪ 1x PBS

137 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Autoclavar

### ▪ RIPA

0,1% SDS  
0,5% Deoxicolat sòdic (DOC)  
1% NP-40  
en 1x PBS

Esterilitzar per filtració.

Abans d'utilitzar afegir:

leupeptina (10 µg/ml)  
aprotinina (10 µg/ml)  
PMSF (1 mM)  
ortovanadat sòdic (0,1 mM)

### ▪ Solució A+B

50 mM Tris-HCl pH 8,0  
50 mM EDTA pH 8,0  
7,5 % sucrosa  
0,05% Triton X-100  
Autoclavar

### ▪ Solució de lisi per miniprep de llevats:

2% (v/v) Triton X-100  
1% (w/v) SDS  
100 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
1 mM EDTA

Guardar a temperatura ambient.

### ▪ Solució D

4M Tiocianat de guanidina  
25 mM Citrat sòdic pH 7  
0,5% N-Lauroil Sarcosina (Sarcosil)  
en H<sub>2</sub>O DEPC

Abans d'utilitzar afegir -mercaptoetanol (720 µl /

100 ml Sol.D)

### ▪ 20 x SSC

3 M NaCl  
0,3M Citrat sòdic

Autoclavar

Ajustar el pH a 7.0

### ▪ 10 x TAE

24,2 g Tris base  
5,71 ml àcid acètic  
3,72 g Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O fins a 1 litre

Autoclavar

### ▪ 10 x TBE

890 mM Tris base  
890 mM Àcid bòric  
20 mM EDTA pH 8,0

Autoclavar

### ▪ TBS/Ca

50 mM Tris base  
150 mM Na Cl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>

Ajustar el pH a 7,4

Autoclavar

### ▪ TE

10 mM Tris-HCl pH 7,5  
1 mM EDTA pH 8,0

Autoclavar

### ▪ Z-Buffer

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM KCl  
1 mM MgSO<sub>4</sub>

Autoclavar

Abans d'utilitzar afegir -mercaptoetanol (50 mM) i  
X-Gal (1 mg/ml)

### ▪ Medis de cultius bacterians

#### • LB

10 g NaCl  
10 g Triptona (Difco)  
5 g yeast extract (Difco)  
H<sub>2</sub>O fins a 1litre  
Ajustar pH a 7,0

Autoclavar

Quan l'experiment ho requereix, el medi LB s'ha suplementat amb els següents antibiòtics:

Ampicil·lina 50 mg/l  
 Kanamicina 50 mg/l  
 Tetraciclina 12,5 mg/l

- **LB agar**

Afegir 20 g d'agar per cada litre de LB  
 Autoclavar  
 Refredar a 50°C  
 Afegir (si s'escau):  
 l'antibiòtic per a la selecció  
 IPTG (20 µg/ml)  
 X-Gal (20 µg/ml)  
 Repartir en plaques de 10 o 15 cm de diàmetre

- **NZY**

5 g NaCl  
 2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O  
 5 g yeast extract (Difco)  
 10 g hidrolisat de caseína (Difco)  
 H<sub>2</sub>O fins a 1 litre  
 Ajustar pH a 7,5  
 Autoclavar

- **NZY agar**

Afegir 15 g d'agar per litre de NZY  
 Autoclavar  
 Repartir en plaques de 10 o 15 cm de diàmetre

- **NZY top agar**

Afegir 0,7 % agarosa al medi NZY  
 Autoclavar

- **2 x YT**

10 g NaCl  
 10 g yeast extract  
 16 g triptona  
 H<sub>2</sub>O fins a 1 litre  
 Ajustar pH a 7,5  
 Autoclavar

- **Medis llevat**

- **YPD**

20 g peptona  
 10 g yeast extract  
 H<sub>2</sub>O fins a 950 ml  
 Ajustar pH a 5,8  
 Autoclavar  
 Refredar a 55°C

Afegir 50 ml de glucosa estèril al 40% (concentració final de glucosa: 2%)

- **YPD agar**

Afegir 15 g d'agar per 950 ml de YPD (sense glucosa)  
 Autoclavar  
 Afegir 50 ml de glucosa estèril al 40% (concentració final de glucosa: 2%)  
 Repartir en plaques

- **SD**

1,7 g yeast nitrogen base  
 5 g Sulfat amònic  
 182,2 g D-sorbitol  
 H<sub>2</sub>O fins a 850 ml  
 Ajustar pH a 5,8  
 Autoclavar  
 Afegir 100 ml de solució 10x d'aminoàcids estèril  
 Afegir 50 ml de glucosa estèril al 40% (concentració final de glucosa: 2%)

- **SD agar**

Afegir 15 g d'agar per 850 ml de SD  
 Autoclavar  
 refredar a 55°C  
 Afegir 100 ml de solució 10x d'aminoàcids estèril  
 Afegir 50 ml de glucosa estèril al 40% (concentració final de glucosa: 2%)  
 Repartir en plaques

- **10 x aminoàcids**

Aminoàcid	mg / litre
L-Isoleucina	300
L-Valina	1500
L-Adenina hemisulfat	200
L-Arginina HCl	200
L-Histidina HCl monohidrat	200
L-Leucina	1000
L-Lisina HCl	300
L-Metionina	200
L-Fenilalanina	500
L-Treonina	2000
L-Triptofan	200
L-Tirosina	300
L-Uracil	200



Autoclavar i guardar a 4°C

El medi no contindrà alguns d'aquests aminoàcids quan es vulgui seleccionar la presència dels plàsmids pAD-GAL4 (sense L-leucina), pBD-GAL4 (sense L-triptòfan) o per a la interacció (sense L-histidina HCl monohidrat).

▪ Medis línies cel·lulars:

• Medi PCT/PR

DMEM -----	50%
HAM'S F12 -----	50%
HEPES -----	20mM
Glutamina-----	2 mM
D(+)-GLUCOSA -----	12,5mM
Transferrina-----	5µg/ml
Insulina-----	5µg/ml
Dexamatasona-----	5·10 <sup>-8</sup> M
T <sub>3</sub> -----	10 <sup>-9</sup> M
EGF -----	10ng/ml
Selenium -----	60nM
Sèrum boví fetal -----	2%
Antibiòtic/Antimicòtic-----	1%

• DMEM complet (HEK293, CHO i MDCK)

Minimum essential medium Eagle  
2 mM L-glutamina  
0,1 mM aminoàcids no essencials  
1 mM Piruvat sòdic  
10% sèrum boví fetal.

• Medi de marcatge metabòlic

MEM Eagle W/ Earle's salts  
w/o met  
2mM L-glutamina  
2% sèrum boví fetal.