



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Ciències**

**MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS EN LA
NEFROTOXICITAT PER CICLOSPORINA A (CsA):
ESTUDI DELS EFECTES DE LA CsA EN LES VIES
ERK I PI3K**

Memòria presentada per

Eduard Sarró Tauler

Per optar al grau de Doctor en
Bioquímica i Biologia Molecular

Treball realitzat a la Unitat de Biociències del Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular sota la direcció del Dr. Emili Itarte Fresquet

Dr. Emili Itarte Fresquet

Eduard Sarró Tauler

Bellaterra, Setembre del 2008

Aquest treball ha estat subvencionat pels ajuts BFU2005-07573 del Ministerio de Educación y Ciencia, i 002231 de la Fundació La Marató de TV3.

als meus pares i germans,

a la Gina

Sóc conscient quan escric aquestes paraules que molts dels que fullejaran aquesta tesi es limitaran a llegir aquesta pàgina. Sento decepcionar-los si esperen un toc d'originalitat, doncs, malauradament, la majoria de neurones han caigut pel camí. Ha estat una tesi extensa (en el temps, més que en l'espai), amb moments bons i moments millors, però com es sol dir, tot va bé si acaba bé, i precarietats apart, ha estat una etapa irreplicable (i que espero no es repeteixi) que sobretot m'ha permès conèixer i gaudir d'una ampla varietat de persones i personatges, il·lustres científics i brillants noctàmbuls, dels qui m'enduc amb molta gratitud un bocí de cadascú. Així doncs, voldria expressar el meu ampli agraïment a totes aquelles persones que d'alguna o altra manera han contribuït a fer possible la realització d'aquesta tesi i que m'han acompanyat en el transcurs d'aquests anys:

En primer lloc al Dr. Emili Itarte, per haver-me acceptat al seu grup d'investigació obrint-me aquesta primera porta del món científic, i per haver dirigit aquest treball amb gran interès i dedicació durant tots aquests anys. El meu agraïment també a la Dra. Maria Plana. A la Dra. Anna Meseguer, per haver-me permès participar en un interessantíssim projecte i col·laborar amb el seu grup.

Als tots els kinàsics, dir-los que em sento orgullós d'haver pogut formar part d'aquesta saga irreductible: gràcies Nerea, Franc, Arnau i Anna i també als continuadors Jordi i Ton, que amb el cap ben alt mantenen els valors científico-culturals del grup. Em caldrien incontables pàgines per expressar-vos el meu agraïment, però com bé sabem, un "gin&tonic" val més que mil paraules. També, com no, voldria agrair als entranyables veïns de la tercera que han patit anys de saquejos i donacions a fons perdut, tanta paciència i comprensió (penseu que aquesta tesi també és vostra!). També voldria agrair al Dr. Bartolomé, que quan he tingut la sort de trobar-lo, i quan no hi ha hagut cap dona que el distraigués (es conya, o no!), ha estat sempre de gran ajut, gràcies company! També agrair a l'Elena el seu ajut però sobretot el seu entusiasme tan contagiós. A la resta de gent del Departament de Bioquímica, moltes gràcies per tots els moments compartits, pels vostres consells i per escoltar amb paciència els renecs dels últims temps, per aturar-me pel passadís preguntant-me "per quan?" o ajudar-me a recordar l'última farra, per haver compartit penes, concursos però també festes, dinars i demés, que espero i desitjo segueixin durant molt de temps. Finalment, a tots aquells que estan en aquesta llarguíssima recta final, animar-los: si amics, hi ha llum al final del túnel!

Finalment agrair a amics, família i en especial a la Gina, per donar-me suport i suportar-me, cosa que no es tan fàcil com aparentment podria semblar. A tots vosaltres, sincerament, moltes gràcies.

Abreviatures	iii
Índex de figures i taules	v
Resum	1
Introducció	3
1. La Ciclosporina A.....	5
1.1 Efecte immunosupressor de la CsA.....	5
1.2 Nefrotoxicitat per CsA	8
1.3 Toxicitat cel·lular de la CsA.....	12
2. Les Ciclofilines.....	15
2.1 Les ciclofilines són immunofilines	15
2.2 Localització subcel·lular i secreció.....	17
2.3 Funcions fisiològiques de la Ciclofilina B.....	17
2.4 Receptors cel·lulars per a les ciclofilines	23
2.4.1 Receptors de tipus II. Els HSPG	23
2.4.2 Receptors de tipus I.....	24
3. El receptor de EGF (EGFR).....	27
3.1 Activació del EGFR.....	27
3.2 Transactivació del EGFR	30
3.3 EGFR i ronyó	31
4. Les fosfatidilinositol-3-quinases (PI3Ks).....	34
4.1 Activació de les PI3K	36
4.2 Efectors de la via PI3K.....	37
5. Les quinases regulades per senyals extracel·lulars (ERKs).....	41
5.1 Activació de la via ERK1/2.....	41
5.2 Efectors de la via ERK1/2	43
Objectius	45
Resultats	49

1. Capítol I: Els inhibidors de la PI3K protegeixen enfront de la toxicitat per CsA en cèl·lules PCT3.....	51
1.1 Introduction	53
1.2 Methods	55
1.3 Results	58
1.4 Discussion.....	67
2. Capítol II: L'activació de les vies ERK i PKB i la toxicitat induïdes per CsA son el resultat d'un bucle autocrí/paracrí implicant un factor d'unió a heparina.....	69
2.1 Introduction	71
2.2 Methods	73
2.3 Results	75
2.4 Discussion.....	84
Discussió general	87
Conclusions	105
Bibliografia	109

ADAM: a desintegrin and metalloprotease
Akt o PKB: Proteïna quinasa B
Ang II: Angiotensina II
CaN: Calcineurina
CD147 o EMMPRIN: extracellular matrix metalloproteinase inducer
CsA: Ciclosporina A
CsA-CM: CsA-conditioned medium
Ctl-CM: Control-conditioned medium
Cyp: Ciclofilina
ECM: matriu extracel·lular
EGF: Epidermal growth factor
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EMT: transició epiteli-mesenquimal
ERK1/2: quinases regulades per senyals extracel·lulars
ET-1: endotelina 1
FKBPs: FK506 binding proteins
GAG: glicosaminoglicans
GPCR: G protein coupled receptors
GTPasa: proteïna hidrolasa de GTP
HB-EGF: heparin-binding EGF-like growth factor
HSPG: proteoglicans de tipus heparan sulfat
IC₅₀: concentració inhibidora del 50%
IL: Interleuquina
JNK: c-Jun N-terminal kinase
KAP: kidney androgen regulated protein
LDH: lactat deshidrogenasa
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MBP: myelin basic protein
MEK o MAPKK: mitogen-activated protein kinase kinase
MMP: matrix metalloproteinase
mTOR: mammalian Targeted of rapamycin
NFAT: Nuclear Factor of Activated T cell
NLS: senyal de localització nuclear
PDGF: Platelet-derived growth factor
PDK1: Phosphoinositide dependent-kinase 1
PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa
PKB: proteïna quinasa B
PKC: proteïna quinasa C
PCT: proximal convoluted tubules
PLC: fosfolipasa C
PP2B: proteïna fosfatasa 2B o calcineurina
PPlasa: activitat peptidil-prolil cis-trans isomerasa
PTB: phospho-tyrosine binding
PtdIns: fosfatidilinositol
PtdIns-P: fosfatidilinositol fosfat
PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10
RAS: sistema Renina-Angiotensina
ROS: reactive oxygen species
RTKs: receptors tirosina quinasa.
SH2: src homology 2
siRNA: small interfering RNA
STAT: signal transducer and activator of transcription
TGF- β : transforming growth factor beta
TMPS: triple membrane passing signal

Introducció:

Figura 1. Estructura de la CsA	5
Figura 2. Mecanisme d'activació del Limfòcit T.....	6
Figura 3. Models estructurals de la interacció entre CsA, ciclofilina A i calcineurina.	7
Figura 4. La nefrona, la unitat morfològica bàsica del ronyó.	8
Figura 5. Efectes histològics del tractament amb CsA.....	10
Figura 6. Model de nefrotoxicitat crònica per CsA.	11
Figura 7. Anàlisi per citometria de flux dels efectes de la CsA en les cèl·lules LLC-PK1.....	12
Figura 8. Activitat peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa).	15
Figura 9. Alineament de la seqüència d'aminoàcids de CypA, B i C.	16
Figura 10. Paral·lelisme entre la senyalització per prolactina i esteroides.	20
Figura 11. L'expressió de la proteïna KAP protegeix de la toxicitat induïda per CsA.....	23
Figura 12. La família dels EGFR.	28
Figura 13. L'activació de EGFR comporta l'activació de diferents vies de senyalització.....	28
Figura 14. Lligands per a la família ErbB de receptors RTKs.	29
Figura 15. Mecanisme de TMPS per a la transactivació del EGFR.....	31
Figura 16. Diagrama esquemàtic resumint les dianes de la via PI3K.....	37
Figura 17. Representació esquemàtica de l'activació de PKB.....	39
Figura 18. Esquema de la via de ERK1/2.	42

Resultats:

Figura 19. CsA induces cell death in PCT3 cells.	58
Figura 20. CsA treatment activates ERK and PKB.	59
Figura 21. CsA-induced ROS generation mediates ERK but not PKB activation and is not involved on CsA cytotoxicity.....	61
Figura 22. CsA-induced ERK and PKB activation are mediated by EGFR.....	62
Figura 23. CsA activates MEK and Raf-1 but has no effect on Ras.	63
Figura 24. ERK inhibitors do not rescue from CsA-induced cell death.	63

Figura 25. PI3K inhibitors rescue from CsA-induced cell death.....	64
Figura 26. siRNA against 110 α catalytic subunit of class IA PI3K does not prevent CsA-induced toxicity.....	65
Figura 27. mRNA expression of PI3K isoforms in PCT3 cells.	66
Figura 28. Potential role for EGFR and PI3K on CsA-induced cell death.....	68
Figura 29. CsA-conditioned medium induces ERK and PKB activation and cell death.	76
Figura 30. BFA blocked CsA-induced EGFR activation.....	77
Figura 31. MMP are involved in CsA-induced ERK and PKB activation.....	78
Figura 32. TGF- β is not involved in CsA-induced effects in PCT3 cells.	79
Figura 33. CsA induces CypB secretion.....	80
Figura 34. CypB in CsA-CM is involved in ERK and PKB activation.	82
Figura 35. HSPGs are necessary for CsA-induced ERK and PKB activation and cell death.	83

Discussió

Figura 36. Efecte del tractament amb CsA en la morfologia cel•lular de HK-2.....	91
---	----

Taules

Taula 1. Expressió dels receptors ErbBs i els seus lligands en el ronyó.	32
Taula 2. Resum dels diferents classes de PI3K.	35

RESUM:

La Ciclosporina A (CsA) és un immunosupressor àmpliament utilitzat per evitar el rebuig de l'òrgan trasplantat. Malgrat tot, el seu ús s'ha vist limitat pels seus marcats efectes nefrotòxics. En el ronyó s'observa una diferent sensibilitat a la CsA segons el tipus cel·lular, sent les cèl·lules dels túbuls proximals les més sensibles. En aquest sentit, diversos treballs anteriors demostren la capacitat de la CsA d'induir efectes tòxics directament sobre la cèl·lula tubular en cultiu. L'objectiu d'aquesta tesi ha estat estudiar els efectes tòxics de la CsA en cèl·lules derivades del túbul proximal de ratolins i intentar determinar els mecanismes moleculars implicats en la toxicitat per CsA. Per a aquest fi s'ha analitzat els efectes del tractament amb CsA en la viabilitat cel·lular i sobre dues importants vies de senyalització implicades en mecanismes de supervivència i mort com són les vies ERK 1/2 i PI3K. Els nostres resultats mostren que el tractament amb CsA indueix toxicitat i pèrdua de la viabilitat cel·lular de manera dosis i temps depenent. El tractament amb CsA també indueix l'activació d'ambdues vies, si bé amb diferents conseqüències fisiològiques. Així, l'activació d'ERK no participa en els efectes tòxics de la CsA mentre que el bloqueig d'algunes isoformes de PI3K resulta en un important rescat de la citotoxicitat. En analitzar els mecanismes que condueixen a aquests efectes, hem observat que els efectes de la CsA sobre la viabilitat i l'activació d'aquestes vies de senyalització venen mediades per la transactivació del receptor de EGF (EGFR). L'activació del EGFR depèn, al seu torn, de la secreció d'un o més factors en resposta a CsA i que actuarien per un mecanisme autocrí sobre la pròpia cèl·lula. En el procés d'activació de EGFR estarien implicades també les metal·loproteïnases de matriu (MMPs). Els nostres resultats mostren que aquest component secretat en resposta a CsA és un factor d'unió a heparina que actuaria a través de la unió a proteoglicans de tipus heparan sulfats (HSPGs) de la superfície cel·lular. En l'intent d'identificar aquest factor hem pogut descartar la implicació del TGF- β , a priori un bon candidat, i hem comprovat la implicació al menys indirecta de la Ciclofilina B (CypB), el receptor intracel·lular de la CsA. En conclusió, els nostres resultats demostren que la CsA és capaç d'induir diferents respostes en les cèl·lules PCT3, on part d'aquest efectes vindrien mediats per un "loop" autocrí en la que es secretaria un factor d'unió a heparina que activaria EGFR i desencadenaria l'activació de ERK, PI3K i la toxicitat cel·lular. En un futur, la identificació dels factors secretats en resposta a CsA podria aportar una valuosa informació en el tractament de la nefrotoxicitat crònica per CsA.

INTRODUCCIÓ

1. LA CICLOSPORINA A

La ciclosporina A (CsA) és un undecapèptid cíclic aïllat del fong *Tolypocladium inflatum* (Fig. 1) utilitzat com a immunosupressor donada la seva capacitat d'inhibir la producció de interleucinas (IL) resultant de la activació antigènica de limfòcits (Borel *et al.*, 1976). Les propietats immunosupressores de la CsA han estat àmpliament utilitzades per evitar el rebuig agut dels òrgans trasplantats. A més, també s'ha utilitzat amb èxit en el tractament de malalties autoimmunes (Kahan, 1993). Malgrat la seva important repercussió clínica el seu ús s'ha vist limitat pels efectes tòxics que produeix, essent la nefrotoxicitat el més important d'ells (Bennett *et al.*, 1996).

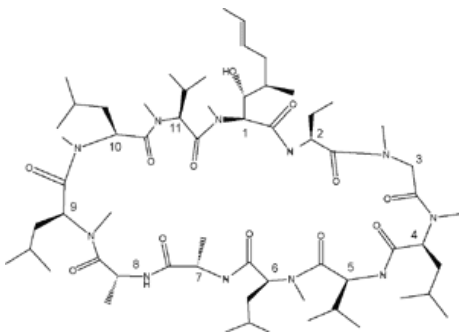


Figura 1. Estructura de la CsA.
Extret de Cardenas *et al.*, (1998).

1.1 Efecte immunosupressor de la CsA

El mecanisme pel qual la CsA exerceix el seu mecanisme immunosupressor sobre el limfòcit T és ben conegut. L'activació del limfòcit T depèn del reconeixement de l'antigen per part del receptors de les cèl·lules T (TCR) en presència d'un senyal coestimulador adequat, generalment CD28, activant-se així dues vies de senyalització independents que convergeixen en la producció d'IL-2 (Fig. 2). La interacció antigen-TCR provoca la fosforilació de les tirosines en la cua citoplasmàtica de CD3 per part de les quinases c-Ick o c-fyn. Un cop fosforilades aquestes regions s'hi poden unir proteïnes amb dominis SH2 (src homology 2), com Zap70, que mediaran en la formació de complexos que contindran proteïnes clau en la senyalització a l'interior de la cèl·lula com la PLC γ (fosfolipasa C), Grb-2 (growth factor binding protein), PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) i altres. L'activació de la PLC γ produeix la hidròlisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfat (PtdIns-(4,5)P $_2$) generant-se diacilglicerol (DAG), que activa la PKC, i inositol 1,4,5-trifosfat (Ins-(1,4,5)P $_3$), que interactua amb els receptors de membrana del reticle endoplasmàtic obrint-ne els canals de calci (Ca $^{2+}$) (Clements *et al.*, 1999, Weber *et al.*, 1992). Aquest increment citosòlic de Ca $^{2+}$ provoca l'activació

de la calmodulina (CaM), que alhora s'uneix i activa a la calcineurina (CaN), una serina-treonina fosfatasa també anomenada PP2B (protein phosphatase 2B) (Rusnak and Mertz, 2000). La calcineurina és un heterodímer que consta de dues subunitats, una subunitat catalítica (calcineurina A, CnA) i una subunitat reguladora (calcineurina B, CnB). La calmodulina activada interacciona amb CnA i allibera el domini autoinhibitori del lloc actiu, portant a l'activació de la seva activitat fosfatasa. En limfòcits, la calcineurina desfosforila el factor de transcripció NFAT (nuclear factor of activated T cell). Aquesta desfosforilació provoca un canvi conformacional que exposa el senyal de localització nuclear i n'augmenta la seva afinitat pel DNA, de manera que NFAT es transloca a nucli i s'uneix al promotor de IL-2 (Crabtree *et al.*, 1994).

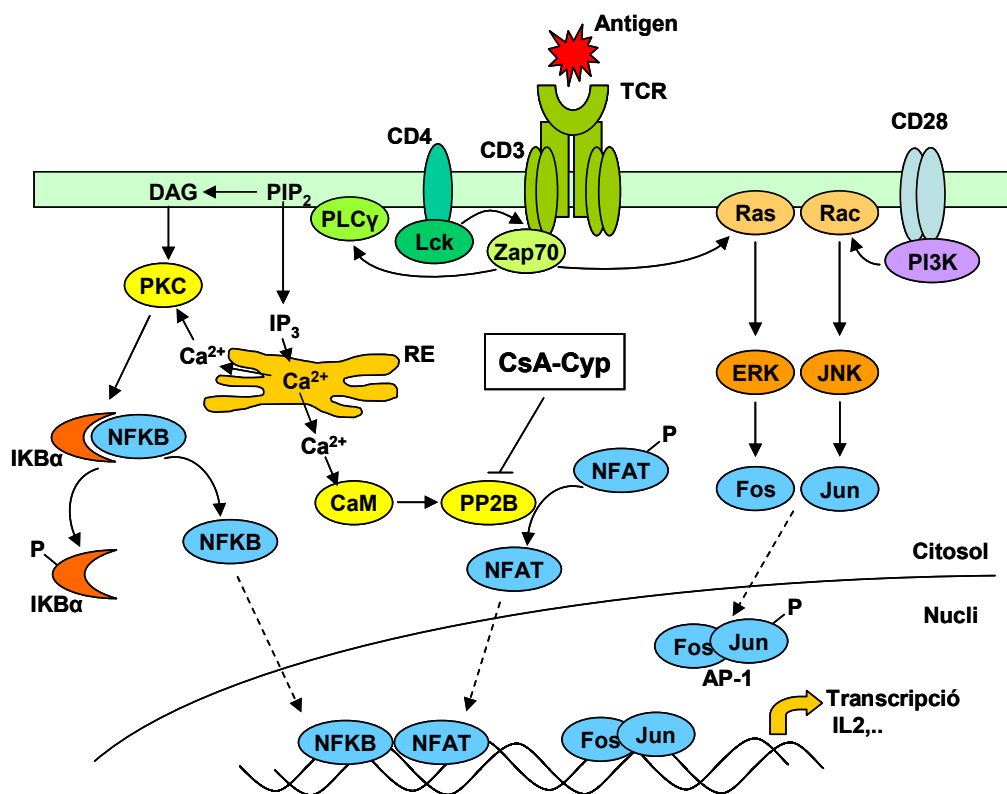


Figura 2. Mecanisme d'activació del Limfòcit T. Esquema simplificat de l'activació del TCR en presència de senyals coestimuladors activant-se diferents vies de senyalització que convergeixen en la producció de IL-2. S'indica també el punt on la CsA acomplexada amb Cyp bloqueja l'activació del limfòcit.

L'activació transcripcional del gen de IL-2 requereix la interacció cooperativa de diferents factors de transcripció a més del NFAT, com AP-1 (activador protein 1) i NF-κB (nuclear factor-kappa B). Així, la unió de CD28 porta a l'activació de la PI3K que promou el pas de PtdIns-(4,5)P₂ a PtdIns-(3,4,5)P₃ activant-se les JNK quinases. Aquestes fosforilen c-Jun que heterodimeritza amb Fos formant AP-1, que assegura una unió més estable de NFAT al DNA. c-Jun també és substrat de ERK1/2, que el

fosforila, fet que augmenta la seva activitat (Woodgett *et al.*, 1990). Així, la senyalització per calci esdevé dependent de una senyalització coincident per Ras/PKC. Tot i que les vies JNK i p38 han estat tradicionalment involucrades en respostes a estrès, com inflamació o apoptosi, ambdues vies estan implicades en l'activació dels limfòcits T quan és induïda a través del TCR i CD28.

La CsA inhibeix l'activació dels limfòcits T bloquejant la transcripció dels gens de les citoquines, entre ells els de IL-2 i IL-4. La CsA exerceix el seu efecte immunosupressor a través de la unió als seus lligands intracel·lulars, les ciclofilines (Fig. 3), (Schreiber *et al.*, 1991, Liu *et al.*, 1991). Les ciclofilines són proteïnes xaperones amb activitat peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPlasa) que descriurem més endavant. Únicament quan la CsA s'ha unit al seu lligant és capaç d'unir-se a la subunitat catalítica de la calcineurina, inhibint-ne l'activitat fosfatasa i impedit així la desfosforilació de NFAT i la seva conseqüent translocació a nucli per induir l'expressió de IL-2 (Fig. 2). Malgrat que la unió amb CsA inhibeix l'activitat PPlasa de les ciclofilines, aquesta inhibició no està involucrada en el mecanisme immunosupressor doncs alguns anàlegs incapaçs de bloquejar l'activació de les cèl·lules T són encara capaçs d'inhibir l'activitat PPlasa (Bierer *et al.*, 1990; Sigal *et al.*, 1991).

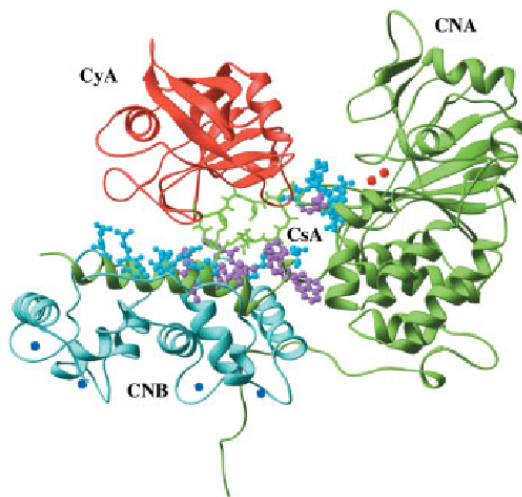


Figura 3. Models estructurals de la interacció entre CsA, ciclofilina A i calcineurina. Els residus de la calcineurina implicats en la unió a Cyp es representen amb boles blaves mentre que els residus d'unió a CsA es representen en rosa. Extret de Fox *et al.*, (2002).

Paral·lelament, el complex ciclofilina-CsA és capaç també de bloquejar l'activació de les vies de JNK i p38 quan són induïdes per una senyal dependent d'antigen i independent de Ca^{2+} i calcineurina, doncs aquest no és bloquejat per FR901725, un inhibidor directe de la calcineurina que no interactua amb les ciclofilines (Matsuda *et al.*, 2000). Curiosament, la CsA no és capaç d'inhibir l'activació de JNK i p38 quan són induïdes per estrès cel·lular. Com s'ha mencionat anteriorment, l'activació transcripcional de IL-2 requereix de l'acció coordinada de diversos factors de

transcripció, els quals serien activats per aquestes vies. Així, el fet que la CsA sigui capaç d'inhibir dues vies independents que participen conjuntament en l'activació del limfòcit expliquen l'elevada especificitat de la seva activitat immunosupressora.

1.2 Nefrotoxicitat per CsA

Els ronyons són els principals òrgans del sistema urinari, el qual purifica la sang extraient-ne els productes catabòlics i substàncies de desfet eliminant-les de l'organisme a través de la orina. Cada dia els ronyons filtren al voltant de 180 litres de sang, aproximadament quatre vegades més del que pot arribar a passar a través de qualsevol altre òrgan. Degut a aquestes grans quantitats, els ronyons estan més exposats a les substàncies tòxiques presents a la sang i són per tant més vulnerables al dany per aquestes substàncies.

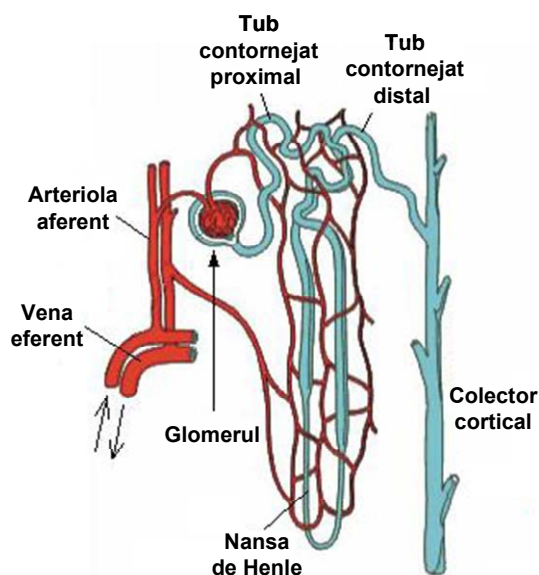


Figura 4. La nefrona, la unitat morfològica bàsica del ronyó. Extret i modificat de <http://vzajic.tripod.com/nephron.jpg>.

El corpuscle renal és on la sang és filtrada. Està formada per una xarxa de capil·lars (el glomèrul) i d'una estructura que embolcalla aquests capil·lars (càpsula de Bowman). La sang flueix dintre el glomèruls, on el plasma passa a través de les parets dels capil·lars, es recull a la càpsula de Bowman i és posteriorment conduit al túbul renal. En els túbuls renals es produeix el processament del filtrat, que té la finalitat de conservar els nutrients essencials com glucosa, vitamines i aminoàcids entre d'altres, s'encarrega de reduir al màxim la quantitat d'aigua i sals secretades, a l'hora que elimina els compostos de rebuig i substàncies potencialment tòxiques per a l'organisme que passaran a la orina.

Cada ronyó humà conté al voltant d'un milió d'unes estructures anomenades nefrones que en constitueixen la unitat funcional (Fig. 4). Cada nefrona està constituïda pel corpuscle renal, l'aparell juxtaglomerular, el túbul proximal, la nansa de Henle i el túbul distal. El corpuscle renal és on la sang és filtrada. Està formada per una xarxa de capil·lars (el glomèrul) i d'una estructura que embolcalla aquests capil·lars (càpsula de Bowman). La sang flueix dintre el glomèruls, on el plasma passa a través de les parets dels capil·lars, es recull a la

Com s'ha mencionat anteriorment, es coneixen amb bastant detall les vies de senyalització implicades en l'efecte immunosupressor de la CsA, però encara no són

del tot conegudes les causes i mecanismes de la seva específicament elevada toxicitat renal. La nefrotoxicitat per CsA compren dos formes de dany renal molt diferents. La nefrotoxicitat aguda induïda per CsA és un fenomen mediat per canvis hemodinàmics, caracteritzat per l'absència de canvis estructurals permanents i per la reversibilitat quan es disminueix o s'elimina l'administració del fàrmac. Per contra, la nefrotoxicitat crònica per CsA és una lesió associada a prolongades exposicions a CsA, on es desenvolupa una fibrosi intersticial renal, progressiva i irreversible, seguida per una important disminució de la funció renal (Cattaneo *et al.*, 2004). A continuació detallem cada forma de toxicitat:

La toxicitat aguda s'ha associat a un desequilibri local entre vasodilatadors i vasoconstrictors que condueix a una intensa vasoconstricció, preferentment de l'arteriòla eferent, resultant en una reducció del flux sanguini renal i una disminució de l'índex de filtració glomerular (Cattaneo *et al.*, 2004). La vasoconstricció induïda per CsA és un procés complex, causat per la interacció de diferents mecanismes (Conger *et al.*, 1994). Entre aquests trobem l'increment de l'activitat del sistema Renina-Angiotensina (RAS), (Lee *et al.*, 1997). També s'ha descrit que la CsA estimula l'alliberament de ET-1 (endotelina 1) en cèl·lules epitelials de ronyó en cultiu i s'ha observat un augment dels receptors per ET-1 en rates amb nefrotoxicitat aguda per CsA (Perico *et al.*, 1990). Els eicosanoids produïts en la via de la ciclooxigenasa (COX) juguen un paper important en el control del flux sanguini renal. La CsA provoca un desequilibri en els nivells d'aquests metabòlits, observant-se nivells elevats de tromboxà (TX) i disminució dels nivells de prostaglandines E₂ i I₂, amb el conseqüent efecte vasoconstrictor (Coffman *et al.*, 1987; Ruiz *et al.*, 1989). S'ha descrit que la CsA augmenta la síntesis renal de TX A₂ i que aquest fet podria comportar una disminució de l'índex de filtració glomerular (Perico *et al.*, 1986; Schnabel *et al.*, 1991). També s'ha descrit una significativa incidència d'hipertensió en pacients tractats amb CsA (Ginsberg *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1995). A nivell histològic, la toxicitat aguda es manifesta de forma important en el túbul proximal renal, on es perd l'estructura de "brush border" i es produeix vacuolització, predominantment en el segment S3 (*pars recta*), causada per la dilatació del reticle endoplasmàtic que apareix buit (Mihatsch *et al.*, 1998).

En la nefrotoxicitat crònica es dona una fibrosi intersticial irreversible amb atròfia tubular que es desenvolupa aproximadament als 6-12 mesos de teràpia amb l'immunosupressor (Fig. 5), (Mihatsch *et al.*, 1989, Mattos *et al.*, 2000). Els mecanismes que condueixen a aquesta fibrosi intersticial no es coneixen amb

profunditat, però s'ha suggerit que la vasoconstricció crònica podria contribuir a la fibrosi (Kopp *et al.*, 1990). S'ha demostrat tant en animals com en cèl·lules del túbul proximal en cultiu que el tractament amb CsA augmenta l'expressió del mRNA de diferents col·làgens (Nast *et al.*, 1991, Wolf *et al.*, 1992 i 1995). També s'ha descrit que la CsA és capaç d'induir la síntesis de TGF- β "in vitro" i "in vivo" (Li *et al.*, 1991) i alguns estudis han involucrat el TGF- β en la progressió de malalties renals (Klahr *et al.*, 1995). El TGF- β és capaç d'estimular les cèl·lules a incrementar la seva matriu extracel·lular (ECM) i disminuir la producció de proteases degradadores de ECM (col·lagenases), induint un estat profibrogènic (Massagué, 1990). Les fonts potencials de TGF- β intersticial al ronyó inclouen macròfags intersticials, fibroblasts i cèl·lules del túbul epitelial. S'ha proposat també un important rol de l'angiotensina II (Ang II) en la nefrotoxicitat crònica. Com hem mencionat anteriorment, la CsA activa el sistema RAS. L'Ang II és un potent factor de creixement induint l'activació de fibroblasts i la deposició de matriu extracel·lular, i la seva administració pot causar dany tubulointersticial semblant al del tractament crònic amb CsA (Ruiz Ortega *et al.*, 1997).

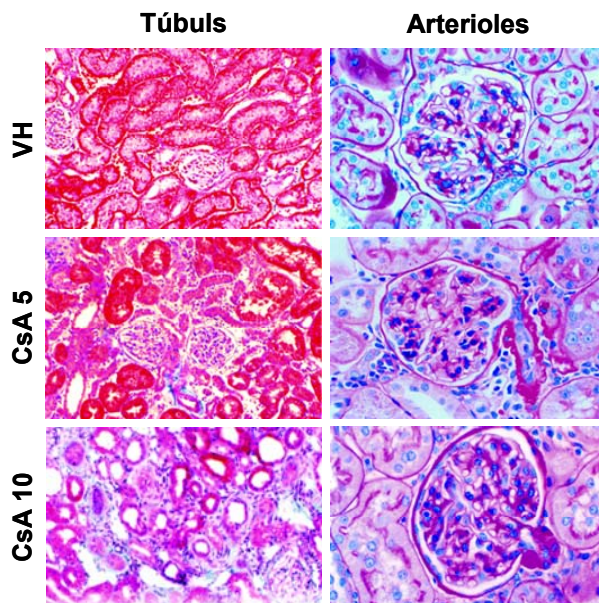


Figura 5. Efectes histològics del tractament amb CsA. Còrtex renals de rates deprivades de sal i tractades amb vehicle (VH), 5 mg/kg/dia (CsA 5) o 10 mg/kg/dia (CsA 10) i sacrificades als 28 dies. Les rates tractades amb dosis baixes de CsA mostren dany tubulointersticial i arteriopaties, ambdós mínims i no significatius. A dosis més altes de CsA s'observa fibrosi intersticial, atròfia tubular i acumulació de material eosinofílic dintre de les cèl·lules de la musculatura llisa de les arterioles aferents. Extret i modificat de Shihab *et al.*, (2004).

També s'ha suggerit la participació de radicals lliures tant en la nefrotoxicitat aguda com crònica. S'ha descrit que la CsA podria induir l'expressió de eNOS (endothelial constitutive nitric oxide synthase) per un mecanisme mediat per ROS (López Ongil *et al.*, 1998). En cèl·lules mesangials en cultiu, la CsA induueix la síntesi de peròxid d'hidrogen de manera dosi i temps depenent a l'hora que inhibida per els antioxidants vitamina E i Seleni (Perez de Lema *et al.*, 1998). S'ha descrit la peroxidació de lípids de membrana com a un mecanisme que comporta mort cel·lular, a través de la destrucció directa de la membrana o alterant la fluïdesa o el potencial de

membrana (Pietrangelo *et al.*, 1990). L' antioxidant α -tocoferol és un potent inhibidor de la peroxidació de lípids i s'ha demostrat molt efectiu evitant la citotoxicitat per CsA en hepatòcits de rata (Wolf *et al.*, 1997). L'administració de CsA en rates també comporta la disminució dels nivells d'antioxidants tant enzimàtics (com la catalasa o la superòxid dismutasa), com no enzimàtics (glutatió, àcid ascòrbic, vitamina E) (Amudha *et al.*, 2006). Així, ha estat àmpliament descrit que el tractament amb diferents antioxidants exògens és capaç de revertir els efectes de la CsA.

En general, aquestes observacions suggereixen que la nefrotoxicitat crònica per CsA és el resultat de la combinació de esdeveniments que indueixen una persistent vasoconstricció preglomerular i mecanismes que actuen directament en les cèl·lules tubulointersticials, que finalment conduirien al desenvolupament de arteriopaties i fibrosi intersticial (Fig. 6). La interacció entre l'Ang II, macròfags, fibroblasts, i cèl·lules residents comportaria la sobreexpressió de substàncies profibròtiques i la inhibició de components antifibròtics (tals com les metal·loproteïnases) en un cicle autosostingut d'activació del sistema RAS, reclutament de macròfags i increment de la deposició de matriu extracel·lular (Cattaneo *et al.*, 2004).

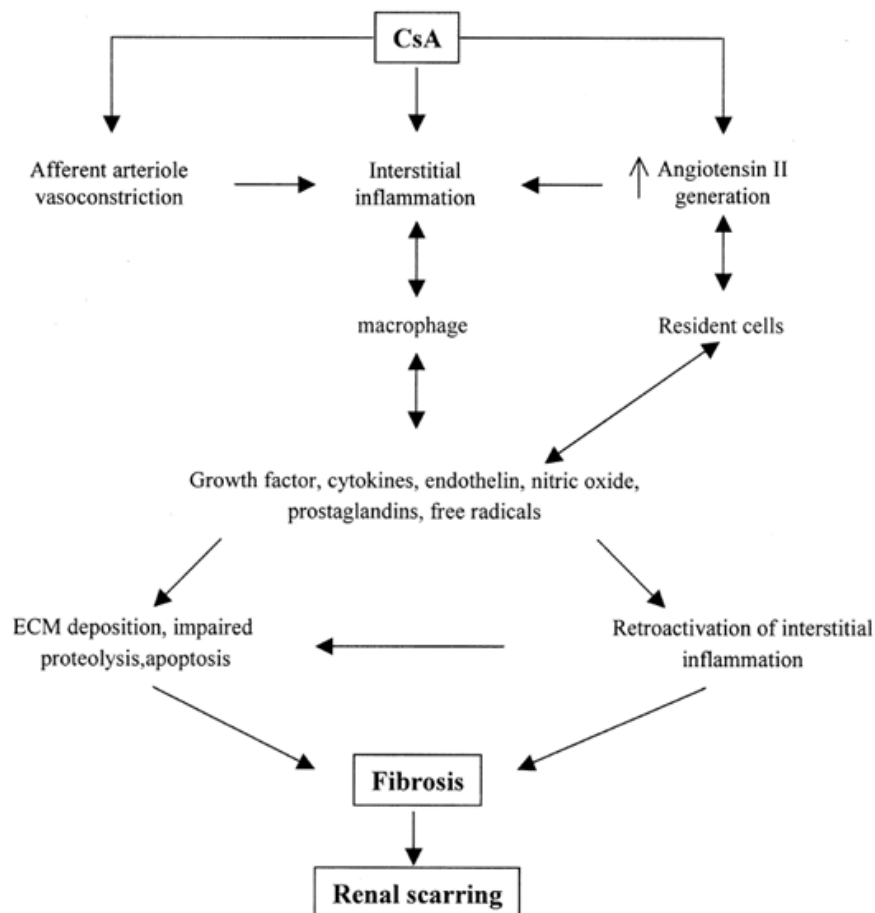


Figura 6. Model de nefrotoxicitat crònica per CsA proposat per Cattaneo *et al.*, (2004).

1.3 Toxicitat cel·lular de la CsA

Com acabem de descriure, la nefrotoxicitat per CsA s'associa amb canvis aguts en la hemodinàmica renal seguits per dany tubular irreversible. No ha estat del tot establert si aquestes alteracions tubulars són secundàries als canvis hemodinàmics o reflecteixen una toxicitat tubular directe de la CsA. Existeixen moltes dades, però, que demostren la capacitat de la CsA d'induir efectes tòxics directament sobre la cèl·lula tubular en cultiu. En el ronyó s'observa una diferent sensibilitat a la CsA segons el tipus cel·lular, sent les cèl·lules dels túbuls proximals les més sensibles (Wilson *et al.* 1988). Les evidències morfològiques suggereixen que el dany tubular més primerenc es dona en el segment S3 del túbul proximal i aquest dany es mostra com un augment de volum del reticle endoplasmàtic i una gran vacuolització (Mihatsch *et al.*, 1986). En la cèl·lula tubular en cultiu s'han descrit àmpliament els efectes citotòxics de la CsA. Els mecanismes de mort cel·lular en resposta a CsA depenen de la dosi emprada (Fig. 7). Amb dosis de l'ordre nanomolar, la CsA induiria apoptosi mentre que a dosis de micromolar, la mort seria per necrosi (Healy *et al.*, 1998). En cèl·lules del túbul proximal en cultiu també s'ha descrit aturada del cicle cel·lular i un augment en l'expressió de p53 precedint la pèrdua de viabilitat cel·lular (Lally *et al.*, 1999). Aquest fet es correlaciona amb experiments fets *in vivo*, on l'administració de CsA a rates augmenta l'expressió de p53 i Fas, augmenta l'activitat de la caspasa-3 i disminueix l'expressió de Bcl-2. (Shihab *et al.*, 1999).

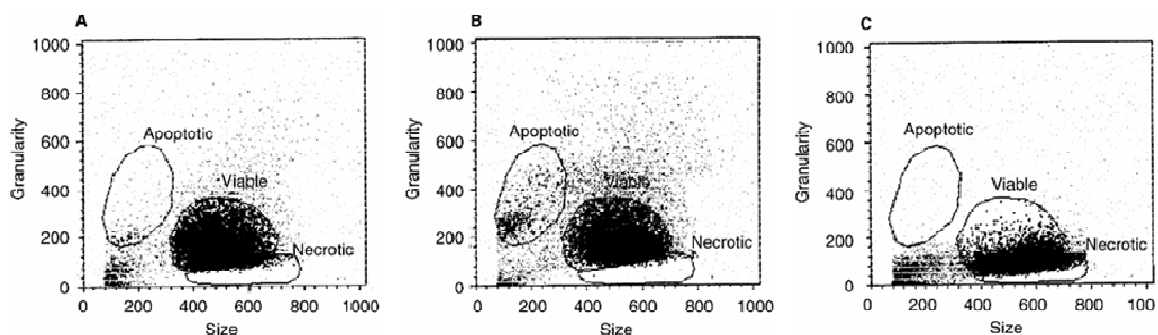


Figura 7. Anàlisi per citometria de flux dels efectes de dosis baixes i altes de CsA en la mida i granulositat de les cèl·lules LLC-PK1. (A) Control. (B) 4.2 nM CsA. (C) 42 µM CsA. Extret i modificat de Healy *et al.*, (1998).

S'han realitzat diferents estudis per determinar les dianes moleculars responsables de la elevada toxicitat de la CsA en cèl·lules renals, amb diferents resultats:

- S'ha demostrat que la CsA provoca una disminució de l'activitat gluconeogènica dels túbuls proximals renals inhibint selectivament l'expressió de la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK), fet que no es dona a nivell hepàtic (Morris *et al.*, 1992).
- S'ha descrit que la CsA podria alterar la fosforilació de proteïnes en membranes renals, observant-se increments en l'activitat de PKC (Oriji *et al.*, 1999) i de tirosina proteïna quinases en membranes basolaterals però no en el "brush border" després de tractaments en CsA (Demeule *et al.*, 1994). Altres articles però, suggereixen que la CsA podria inhibir la PKC de manera dosi-depenent en el citosol de cèl·lules epitelials renals (Walker *et al.*, 1989), i cardiomiòcits (Murat *et al.*, 2000).
- En estudis de toxicitat per CsA en rates, l'administració de CsA produeix canvis en la traducció microsomal de manera dosi-depenent i específica de teixit (Buss *et al.*, 1994). Els efectes de la CsA es produeixen en la fase d'elongació de la traducció, que ve regulada per la fosforilació reversible del factor d'elongació 2 (EF2). Mentre que en microsomes de ronyó el tractament amb CsA provoca un increment de la fosforilació de EF2 i per tant la inhibició de la traducció, en fetge la CsA disminueix la fosforilació de EF2 estimulant la traducció microsomal.
- S'han descrit diferents efectes de la CsA sobre els nivells intracel·lulars de calci. Frapier *et al.*, (2001) afirmen que el tractament amb CsA podria induir increments febles però significatius en la concentració de calci intracel·lular basal, augmentar els nivells induïts per hormones i la freqüència d'increments espontanis. Gordjani *et al.*, (2000) descriuen que la CsA és capaç de promoure un increment del calci intracel·lular a través de l'alliberació del calci dels magatzems sensibles a Ins-P₃ però independentment del metabolisme d'aquests i de l'activitat PLC. També s'ha descrit que la reducció del calci extracel·lular o l'ús d'antagonistes del calci protegeix a les cèl·lules del túbul proximal de la toxicitat induïda per CsA (Wilson *et al.*, 1991). Els autors suggereixen un rol per la Calpaïna, una cisteïna-proteasa citoplasmàtica depenent de calci, en la toxicitat per CsA, doncs la inhibició d'aquesta proteasa en redueix la toxicitat.
- Estudis realitzats amb anàlegs de la CsA mostren que la capacitat immunosupressora i la nefrotoxicitat són inseparables (Sigal *et al.*, 1991), suggerint que els mecanismes de transducció de senyal implicats en ambdós casos eren similars. Així, tot i que inicialment el NFAT era considerat un factor específic del

limfòcit, posteriorment s'ha demostrat la seva existència en múscul (Hoey *et al.*, 1995), s'ha descrit la presència de NFAT3 a cor (Molkentin *et al.*, 1998) i a l'epiteli pulmonar (Dave *et al.*, 2004). A nivell renal s'ha identificat el mRNA de NFAT3 i NFAT4 sense que hi hagi evidències de la presència de proteïna (Hoey *et al.*, 1995). Posteriorment però, s'ha demostrat la presència de NFAT2 en cèl·lules mesangials de glomèrul, on s'ha descrit un paper en la regulació transcripcional de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), l'expressió de la qual és inhibida per CsA (Sugimoto *et al.*, 2001). NFATc1 s'ha trobat també present en cèl·lules mesangials, cooperant amb els factors de transcripció Sp1/Sp2 i Egr-1 regulant la expressió de MT1-MMP (membrane type I matrix metalloproteinase), enzim que juga un paper clau en els processos proteolítics que es donen en la inflamació glomerular aguda (Alfonso-Jaume *et al.*, 2004). Per altra banda, la calcineurina també és present al teixit renal. El paper fisiològic exacte de la calcineurina al ronyó es desconeix però s'ha evidenciat la seva implicació en la regulació de l'ATPasa Na/K de l'epiteli renal (Tumlin *et al.*, 1993; Lea *et al.*, 1994), en senyalització via receptors adrenèrgics i dopaminèrgics, i de glucocorticoides i de mineralocorticoides (Tumlin *et al.*, 1997). També s'ha demostrat que la calcineurina té un paper clau en la via de transducció de senyals que regulen l'homeòstasi renal dels fosfats extracel·lulars (Moz *et al.*, 2004).

- Finalment s'ha descrit que les pròpies ciclofilines podrien estar implicades en la toxicitat per CsA. En eucariotes inferiors s'ha demostrat que les ciclofilines (Cyp) són mediadores de la toxicitat per CsA (Tropschug *et al.*, 1989). Tot i que per inhibir l'activitat PPlasa de les ciclofilines calen concentracions de CsA més altes de les trobades en sèrum de pacients trasplantats, en determinades circumstàncies podria donar-se un efecte de concentració intracel·lular de CsA suficient per inhibir-la (Rühlmann *et al.*, 1997). Així s'ha vist que en cèl·lules en cultiu la CsA alenteix el plegament del procol·làgen I (Steimann *et al.*, 1991) o de la transferrina (Lodish *et al.*, 1991). A més la CsA pot promoure la dissociació de les ciclofilines amb les seves proteïnes d'unió. CsA inhibeix la interacció de CypA amb el factor de transcripció YY1, alterant així la transcripció d'aquells gens regulats per aquest factor (Yang *et al.*, 1995). La unió de Cyp40 al factor de transcripció C-Myb inhibeix la seva capacitat d'unió al DNA. La CsA inhibeix aquesta interacció de manera que C-Myb és capaç d'unir-se al DNA (Hunter *et al.*, 1998). També s'ha descrit que la CsA interfereix la unió de Cyp40 amb HSP90 per formar un heterocomplex amb el receptor de glucocorticoides (Owens-Grillo *et al.*, 1995).

2. LA CICLOFILINA B

2.1 Les ciclofilines són immunofilines

Les ciclofilines formen part de la superfamília de les immunofilines. Les immunofilines són proteïnes xaperones amb activitat peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa). L'enllaç peptídic està predominantment en la conformació trans, malgrat això, els residus de prolines tenen una probabilitat intrínseca relativament alta d'estar en cis. Així, la trans-cis isomerització de l'enllaç peptídic en l'extrem N-terminal de les prolines resulta essencial pel correcte plegament de la proteïna. Aquest pas limitant és accelerat per enzims amb activitat PPIasa.

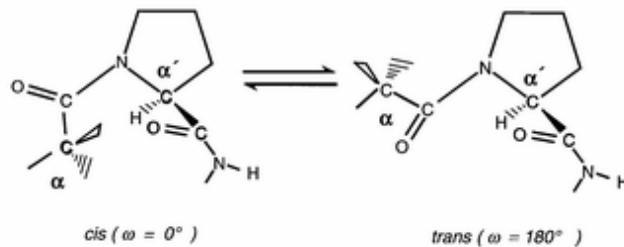


Figura 8. Activitat peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa).

Malgrat que s'ha descrit que les immunofilines participen en el plegament de pèptids sintètics i proteïnes naturals com el col·lagen, l'inhibidor de la quimotripsina, l'anhidrasa carbònica o la ribonucleasa, el mecanisme exacte es desconeix. És més, encara no es disposa d'evidències de si l'activitat PPIasa de les immunofilines és absolutament essencial *in vivo*. De fet, les immunofilines poden actuar com a xaperones de manera independent a la seva activitat PPIasa (Barik, 2006).

Les immunofilines van ser originalment dividides en funció de la seva capacitat d'unir diferents fàrmacs immunosupressors. La família de les ciclofilines (Cyps) uneixen la CsA, mentre que les FKBP (FK506 binding proteins) uneixen macròlids tals com FK506 (tacrolimus) i la rapamicina (sirolimus), els quals no guarden relació estructural amb la ciclosporina. Aquests compostos s'uneixen a la butxaca catalítica del domini PPIasa inhibint-ne l'activitat PPIasa. Mentre que els complexos Cyp-CsA i FKBP-FK506 exerceixen els seu efecte immunosupressor inhibint la calcineurina, el complex FKBP-rapamicina no inhibeix la calcineurina però sí una proteïna anomenada mTOR (mammalian targeted of rapamycin), una Ser/Thr proteïna quinasa essencial per a molts processos. Curiosament, tot i que ciclofilines i FKBP comparteixen activitat PPIasa, no mostren similituds ni a nivell de seqüència ni d'estructura. Dins de cada família, però, existeix un alt grau de conservació estructural (Barik 2006, Hamilton i Steiner, 1998).

Les ciclofilines són proteïnes ubiques presents en bacteris, fongs, plantes i vertebrats (Göthel i Marahiel, 1999). Els diferents membres presenten un alt grau d'homologia i difereixen entre elles per la localització subcel·lular i en l'afinitat per la CsA, essent la CypB la que presenta una major afinitat per la CsA (Schneider *et al.*, 1994) i els majors nivells d'expressió en ronyó (Kainer *et al.*, 2000). La CypB fou clonada i caracteritzada per Price *et al.* en 1991. Aquesta es diferenciava de CypA, de distribució citosòlica i amb la que mostra un 64% d'homologia (Fig. 9), per la presència d'un pèptid senyal característic de proteïnes dirigides al reticle endoplasmàtic en l'extrem N-terminal. En l'extrem N-terminal de la proteïna madura també s'ha descrit una senyal de localització nuclear (NLS) (Ryczyn *et al.*, 2000). També presenta a l'extrem C-terminal un senyal de retenció al reticle endoplasmàtic (Arber *et al.*, 1992). A la part central CypB presenta 165 aminoàcids que contenen el domini peptidil-prolil cis/trans isomerasa i el domini d'unió a ciclosporina (Price *et al.*, 1991).

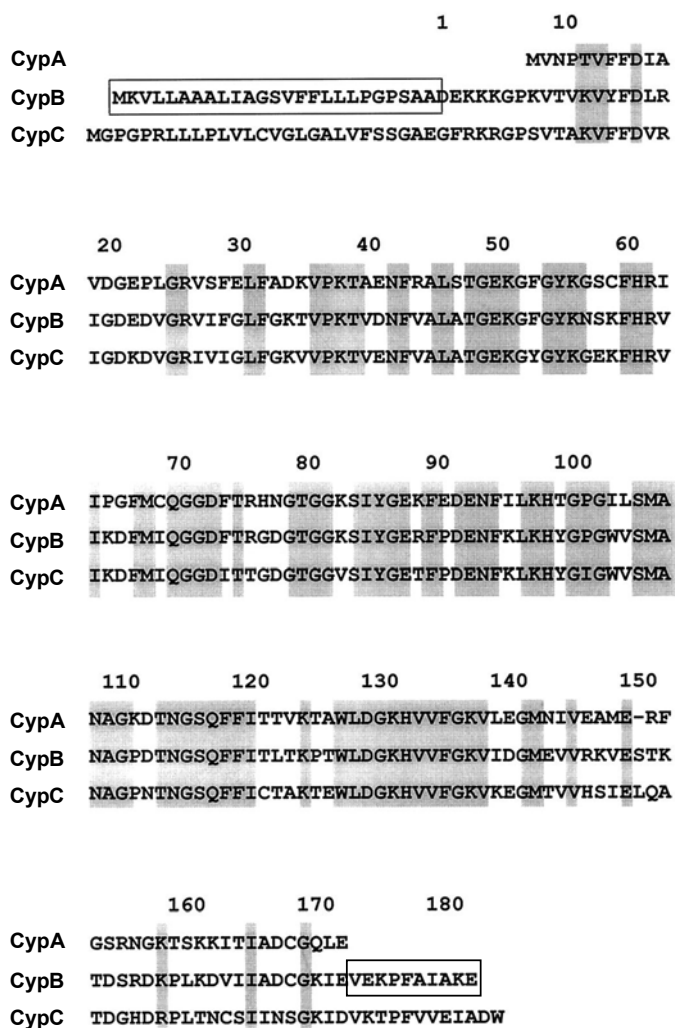


Figura 9. Alineament de la seqüència d'aminoàcids de CypA, B i C. Les zones sombrejades indiquen residus conservats en les tres proteïnes. Els requadres assenyalen el pèptid senyal de l'extrem N-terminal i la senyal de retenció a reticle endoplasmàtic de l'extrem C-terminal de cypB. Extret i modificat de Carpentier *et al.*, (1999).

2.2 Localització subcel·lular i secreció

A més de trobar-se en reticle endoplasmàtic i al complex de Golgi, CypB es troba a la membrana plasmàtica i secretada al medi. S'ha descrit també la presència de CypB al nucli (Le Hir *et al.*, 1995). Mentre que la localització al reticle ve determinada per la seva seqüència, CypB no presenta dominis que explicarien la presència a la membrana plasmàtica. Així, el fet de trobar CypB en complexos estables en la membrana indicaria un paper com a xaperona de proteïnes destinades a la membrana plasmàtica o a la secreció, a més de la ja descrita funció de PPIasa al reticle (Price *et al.*, 1994).

S'ha descrit la presència de CypB en diferents fluids biològics com la llet (Mariner *et al.* 1996, Spik *et al.*, 1991), en plasma (Denys *et al.*, 1998, Allain *et al.*, 1995) i en el sobrenedant de cèl·lules en cultiu (Davis *et al.*, 1991). Aquest fet suggereix que una petita fracció de la CypB intracel·lular deu ser secretada i recuperada en l'espai extracel·lular. La purificació de la forma secretada de CypB a partir de la llet humana i la posterior comparació per espectrometria de masses amb la CypB recombinant expressada en *E. Coli* va demostrar que la forma secretada era de menor pes molecular. Aquesta diferència pot ser explicada per l'absència de 5 aminoàcids (AIAKE) dins la seqüència de retenció a reticle de l'extrem C-terminal (VEKPF~~A~~I~~A~~I~~A~~KE). Així, CypB seria processada per peptidases específiques per tal de ser secretada (Mariller *et al.*, 1996). La presència de CypB en el medi extracel·lular suggereix l'existència de proteïnes a la membrana cel·lular amb les que interactuarien. Aquesta interacció, al seu torn, haurà de comportar una activitat biològica.

S'ha demostrat que el tractament amb CsA (1 μ M) causa una translocació ràpida de la CypB des del reticle cap estats més avançats de la via secretora, eliminant CypB de la superfície cel·lular (Price *et al.*, 1994). Aquest efecte de la CsA és específic per CypB i no distorsiona els mecanismes generals de translocació de proteïnes de la via secretora. Els autors proposen que la CsA competiria amb proteïnes de membrana recent sintetitzades per a unir-se a CypB, però al manca-li a la CsA dominis que l'ancorarien a la membrana mantenint unida CypB, el complex CsA-CypB seria secretat. En aquest aspecte, s'ha observat un increment significatiu de CypB en plasma en pacients tractats amb CsA (Denys *et al.*, 1998).

2.3 Funcions fisiològiques de la Ciclofilina B

El paper de les ciclofilines en la toxicitat per CsA encara no ha quedat del tot establert. Però el fet que les ciclofilines siguin el receptor intracel·lular de la CsA junt a diverses evidències en eucariotes inferiors (Tropschug *et al.*, 1989), suggereixen un possible paper d'aquestes proteïnes. La implicació de les ciclofilines en la toxicitat per CsA es podria donar a través d'una diana específica pel complex CsA-Cyp, com en el cas de la immunosupressió. Per altra banda, la toxicitat per CsA podria resultar de la inhibició d'alguna de les funcions de les ciclofilines. S'ha descrit la implicació de CypB en diferents processos. A continuació es descriuen amb més detall algunes de les funcions de la CypB:

- Plegament de proteïnes i activitat xaperona: L'activitat PPIasa de les ciclofilines suggereix la seva participació en el plegament de proteïnes, catalitzant el pas limitant de la isomerització *cis/trans* de les unions peptidil-prolil, com s'ha descrit *in vitro* per la Rnase T1 (Kiefhaber *et al.*, 1990). També s'ha descrit l'associació de CypB amb el procol·làgen de tipus I en les primeres fases de la seva traducció/translocació evitant possiblement l'agregació de cadenes naixents (Smith *et al.*, 1995).

Un segon, però potencialment més important paper per a les ciclofilines és la seva actuació com a xaperones per al trànsit de proteïnes i l'assemblatge macromolecular. Aquesta activitat xaperona podria ser tant dependent com independent de la seva activitat PPIasa. S'ha trobat CypB associada a la apoB tant en reticle com a l'aparell de Golgi (Zhang *et al.*, 2003). S'ha descrit també la presència de CypB en un gran complex multiproteic localitzat al reticle endoplasmàtic que inclouria entre d'altres a les xaperones BiP, Grp94, CaBP1 i PDI. Aquest complex es troba associat amb cadenes pesades de immunoglobulines que no han estat assemblades o completament plegades. Aquestes xaperones es trobarien formant un entramat o complex preexistent i no en forma lliure, de manera anàloga al ja descrit per el sistema calnexina/calreticulina (Meunier *et al.*, 2002). Així, les ciclofilines no només ajuden al correcte plegament de les proteïnes recent sintetitzades, sinó que també estan involucrades en la reparació de proteïnes danyades per estrès ambiental, tèrmic, oxidatiu o radiació UV. L'estrès ambiental per tant, podria induir l'expressió de ciclofilines per portar a terme aquesta funció (Yao *et al.*, 2005).

- Immunosupressió: Com s'ha mencionat abans, l'efecte immunosupressor de la CsA ve mediat per la formació d'un complex amb ciclofilines intracel·lulars alterant posteriorment l'activitat de la fosfatasa dependent de calci, calcineurina. Aquest fet

evitaria que el NFAT citosòlic es desfosforilés i transloqués a nucli. S'ha postulat que, degut a seva localització intravesicular els limfòcits presenten concentracions molt baixes de CypB respecte a les de CypA, és difícil que CypB participi en aquest procés (Allain *et al.*, 1995). Per altre banda, Allain *et al.* (1994) han descrit la unió específica de CypB a la superfície de limfòcits T perifèrics i cèl·lules T limfoblàstiques. Més específicament, CypB s'uneix principalment a limfòcits CD-4 positius (Denys *et al.*, 1997). Tant el complex CypB-CsA com la CypB lliure mostren una capacitat d'unió similar i la CsA complexada manté les propietats immunosupressores (Allain *et al.*, 1996). Així, la unió específica del complex CypB-CsA a la superfície cel·lular incrementaria la incorporació de la CsA, inclús en presència d'altres cèl·lules sanguínies, augmentant la concentració local del fàrmac al voltant del limfòcit T, de manera que l'increment de la concentració intracel·lular del fàrmac probablement resultaria de la dissociació del complex unit a la membrana i el conseqüent pas de la CsA lliure a través de la bicapa lipídica, tal i com s'ha descrit prèviament (Legrue *et al.*, 1983). Aquest direccionament específic del complex CypB-CsA cap als limfòcits T potenciarà per tant l'activitat immunosupressora de la CsA.

S'han descrit altres processos pels quals CypB podria mediar l'efecte immunosupressor de la CsA. CypB està associada a una part especialitzada del reticle endoplasmàtic relacionada amb l'activació per calci anomenada calciosoma, localització que vindria mediada per la seqüència senyal de retenció a reticle en l'extrem C-terminal de CypB (Arber *et al.*, 1992). Mitjançant el sistema de doble híbrid, Bram *et al.*, (1994) han descrit un lligand per CypB anomenat CAML (calcium-signal modulating cyclophilin ligand). Aquesta proteïna de la membrana del reticle participa en la modulació de les vies de senyalització per calci, implicades en molts processos entre ells l'activació del limfòcit. A través de la inhibició de la CypB, la CsA blocaria l'activitat de la proteïna CAML i conseqüentment comportaria un nou mecanisme d'immunosupressió. A través de la unió a CAML, CypB també podria participar en altres vies de senyalització per calci.

- Proliferació Cel·lular: Mitjançant estudis de doble híbrid en llevat s'ha identificat a CypB com a proteïna d'interacció amb la hormona Prolactina (PRL) (Rycyzyn *et al.*, 2000). CypB podria potenciar la proliferació cel·lular induïda per PRL augmentant la PRL intranuclear, doncs l'eliminació de la seqüència de localització nuclear en l'extrem N-terminal de CypB evitava aquesta potenciació i l'augment del transport nuclear de la Prolactina. És més, els autors descriuen una interacció directa entre el complex PRL/CypB i Stat5 depenent de l'activitat enzimàtica de CypB (Fig. 10). Aquesta interacció es produeix després de la entrada a nucli del complex i finalitza un

cop Stat5 s'ha unit al DNA. La interacció directa amb Stat5 comporta l'alliberament del repressor de l'activitat de Stat PIAS3 (Stat-repressor protein inhibitor of activated Stat3), fet que augmenta la capacitat d'unió a DNA de Stat5 i la conseqüent expressió gènica induïda per PRL (Rycyzyn *et al.*, 2002). També s'ha descrit que el medi condicionat de cèl·lules transfectades amb CypB promou el creixement de neurites en cèl·lules embrionàries de pollastre, i té un efecte mitogènic en fibroblasts i cèl·lules cardíques (Caroni *et al.*, 1991).

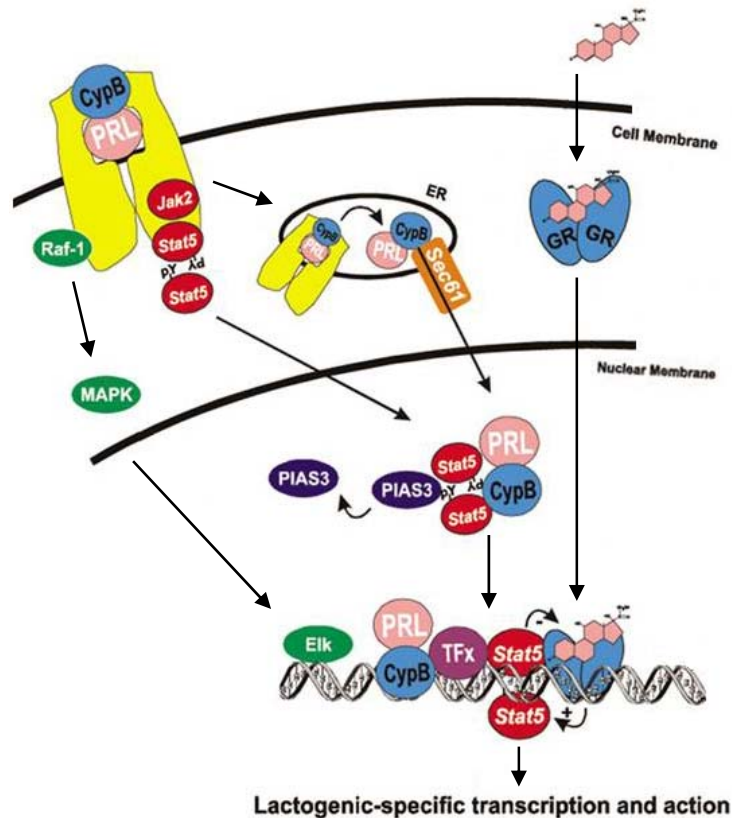


Figura 10. Paral·lelisme entre la senyalització per prolactina i esteroides. De manera anàloga a com passa amb el complex esteroide/receptor d'esteroides, després de la endocitosis mediada per receptor, el complex PRL/CypB es transloca al nucli on interacciona amb diferents elements de l'aparell transcripcional, entre ells Stat5. Extret i modificat de Clevenger *et al.*, (2003).

- Infecció per HIV: La proteïna retroviral Gag dirigeix l'assemblatge de les partícules víriques i juga un paper important en les primeres fases d'infecció. Mitjançant assaigs de doble híbrid, s'ha descrit que CypA i CypB uneixen específicament la poliproteïna Pr55^{gag} del virus de la immunodeficiència humana de tipus 1 (HIV-1). Les ciclofilines també uneixen la proteïna 24 de la càpsida de HIV-1. CsA bloqueja eficientment la unió Gag-CypA i menys eficientment la unió Gag-CypB. S'ha suggerit que la interacció Gag-Cyp deu ser important per el cicle vital de HIV-1 i

deu estar implicada en la patologia causada per aquest virus immunosupressor (Luban *et al.*, 1993).

- Activitat nucleasa i apoptosi: L'aïllament en timòcits de rata en apoptosi de NUC18, una nucleasa de 18 KDa que mostrava una elevada similitud de seqüència i estructura amb la família de les ciclofilines (Gaido *et al.*, 1991; Montague *et al.*, 1994), va portar a explorar l'activitat nucleasa de les ciclofilines. L'activitat nucleasa de les ciclofilines és independent de l'activitat PPIasa doncs no és inhibida per CsA i és similar a aquella descrita per les nucleases apoptòtiques. L'activitat nucleasa de les ciclofilines és estimulada per Calci i/o Magnesi, essent la combinació dels dos òptima per l'activitat de CypA i CypB. Les ciclofilines poden degradar tant DNA de cadena senzilla o doble cadena, podent generar extrems 3'OH en DNA lineals de doble cadena similars als que s'observen en cèl·lules apoptòtiques. Les ciclofilines també mostren activitat endonucleasa, doncs són capaces de degradar DNA superenrotllat. En conjunt, aquestes dades suggereixen que les ciclofilines estarien implicades en la degradació del genoma durant l'apoptosi (Montague *et al.*, 1997). La CypB ha estat implicada també en la degradació del DNA durant la mort cel·lular dels timòcits estimulats per TCR en els processos de selecció negativa que es donen en el timus (Nagata *et al.*, 2000).

- Funció presinàptica: CypB és una de les immunofilines més abundants en cervell (Galat *et al.*, 1994). La proteïna Synapsin, una fosfoproteïna específica de neurones implicada en el transit de vesícules sinàptiques i l'alliberament de neurotransmissors, ha estat identificada com a lligand endogen per a la CypB (Lane-Guermonprez *et al.*, 2005). Aquesta interacció és regulada per concentracions fisiològiques de ATP i és inhibida per CsA. El paper de la CypB és encara desconegut però el fet que la unió sigui inhibida per CsA suggereix que l'activitat PPIasa seria necessària per aquesta unió. Els diversos llocs de fosforilació de Synapsin són desfosforilats per calcineurina i PP2A. La interacció de Synapsin amb calcineurina o CypB és mútuament exclouent, per el que s'ha hipotetitzat que CypB podria actuar competint amb la calcineurina per la unió a Synapsin, evitant-ne així la desfosforilació, fet que comporta un augment de la eficiència en l'alliberació de neurotransmissors.

- Hipertensió: S'han descrit que els nivells d'expressió de CypB estan augmentats en el túbul proximal contornejat de rates de la soca SHR (spontaneously hypertensive rats), en comparació amb soques control (Kainer *et al.*, 2000). Aquest increment apareix a les cinc setmanes, moment en que la reabsorció de sodi esta ja augmentada

però precedint el desenvolupament de hipertensió, demostrant que no n'és una conseqüència sinó que més aviat reflecteix el procés patogenètic que condueix a la hipertensió. El fet que CypB interaccioni amb proteïnes clau de la resposta a estrès del reticle endoplasmàtic i que l'Angiotensina II sigui capaç de modular l'expressió de CypB en cèl·lules en cultiu suggeririen que l'augment dels nivells de CypB seria una adaptació a l'estrès metabòlic.

- Estrès oxidatiu: S'ha descrit que la CypA podria tenir un paper protector enfront la generació de ROS induïda per CsA. En mioblasts exposats a CsA, part dels ROS generats pel fàrmac són conseqüència de la inhibició de l'activitat PPlasa de la CypA (Hong *et al.*, 2002). Per altre banda, s'ha suggerit que CypA podria funcionar directament com a antioxidant, possiblement en associació amb la proteïna Aop1, una proteïna antioxidant específica de tiols (Doyle *et al.*, 1999). El paper de CypB en l'estrès oxidatiu no està del tot clar, però s'ha identificat CypB entre els diferents factors secretats en cèl·lules de la musculatura llisa (VSMC) exposades a estrès oxidatiu. Aquests factors actuarien de manera autocrina provocant l'activació tardana de ERK1/2, per el que s'ha proposat CypB com a possible mediadora en les respostes a ROS (Liao *et al.*, 2000).

- Nefrotoxicitat. Cebrián *et al.*, (2001) han demostrat, mitjançant assajos de doble híbrid, que CypB interacciona amb la proteïna de ronyó regulada per andrògens (KAP). La sobreexpressió de KAP redueix la toxicitat provocada per CsA en les cèl·lules en cultiu derivades de túbul proximal de ronyó PKSV-PCT-3 (Fig. 11). CypB és present en aquestes cèl·lules en la localització esperada, és a dir, en el reticle endoplasmàtic i en la membrana plasmàtica. La transfecció amb la proteïna de fusió GFP-KAP indica que ambdós proteïnes co-localitzen. En presència d'elevats nivells de KAP però, CypB presenta una distribució més intracel·lular que no pas en la membrana, indicant que a través de la interacció amb CypB, KAP contribuiria a la retenció d'aquesta ciclofilina al reticle, amb possibles implicacions en la funció de CypB. Els autors suggereixen que la disminució observada en els nivells de KAP en el tractament amb CsA seria el que promouria la secreció de CypB fora de la cèl·lula i la disminució del reservori en el reticle, afectant així la mobilització del calci i la conseqüent activació de la calcineurina .

- Processos inflamatoris: S'ha observat la presència de CypB en plasma en pacients infectats amb HIV-1 (Endrich *et al.*, 1998) o amb sèpsia (Tegeder *et al.*, 1997), suggerint un possible paper com a mediadora de processos inflamatoris. En el dany renal es dona una inflamació intersticial deguda, en part, a l'alliberament de factors

quimiotàctics, entre ells la CypB, per part de fibroblasts intersticials. Així CypB podria actuar reclutant leucòcits inflamatoris a l'interstici (González-Cuadrado *et al.*, 1996).

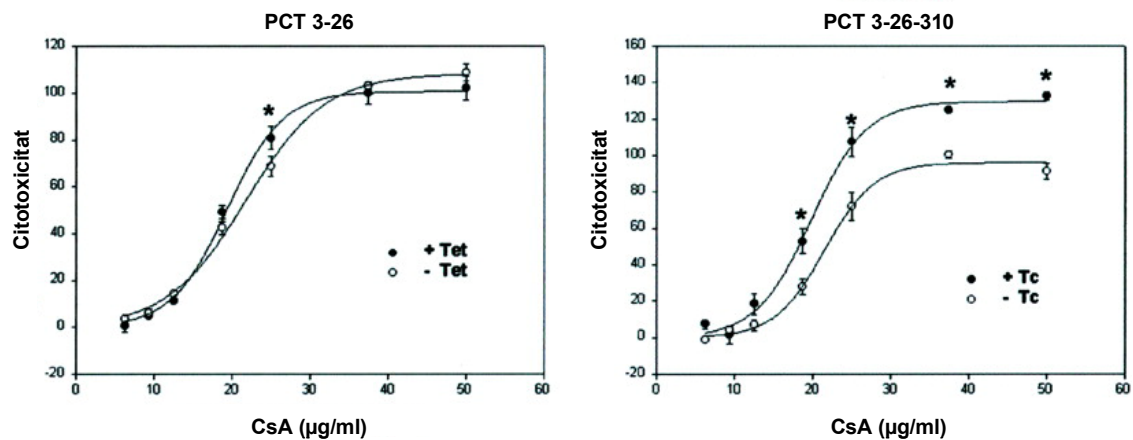


Figura 11. L'expressió de la proteïna KAP protegeix de la toxicitat induïda per CsA. Les cèl·lules PKSV-PCT-3 van ser transfectades amb el sistema Tet-offTM de transfecció estable i regulada. El clon PCT 3-26, transfectat únicament amb el plasmidi regulador pTet-off, s'utilitza com a control per mesurar l'efecte de la tetraciclina (Tet). El clon PCT 3-26-310, obtingut transfectant les cèl·lules PCT 3-26 amb pTRE-KAP, expressa KAP en absència de Tet. Les cèl·lules van ser tractades amb dosis creixents de CsA durant 24 h i la toxicitat s'analitzà mesurant l'activitat lactat deshidrogenasa (LDH) en cultiu. Extret i modificat de Cebrián *et al.*, (2001).

2.4 Receptors cel·lulars per a les ciclofilines

Com s'ha mencionat anteriorment, la presència de CypB en el medi suggereix una activitat biològica extracel·lular a través de la interacció amb un hipotètic receptor a la membrana cel·lular. En aquest sentit, s'han descrit llocs d'unió per CypB en limfòcits (Allain *et al.*, 1994, Denys *et al.*, 1997), plaquetes (Allain *et al.*, 1999) i cèl·lules endotelials (Carpentier *et al.*, 1999). A la superfície de limfòcits T s'han descrit dos llocs d'unió diferents i independents per CypB (Denys *et al.*, 1998):

2.4.1 Receptors de tipus II

Els anomenats de tipus II representen el 70% del total i van ser identificats com glicosaminoglicans (GAGs) de la família dels heparan sulfats. Els heparan sulfats (HS) són polisacàrids lineals fixats covalentment a la proteïna central dels proteoglicans, inicialment sintetitzats com una cadena no sulfatada i que pateixen successives modificacions. El nombre i la posició de les modificacions és variable obtenint-se una gran diversitat en els motius d'unió en HS. Aquesta diversitat explica, a través d'interaccions específiques amb mediadors extracel·lulars, la varietat de processos

biològics en la que participen tals com proliferació, diferenciació, homeòstasis i patologies víriques (Capila *et al.*, 2002). En els últims anys s'han descrit centenars de proteïnes d'unió a HS, entre elles factors de creixement, proteïnes d'adhesió, enzims, citoquines, quimioquines, inhibidors de proteases i proteïnes víriques.

La unió de CypB als GAGs és sensible al tractament amb 0.6 M NaCl. CypB s'uneix als GAGs a través de una regió localitzada a l'extrem N-terminal de CypB on s'identifiquen clarament les seqüències ³KKK⁵ i ¹⁵YFD¹⁷ com a absolutament imprescindibles per a aquesta interacció. La presència del "cluster" de lisines estaria implicat en la interacció iònica amb molècules carregades negativament com l'heparina i els HS, i el tripèptid ¹⁵YFD¹⁷ possiblement participaria de forma sinèrgica estabilitzant el complex (Carpentier *et al.*, 1999). Cyp A no posseeix aquests "clusters", fet que explicaria per que CypB és un lligand únic i altament específic pels receptors de tipus II. Aquest extrem N-terminal bàsic de CypB està localitzat en el costat oposat de la regió d'unió a CsA, per el que la unió de CypB als GAGs no és inhibida per CsA. És més, el complex CypB-CsA conserva l'eficiència d'unió per aquests receptors (Denys *et al.*, 1998). Els receptors de tipus II no estan implicats en la internalització de CypB però participen en la incorporació mediada per CypB de la CsA a l'interior dels limfòcits (Denys *et al.*, 1998).

2.4.2 Receptors de Tipus I

Els receptors de Tipus I són insensibles a força iònica, són menys abundants i corresponen a receptors funcionals específics doncs condueixen a la internalització del complex lligand/receptor (Denys *et al.*, 1998) i a la mobilització de calci en el primer minut després de l'addició del lligand (Allain *et al.*, 2002). La interacció amb els receptors de tipus I implica el nucli central conservat de CypB, on es situa el lloc d'unió a CsA i el domini catalític, fet que explica que sigui fortament inhibida per CsA (Yurchenko *et al.*, 2001). Com s'ha mencionat anteriorment, aquesta regió està molt conservada entre les diferents ciclofilines, i s'ha descrit que tant CypC com CypA també podrien interaccionar amb aquest receptor, tot i que amb molta menor afinitat. Aquestes diferències podrien venir explicades per petites diferències en l'estructura tridimensional o alguns pocs aminoàcids en el nucli central de les ciclofilines (Denys *et al.*, 1998). S'ha descrit que CypB és internalitzada a l'interior dels limfòcits T i subseqüentment degradada a l'interior de compartiments àcids, tals com els lisosomes (Allain *et al.*, 1994). Aquesta endocitosis és parcial i no implica més del 25% del lligand unit a la superfície, corresponent-se aquest percentatge a la capacitat d'unió dels receptors de tipus I (Denys *et al.*, 1998).

Pushkarsky *et al.*, (2001) demostraren que CD147, una glicoproteïna integral de la membrana plasmàtica de tipus I i d'expressió ubiqüa, facilitava la infecció per HIV-1 a través de la interacció amb la CypA associada a virus. Més tard, Yurchenko *et al.*, (2001) van descriure que CD147 podria actuar també com a receptor per CypB, doncs CypB era capaç d'induir influx de Ca^{2+} i quimiotaxis en cèl·lules CHO transfectades amb CD147 però no en les control. La presència d'anticossos anti-CD147 blocava la resposta quimiotàctica a CypB en neutròfils primaris humans, suggerint que CD147 podria servir com a receptor per ciclofilines extracel·lulars i hipotetitzant que es podria correspondre al receptor de tipus I anteriorment descrit per Denys *et al.*, (1998). Allain *et al.*, (2001) també han demostrat que anticossos anti-CD147 blocaven l'adhesió de cèl·lules T a la fibronectina induïda per CypB, indicant que CD147 és necessari per a l'efecte potenciador de CypB en l'adhesió de les cèl·lules T. Aquests resultats reafirmaven el paper de CD147 en la regulació de l'adhesió intercel·lular prèviament descrita (Kasinrerk *et al.*, 1999).

Per altre banda, anticossos anti-CD147 no inhibien la unió de CypB a la superfície cel·lular. Això no vol dir que CD147 no sigui un receptor per CypB doncs l'anticòs anti-CD147 i CypB podrien interactuar per regions diferents de la mateixa molècula. De totes maneres, prèviament s'havia descrit que CypB induïa la internalització del receptor de tipus I (Denys *et al.*, 1998) i no s'ha observat cap disminució dels nivells de CD147 en la superfície cel·lular en presència de CypB. Basats en aquests fets, s'ha suggerit que CD147 no estaria directament implicat en la unió a CypB, sinó que presumiblement actuaria com a una molècula coestimuladora en la senyalització mediada per ciclofilines (Allain *et al.*, 2001). Així, encara no s'ha demostrat la interacció directa entre CD147 i les ciclofilines, deixant oberta la possibilitat de que CD147 transmeti senyals des d'un encara no identificat receptor primari per a ciclofilines (Bukrinsky, 2002).

CD147 també es coneix com a EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), i va ser descrita originalment per Biswas (1982) com a un factor de cèl·lules tumorals que estimulava la producció de col·lagenasa (metal·loproteïnasa de matriu tipus I, MMP-1) per part dels fibroblasts. S'ha descrit que el tractament amb CsA redueix significativament la presència de CD147 a la superfície cel·lular, suggerint la participació d'alguna ciclofilina en la regulació del transport cel·lular de CD147 (Yurchenko *et al.*, 2005). Aquesta ciclofilina ha estat identificada recentment com la ciclofilina 60 (Cyp60), (Yurchenko *et al.*, 2005 b).

Així, l'existència de dos llocs d'unió diferents en la superfície dels limfòcits explicaria les diferències en la resposta biològica induïdes per CypB i CypA: mentre que tant CypB com CypA poden induir quimiotaxis a través de la interacció amb el

receptor de tipus I, només la CypB és capaç de promoure l'adhesió mediada per integrines dels limfòcits T a la fibronectina (Allain *et al.*, 2002), per la qual la unió al receptor no seria suficient per induir aquesta resposta, i la unió als receptors de tipus II seria absolutament necessària (Vanpouille *et al.*, 2004).

3. EL RECEPTOR DE EGF (EGFR)

Els receptors tirosina quinases (RTKs) són enzims al·lostèrics de la superfície cel·lular formats per un únic domini transmembrana que separa un domini quinasa intracel·lular d'un domini d'unió a lligand extracel·lular. El primer en ser descobert i prototipus d'aquests receptors és el receptor per al EGF (EGFR, també anomenat HER1 o c-erbB1). El EGFR és membre de la família ErbB de receptors RTKs que també inclou ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3, i ErbB4/HER4, tots ells estructuralment similars (Fig. 12). Aquests receptors estan expressats en diversos teixits tant d'origen epitelial, mesenquimal o neuronal, on tenen funcions fonamentals en el desenvolupament, proliferació i diferenciació (Singh *et al.*, 2005).

El EGFR és una glicoproteïna de membrana de 170 KDa. El domini extracel·lular està format per quatre subdominis que contenen dos dominis rics en cisteïnes. Aquest domini extracel·lular conté el lloc d'unió al lligand, les regions que participen en la dimerització del receptor i en les interaccions amb altres proteïnes de membrana. El domini transmembrana conté principalment els llocs d'atenuació per feedback per PKC i ERK1/2, tot i que s'hi han descrit motius estructurals que podrien connectar el receptor amb les proteïnes G heterotrimèriques (Sun *et al.*, 1997). La cua C-terminal conté 5 motius d'autofosforilació (Fig.12) que connecten amb proteïnes que contenen dominis SH2 (Src-homology 2) o PTB (phospho-tyrosine binding), tres motius d'internalització i llocs per transfosforilació així com per activació proteolítica i degradació (Singh *et al.*, 2005).

3.1 Activació del EGFR

El receptor EGFR és activat per diferents lligands específics. La unió al lligand comporta la homo o heterodimerització del receptor. Conseqüentment, l'activitat quinàsica intrínseca del receptor és activada resultant en la fosforilació de residus tirosina específics en la cua citoplasmàtica del receptor (Olayioye *et al.*, 2000). La formació de homo i heterodímers amb fosforilació encreuada permet modular les senyals d'un receptor a l'altre, fet que explica la pliotropia de les respostes mediades per EGFR, incloent mitogènesis, apoptosis, augment de la motilitat cel·lular, secreció proteica, i diferenciació o desdiferenciació. Els residus fosforilats serveixen com a llocs d'unió per nombroses molècules efectores que continguin dominis SH2 o PTB. Algunes d'elles són substrat del propi receptor i resulten fosforilades en tirosines i conseqüentment activades, com Src, PLC o PI3K, mentre que d'altres com Shc, Grb2, Grb7 i Nck actuen com a molècules adaptadores.

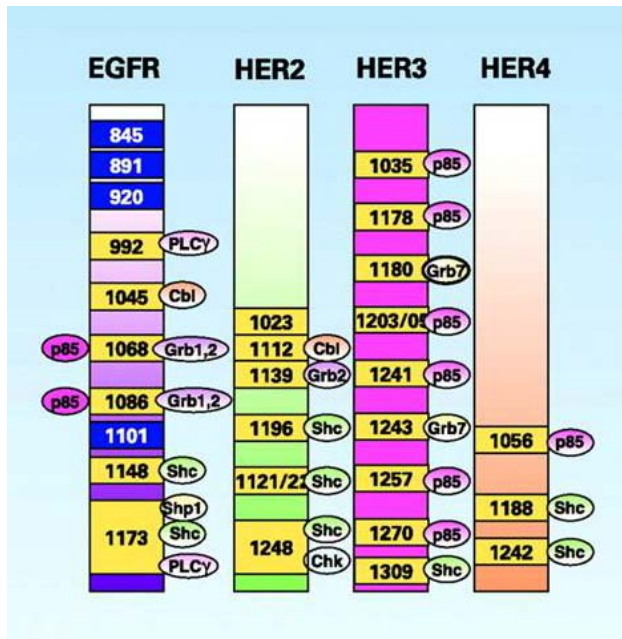


Figura 12. La família dels EGFR, els seus llocs específics de fosforilació, i els llocs d'unió de molècules senyalitzadores als dominis tirosina quinasa. Extret i modificat de Ono *et al.*, (2006).

El reclutament d'aquestes proteïnes comporta l'activació de nombroses vies de senyalització. Entre aquestes trobem l'activació de la PLC γ amb la subseqüent activació de les vies mediades per PKC i calci, l'activació de Ras que condueix a l'activació de diverses MAPK, l'activació d'altres GTPases petites com Rac, múltiples isoformes de STAT (signal transducer and activator of transcription), proteïnes G heterotrimeriques, la tirosina-quinasa Src i de les vies dirigides per fosfolípids PI3K i PLD (fosfolipasa D) (Fig. 13). Recentment s'ha descrit una nova via de senyalització, en que el EGFR, un cop activat és translocat de la superfície de la cèl·lula al nucli, on regularia transcripcionalment l'expressió gènica, a través de STAT3 o altres factors de transcripció (Lo *et al.*, 2005).

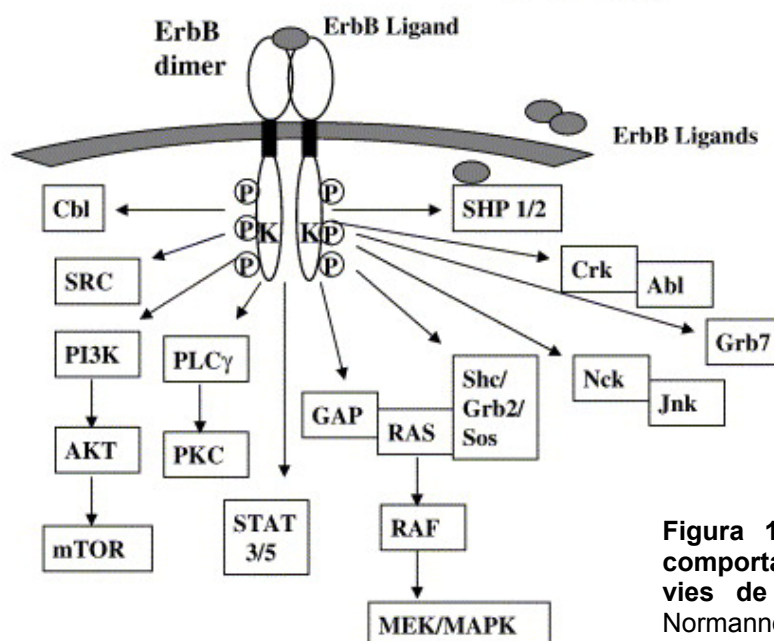


Figura 13. L'activació de EGFR comporta l'activació de diferents vies de senyalització. Extret de Normanno *et al.*, (2005).

La durada i intensitat de la senyal per EGFR està finament regulada per diferents mecanismes, entre els que trobem la disponibilitat del lligand per al receptor, la disponibilitat pròpia del receptor doncs després de la unió al lligand el EGFR és ràpidament internalitzat i degradat, i la regulació negativa per fosfatases. En aquest sentit s'ha suggerit que la fosfatasa calcineurina podria regular negativament EGFR en *Drosòfila* (Sullivan *et al.*, 2002).

Tal i com hem indicat anteriorment, l'activació dels receptors ErbB ve controlada per els seus lligands, que formen part de la família de factors de creixement peptídics relacionats amb el EGF. Aquests lligands poden ser dividits en tres grups (Fig. 14). El primer grup inclou el EGF (epidermal growth factor), l'amfiregulina (AR) i el TGF α (transforming growth factor alpha), els quals uneixen específicament el EGFR. El segon grup inclou la betacelulina (BTC), el HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) i la epiregulina (EPR), els quals poden unir tant EGFR com ErbB4. El tercer grup esta compost per les neuregulines (NRG, també anomenades heregulines, HRG) i forma dos subgrups en base a la seva capacitat d'unir ErbB3 i ErbB4 (NRG-1 i NRG-2) o només ErbB4 (NRG-3 i NRG-4).

Tots els lligands de EGFR són sintetitzats com a precursors transmembrana de tipus I formats per un motiu EGF flanquejat per una extensió N-terminal i un domini C-terminal d'ancoratge a la membrana. El lligand és processat proteolíticament per metal·loproteïnases per alliberar el factor de creixement "madur" en forma soluble (Massague and Pandiella,1993). L'alliberament proteolític dels lligands d'EGFR representa una etapa important en la regulació de l'activació del receptor, procés en el qual han estat implicats entre d'altres la PKC, l'influx de calci, i l'activitat fosfatasa (Dethlefsen *et al.*, 1998). A més a més, diversos lligands, tals com el HB-EGF, TGF- α , AR i BTC, poden ser biològicament actius inclús en la seva forma precursora de membrana, suggerint la capacitat de funcionar com a factors juxtacrins (Singh *et al.*, 2005).

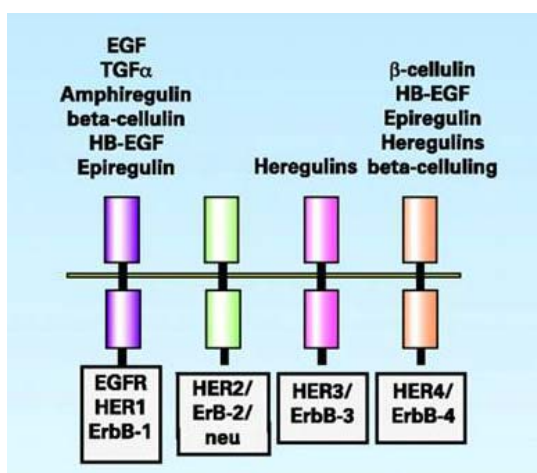


Figura 14. Lligands per a la família ErbB de receptors RTKs. Extret i modificat de Ono *et al.*, (2006).

3.2 Transactivació de EGFR

El EGFR ha estat considerat com a punt de convergència per diverses vies de senyalització. A més dels agonistes prèviament descrits, el receptor EGFR pot ser activat per estímuls que no s'uneixen directament a l'ectodomini de EGFR, tals com lligands per GPCR (G protein coupled receptors), altres agonistes de RTK, citoquines, quimioquines i elements d'adhesió cel·lular. És més, EGFR també pot ser activat per estímuls no fisiològics tals com UV i radiació gamma, xoc osmòtic, despolarització de membrana, ions de metalls pesats o agents generadors de radicals lliures tals com el peròxid d'hidrogen (Gschwind *et al.*, 2001). L'activació no fisiològica del receptor ha estat atribuïda a la inactivació de les fosfatases que antagonitzen l'activitat quinàsica intrínseca del receptor, desplaçant l'equilibri d'autofosforilació/desfosforilació basal cap a l'estat activat (Fischer *et al.*, 2003).

Els GPCR representen el grup més abundant de receptors de la superfície cel·lular i exerceixen una gran varietat de funcions biològiques. El fet que l'estimulació de GPCRs comporti l'activació de EGFR combina la gran diversitat dels GPCRs amb la potencia senyalitzadora del EGFR i serveix com a paradigma de comunicació entre receptors (Fischer *et al.*, 2003). El mecanisme pel qual l'EGFR és transactivat és diferent en funció del tipus cel·lular, però s'ha descrit un paper generalitzat per PKC, Ca^{2+} i Src com a mediadors d'aquesta activació. El fet que en experiments de temps-resposta la fosforilació de tirosines en EGFR induïda per GPCR fos detectat només 2 min després de l'estimulació (Daub *et al.*, 1996), que no es detectessin factors de creixement solubles del tipus EGF en el medi de cultiu (Daub *et al.*, 1996) i que la sobreexpressió transitòria de subunitats $G\beta_1\gamma_2$ fos suficient per induir la fosforilació de SHC suggerint una interacció física d'aquestes subunitats amb el receptor (Luttrell, 1997), va fer pensar inicialment que la transactivació del EGFR era un procés mediat exclusivament per mecanismes intracel·lulars (Gschwind *et al.*, 2001).

Prenzel *et al.*, (1999) van demostrar que un RTK quimèric format per l'ectodomini de EGFR i els dominis transmembrana i citoplasmàtic del receptor de PDGF era transactivat per lligands de GPCR mentre que el receptor de PDGF endogen no ho era, demostrant que la transactivació de EGFR no implicava un mecanisme intracel·lular i era dependent del domini extracel·lular d'unió a lligand de EGFR. És més, utilitzant el mutant per la toxina de la diftèria (CRM197), que bloca específicament la funció de HB-EGF, o l'inhibidor de metal·loproteïnases batimastat (BB94), la transactivació de EGFR induïda per LPA, carbachol o TPA (tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate) era completament blocada en cèl·lules COS-7 i HEK-293. Anàlisis de citometria de flux van confirmar la pèrdua en la superfície cel·lular de l'ectodomini del proHB-EGF després

del tractament amb agonistes de GPCR o TPA. Conjuntament aquests experiments van portar a l'establiment del mecanisme de TMPS (Triple membrane passing signal), on l'estimulació de GPCR indueix una activitat metal·loproteïnasa que talla el precursor de HB-EGF permetent al factor de creixement alliberat unir-se al domini extracel·lular de EGFR amb la conseqüent activació del receptor (Fig. 15). En aquest sentit, diversos treballs han suggerit la implicació de las metal·loproteïnases de la família de les ADAM (a desintegrin and metalloprotease) en el processament dels precursors "EGF-like". Aquest mecanisme també permet la transactivació del EGFR de cèl·lules veïnes, però només en distàncies curtes i amb la participació de la matriu de proteoglicans heparan sulfats (Gschwind *et al.*, 2001). Aquest fet explica que en el treball de Daub *et al.*, (1996) no es detectessin factors de creixement solubles en el medi, doncs el HB-EGF processat seria retinut en la matriu de proteoglicans.

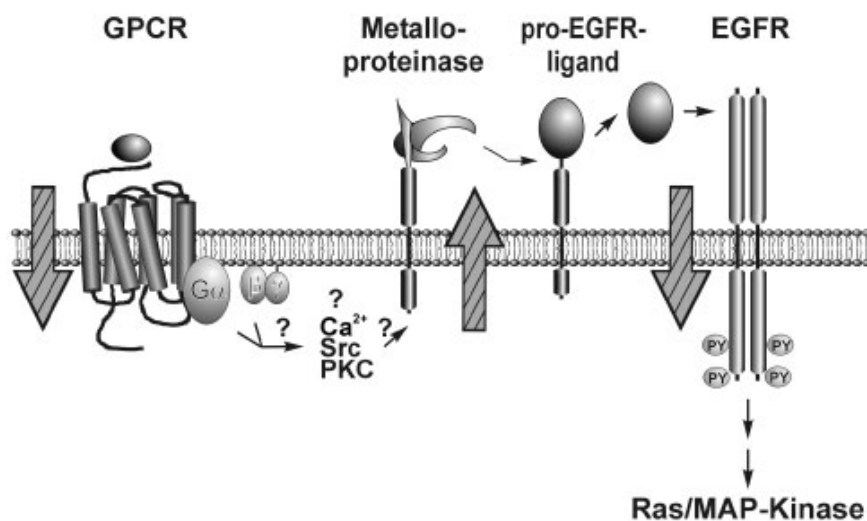


Figura 15. Mecanisme de TMPS per a la transactivació del EGFR. L'estimulació de GPCR comporta el processament mediat per metal·loproteïnases de lligands EGF-like, que al seu torn activen el receptor de EGFR i les vies de senyalització que en depenen. Aquest mecanisme implica tres passades per la membrana i acobla l'activació de GPCR a la via MAPK. Extret de Gschwind *et al.*, (2001).

3.3 EGFR i ronyó

Els ronyons de mamífers expressen tots els membres de la família de receptors ErbB i els seus respectius lligands (Taula 1). Diferents estudis donen suport a un rol de la família ErbB en el desenvolupament i la diferenciació del ronyó. En condicions fisiològiques, l'activació del EGFR juga un paper important en la regulació de la hemodinàmica renal i en el transport d'electròlits, mentre que en estats patològics, s'ha descrit que el EGFR pot jugar un paper tan beneficiós com perjudicial (Zeng *et al.*, 2008). S'ha descrit que l'addició de lligands del EGFR a cèl·lules tubulars renals

promou respostes biològiques *in vitro* tals com proliferació, migració, producció de matriu extracel·lular i transició epiteli-mesenquimal (EMT) (Zeng *et al.*, 2008).

ErbBs/ Ligands	Dev. kidney	Adult kidney					Cellular localization
		glomeruli	PCT ¹	TAL ²	DCT ³	CD ⁴	
ErbB1	+	+	+	-	+	+	basolateral
ErbB2	+	+	+	+	+	+/++	basolateral
ErbB3	+	-	-	-	+	+	basolateral
ErbB4	+ UB ⁵)	-	+	+	++	++	basolateral
EGF	+	-	-	++	+	+	apical and basolateral
HB- EGF	+(UB)	-	+	+		+	apical and basolateral
TGF- α	++	-	-	-	+	+	Cytoplasmic and basolateral

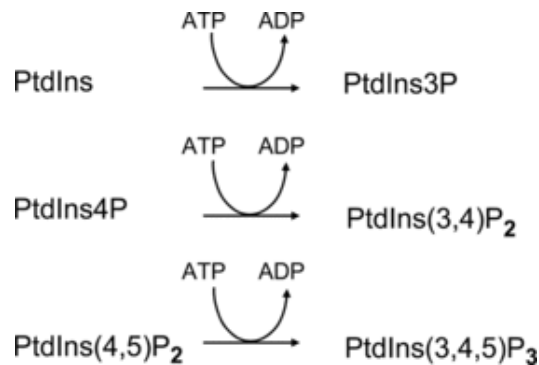
Taula 1. Expressió dels receptors ErbBs i els seus lligands en el ronyó. Els nivells d'expressió relatius en els diferents teixits han estat assignats de la següent manera: negatiu (-); lleugerament positiu (+); moderat a fort positiu (++) . PCT¹, proximal convoluted tubules, TAL², thick ascending limbs; DCT³, distal convoluted tubules; CD⁴, collecting ducts; UB⁵, ureteric buds. Extret i modificat de Zeng *et al.*, (2008).

En cèl·lules epitelials tubulars normals, el EGFR és expressat en la superfície basolateral per el que no és accessible al EGF present al lumen. Aquesta segregació física proveeix un mecanisme senzill disponible per a l'activació del receptor quan la integritat epitelial es veu compromesa. Així, després d'un dany localitzat o general, les interaccions cèl·lula-cèl·lula es veuen pertorbades, i el EGF pot travessar cap a la superfície basolateral i activar els EGFR localitzats allà per promoure el restabliment de la barrera epitelial. Paral·lelament als diferents estudis que donen suport a un rol del EGFR com a un important mediador de la reparació renal després del dany, l'activació crònica de EGFR ha estat considerada potencialment important en la

evolució de malalties renals que inclouen la fibrosi renal, la malaltia renal poliquística i el càncer renal.

4. LES FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASES (PI3Ks)

La família de les fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) és una família de proteïnes conservada a llarg de la evolució implicada en una gran varietat de processos biològics tals com la supervivència cel·lular, proliferació, inflamació, adhesió, el metabolisme de la glucosa, quimiotaxis i càncer. Totes les PI3Ks comparteixen dominis quinases homòlegs i poden fosforilar el grup hidroxil en la posició 3' de l'anell inositol dels fosfatidilinositols:



La integració de dades de seqüència, unió de proteïnes reguladores/adaptadores i l'especificitat de substrat per un o altre fosfatidilinositol permeten dividir la família de les PI3Ks en tres classes (resumit a la Taula 2), (Wymann *et al.*, 1998):

I. Les PI3K de la classe I estan subclassificades en funció de la seva estructura i mecanisme d'activació pels receptors de la superfície cel·lular. Les PI3Ks de la classe Ia són activades per receptors tirosina quinasa i els seus efectors i són d'expressió ubíqua. Són heterodímers compostos d'una subunitat catalítica de 110 kDa (p110 α , p110 β o p110 δ) constitutivament unida via seqüències amino-terminals a una subunitat reguladora (p85 α , p55 α , p85 β , o p55 γ). Les PI3K Ia poden fosforilar *in vitro* PtdIns, PtdIns 4P i PtdIns (4,5)P₂. Les PI3Ks de la classe Ib estan formades per una subunitat catalítica (p110 γ) unides a una subunitat reguladora (p101) i actuen "downstream" de receptors acoblats a proteïnes G. Les PI3K de classe Ib es troben principalment en cèl·lules hematopoètiques, són presents a baixes concentracions en l'endoteli, cèl·lules de la musculatura llisa i cardiomiòcits i han estat implicades en processos inflamatoris i en la funció cardiovascular (Wymann *et al.*, 2003). Només les PI3K de classe I són capaces de generar PtdIns (3,4)P₂ i PtdIns (3,4,5)P₃ *in vivo* (Garcia *et al.*, 2006).

II. Les PI3Ks de la classe II són monomèriques doncs no presenten subunitats reguladores, tenen un domini homòleg C2 característic i fosforilen *in vitro* PtdIns i PtdIns 4P. Aquesta classe inclou la PI3K C2 α i C2 β , d'expressió ubiqua, i la C2 γ , pràcticament restringida a fetge. Les PI3K de classe 2 estan constitutivament associades a membranes cel·lulars i s'associen i actuen "downstream" proteïnes transmembrana tals com la clatrina, integrines, receptors de quimioquines i receptors de factors de creixement (Wymann *et al.*, 1998 i 2003).

III. Les PI3K de classe III són homòlogues de Vps34p (vacuolar protein sorting mutant) de *S. Cerevisiae*, i només fosforilen PtdIns per formar PtdIns 3P, el qual és reconegut per proteïnes amb dominis FYVE i PX (phox homology). Vps34p i les seves proteïnes efectores estan implicades en el transport vesicular a les vacuoles de llevat i en els compartiments endosomals en mamífers (Wymann *et al.*, 2005).

Class	Catalytic subunit	Expression	<i>In vitro</i> substrates	Likely <i>in vivo</i> substrate	Adapter/regulatory subunits	Localisation	Regulation	Functions
Ia	p110 α p110 β p110 δ	Ubiquitous? Widely expressed, but not ubiquitous. Whole blood, thymus, breast.	PtdIns PtdIns(4)P PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(4,5)P ₂	p85 α , p85 β p55 ^{PIK} /p55 γ	Cytosol (resting), PM (stimulated), Nuclear	PTK, GPCR, Ras	Cell proliferation, Cell differentiation, Cell survival, Cell migration, Chemotaxis, Phagocytosis.
Ib	p110 γ	Whole blood, thymus, heart, endothelium	PtdIns PtdIns(4)P PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(4,5)P ₂	p101 p84/p87PIKAP	Cytosol (resting), PM (stimulated), Nuclear	GPCR, Heterotrimeric G Proteins, Ras	GPCR signalling, Cell migration, Chemotaxis.
II	PI3K-C2 α	Widely expressed, but not ubiquitous.	PtdIns PtdIns(4)P	PtdIns	?	TGN, Clathrin-coated vesicles, Nuclear speckles	PTK, GPCR, Integrins, Clathrin	Vascular smooth muscle contraction, Priming of neurosecretory granule exocytosis, Insulin signalling, Clathrin-mediated membrane trafficking.
II	PI3K-C2 β	Widely expressed, but not ubiquitous. High in thymus and epithelia.	PtdIns PtdIns(4)P	PtdIns	?	Intracellular membranes, Nucleus	PTK, GPCR, Integrins, Clathrin	Cell migration, Cell proliferation? PTK receptor signalling.
II	PI3K-C2 γ	Liver, Breast, Prostate	PtdIns PtdIns(4)P	PtdIns?	?	Golgi?	?	?
III	hsVps34	Ubiquitous	PtdIns	PtdIns	p150 (hsVps15) Beclin 1 (autophagy)	Endosomes Nucleus?	Constitutive?	Protein and vesicular trafficking and sorting, Autophagy, Phagocytosis?

Taula 2. Resum dels diferents classes de PI3K, la seva distribució, substrats, activadors i funcions en les que han estat implicades. Abreviatures: PM: plasma membrane; PTK: protein tyrosine kinase; TGN: Trans-Golgi Network; ?: function unclear or unknown. Extret de Traer *et al.*, (2006).

A més a més de la seva funció com a quinases de lípids, les PI3Ks tenen una activitat proteïna quinasa menys caracteritzada. En aquest aspecte, s'ha descrit que p100 α és capaç d'autofosforilar-se a si mateixa, de fosforilar la seva subunitat reguladora p85 associada (el que resulta en una disminució de l'activitat quinasa del

complex p100 α /p85 sobre lípid substrat), i el substrat del receptor d'insulina-1 (IRS-1). L'autofosforilació de p110 δ en la serina 1039 també ha estat associada a una disminució de l'activitat quinàsica sobre lípid (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). També s'ha descrit que l'activitat proteïna quinasa de la PI3K de classe IB p110 γ és suficient per activar la MAPK ERK1/2 (Duckworth *et al.*, 1997). L'autofosforilació de proteïnes també s'ha vist implicada en l'activació de les PI3K de classe III. Conseqüentment, la funció de les diferents PI3K ve determinada per l'especificitat de substrat d'un o altre lípid i per la seva activitat proteïna quinasa (Pirola *et al.*, 2001). En aquest aspecte cal mencionar que inhibidors de la PI3K tals com la wortmanina o LY294002 no poden ser usats per discriminar entre l'activitat quinasa sobre lípid o sobre proteïna ja que interfereixen en ambdues.

4.1 Activació de les PI3Ks

Les PI3Ks de classe I han estat les més estudiades i se'n coneix bé el mecanisme d'activació. Tot i que les PI3Ks de classe I interactuen directament amb els receptors de factors de creixement i amb Ras, les molècules adaptadores tenen un paper clau en l'activació i la localització de les PI3Ks. Així, degut a la presència de múltiples dominis d'interacció amb proteïnes, p85 és capaç d'interaccionar simultàniament amb diverses molècules senyalitzadores, permetent la integració de diverses vies de senyalització per regular finament l'activitat de la PI3K (Wymann *et al.*, 2003 i 2005). Les PI3Ks de classe I poden ser activades per com a mínim per 4 processos que poden cooperar entre ells:

- I. Translocació cap a la membrana plasmàtica dirigint el domini SH2 de p85 cap als motius pYXXM de receptors tirosina quinasa o dels seus substrats.
- II. A través de la unió de Ras-GTP a la subunitat catalítica.
- III. A través de la unió del domini SH3 de p85 a les regions riques en prolines de Shc, Cbl o dinamina.
- IV. Exposició de les regions riques en prolines als dominis SH3 de proteïnes tirosina-quinases tals com Lyn, Fyn, Grb2, v-Src, Abl, Lck.

Les PI3K de classe I són inactives en cèl·lules quiescents però són ràpidament activades en presència d'un estímul extracel·lular. Diversos mecanismes d'inactivació asseguren que la formació de PtdIns (3,4,5)P₃ és transitòria; aquests inclouen la fosfatasa SHIP (SH2-containing inositol D5-phosphatase), que transforma PtdIns (3,4,5)P₃ a PtdIns (3,4)P₂, i la fosfatasa PTEN (phosphatase and tensin homolog

deleted in chromosome 10). PTEN redueix els nivells tant de PtdIns (3,4,5)P₃ com de PtdIns (3,4)P₂ (Wymann *et al.*, 1998).

4.2 Efectors de la via de les PI3Ks

Part de la diversitat de les accions de PI3K es basa en la quantitat de proteïnes efectores dels lípids generats per PI3K, que serveixen com a segons missatgers (Fig. 16). El principal producte de la fosforilació del substrats fosfatidilinositols és el PtdIns (3,4,5)P₃, que pot ser llavors metabolitzat per fosfatases de lípids inositol a PtdIns(3,4)P₂. Aquests lípids es troben en nivells molt baixos en cèl·lules quiescents i incrementen ràpidament i transitòriament després d'estimulació. Localitzats a la membrana plasmàtica, aquest lípids serveixen com a llocs d'ancoratge per a proteïnes que contenen dominis d'homologia a plecstrina (PH).

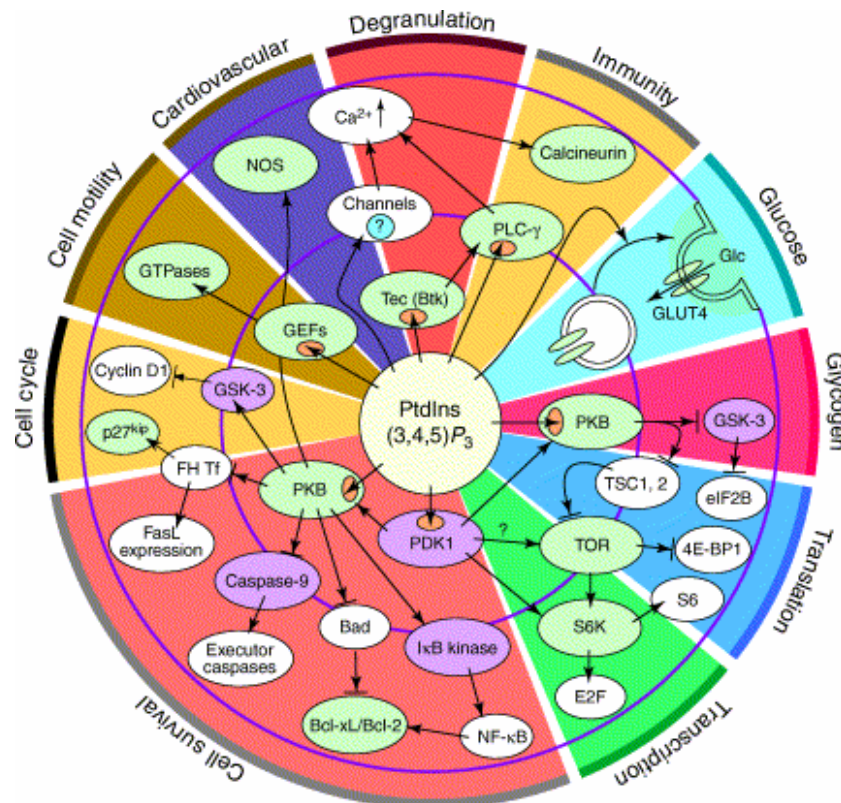


Figura 16. Diagrama esquemàtic resumint les dianes de la via PI3K. L'activació de PDK1 i PKB és essencial per al control metabòlic, proliferació i creixement, a través de la fosforilació de les seves dianes "downstream" tals com la GSK3 (glycogen synthase kinase-3), TOR (target of rapamycin) i la S6K (p70 S6 kinase). Addicionalment, PKB neutralitza la mort cel·lular programada inactivant la caspasa-9, Bad i els factors de transcripció forkhead (FH Tfs). La inducció de creixement, la promoció de la supervivència cel·lular i entrada al cicle, combinat amb l'inici de la motilitat proveeix de totes les senyals que converteixen les cèl·lules en tumorigèniques i malignes. PKB controla el to cardiovascular a través de la fosforilació de NOS, fet que promou també l'angiogènesis. L'acció sobre les proteïnes Tec i PLC-γ duu a l'augment del Ca²⁺ intracel·lular requerit per al procés de selecció clonal de cèl·lules B i T i per mediar la degranulació en els mastòcits i granulòcits. Extret de Wymann *et al.*, (2003).

Entre aquestes trobem la PDK1 (Phosphoinositide dependent-kinase 1), la serina/treonina proteïna quinasa B (PKB), la PLC γ , factors intercanviadors del nucleòtid de guanina (GEFs), proteïnes tirosina quinases de la família Tec (com per exemple Btk) i molts altres. Així, per exemple, l'activació de Rac per GEFs media molts dels efectes de PI3K en la polimerització d'actina (Jimenez *et al.*, 2000) i en migració cel·lular (Raftopoulos and Hall, 2004), (Fig. 16). Un altre grup d'efectors de PI3K són activats independentment de l'activitat lípid quinasa. Per exemple, p110 α fosforila la proteïna-1 d'unió al factor d'inici de la traducció 4E i a Ras, influint potencialment en la seves accions (Foukas and Shepered, 2004). p110 γ actua com a "scaffold" per la fosfodiesterasa 3B, essent aquesta associació requerida per mantenir l'activitat de la fosfodiesterasa (Patrucco *et al.*, 2004). Finalment, p85 també s'uneix i regula altres enzims, tals com Cdc42 i la JNK, independentment de l'activitat de p110 (Jimenez *et al.*, 2000).

La diana més ben caracteritzada per als productes lipídics derivats de PI3K és PKB. Fins al moment, només s'han descrit les PI3K de classe I com a responsables de l'activació de PKB *in vivo*. La PKB va ser identificada com a una proteïna quinasa amb alta homologia amb les proteïna quinasa A i C, per el que va ser anomenada PKB. També es coneix com c-Akt o Akt degut a la seva homologia amb la oncoproteïna viral v-Akt (Vanhaesebroeck *et al.*, 2000). En cèl·lules no estimulades, PKB és present al citosol en una conformació poc activa (Fig. 17). L'activació de PI3K genera PtdIns (3,4,5)P $_3$ /PtdIns(3,4)P $_2$, llavors PKB es transloca cap a la membrana i s'hi uneix a través del domini PH. Aquesta interacció indueix un canvi conformacional que exposa els residus Thr-308 i Ser-473 per que puguin ser fosforilats respectivament per PDK-1 i per una segona quinasa encara no identificada, resultant en la total activació enzimàtica *in vivo*. Com s'ha mencionat anteriorment, PDK-1 també conté un domini PH, assegurant que PDK-1 i PKB colocalitzin a la membrana. PDK1 però, no sembla que sigui directament activada o inhibida per cap senyal extracel·lular, sinó que seria controlada per mecanismes de direccionament cap a substrat i per interacció amb diferents proteïnes, que no només regularien la seva activitat, especificitat de substrat i localització subcel·lular, sinó que la farien susceptible als missatgers lipídics derivats de PI3K (Vanhaesebroeck *et al.*, 2000). L'activació de PKB succeeix ràpidament i és normalment màxima després de pocs minuts de ser estimulada per agonistes. Després de l'activació, PKB es dissocia de la membrana i entra al nucli (Hanada *et al.*, 2003).

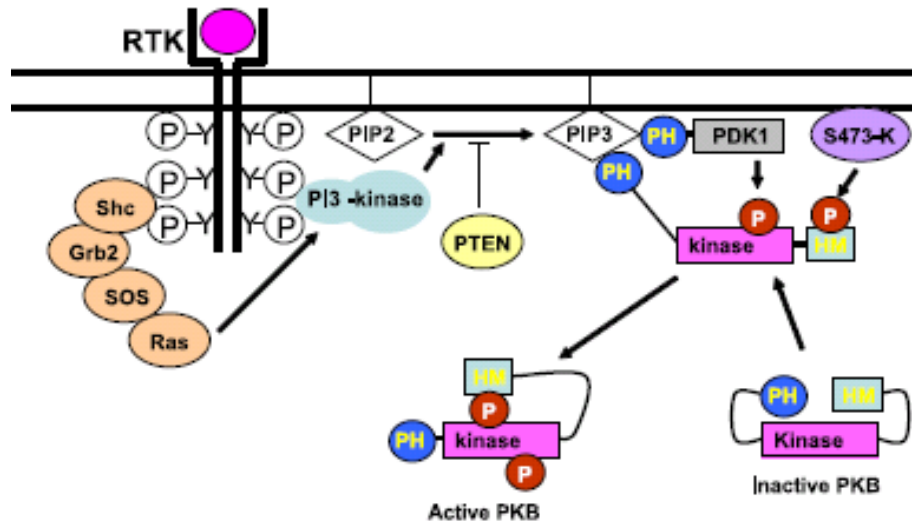


Figura 17. Representació esquemàtica de l'activació de PKB. La unió del lligand a un receptor RTK activa la PI3K que produeix PtdIns (3,4,5)P₃, que recluten PKB, PDK1 i probablement la quinasa que fosforila Ser473 a la membrana plasmàtica, on PKB esdevé fosforilada i activada. Extret de Hanada *et al.*, (2003).

PKB media molts dels processos controlats per PI3K (Fig. 16) i fosforila nombroses proteïnes tant a citoplasma com a nucli. La sobreexpressió de PKB té un efecte anti-apoptòtic en molts tipus cel·lulars, retardant-ne la mort (Franke *et al.*, 1997). Aquest fet és important sobretot en cèl·lules tumorals on PKB és sobreexpressada. La inactivació de PTEN també ha estat associada a la transformació de les cèl·lules tumorals, doncs l'augment dels nivells de PtdIns condueix a una elevada activitat de PKB (Haas-Kogan *et al.*, 1998). La proteïna Bad forma un heterodímer amb les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-2 i Bcl-XL prevenint que aquestes exerceixin la seva funció antiapoptòtica. Quan Bad és fosforilat per PKB deixa de interaccionar amb aquestes proteïnes permetent que inhibeixin l'apoptosis (Downward *et al.*, 1999). També s'ha descrit que PKB fosforila i inhibeix la Caspasa-9, una proteasa crucial en la iniciació de l'apoptosis (Cardone *et al.*, 1998). PKB també s'associa i fosforila les IKKs (kinasa de IκBα), això comporta la fosforilació i subseqüent degradació de IκBα, fet que permet al factor de transcripció NFκB translocar-se a nucli i activar la transcripció de proteïnes anti-apoptòtiques (Kane *et al.*, 1999). PKB també juga un paper clau en la regulació dels factors de transcripció de la família Forkhead (FOXO), doncs la fosforilació per PKB indueix l'export nuclear evitant així que estimulin la transcripció de gens com el lligand Fas (Brunet *et al.*, 1999). Finalment la fosforilació de MDM2 per PKB resulta en la inactivació de p53 (Mayo i Donner, 2002).

La inhibició de PI3K bloca la proliferació cel·lular però no indueix apoptosis (Craddock *et al.*, 1999), suggerint que a més de ser antiapoptòtica, PKB deu participar en la regulació del cycle cel·lular. PKB exerceix un paper fonamental en la transcripció,

traducció i síntesis proteica. PKB activa indirectament mTOR, fosforilant i inhibint el TSC (tuberous sclerosis complex), que inhibeix mTOR. PKB també fosforila i inhibeix la GSK3 (glycogen synthase kinase 3- β), un enzim implicat en la degradació de reguladors del cicle cel·lular, entre els que trobem la ciclina D1. La inhibició de GSK3 augmenta els nivells de ciclina D1 permetent l'entrada a cicle cel·lular (van Weeren *et al.*, 1998). PKB també activa el factor de transcripció E2F, un regulador crucial dels "checkpoints" del cicle cel·lular. Com hem mencionat abans, PKB inhibeix els factors de transcripció FOXO, implicats també en la inhibició de la proliferació cel·lular (Tran *et al.*, 2003). Finalment, PKB fosforila i activa eNOS, el que suposa una producció sostinguda de NO per cèl·lules endotelials (Vanhaesebroeck *et al.*, 2000). La producció mantinguda de NO per part de cèl·lules endotelials ha estat implicada en molts efectes biològics, tals com la regulació gènica i l'angiogènesis, doncs PKB s'activa en resposta a VEGF.

5. LES QUINASES REGULADES PER SENYALS EXTRACEL·LULARS (ERK1/2)

La via de les MAPK (mitogen-activated protein kinase) és una via altament conservada que existeix en tots els eucariotes i controla processos tan fonamentals com la proliferació, diferenciació, supervivència i apoptosi. L'esquema bàsic de la via inclou una proteïna G situada anterior a un mòdul que actua com a nucli que consisteix en tres quinases: una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) que fosforila i activa una MAPK quinasa (MAPKK) que al seu torn activa una MAPK. Aquest sistema no només permet una amplificació de la senyal, sinó punts addicionals de regulació que permeten controlar la cinètica, durada i intensitat de l'activitat regulant-la molt finament. Actualment s'han descrit fins a sis mòduls que, tot i compartir components relacionats estructuralment, participen en respostes biològiques específiques (Kolch, 2000). En mamífers trobem principalment tres famílies de MAPK: la de les quinases regulades per senyals extracel·lulars (ERK), les p38 MAP quinases i les quinases N-terminal de c-Jun (JNK). En aquest treball ens hem centrat en la via de les ERK1/2.

5.1 Activació de la via

Una àmplia varietat d'hormones, factors de creixement i de diferenciació, així com substàncies promotores de tumors utilitzen aquesta via (Fig. 18). Aquests estímuls activen Ras, una proteïna G petita, induint-li el recanvi de GDP per GTP i convertint-la a la seva conformació activa. Aquest procés requereix el reclutament de factors intercanviadors de GDP/GTP cap a la membrana cel·lular, on resideix Ras. L'arquetip d'aquests factors és SOS (*son of sevenless*), que està unit a la membrana per una proteïna adaptadora, que reconeix els llocs d'acoblament de tirosines fosfats en el mateix receptor o en el seu substrat (McCormick *et al.*, 1993). La fosforilació de SOS per ERK provoca el desassemblatge del complex SOS i per tant la fi de l'activació de Ras, proveint un mecanisme de retroinhibició. Ras activat funciona com un adaptador que uneix amb alta afinitat la quinasa Raf-1 provocant la seva translocació a la membrana on tindrà lloc l'activació (Moodie *et al.*, 1994). L'activació de Raf-1 és un procés de múltiples etapes que implica la desfosforilació de llocs inhibitoris per part de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) així com la fosforilació de llocs d'activació per part de PAK-1 (p21^{rac/cdc42}-activated kinase), Src i alguna altre quinasa encara desconeguda. Raf-1 activada fosforila i activa MEK, una quinasa dual que pot fosforilar tant residus treonina com tirosina. Alguns estudis suggereixen acoblaments preferents entre alguns tipus de Raf i isoformes de MEK. A més, MEK també pot ser activada per MEKK-1,

Mos o Tpl-2, sent Raf-1 però el principal activador (Schaeffer *et al.*,1999). MEK és activada per fosforilació de dos residus serina en el llaç d'activació. Alhora MEK fosforila i activa ERK-1 i ERK-2 (també anomenades p44 i p42 MAPK), activació que condueix a la seva translocació a nucli (Kim *et al.*, 1997). Al igual que en el cas de MEK, no està clar perquè existeixen dos gens per ERK ja que els estudis suggereixen que són funcionalment equivalents. Malgrat això, la conservació evolutiva dels dos gens i el fet que tant en el cas de MEK com ERK les dues isoformes normalment coexpressin, sembla indicar una diversificació funcional.

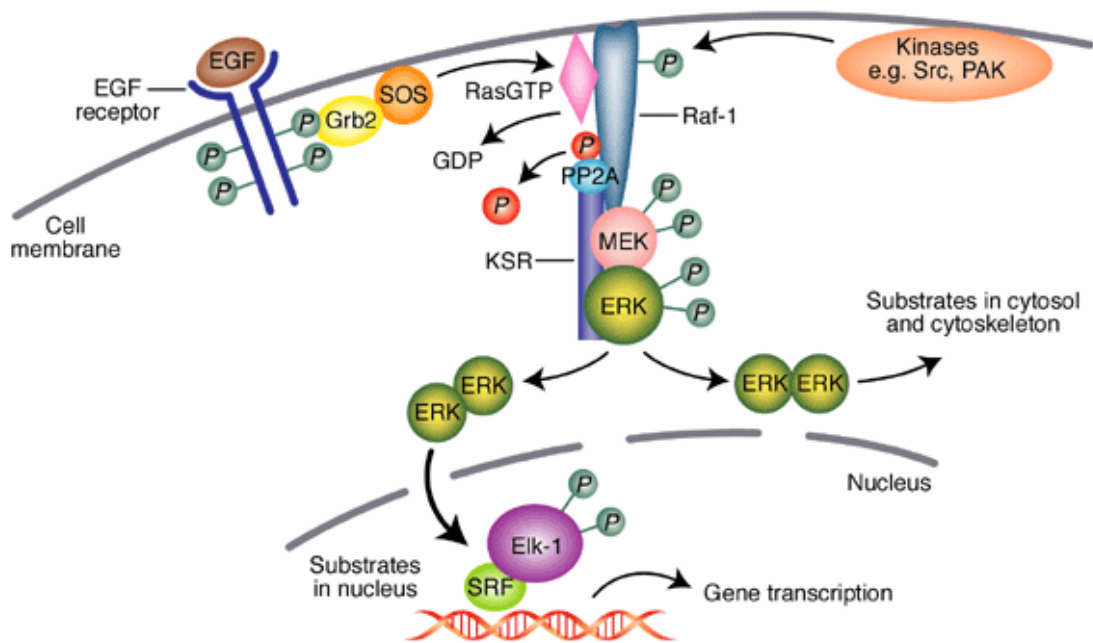


Figura 18. Esquema de la via de ERK1/2. Extret de Kolch *et al.*, (2002).

L'especificitat del senyal així com l'activació espai-temporal de la via són elements claus a l'hora de generar una resposta biològica precisa (Pouysségur *et al.*, 2002). La durada i intensitat de l'activació de ERK esta finament regulada per l'equilibri entre els mecanismes d'activació/inactivació i per compartimentalització. Nombroses fosfatases han estat implicades en la desfosforilació de ERK, entre aquestes trobem la PP2A i les MKPs. L'especificitat així com l'eficiència en la transmissió de la senyal al llarg de la via es pot aconseguir a través de proteïnes "scaffolds" i per llocs d'anclatge específics entre els diferents components de la via i en els seus substrats. Les proteïnes "scaffolds", tals com KSR o MP-1, actuen mantenint units els diferents components de la via i juguen també un paper important en la localització subcel·lular d'aquests components (Pouysségur *et al.*, 2002).

5.2 Efectors de la via

ERK és una serina/treonina quinasa amb més de 50 substrats que inclouen proteïnes del citoesquelet, altres quinases (com p90/rsk), fosfatases i factors de transcripció (entre ells Elk, Ets, Myc, c-jun, NFAT). L'accessibilitat d'un substrat o altre vindria donada per compartimentalització subcel·lular.

La via de les ERK té un paper fonamental en expressió gènica, proliferació cel·lular, diferenciació i l'apoptosi. Així, l'activació de ERK1/2 ha estat implicada en supervivència cel·lular i quimioresistència tot i que també s'ha implicat en mort cel·lular. L'activació de ERK és necessària pels efectes apoptòtics de la cisplatina (Wang *et al.*, 2000, Choi *et al.*, 2004), l'etoposít (Stefanelli *et al.*, 2002) i ha estat implicada en malalties neurodegeneratives (Colucci-D'Amato *et al.*, 2003). Així, s'ha descrit que quan l'activació de ERK1/2 promou la supervivència, l'activació de la via és ràpida i transitòria, mentre que en situacions pro-apoptòtiques, l'activació tendeix a ser més retardada i sostinguda (Choi *et al.*, 2004).

S'han descrit diferents punts de connexió entre les vies de senyalització de ERK i PI3K. En resposta a factors de creixement i integrines, l'activació dependent de PI3K de les GTPases Rac/cdc42 coopera amb Ras activant la via Raf/MEK/ERK. Aquesta cooperació implica la quinasa PAK (p21 activated kinase), la qual fosforila Raf-1 en la Ser338 i MEK en la Ser298, aquesta última essent important per la unió de Raf-1 a MEK (Garcia *et al.*, 2002). També s'ha descrit que PDK1 promou l'activació de ERK a través de la fosforilació de MEK en les Ser222 i 226, requerides per la plena activació de MEK (Sato *et al.*, 2004). Alternativament, l'activació de PKB per PI3K pot comportar la inactivació de Raf-1 a través de la fosforilació en la Ser259, que se suposa que és un dels llocs d'unió de 14-3-3, proteïna que manté Raf-1 en un estat autoinhibit (Dhillon *et al.*, 2002).

OBJECTIUS

La CsA és un dels fàrmacs immunosupressors més àmpliament utilitzats i el seu ús ha suposat una important disminució del rebuig i un augment de la vida mitja de l'òrgan trasplantat. Malgrat tot, els seus efectes secundaris, principalment la nefrotoxicitat, han limitat la seva utilització. La nefrotoxicitat crònica per CsA és un procés complex que ha estat associat a canvis hemodinàmics i fibrosi intersticial. Cada cop hi ha més evidències però que la CsA exerceix part dels seus efectes directament sobre les cèl·lules del túbul proximal. Per aquest motiu és de gran importància identificar els mecanismes moleculars implicats en la toxicitat per CsA en aquestes cèl·lules. Si bé els mecanismes moleculars implicats en la immunosupressió són coneguts, aquells implicats en la nefrotoxicitat encara no han quedat del tot establerts. Tenint en compte aquests precedents, en aquesta tesi es van plantejar els següents objectius:

1. Estudiar la toxicitat per CsA en la línia cel·lular PKSV-PCT3 (PCT3), derivada del túbul proximal de ratolins. Establir les condicions en les que la CsA causava mort cel·lular per tal d'establir un model de toxicitat *in vitro*.
2. Un cop establertes aquestes condicions, analitzar els efectes de la CsA en dues vies de senyalització àmpliament implicades en la supervivència/mort cel·lular com són les vies ERK1/2 i PI3K. Estudiar el seu possible paper en la toxicitat induïda per CsA mitjançant l'ús d'inhibidors farmacològics específics per aquestes vies.
3. Estudiar si els mecanismes que condueixen a l'activació d'aquestes vies en resposta al tractament amb CsA podrien ser degudes a l'alliberació de factors autocrins/paracrins per part de les cèl·lules PCT3.

RESULTATS

CAPÍTOL I

**ELS INHIBIDORS DE LA PI3K PROTEGEIXEN
ENFRONT DE LA TOXICITAT PER CsA EN
CÈL·LULES PCT3**

INTRODUCTION

The immunosuppressor cyclosporine A (CsA) has been widely used to prevent organ transplant rejection. CsA has also potential therapeutic use in the treatment of cancer and a diversity of autoimmune diseases. The beneficial effects of CsA are restricted by its toxic side effects, with nephrotoxicity being the most remarkable one (Olyaei *et al.*, 2001). The molecular mechanisms responsible for these adverse effects are largely unknown. A potential involvement of reactive oxygen species (ROS) has been suggested (Wang and Salahudeens, 1994; Perez de Lema *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1997), although others do not support a direct link between CsA-mediated ROS generation and adverse renal effects (Galletti *et al.*, 2005). CsA-induced ROS generation and susceptibility to ROS are highly tissue specific (Buetler *et al.*, 2000). PI3K/PKB and ERK are among those pathways activated by oxidative stress (Blanc *et al.*, 2003), and both of them have been implicated in survival and death responses in the cell.

The evolutionary conserved phosphoinositide 3-kinase (PI3K) family is implicated in a wide range of biological processes such as cell survival, proliferation, inflammation, adhesion, glucose metabolism, chemotaxis, and cancer (Cantley, 2002; Wymann and Marone, 2005). PI3Ks are divided into three classes according to their structure and *in vitro* substrate specificities and all of them are targeted by the pharmacological inhibitors Wortmannin, LY294002 and Apigenin (Wymann *et al.*, 2003). The ubiquitously expressed class IA PI3Ks are comprised of a 110-kDa catalytic subunit (p110 α , p110 β , or p110 δ) that is constitutively bound to a regulatory subunit (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , or p55 γ) and are activated by receptor tyrosine kinases. The single Class IB PI3K is primarily found in hematopoietic cells, is composed of a catalytic subunit (p110 γ) bound to a p101 regulatory subunit and acts downstream of G-protein-coupled receptors. It has been described that only Class I PI3Ks can produce PtdIns(3,4,5)P₃, which act as docking sites for downstream effectors such as PDK-1, PKB, Sos, and PLC γ . In contrast to class I PI3Ks, Class II PI3Ks lack regulatory subunits, phosphorylate PtdIns(4,5)P₂ poorly *in vitro*, and appear to associate with and function downstream of a number of transmembrane proteins, including clathrin, integrins, chemokine receptors, and growth factor receptors (reviewed in Wymann and Marone, 2005; Wymann *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2005). Class III PI3K is composed of a catalytic homolog of the Vps34 protein, which is implicated in vesicle sorting, and a p150 regulatory subunit (Harada *et al.*, 2005). While diverse effects have been assigned to class I PI3Ks, the functions of class II and class III PI3Ks are still being elucidated.

The ERK pathway plays critical role in gene expression, cell growth, differentiation and apoptosis. Activated tyrosine kinase receptors induce translocation of Grb2/SOS complex to the membrane what leads to GTPases activation and the recruitment of Raf to the membrane. Once activated, Raf phosphorylates and activates MEK which in turn phosphorylates and activates ERK (Kolch, 2000). Activation of the ERK pathway has been repeatedly shown to contribute to cell survival and chemoresistance (Guyton *et al.*, 1996; Tran *et al.*, 2001; Miyamoto and Fox 2000). However, other studies have evidenced a link between ERK1/2 activation and cell death (Ishikawa and Kitamura, 1999; Wang *et al.*, 2000; Stefanelli *et al.*, 2002). Activation of ERK1/2 is required for the apoptotic effects of cisplatin (Wang *et al.*, 2000), etoposide (Stefanelli *et al.*, 2002) and neurodegenerative diseases (Colucci-D'Amato *et al.*, 2003). When ERK activation enhances survival, the activation occurs rapidly and is more transient, whereas in situations where it is apoptotic, the activation tends to be delayed and sustained (Choi *et al.*, 2004) CsA induces ERK activation in various cell types (Paslaru *et al.*, 1997; Kiely *et al.*, 2003) but the specific mechanism remains unknown.

The PKSV-PCT cell line, derived from the convoluted portion of the proximal tubule of kidneys from transgenic mice, has been shown to be a useful model for the studies on the effects of CsA in renal cells (Cebrián *et al.*, 2001). Then, the aim of the present work was to study the effects of CsA on ERK and PI3K pathways and the potential involvement of these pathways on CsA-induced toxicity in PKSV-PCT cells.

METHODS

Materials

Cyclosporine A (CsA), EGF, PD98059, U0126, AG1478, Wortmannin and LY294002 were from Calbiochem. Anti-ERK1/2 and anti-Ras were from Transduction Laboratories. Anti-phospho Raf-1 (Ser²⁵⁹), anti-phospho Raf-1 (Ser³³⁸), anti-phospho PKB/Akt (Ser⁴⁷³), anti-PKB, anti-phospho EGFR (Tyr¹⁰⁶⁸), anti-phospho ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-PI3K 110 α , anti-p53 and anti-phospho MEK1/2 (Ser^{217/221}) were from Cell Signalling. Anti MEK and anti Raf-1 (C12) were from Santa Cruz. Apigenin and all other reagents were from Sigma.

Cell culture and treatments

Immortalized cells from the convoluted portion of mouse kidney proximal tubule PKSV-PCT cells (PCT3 clone) were cultured in a medium A (DMEM:Ham's F12 (1:1, v/v), 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 12.5 mM D-glucose, 60 nM sodium selenite, 5 μ g/ml transferrin, 50 nM dexamethasone, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) supplemented with 2% foetal bovine serum (FBS), 5 μ g/ml insulin, 10 ng/ml epidermal growth factor and 1 nM triiodothyronine, at 37°C in a 95:5 air:CO₂ water saturated atmosphere. For all experiments, cells were seeded at 0.2 x 10⁶ cells/ml and after 24 h with complete medium cells were starved for 16 h in medium A supplemented with 0.1% FBS but not insulin, epidermal growth factor or triiodothyronine. CsA was dissolved in ethanol and all the pharmacological inhibitors were in DMSO. In all cases controls were carried out with cells treated with the corresponding vehicle alone. After treatments, cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and harvested with lysis buffer as in (Llorens *et al.*, 2004).

Cell viability

After treatments, PCT3 cells were harvested and washed twice with cold PBS, and the viable cells were counted with Trypan Blue Dye (Gibco-Life Technologies) in a Neubauer chamber. Living cells exclude the dye, whereas dead cells will take up the blue dye. For Hoechst staining, cells seeded in six-well dishes were washed twice with PBS and fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde at room temperature. Then, cells were washed twice again with PBS and stained with Hoescht (5 μ g/ml in PBS) for 5 min.

Western Blots

The protein content of cellular extracts was quantified by the Bradford assay (Bradford, 1976). 25 µg of total cell extract protein was run on SDS-PAGE gels, transferred onto PVDF membranes and incubated with the corresponding antibodies. The membranes were developed with the enhanced chemiluminescence method (ECL-Pierce).

Measurement of ROS generation

The assay is based on the incorporation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) into the cell. H₂O₂ and peroxidases are able to oxidise the cleaved DCFH to DCF, which is highly fluorescent at 530 nm. To measure CsA-induced ROS generation cells were washed twice with PBS, and fresh medium containing 20 µM DCFH-DA was added to previously treated cells. After 30 minutes cells were washed again, trypsinized and resuspended with cold PBS. Fluorescence was measured by flow cytometry on a FACScan flow cytometer.

Raf-1 activity

Raf-1 immunoprecipitation and kinase assay were done as described previously (Barnard *et al.*, 1998). Immunoprecipitated Raf was incubated for 30 min at 30 °C with 0.8 mM ATP, 10 µg/ml GST-MEK and 100 µg/ml GST-ERK2. An aliquot of the supernatant was used for ERK2 activity assays using 0.5 mg/ml myelin basic protein (MBP) and 0.1 mM [γ -³²P] ATP (400 cpm/pmol). After 15 min incubation at 30 °C, 12 µl of 5x Laemmli loading buffer were added to the tubes and the mixture analyzed by SDS-PAGE. Radiolabelled bands were quantified in a PhosphorImager.

Measurement of Ras activation

The ability of Ras-GTP to bind to RBD (Ras-binding domain of Raf-1) was used to analyse the amount of active Ras. Cell lysates (400 µg) were incubated with 75 µg of GST-RBD bound to glutathione-Sepharose beads for 2 h at 4 °C. Beads were washed four times and bound proteins eluted by the addition of 25 µl of Laemmli loading buffer and immunoblotted with pan-Ras antibody as described above. 50 µg of cell lysates were also analysed by Western Blot to ensure equal quantities of Ras in the assays.

Transfection Techniques

For silencing the 110α catalytic subunit of PI3K we used ON-TARGETplus SMARTpool siRNA from Dharmacon (Lafayette, CO), that contained four pooled siRNA

duplexes with "UU" overhangs and a 5' phosphate on the antisense strand. Thus, a mixture of several siRNAs ensures an effective depletion of PI3K gene in the cells. A nonrelated control siRNA pool (Dharmacon) that lacks identity with known gene targets was used as a control for nonsequence-specific effects.

Transfections were performed using Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Briefly, cells were transfected with 50 nmol/L siRNA and incubated at 37 °C for 4 h, at which time one volume medium with 4% FBS was added and the cells were further incubated for another 3 h. Then, cells were washed with PBS and starved for 16 h before treatments.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured PCT3 cells using total RNA isolation system (Qiagen) following the manufacturer's recommendations and employing the optimal DNase treatment to remove contaminating genomic DNA. The presence of the catalytic subunit of class IA PI3Ks 110 α (Pik3ca) and 110 β (Pik3cb), and the class II PI3K-C2 α (Pik3c2a) and PI3K-C2 β (Pik3c2b) mRNA was analyzed by RT-PCR with a SuperScript One-Step RT-PCR system (Invitrogen) from 500 ng of total RNA using primers specific for the individual PI3K isoforms and for cyclophilin A (CypA) as a control of RNA amount and integrity. Forward (Fw) and reverse (Rv) primer pairs are as follows: Pik3ca Fw, 5'- ccaacaacgacaagcagaa-3' and Rv, 5'-tatgaccagagggatttcg-3'; Pik3cb Fw, 5'-atgtgtcaagtcgtggtgga-3' and Rv, 5'-agagggcacaatcgagaaaa-3'; Pik3c2a Fw, 5'-ccacaccattcatccaaa-3' and Rv, 5'-ttacagttgccccagaaagg-3'; Pik3c2b Fw, 5'-tccaggatcaggtgacacag-3' and Rv, 5'-cacaggttcccagaggtgt-3' and CypA (Fw, 5'-atgttcaaccccaccgtg-3' and Rv, 5'-cagatggggtagggacg-3'). The products were electrophoresed on a 1% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

RESULTS

CsA induces cell death

PCT3 cells were seeded as indicated in Methods and after 24 h medium was replaced by a starving medium for additional 16 h. This was set as standard working conditions. Cells were then treated with CsA for the indicated times and doses. As observed in Figure 19A, medium replacement did not induce growth arrest in untreated cells, where cell number still increased for the next 48 h. Treatment with doses lower than 5 $\mu\text{g/ml}$ resembled control. Treatment with 5 $\mu\text{g/ml}$ slowed down cell proliferation when compared to untreated cells but no toxicity was observed. Doses of 10 $\mu\text{g/ml}$ or higher induced cytotoxicity as observed in a decrease in number of cells that exclude the dye after 12-24 h of incubation with CsA. These results showed that CsA toxicity was time and dose dependent, and that CsA-induced cell death is a relatively late event.

Treatment of PCT3 cells for 24 h with 25 $\mu\text{g/ml}$ of CsA decreased cell adhesion and induced changes in cell morphology (Fig. 19B, upper panel). In order to assess the nature of CsA-induced cell death we stained cells with Hoescht. Nuclear staining of CsA treated PCT3 cells did not show chromatin condensation (Fig. 19B, lower panel). Moreover, CsA treatment with 25 $\mu\text{g/ml}$ did not increase p53 levels at any of the times studied (data not shown).

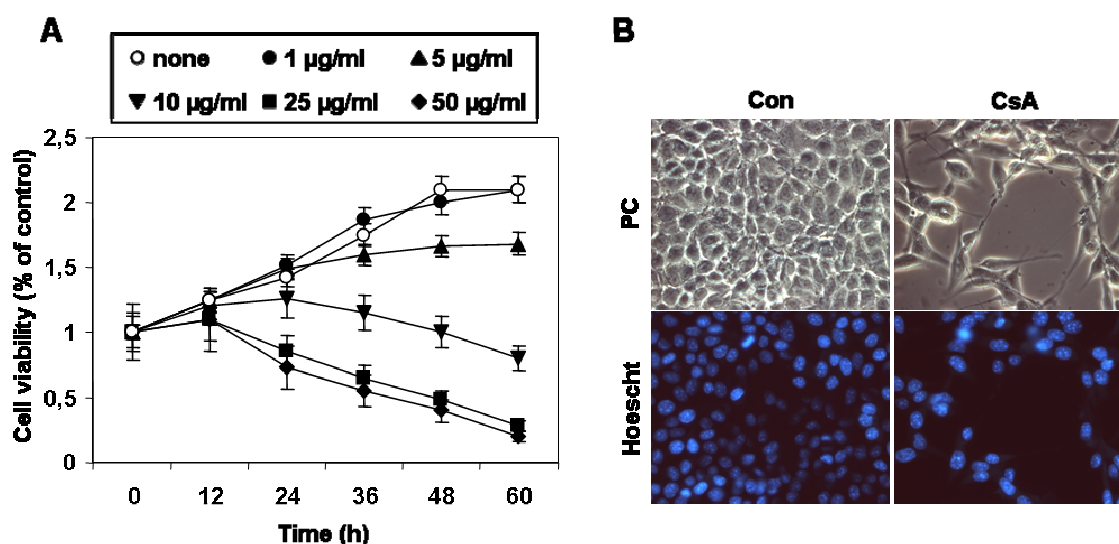


Figure 19. CsA induces cell death in PCT3 cells. (A) PCT3 cells were seeded as indicated in Methods and then treated with increasing doses of CsA or vehicle alone for the indicated times. Cell viability was analyzed by Trypan blue assay. The data are the means of three experiments performed on different days taking the number of cells at the onset of the experiment as 100%. **(B)** PCT3 cells were treated with 25 $\mu\text{g/ml}$ CsA or vehicle alone for 24 h and then fixed with paraformaldehyde and stained with Hoescht as indicated in Methods. Then cells were visualized by phase-contrast microscopy (upper panel) and fluorescence microscopy (lower panel).

CsA activates ERK and PI3K pathways

ERK and PI3K pathways are two important pathways related with cell death and survival. Then we asked whether CsA exerts any effect over these pathways. PI3K activation was monitored by determining the phosphorylation status of PKB, the best-characterized target for PI3K-derived lipid products. ERK and PKB activation were monitored by measuring the levels of activating phosphorylations (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ for ERK1/2 and Ser⁴⁷³ for PKB) using phospho-specific antibodies (Fig. 20). CsA induced ERK and PKB activation in a time and dose dependent manner. Doses lower than 5 µg/ml did not induce any significant activation, but ERK and PKB phosphorylation was observed with doses of 10 µg/ml or above. Phosphorylation kinetics differed between both enzymes. PKB activation was observed within minutes of CsA addition reaching a maximal value after 1 h of treatment whereas ERK activation started to be evident after 1 h of CsA addition and reached a maximal value after 6 h of treatment (Fig. 20C).

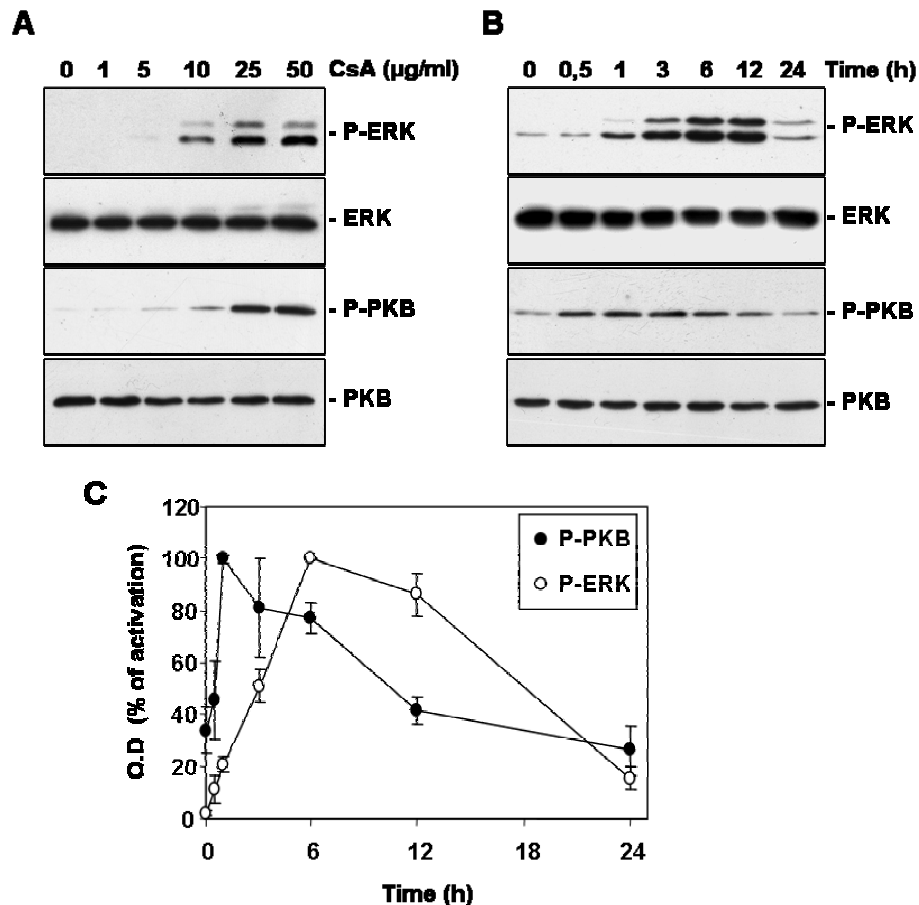


Figure 20. CsA treatment activates ERK and PKB. PCT3 cells were treated with the indicated doses of CsA for 6 h (**A**) or with 25 µg/ml CsA for the indicated times (**B**). ERK and PKB activation were then analysed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies. To ensure equal amount of protein in each lane Western Blots against total protein were performed for ERK and PKB. (**C**) The means of optical density (OD) values of the bands detected in Western Blots of three different experiments are plotted taking the maximal value of phosphorylation of ERK and PKB as 100%.

ERK but not PKB activation in response to CsA is mediated by ROS.

In agreement with previous reports on other cell types (Wang and Salahudeens, 1994; Perez de Lema *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1997; Galleti *et al.*, 2005; Buetler *et al.*, 2000), we observed that in PCT3 cells CsA induced ROS generation (Fig. 21A). ROS generation was time and dose dependent becoming evident at doses of 10 µg/ml and 1 to 3 h after CsA addition (data not shown). It has been described that ERK and PKB can be activated by ROS (Blanc *et al.*, 2003). Since CsA induced both ERK and PKB activation, we wondered if this activation was mediated by ROS generation. For this purpose we treated cells with the superoxide dismutase (SOD) mimetic Tiron or the antioxidant enzyme PEG-catalase before CsA addition. Covalent conjugation of catalase with polyethylene glycol (PEG) increases protein half-life and enhances the uptake of the active form of this enzyme by cultured cells (Beckman *et al.*, 1998). Figure 21A shows that ROS generation induced by 25 µg/ml CsA was significantly decreased by pre-treatment with PEG-catalase and Tiron, with a maximum effect when both antioxidants were added together. Pre-treatment with the antioxidants blocked ERK activation, but not PKB activation (Fig. 21B).

Antioxidants do not protect from CsA-induced cell death

It has been widely described that ROS could mediate the nephrotoxic effects of CsA (Parra *et al.*, 2003; Burdmann *et al.*, 2003). Then, we wondered if antioxidants would prevent CsA induced cytotoxicity. Figure 21C shows that pre-treatment with either PEG-catalase, Tiron, or both did not attenuate CsA induced cell death, suggesting that in PCT3 cells the cytotoxic effects of CsA were not directly related to its ability to generate ROS.

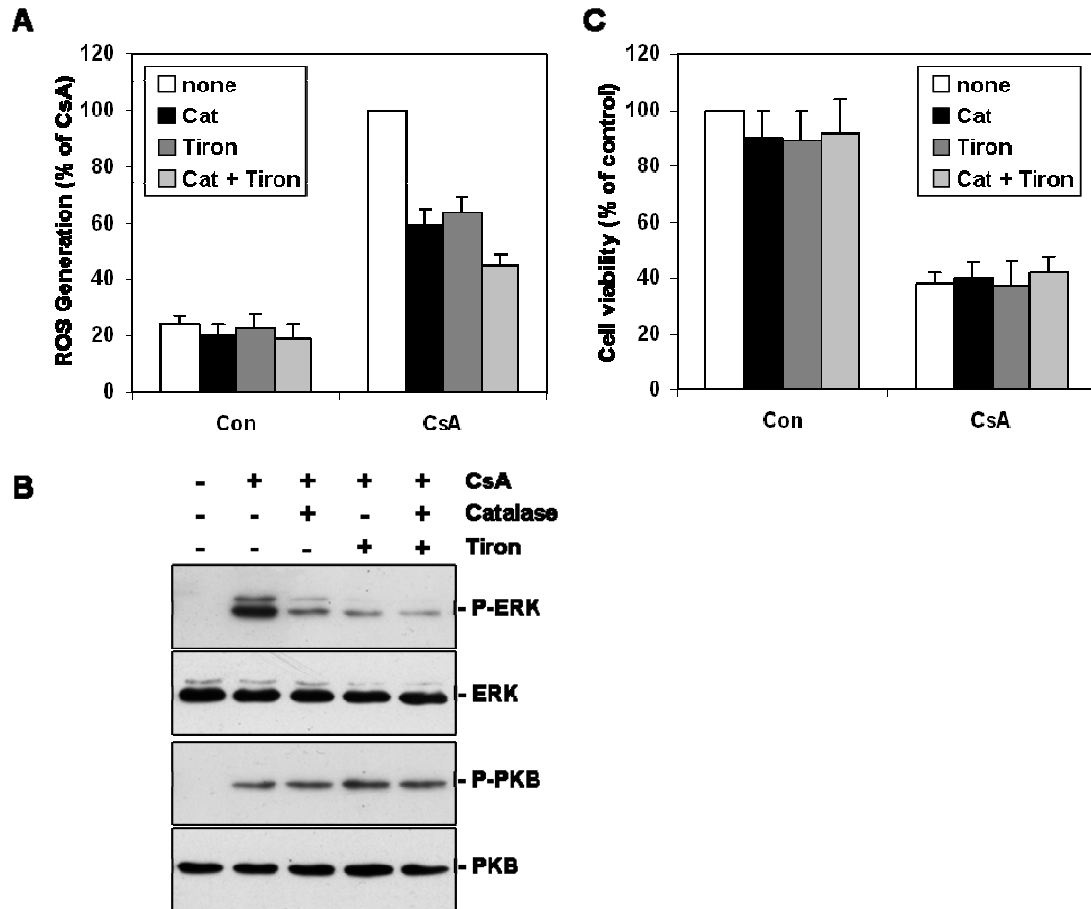


Figure 21. CsA-induced ROS generation mediates ERK but not PKB activation and is not involved on CsA cytotoxicity. (A) PCT3 cells were treated with 25 $\mu\text{g/ml}$ CsA or vehicle alone for 6 h and then ROS levels were detected as indicated in Methods. When indicated, 10 mM Tiron or 15 000 U/ml PEG-Catalase were added 30 min or 12 h respectively before CsA addition. The data are the means of ROS levels of three different experiments and are plotted taking the value obtained with 25 $\mu\text{g/ml}$ CsA as 100%. (B) PCT3 cells treated as above were used to determine ERK and PKB activation by Western Blot using phospho-specific antibodies. (C) PCT3 cells pre-treated with 15 000 U/ml PEG-Catalase for 12 h and/or 10 mM Tiron for 30 min were treated with 25 $\mu\text{g/ml}$ CsA or vehicle alone for 24 h. Cell viability was analyzed by Trypan blue assay. The data are the means of three different experiments taking the number of untreated cells (vehicle alone) as 100%.

CsA-induced ERK and PI3K/PKB activation are mediated through EGFR

ERK and PI3K pathways are two major signaling pathways initiated at EGFR (Okano *et al.*, 2000). We wondered whether CsA-induced ERK and PKB activation was a consequence of EGFR activation. Figure 22A shows that CsA treatment induced EGFR phosphorylation at Tyr¹⁰⁶⁸, a Grb2 binding site that has been described to trigger MAPK activation. Moreover, EGFR activation was required for ERK and PKB activation since pre-treatment with AG1478, a specific EGFR inhibitor, blocked this activation (Fig. 22B). These results suggested that EGFR would mediate CsA effects. Then, we tested if inhibition of EGFR could block ROS production or would ameliorate cell death. Pre-

treatment with AG1478 did not prevent ROS generation (Fig. 22C) but rescued from CsA-induced cytotoxicity (Fig. 22D). Pre-treatment with AG1478 alone resulted in a slight diminution of cell growth without affecting viability, as expected when inhibiting a growth factor receptor.

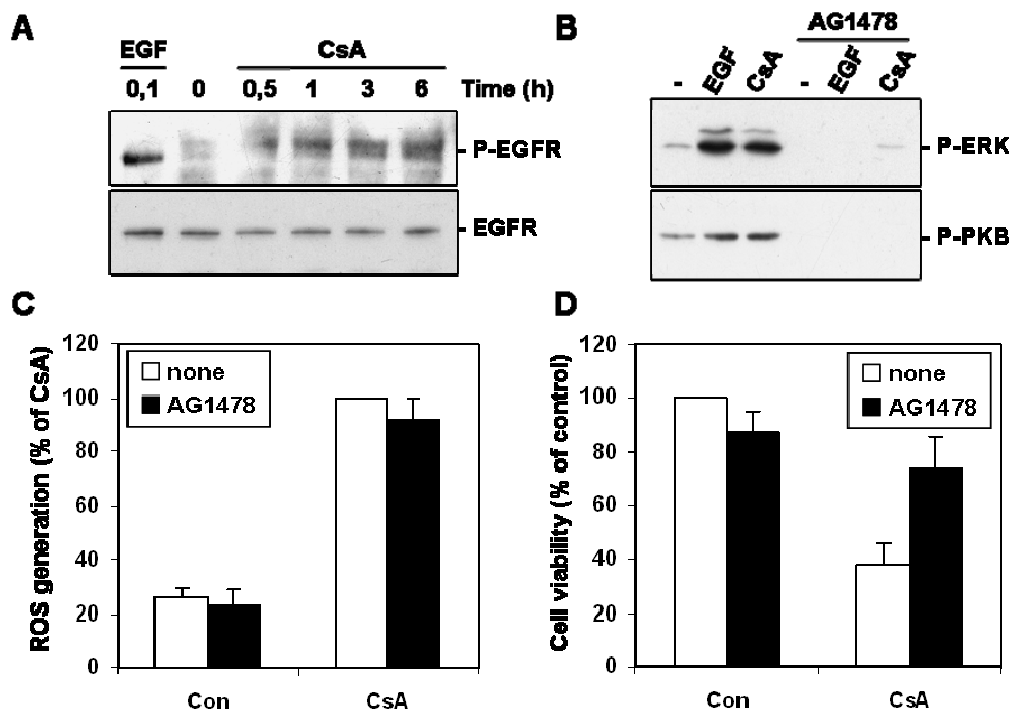


Figure 22. CsA-induced ERK and PKB activation are mediated by EGFR. (A) PCT3 cells were treated with 100 ng/ml EGF for 5 min or 25 µg/ml CsA for the indicated times and EGFR activation was measured by Western Blot using a phospho-specific antibody against Tyr1068. To ensure equal amount of protein in each lane Western Blots against total EGFR protein was performed. (B) PCT3 cells were pre-treated with the EGFR specific inhibitor AG1478 for 30 min before addition of 100 ng/ml EGF for 5 min or 25 µg/ml CsA for 6 h. ERK and PKB activation were measured by Western Blot using phospho-specific antibodies. (C) PCT3 cells were treated with 25 µg/ml CsA or vehicle alone for 6 h and then ROS levels were detected as indicated in Methods. When indicated, AG1478 was added 30 min before CsA addition. The data are the means of ROS levels of three different experiments and are plotted taking the value obtained with 25 µg/ml CsA as 100%. (D) PCT3 cells pre-treated with AG1478 30 min before addition of 25 µg/ml CsA or vehicle alone for 24 h. Cell viability was analyzed by Trypan blue assay. The data are the means of three experiments taking the number of untreated cells (vehicle alone) as 100%.

CsA-induced ERK activation is mediated through Raf/MEK activation

To gain an insight on how CsA activates ERK we analyzed the upstream elements of the ERK pathway. Treatment for 5 min with 100 ng/ml EGF was used as a positive control of ERK pathway activation. Figure 23A shows that CsA treatment activated MEK 1/2. Raf-1 activity, monitored either by a MBP-coupled assay or by analyzing Ser³³⁸ phosphorylation, was also enhanced by CsA (Fig. 23B), showing a close coincidence between phosphorylation and kinase activity as reported previously to occur in EGF stimulated NIH 3T3 cells (Dhillon *et al.*, 2002). We next checked Ras activity and observed that Ras was not activated by CsA treatment (Fig. 23C).

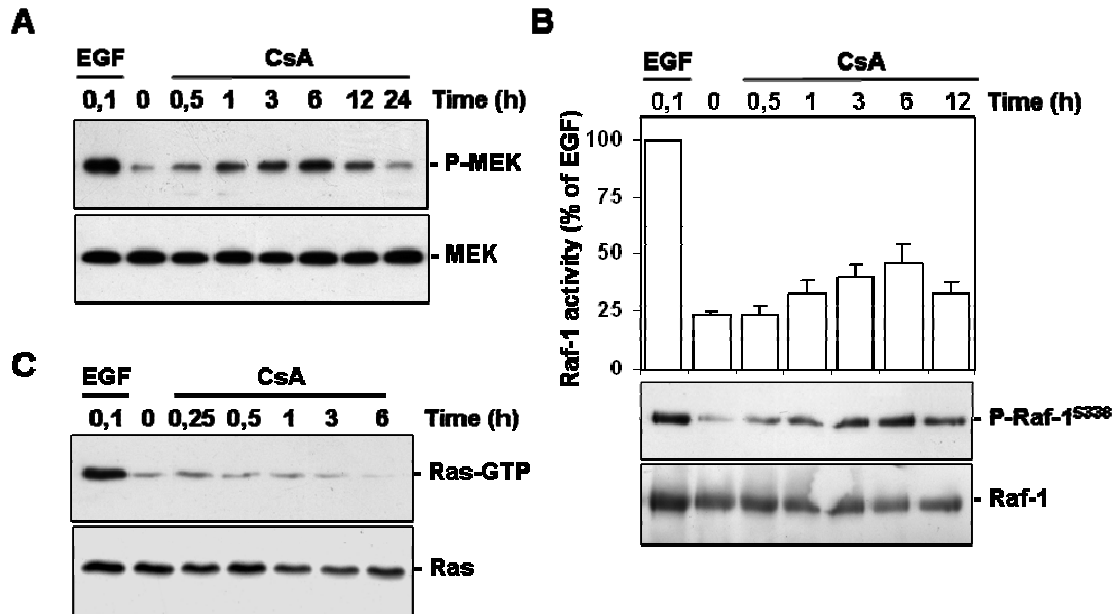


Figure 23. CsA activates MEK and Raf-1 but has no effect on Ras. (A) PCT3 cells were treated with 100 ng/ml EGF for 5 min or 25 μ g/ml CsA for the indicated times. MEK activation was measured by Western Blot using phospho-specific antibodies. (B) PCT3 cells were treated as above and Raf-1 immunoprecipitates were blotted against anti-phospho Ser³³⁸ of Raf-1 (lower panel) or used to measure Raf-1 activity by a MBP-coupled assay (upper graph). Values are plotted taking the value obtained after treatment with 100 ng/ml EGF for 5 min as 100 %. (C) PCT3 cells were treated as above and Ras activity was analyzed as described in Methods.

ERK is not involved in CsA-induced cell death

To test the involvement of ERK in CsA-induced toxicity, PCT3 cells were pre-treated with the MEK inhibitors PD98059 and U0126 for 30 min before CsA addition. PD98059 and U0126 selectively inhibited ERK activation, had no effect on PKB activation (Fig. 24A) and afforded little protection against CsA (Fig. 24B). This indicates that ERK was not involved in CsA toxicity.

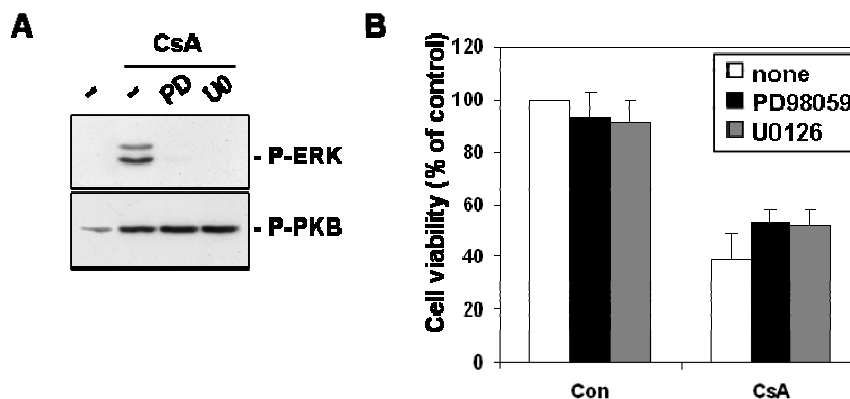


Figure 24. ERK inhibitors do not rescue from CsA-induced cell death. (A) PCT3 cells were pre-treated with 50 μ M PD98059 or 10 μ M U0126 for 30 min and then cells were stimulated with 25 μ g/ml CsA for 6 h. ERK and PKB activation were analysed by Western Blot using phospho-specific antibodies. (B) 50 μ M PD98059 or 10 μ M U0126 were added 30 min before treatment with 25 μ g/ml CsA for 24 h. Cell viability was then analyzed using Trypan Blue assay. The data are the means of three experiments performed on different days and are plotted taking the number of untreated cells (vehicle alone) as 100%.

PI3K inhibitors Apigenin and LY294002 but not Wortmannin block ERK activation in response to CsA

PI3K activation can have opposing effects on ERK pathway (Garcia et al., 2002; Sato et al., 2004). As shown above, in PCT3 cells treated with CsA, PKB is activated earlier than ERK. Then we decided to evaluate the potential involvement of PI3K/PKB pathway in the activation of ERK1/2 in response to CsA (Fig. 25A). EGF was used as positive control for ERK and PKB activation. The PI3K inhibitors Apigenin, LY294002 and Wortmannin blocked PKB activation in EGF or CsA stimulated cells. Interestingly, divergences were observed at the level of ERK. PI3K inhibitors have little effects on EGF-stimulated ERK activation. On the other side, Apigenin and LY294002 blocked ERK activation in CsA treated cells although Wortmannin did not. These results were also observed at the level of MEK. Differential effects of LY294002 and Wortmannin on ERK activation have been shown previously by others (Chiu *et al.*, 2005). The different behaviour is cell type dependent and its molecular basis is still unclear (Chiu *et al.*, 2005). To explore if these effects could be explained by changes in Raf-1, we analysed Ser²⁵⁹ and Ser³³⁸ phosphorylations on Raf-1 immunoprecipitates (Fig. 25A). After EGF or CsA stimulation, Ser²⁵⁹ is dephosphorylated as a previous stage for Raf-1 activation. Pre-treatment with PI3K inhibitors did not exert significant effects on Ser²⁵⁹ dephosphorylation. Apigenin and LY294002 but not Wortmannin partially blocked Ser³³⁸ phosphorylation induced by CsA. Then, changes in MEK/ERK phosphorylation state in response to either CsA or EGF correlated with that of Ser³³⁸ in Raf-1.

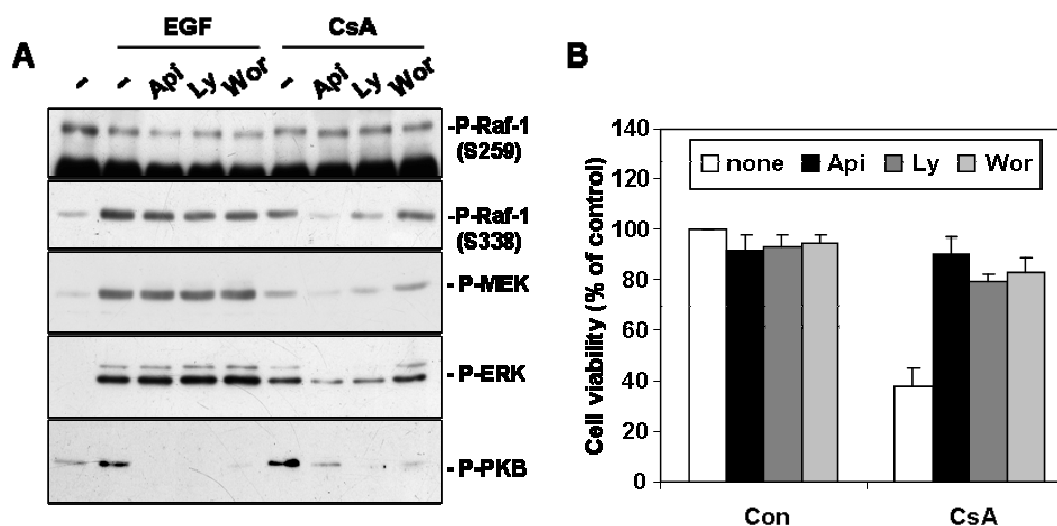


Figure 25. PI3K inhibitors rescue from CsA-induced cell death. (A) 40 μ M Apigenin (Api), 40 μ M LY294002 (Ly) or 100 nM Wortmannin (Wor) were added 30 min before treatment with 100 ng/ml EGF for 5 min or 25 μ g/ml CsA for 6 h. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-Raf-1 and Ser³³⁸ and Ser²⁵⁹ were analyzed using phospho-specific antibodies. ERK, MEK and PKB activation were also analysed by Western Blot using phospho-specific antibodies **(B)** PI3K inhibitors were added 30 min before treatment with 25 μ g/ml CsA or vehicle alone for 24 h. Cell viability was then analyzed using Trypan Blue assay. Data are the means of three

experiments performed on different days and are plotted taking the number of untreated cells (vehicle alone) as 100%.

siRNA against 110 α catalytic subunit of class IA PI3K does not prevent CsA-induced toxicity

It has been described that only Class I PI3Ks can produce PtdIns(3,4,5)P₃ and thus activate PKB *in vivo* (Wymann and Marone, 2005; Wymann *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2005). Pharmacological inhibitors of PI3K target all PI3K isoforms and at elevated concentrations could interfere with PI3K-related kinases (Wymann *et al.*, 2003). To elucidate if class IA PI3Ks were mediating CsA-induced cell death we decided to use a siRNA directed against the 110 α catalytic subunit of class IA PI3Ks. Both EGF and CsA-induced PKB phosphorylation was decreased by siRNA transfection (Fig. 26A). ERK activation in response to CsA was blocked by siRNA but its response to EGF was unaffected. In addition, PI3K 110 α knockdown did not protect against CsA-induced cytotoxicity (Fig. 26B).

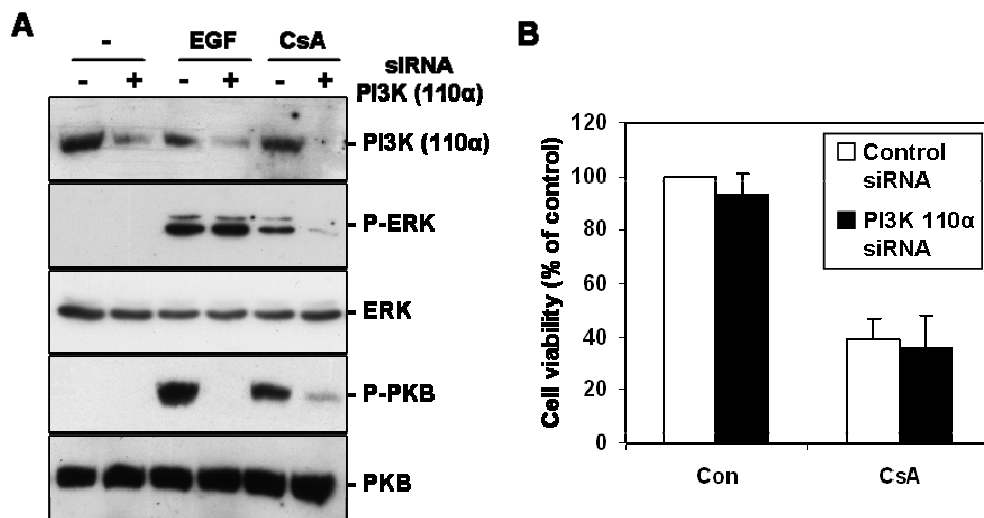


Figure 26. siRNA against 110 α catalytic subunit of class IA PI3K does not prevent CsA-induced toxicity. (A) PCT3 cells were transfected with a non-silencing siRNA (-) or the 110 α subunit of class IA PI3K directed siRNA (+) as indicated in Methods. Cells were then treated with 100 ng/ml EGF for 5 min or 25 μ g/ml CsA for 6 h and ERK and PKB activation and PI3K 110 α levels were analysed by Western Blot. (B) PCT3 cells transfected as above were treated with 25 μ g/ml CsA or vehicle alone for 24 h and cell viability was then analyzed using Trypan Blue assay. The data are the means of three different experiments and are plotted taking the number of untreated non-silencing siRNA transfected cells as 100%.

Class IA 110 β PI3K, class II PI3K-C2 α and PI3K-C2 β are also expressed in PCT3 cells and in mouse kidney

Among the different PI3Ks isoforms, class IA 110 α and 110 β PI3Ks and class II PI3K-C2 α and PI3K-C2 β are considered to be widely distributed in mammalian tissues (Wymann and Marone, 2005). The presence of class II PI3Ks has been reported in human kidney proximal tubules (El Sheikh *et al.*, 2003), in human kidney cell lines HK-2 (Domin *et al.*, 2005) and HEK-293 (Arcaro *et al.*, 2000), and in rat kidney proximal tubule cells (Crljen *et al.*, 2002). By means of RT-PCR techniques and using specific primers for each isoform we amplified products from PCT3 cells total RNA that corresponded to class IA 110 α and 110 β PI3Ks and class II PI3K-C2 α and PI3K-C2 β isoforms (Fig. 9). Identity of the amplified products was further confirmed by sequence analysis.

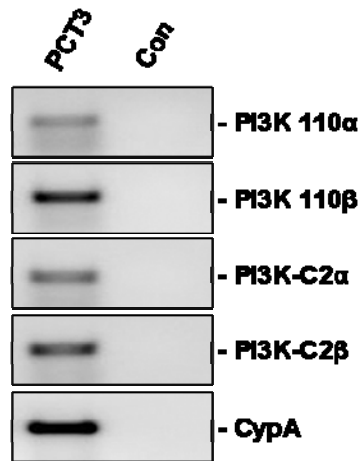


Figure 27. mRNA expression of PI3K isoforms in PCT3 cells. RT-PCR analyses using specific oligonucleotides for the PI3K isoforms demonstrate the presence of transcripts for Class IA 110 α PI3K (Pik3ca, gene ID: 18706), Class IA 110 β (Pik3cb, gene ID: 74769), PI3K-C2 α (Pik2ca, gene ID: 18704) and PI3K-C2 β (Pik2cb, gene ID: 240752) isoforms. When indicated, H₂O was used as control.

DISCUSSION

Our results show that CsA affected PCT3 cells viability in a dose-dependent manner. A decrease in cell proliferation was observed at low doses (5 µg/ml) while higher doses (10 to 50 µg/ml) induced cell death. It has been reported that such high doses are reached in kidneys of CsA treated patients (Galleti *et al.*, 2005), so we think that these treatments could be a good approximation to study CsA nephrotoxicity. Healy *et al.*, described that in the renal proximal tubular LLC-PK1 epithelial cell line high doses of CsA (21 µM or greater) induced necrosis (Healy *et al.*, 1998). The lack of chromatine condensation or increased p53 levels observed in our work would argue against apoptosis. The molecular mechanisms responsible for CsA cytotoxicity are poorly understood. It has been proposed that non-physiological ROS levels could be responsible for the cytotoxic side effects of CsA (Wang and Salahudeens, 1994; Wolf *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 2003; Burdmann *et al.*, 2003), although others do not support a direct link between CsA-mediated ROS generation and nephrotoxicity (Galleti *et al.*, 2005). To elucidate the mechanisms that mediate CsA cytotoxicity we have analyzed the effects of CsA on ROS levels and on ERK and PI3K pathways since both pathways have been related to cell survival and death processes and could be activated after ROS generation (Blanc *et al.*, 2003). The data obtained with the antioxidants PEG-catalase and Tiron show that ERK activation in response to CsA is mediated by ROS but PKB activation and cell death are ROS independent.

CsA-induced ERK activation was achieved through Raf-1 and MEK activation, but occurred without significant Ras activation. We can not rule out the possibility that other GTPases different from Ras could be implicated in Raf activation (Chong *et al.*, 2003). A potential dual role in promoting either cell survival or cell death has been proposed for ERK activation. The cell fate would depend on the type of stimulus and the intensity and length of the activation (Ishikawa and Kitamura, 1999; Wang *et al.*, 2000; Stefanelli *et al.*, 2002; Colucci-D'Amato *et al.*, 2003). Our results suggest that ERK pathway is not involved in CsA toxicity since pre-treatment with the MEK inhibitors PD98059 and U0126 afforded little rescue. Moreover CsA-triggered ERK activation was ROS-dependent and antioxidants did not prevent CsA-induced cell death.

EGFR is an upstream element common to the ERK and PI3K signaling pathways (Okano *et al.*, 2000). Our results indicate that EGFR activation is required for ERK and PI3K activation in response to EGF and CsA. In addition they show that EGFR triggers the cytotoxic effects of CsA since pre-treatment with the specific EGFR inhibitor AG1478 rescued from CsA-induced cell death.

PI3K pathway has been mostly reported as an antiapoptotic pathway and its inhibition may lead cells to apoptotic death. However, in recent years it has become

evident that activation of the PI3K pathway may also promote cell death. In this regard, inhibition of PI3K blocked cell death induced by cadmium (Liu *et al.*, 2007), arsenite (Shack *et al.*, 2003), hypoxia (Aki *et al.*, 2001), glucose deprivation (Aki *et al.*, 2003) and serum withdrawal (Lee *et al.*, 2005). Our results fit well with this context since Wortmannin, LY294002 and Apigenin induced an almost total rescue from CsA-induced cell death. As in the case of the EGFR inhibitor, pro-survival effects of PI3K inhibitors were not mediated by a decrease in ROS levels (data not shown). The implication of distinct PI3K isoforms in specific biological responses is a matter of increasing interest in the recent years. Among PI3Ks, only class I PI3Ks have been shown to activate PKB *in vivo*. PI3K inhibitors target the ATP-binding site of all PI3K isoforms (except the inhibitors refractory PI3K-C2 α) and do not allow to discern between the effects of individual PI3K isoforms (Wymann *et al.*, 2003). The use of a more specific approach based on siRNA targeting the 110 α catalytic subunit of class IA PI3K showed that knocking down this isoform did not prevent CsA induced cell death although ERK and PKB phosphorylation were markedly decreased. These results indicate that class IA 110 α PI3K isoform is not involved in the pro-death effects of CsA. Then, CsA should also activate other PI3Ks which would mediate CsA cytotoxic effects. The presence of other inhibitor-sensitive PI3K isoforms in PCT3 cells gives support to this idea.

In summary, our results suggest that in PCT3 cells CsA would activate, through EGFR, two different sets of PI3K isoforms (Fig. 10). The first one includes the class IA 110 α PI3K isoform, which would promote PKB phosphorylation, would be implicated in ROS dependent ERK activation, but would not be involved in cell death. Another set of PI3K isoforms sensitive to Apigenin, LY294002 and Wortmannin would trigger the CsA-induced cell death in an ERK and ROS independent way.

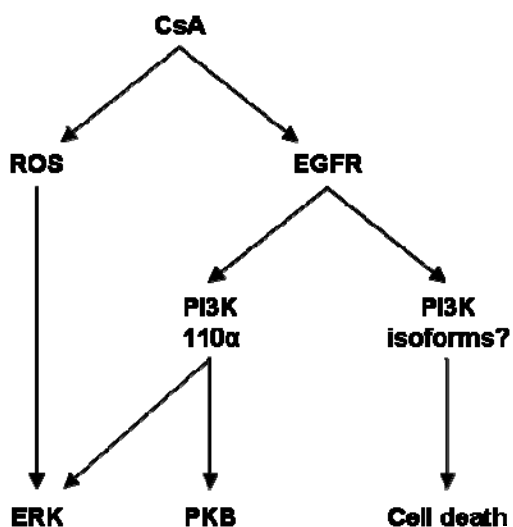


Figure 28. Potential role for EGFR and PI3K on CsA-induced cell death. CsA activates ERK and PI3K pathways. Activation of ERK by CsA is ROS/EGFR/110 α PI3K isoform dependent. CsA-induced PKB phosphorylation is also EGFR/110 α PI3K isoform dependent but does not require ROS production. CsA cytotoxic effects requires EGFR but would be mediated through other PI3K(s) different from 110 α isoform and do not involve ROS generation or ERK activation.

CAPÍTOL II

**L'ACTIVACIÓ DE LES VIES ERK I PKB I LA
TOXICITAT INDUÏDES PER CsA SON EL
RESULTAT D'UN BUCLE AUTOCRÍ/PARACRÍ
IMPLICANT UN FACTOR D'UNIÓ A HEPARINA**

INTRODUCTION

The fungal metabolite cyclosporine A (CsA) has been widely used in the prevention of graft rejection. The beneficial effects of CsA are restricted by its toxic side effects, the most important being renal toxicity (Olyaei *et al.*, 2001). CsA exerts its nephrotoxic effects through (i) acute changes in renal hemodynamics (Olyaei *et al.*, 2001, de Mattos *et al.*, 2000) followed by irreversible interstitial fibrosis (Kopp *et al.*, 1990, Shihab *et al.*, 1996), and (ii) cytotoxicity in proximal tubule cells (Anderson *et al.*, 1994, Myers *et al.*, 1984). Recently we reported that cytotoxic effects of CsA in mouse proximal convoluted tubule-derived cells (PCT3) were mediated by EGFR (Sarró *et al.*, 2008).

EGFR controls a wide variety of biological processes such as proliferation, differentiation, migration and the modulation of apoptosis (Fischer *et al.*, 2003). EGFR ligands are synthesized as transmembrane precursors that are then proteolytically cleaved by metalloproteinases, thus releasing mature soluble ligands. After ligand binding, EGFR receptors undergo autophosphorylation and dimerization to form catalytically active homo- or heterodimers (McCole *et al.*, 2007). In addition to its cognate ligands, the EGFR is transactivated by stimuli that do not directly interact with the EGFR ectodomain including GPCR (G-protein coupled receptors) ligands, other RTK agonists, cytokines, chemokines and cell adhesion elements. Furthermore EGFR can also be activated by unphysiological stimuli such as oxidative stress, hyperosmolarity, UV light and γ -irradiation (Gschwind *et al.*, 2001). Aberrant receptor signaling due to overexpression, mutation or autocrine signaling loops has been frequently implicated in diseases such as cancer and increasing evidence implicates EGFR transactivation in diverse pathophysiological disorders (Fischer *et al.*, 2003). EGFR is present in the proximal tubules but not in the thick ascending limb or distal convoluted tubules of the kidney (Arany *et al.*, 2004). In proximal tubules of the kidney EGFR is activated by Cisplatin, by severe oxidative stress and during ischemia/reperfusion injury, in all cases resulting in cell death (Arany *et al.*, 2004, Arany *et al.*, 2005). It has also been described that functional inactivation of the EGFR in renal proximal tubular cells reduces tubular-interstitial lesions after renal injury (Terzi *et al.*, 2000).

Autocrine and paracrine factors can be released by kidney epithelial cells in response to physiological and pathological signals (Toback *et al.*, 1990). Injury to renal tubular epithelial cells results in enhanced release and/or synthesis of growing factors (GFs), which, in turn, could promote recovery (Anderson *et al.*, 1998). Several GFs, including epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblastic growth factor (FGF), insulin-like growth factor I (IGF-I), endothelin (ET), and

transforming growth factor- β (TGF- β), are normally synthesized in the kidney (Anderson *et al.*, 1998). In addition, during primary tubular injury, tubular epithelial cells directly become a major site of chemokine production. This in turn supports leukocyte infiltration and activation (Anders *et al.*, 2003). It has also been speculated that an enhanced endothelin production by autocrine mechanisms might be involved in mediating cyclosporine-associated tubular structural damage (Haug *et al.*, 1998). Increasing concentrations of CsA progressively augmented proximal tubular cells secretion of the fibrogenic cytokines transforming growth factor- β 1 and platelet-derived growth factor (Johnson *et al.*, 1999a). Proximal tubular cells modulate the biological behavior of neighboring cortical fibroblasts in the human kidney through paracrine mechanisms, which include the production and release of PDGF-AB and TGF-beta1. Renal insults that result in proximal tubule injury may perturb this paracrine interaction, thereby culminating in excessive fibroblast proliferation and interstitial fibrosis (Johnson *et al.*, 1999b).

Chemical modifications of the CsA molecule aiming at eliminating its toxicity while preserving immunosuppressive effects have failed, suggesting that both actions occur through common mechanisms (Sigal *et al.*, 1991). CsA exerts its immunosuppressive effects through binding to Cyclophilins. Cyclophilin-CsA complex, but not CsA or cyclophilin alone, can associate and inhibit the protein phosphatase Calcineurin and thus inhibit lymphocyte activation (Liu *et al.*, 1991). Cyclophilins are ubiquitous, highly conserved proteins possessing peptidyl-proline-cis-trans isomerase (PPIase) activity that have been suggested to participate in protein folding and as chaperone for protein trafficking and cell assembly (Price *et al.*, 1994). Cyclophilin B (CypB) was the second member of the cyclophilin family described and resides both in the ER and in complexes on the cell surface (Price *et al.*, 1994), and shows the highest expression levels in the kidney (Kainer *et al.*, 2000). Apart from the described intracellular activities of cyclophilins, accumulating evidence suggests a role for these proteins as mediators of intercellular communication (Bukrinsky, 2002). Both CypA and CypB are believed to be involved in inflammatory reactions, e.g., in rheumatoid arthritis (Billich *et al.*, 1997) or sepsis (Tegeder *et al.*, 1997). CypB was shown to induce chemotaxis and integrin-mediated adhesion of T cells to the extracellular matrix (Allain *et al.*, 2002) and to enhance platelet adhesion to collagen (Allain *et al.*, 1999). However, involvement of cyclophilins in the nephrotoxic effects of CsA has not been assessed and the question as to which cyclophilin is relevant in nephrotoxicity remains open.

In this report we show that EGFR-mediated ERK and PKB activation and cell death in response to CsA are triggered by an autocrine loop involving secretion of a heparin binding factor(s).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cyclosporine A (CsA), GM6001 and AG1478 were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). SB431542 was from Tocris (Bristol, UK). Anti-phospho ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-phospho PKB/Akt (Ser⁴⁷³) and anti-phospho EGFR (Tyr¹¹⁴⁸) were from Cell Signalling (Danvers, MA, USA). Anti-CypB was from Affinity Bioreagents (Golden, CO, USA). Anti-CypA was from Upstate (Lake Placid, NY, USA) and anti-CD147 was from Ancell (Bayport, MN, USA). Mouse recombinant CypB (mr-CypB) was a generous gift of Dra.Meseguer. All other reagents were from Sigma (Saint Louis, MO, USA).

Cell culture and treatments

Immortalized cells from the convoluted portion of mouse kidney proximal tubule PKSV-PCT cells (PCT3 clone) were cultured in a medium A (DMEM:Ham's F12 (1:1, v/v), 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 12.5 mM D-glucose, 60 nM sodium selenite, 5 µg/ml transferrin, 50 nM dexamethasone, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) supplemented with 2% foetal bovine serum (FBS), 5 µg/ml insulin, 10 ng/ml epidermal growth factor and 1 nM triiodothyronine, at 37°C in a 95:5 air:CO₂ water saturated atmosphere. For all experiments, cells were seeded at 0.2 x 10⁶ cells/ml and after 24 h with complete medium cells were starved for 16 h in medium A supplemented with 0.1% FBS but not insulin, epidermal growth factor or triiodothyronine. CsA and BFA were dissolved in ethanol and AG1478, SB431542 and GM6001 were in DMSO. In all cases controls were carried out with cells treated with the corresponding vehicle alone. After treatments, cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and harvested with lysis buffer.

Preparation of conditioned medium and CypB depletion

PCT3 cells were treated for 6 h with 25 µg/ml CsA for CsA-conditioned medium (CsA-CM) or with vehicle alone for Control-conditioned medium (Ctl-CM). Medium was then collected and centrifuged 5 min to remove cell debris. For CypB immunodepletion, CsA-CM was incubated with 50 µg/ml anti-CypB or an equal amount of rabbit antiserum bound to protein A-Sepharose for 16 h at 4° C. For depletion with Heparin-agarose, CsA-CM was incubated for 1 h at 4° C. For cell treatments with Ctl-CM or CsA-CM, supernatant of starved PCT3 cells was aspirated and Ctl-CM or CsA-CM was immediately added to cells.

Cell toxicity

CsA cytotoxicity was measured by a lactate dehydrogenase (LDH) assay based upon the ability of LDH to oxidize $\text{NADH} + \text{H}^+$ to NAD^+ . The normal plasma membrane is impermeable to LDH, but damage to the cell membrane results in a change in the membrane permeability and subsequent release of LDH into the extracellular media. Briefly, PCT3 cells were seeded as indicated above. After treatments, aliquots of the supernatant were taken and incubated with pyruvate and NADH for 10 min and diminution of optical absorbance was measured at 340nm.

Western-blot

The protein content of cellular extracts was quantified by the Bradford assay. Total cell extract protein was run on SDS-PAGE gels, transferred onto PVDF membranes and incubated with the corresponding antibodies. The membranes were developed with the enhanced chemiluminescence method (Pierce, Rockford, IL, USA).

RESULTS

CsA-conditioned medium induce ERK and PKB activation

We have previously shown that in PCT3 cells, CsA treatment induced time-dependent ERK and PKB activation and cell death (Sarró *et al.*, 2008). ERK and PKB pathways were not involved in CsA toxicity, but their activation and the cytotoxic effects in response to CsA were mediated by EGFR (Sarró *et al.*, 2008). Ligand binding to the extracellular domain of EGFR leads to receptor activation. Since CsA is not a direct ligand for EGFR, we wondered whether CsA treatment induces the release to the extracellular media of an as yet unidentified factor that would activate EGFR. To test this hypothesis, the ability of conditioned medium from CsA treated cells to trigger ERK and PKB activation and cell death was assayed.

Different CsA-conditioned medium were prepared by exposing PCT3 cells to 25 µg/ml CsA for increasing periods of time (0.5 to 12 h). Control-conditioned medium (Ctl-CM) was prepared by exposing cells to vehicle alone for 6 h. Medium of cells were then collected, centrifuged 5 min to remove cell debris and immediately added to naive starved PCT3 cells for 15 min as indicated in Methods. As shown in Figure 29A, CsA-conditioned medium from cells treated with CsA for at least 3 h were able to induce ERK activation when added to starved PCT3 cells. Interestingly, shorter exposure to CsA was enough to produce CsA-conditioned medium able to activate PKB. Addition of Ctl-CM did not induce ERK or PKB activation. CsA-conditioned medium obtained from PCT3 cells treated with CsA for 6h was then set as a standard working condition and hereafter termed CsA-CM.

ERK and PKB activation in response to CsA-CM was rapid and detectable within 5 min of treatment (Fig. 29B). This is in contrast to direct CsA-induced PKB and ERK activation that was previously observed to require from 30 min for PKB and 1 to 3 h for ERK (Sarró *et al.*, 2008). These results suggest that prolonged exposure to CsA induce PCT3 cells to secrete a soluble factor(s) that is able to trigger a rapid response when added to naive PCT3 cells. This response could not be attributable to the presence of CsA *per se* since treatment of PCT3 cells for 15 min with CsA alone did not induce any effect on ERK and PKB pathways (Fig 29A and 29B).

ERK and PKB activation in response to CsA-CM are mediated by EGFR

To determine whether CsA-CM-induced ERK and PKB activation were dependent of EGFR kinase activity, PCT3 cells were pretreated with the EGFR inhibitor AG1478 before addition of CsA-CM. EGFR activation was monitored by measuring the levels of Tyr¹¹⁴⁸, one of the major autophosphorylation sites that result from receptor activation.

As shown in Figure 29C, AG1478 blocked ERK, PKB and EGFR activation induced by CsA-CM.

CsA-CM triggers cell death

To explore if CsA-CM also induced cytotoxicity, Ctl-CM or CsA-CM were added to PCT3 cells and after 24 h of treatment LDH activity in the supernatants was measured as indicated in Methods. As observed in Figure 29D, LDH activity was higher in CsA-CM treated cells when compared to those treated with Ctl-CM. In addition, CsA-CM-induced cytotoxicity was significantly reduced by AG1478 pretreatment. Taken together these results suggest that EGFR-mediated CsA-induced cytotoxicity in PCT3 cells may also be attributable to factor(s) secreted into the medium.

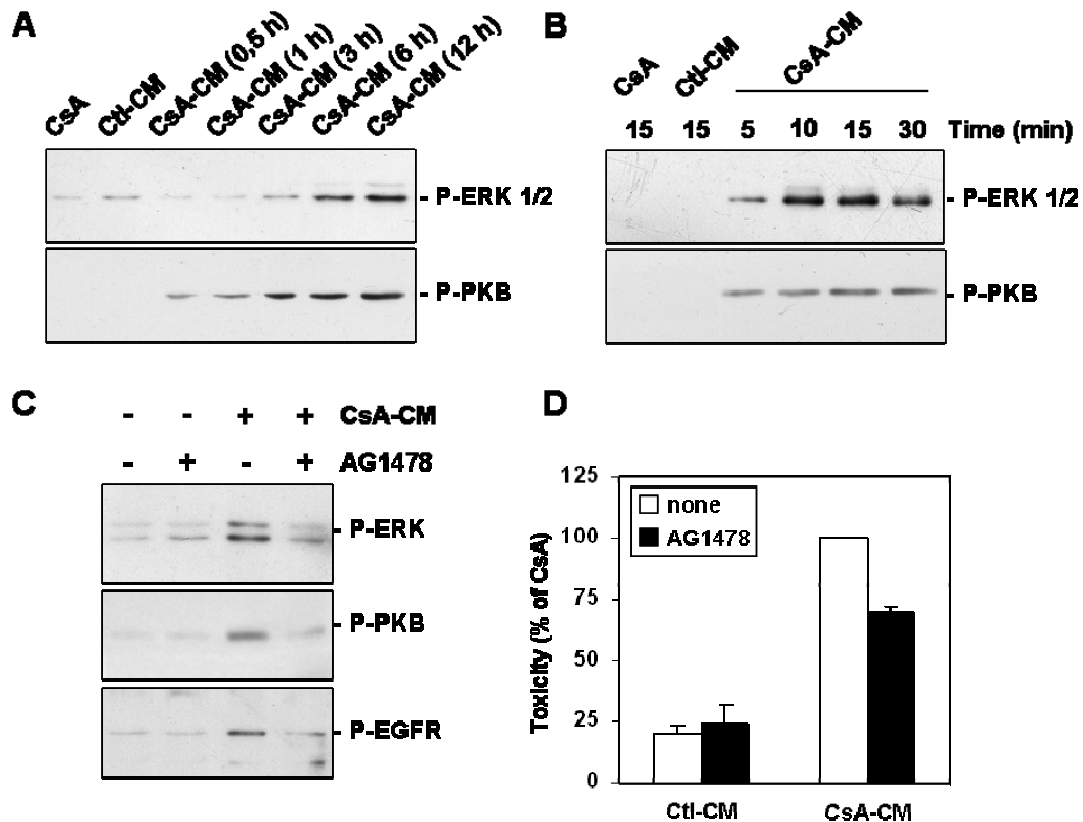
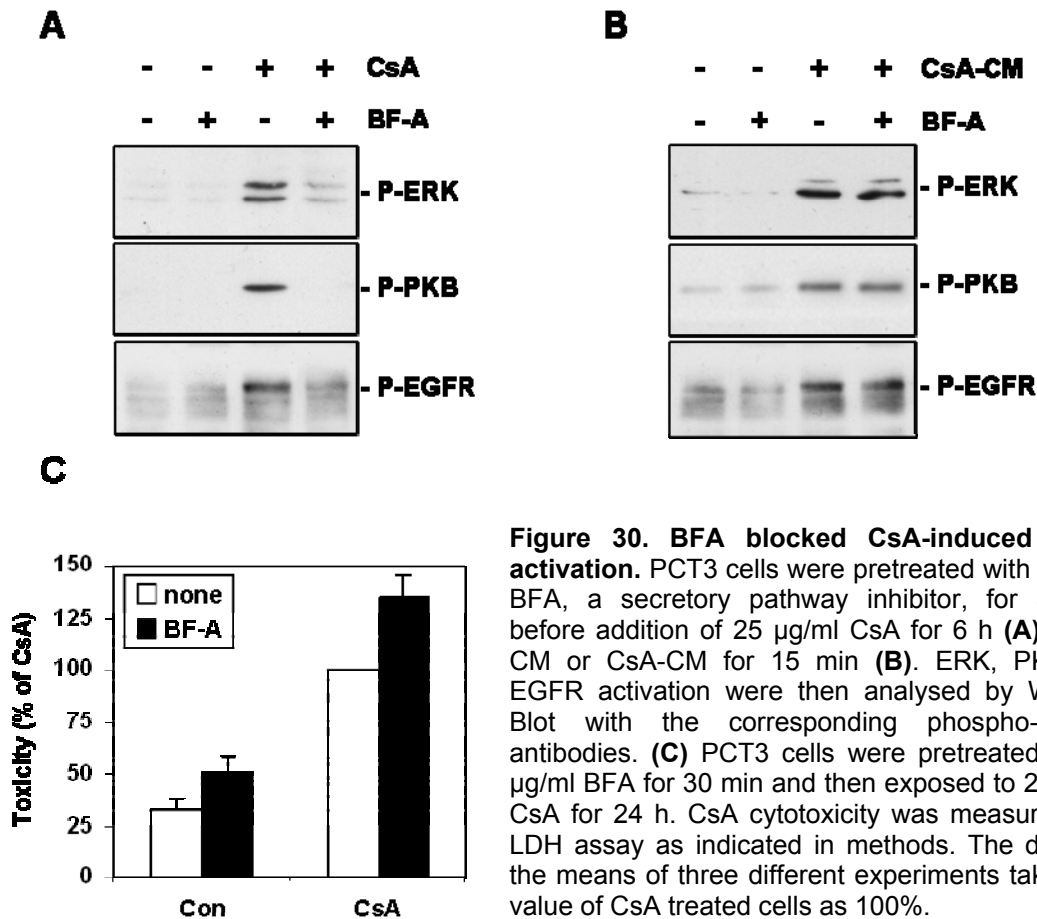


Figure 29. CsA-conditioned medium induce ERK and PKB activation and cell death. (A) PCT3 cells were treated with 25 µg/ml for 0.5, 1, 3, 6 and 12 h. Medium of the different treated cells was collected and immediately added to naive PCT3 cells for 15 min. As a controls, 25 µg/ml CsA or medium from untreated cells were added for 15 min. ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies. **(B)** PCT3 cells were treated with 25 µg/ml CsA, control-conditioned medium (Ctl-CM), or CsA-conditioned medium (CsA-CM) for the indicated times. ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies. **(C)** PCT3 cells were pretreated with 10 µM of the EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 for 30 min before addition of Ctl-CM or CsA-CM for 15 min. EGFR, ERK and PKB activation were analyzed as above. **(D)** PCT3 cells were pretreated with 10 µM AG1478 for 30 min before addition of Ctl-CM or CsA-CM for 24 h. Then LDH activity in the supernatants was assayed as indicated in methods. The data are the means of three different experiments taking the value of CsA-CM treated cells as 100%.

Brefeldin A blocks EGFR-mediated ERK and PKB activation in response to CsA

To further investigate whether CsA-triggered effects were due to factor secretion into the medium, Brefeldin A was used. Brefeldin A (BFA) is a fungal metabolite that disrupts the structure and function of the Golgi apparatus and reversibly inhibits the intracellular translocation of proteins in eukaryotes, e.g., during transport of proteins to the cell surface for secretion, while has no effect on the endocytic pathway (Misumi *et al.*, 1986). Pretreatment with BFA blocked EGFR-mediated ERK and PKB activation in response to CsA (Fig. 30A). However, when cells were treated with CsA-CM, BFA was unable to inhibit ERK or PKB activation (Fig. 30B). These results suggest that protein secretion is an early step required to trigger CsA-induced ERK and PKB activation. To explore if the secretory pathway was also involved in CsA cytotoxic effects, PCT3 cells were pretreated with BFA and exposed to CsA for 24 h. Our results show that treatment with BFA was unable to prevent CsA-induced cytotoxicity but increased it (Fig. 30C). In fact, treatment with BFA alone induced cell death. It is well established that prolonged exposure to BFA is a potent endoplasmic reticulum (ER) stress inducer (Klausner *et al.*, 1992). Thus, the increase in cell toxicity observed could be the result of an accumulative toxic effect of both BFA and CsA.



CsA-induced EGFR activation is dependent of MMPs

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases responsible for matrix degradation and remodeling that cleave protein components of extracellular matrix (ECM) such as collagens, laminin, fibronectin, or proteoglycans. MMPs also cleave a variety of non-ECM proteins, including cytokines, chemokines, and growth factors, activating or inactivating them, or generating other products that have biological consequences (Hrabec *et al.*, 2007). In this sense, it has been described that MMPs mediate EGFR transactivation by cleaving EGFR ligands from its transmembrane precursors (Fischer *et al.*, 2003). Thus, we wondered whether CsA-induced effects could be the result of MMPs-mediated EGFR transactivation. Pretreatment of PCT3 cells with GM6001, a broad spectrum MMPs inhibitor, blocked ERK and PKB activation in response to CsA (Fig. 31A). Moreover, MMPs inhibition rescued from CsA-induced cell death (Fig. 31B). However, when PCT3 cells were treated with CsA-CM, MMPs inhibition did not block ERK activation or cell death and only PKB activation was blocked by GM6001 (Fig. 31C and 31D). These results suggest that MMPs may act at different stages on processes initiated by CsA treatment.

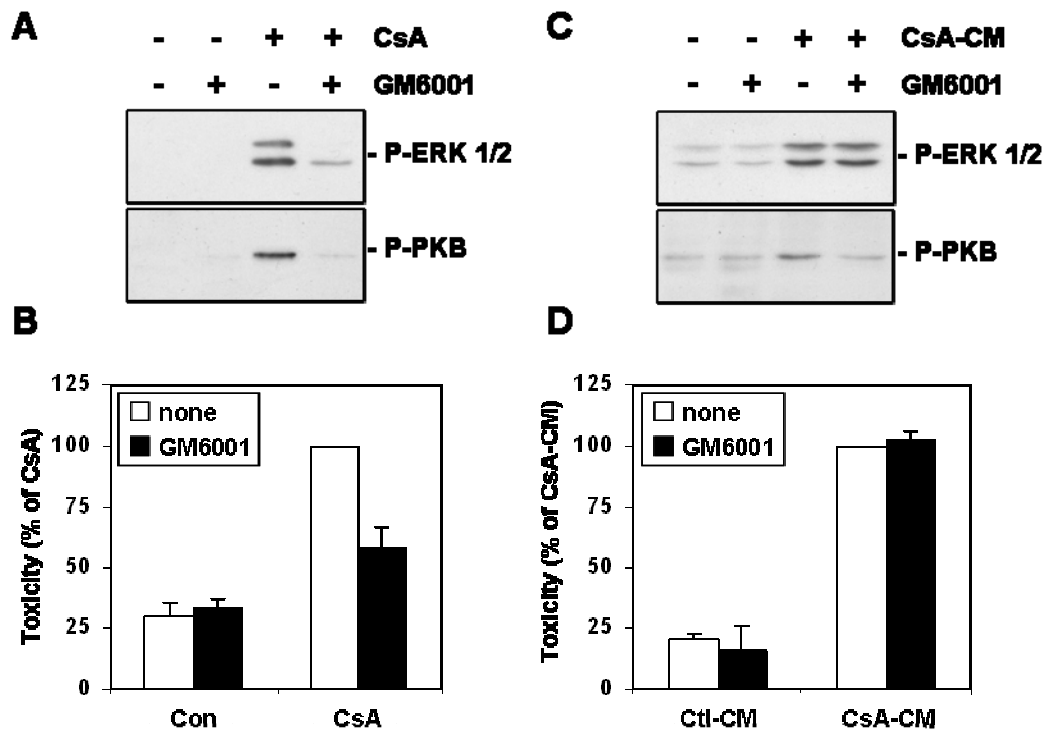


Figure 31. MMP are involved in CsA-induced ERK and PKB activation. PCT3 cells were pretreated for 30 min with 50 μ M of the MMPs inhibitor GM6001 before addition of 25 μ g/ml CsA for 6 h (A) or NM or CM for 15 min (C). ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies. PCT3 cells were pretreated with 50 μ M GM6001 30 min before addition of 25 μ g/ml CsA (B) or Ctl-CM or CsA-CM (D) for 24 h. Cell cytotoxicity was measured with LDH assay as indicated in methods. The data are the means of three different experiments taking the value of CsA (B) or CsA-CM (D) treated cells as 100%.

TGF beta is not involved in CsA-induced effects

It has been described that CsA induce the expression of transforming growth factor beta (TGF- β) both *in vitro* and *in vivo* (Khanna *et al.*, 1999). Wolf *et al.* (1995), treated proximal tubular cells with different concentrations of CsA and observed that TGF- β protein and mRNA were induced in a dose-dependent manner. Moreover, TGF- β has been described to transactivate EGFR (Uchiyama-Tanaka *et al.*, 2002). To explore the possible involvement of TGF- β , PCT3 cells were pretreated with SB431542, a selective inhibitor of TGF- β type I receptor. SB431542 did not prevent ERK nor PKB activation in response to CsA (Fig. 32A) and did not rescue from CsA-induced cell death (Fig. 32B).

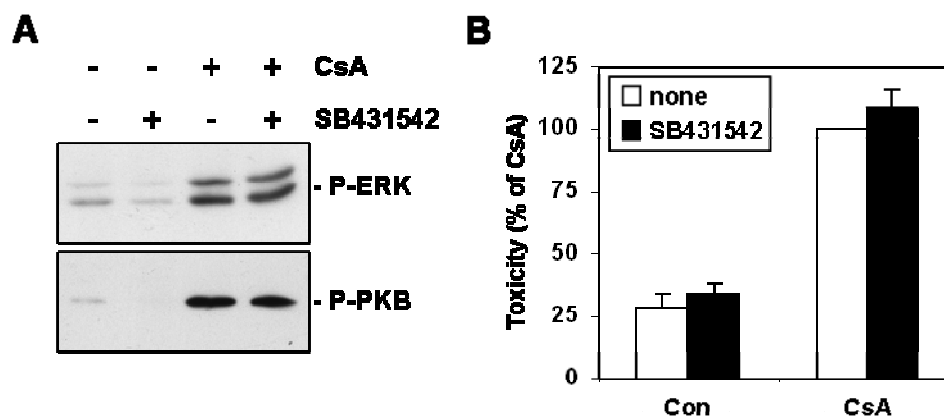


Figure 32. TGF- β is not involved in CsA-induced effects in PCT3 cells (A) PCT3 cells were pretreated for 30 min with 10 μ M SB431542, a selective inhibitor of TGF beta type I receptor, before addition of 25 μ g/ml CsA. ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies. **(B)** PCT3 cells were pretreated with 10 μ M SB431542 30 min before addition of 25 μ g/ml CsA or vehicle alone for 24 h. CsA cytotoxicity was measured with LDH assay as indicated in methods. The data are the means of three different experiments taking the value of CsA treated cells as 100%.

CypB is secreted in PCT3 cells in response to CsA

It has been previously described that CsA induced CypB secretion on HeLa cells (Price *et al.*, 1994). Our results in PCT3 cells agree with this since CsA treatment resulted in intracellular decrease of CypB and accumulation of CypB in the extracellular media in a time dependent manner (Fig. 33A). Interestingly, intracellular levels of CypA remained unaffected in response to CsA and it was not detected in the extracellular medium (data not shown). Since it has been described that CypB could be secreted in response to oxidative stress (Liao *et al.*, 2000) and we have previously observed that CsA increased ROS levels in PCT3 cells (Sarró *et al.*, 2008), we wondered whether CsA-induced CypB secretion observed in PCT3 cells was due to ROS generation. For this purpose, we pretreated cells with antioxidants PEG-catalase and Tiron at doses that we had previously seen that prevented ROS generation in response to CsA (Sarró

et al., 2008). As shown in Figure 33B, neither PEG-catalase nor Tiron, nor both together, blocked CypB secretion. As expected, CsA-induced CypB secretion was blocked by pretreatment with BFA (Fig. 33C). De Ceuninck *et al.* (2003), have described the release of CypB from chondrocytes by activated MMPs. CypB was constitutively secreted from chondrocytes and bound to the cell surface of chondrocytes by means of its interaction with heparan sulphate proteoglycans susceptible to internal cleavage by MMPs. To explore if MMPs were involved in CypB release, PCT3 cells were treated with GM6001 before CsA treatment. Figure 33D shows that MMPs inhibition does not prevent CypB release to the extracellular media.

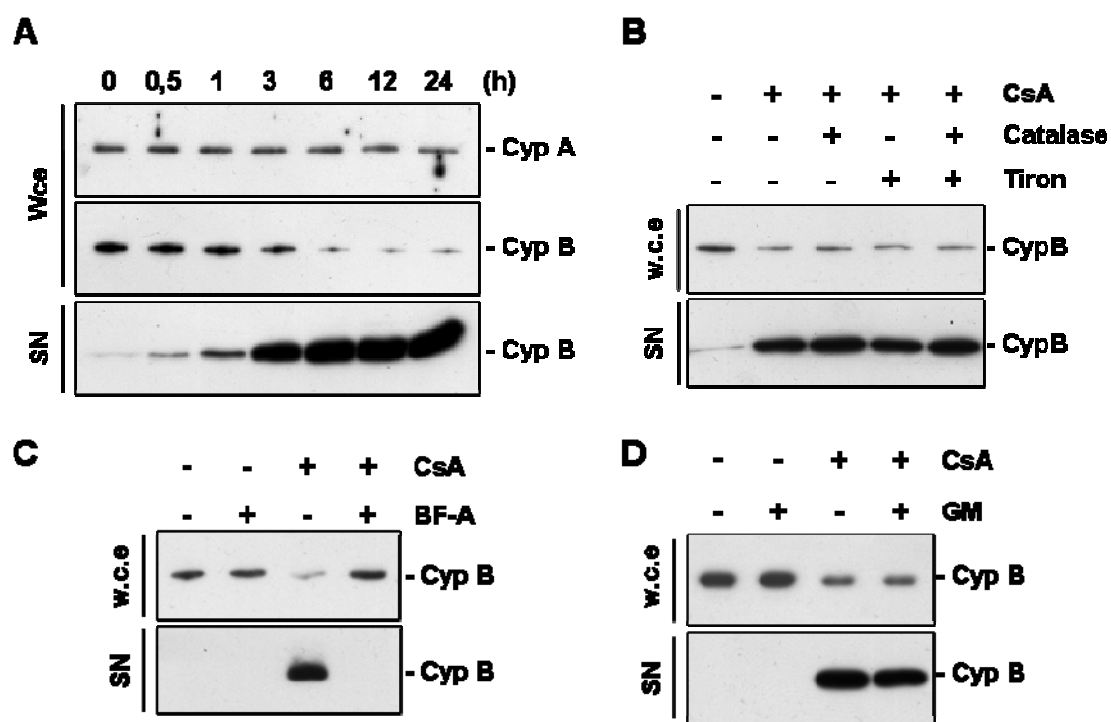


Figure 33. CsA induces CypB secretion. (A) PCT3 cells were treated with 25 µg/ml CsA for the indicated times and CypA and CypB levels in the whole cell lysate (w.c.e) or in the supernatants (SN) of treated cells were determined by Western Blot with the corresponding antibodies. (B) PCT3 cells pretreated with 15 000 U/ml PEG-Catalase for 12 h and/or 10 mM Tiron for 30 min were treated with 25 µg/ml CsA for 6 h. CypB levels in the whole cell lysate (w.c.e) or in the supernatants (SN) of treated cells were determined by Western Blot. PCT3 cells were pretreated with 1 µg/ml BFA (C) or 50 µM GM6001 (D) 30 min before addition of 25 µg/ml CsA for 6 h. CypB levels in the whole cell lysate (w.c.e) or in the supernatants (SN) of treated cells were determined by Western Blot.

CypB is involved in CsA-induced ERK and PKB activation

We next wondered whether extracellular CypB was mediating CsA effects. To determine if secreted CypB was contributing to ERK and PKB activation induced by CsA, CypB in CsA-CM was depleted with either anti-CypB antibody or with heparin-agarose, due to the ability of CypB to bind heparin. Immunodepletion of CypB from CsA-conditioned medium resulted in decreased levels of CypB, whereas rabbit IgG caused no significant depletion (Fig. 34A, upper panel). CypB was decreased to a higher extent when incubated with heparin-agarose. Depletion of CypB from the CsA-CM significantly reduced CsA-CM-induced ERK and PKB activation (Fig. 34A, lower panel).

To further explore if CypB was involved in CsA-induced ERK and PKB activation in PCT3 cells, mouse recombinant CypB (mr-CypB) was used. ERK activation in response to CypB has been previously observed in T lymphocytes treated for 15 min with 1 µg/ml CypB (Pakula *et al.*, 2007). In PCT3 cells, treatment with 1 µg/ml mr-CypB for 15 min did not afford ERK and PKB activation (Fig. 34B), and only when stimulating with doses up to 10 µg/ml or higher resulted in a light ERK and PKB activation. Moreover, mr-CypB did not affect cell viability at any of the doses tested (data not shown).

CD-147, also known as the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) due to its ability to induce the expression of several MMPs, has been described to be a functional receptor for CypB (Yurchenko *et al.*, 2001). The authors described that CD-147 was required to induce chemotaxis and ERK activation by CypB. Thus, we wondered whether this molecule could function as a receptor for secreted CypB. Pretreatment with anti-CD-147 neutralizing antibodies has no effect on ERK and PKB activation induced by CsA-CM (Fig. 34C) or CsA (Fig 34D).

Taken together these results suggest that, although CypB might be involved in ERK and PKB activation, it did not act alone. CypB is probably secreted bound to CsA, but cyclophilins can act as chaperones independently of its PPIase activity (Barik, 2006). Thus CsA observed effects could be due to a co-secreted CypB partner.

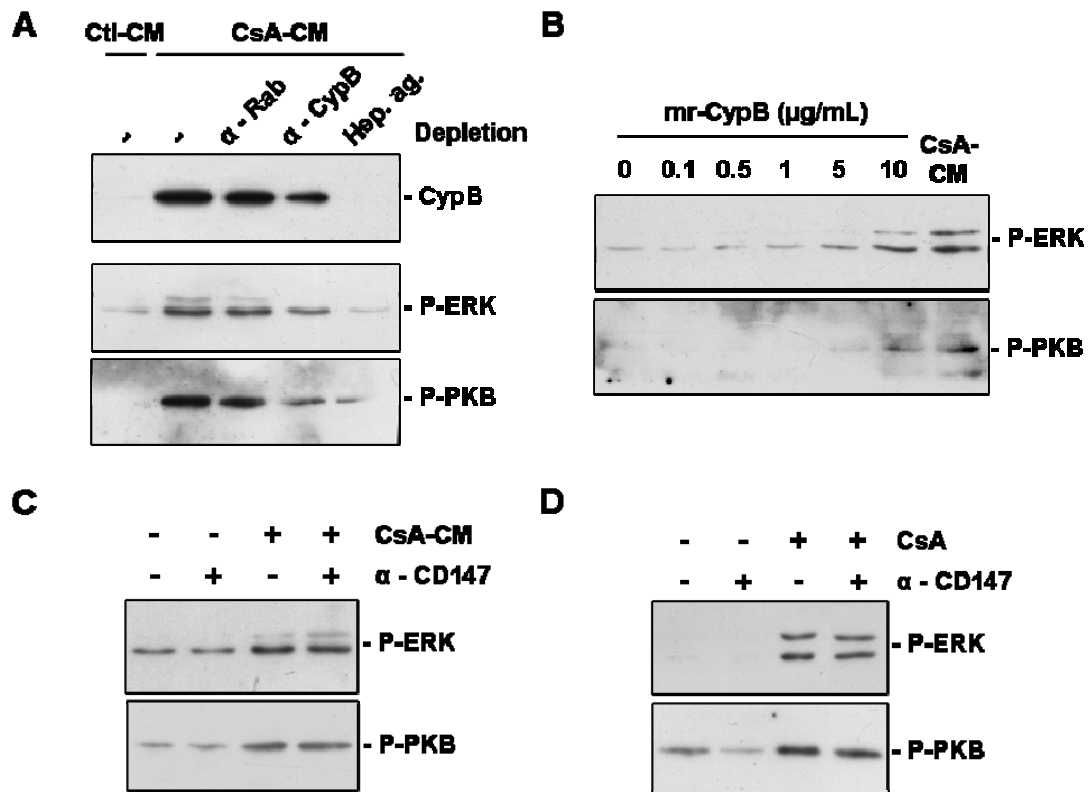


Figure 34. CypB in CsA-CM is involved in ERK and PKB activation. (A) To deplete CypB from the CsA-CM, CsA-CM were incubated with 50 µg/ml of a rabbit secondary antibody (α-Rab) or 50 µg/ml CypB antibody (α-CypB) bound to protein-Sepharose, or incubated with heparin-agarose (Hep. Ag) as indicated in Methods. CypB levels in the depleted CsA-CM were then analyzed by Western Blot (upper panel). PCT3 cells were treated for 15 min with CsA-CM depleted of CypB as indicated above and ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies (lower panels). (B) PCT3 cells were treated for 15 min with the indicated doses of mr-CypB or with CsA-CM. ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies. PCT3 cells were pretreated with 20 µg/ml of CD147 neutralizing antibody 5 min before addition of CsA-CM for 15 min (C) or 25 µg/ml CsA for 6 h (D). ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies.

Cell surface HSPG are involved in CsA-induced responses

Glycosaminoglycans of the heparan sulphate family (HSPG) have been suggested to play a role in effective presentation of ligands to their cognate signaling receptor or, alternatively, may function as coreceptors (Pakula *et al.*, 2007). Moreover, HSPG have been described to be necessary for CypB enhanced integrin-mediated adhesion of T cells to the extracellular matrix (Carpentier *et al.*, 1999). To explore the involvement of HSPG, cells were pretreated with soluble heparin or Heparinase-I. Soluble heparin has been described to competitively prevent binding to HSPGs (Jones *et al.*, 2005). Heparinase-I treatment removes cell surface and matrix HSPGs (Lohse *et al.*, 1992). As shown in figures 35A and 35B, both treatments reduced ERK and PKB activation in response to CsA in a dose dependent manner.

To investigate the effects of HSPG-binding proteins on cytotoxicity, CsA-CM was incubated with heparin-agarose as indicated in Methods, and then transferred to PCT3 cells. As observed in figure 35C, depletion of heparin-binding proteins from CsA-CM significantly attenuated CsA-CM-induced toxicity. In addition, Heparinase-I treatment reduced cytotoxicity in response to CsA (Fig. 35D).

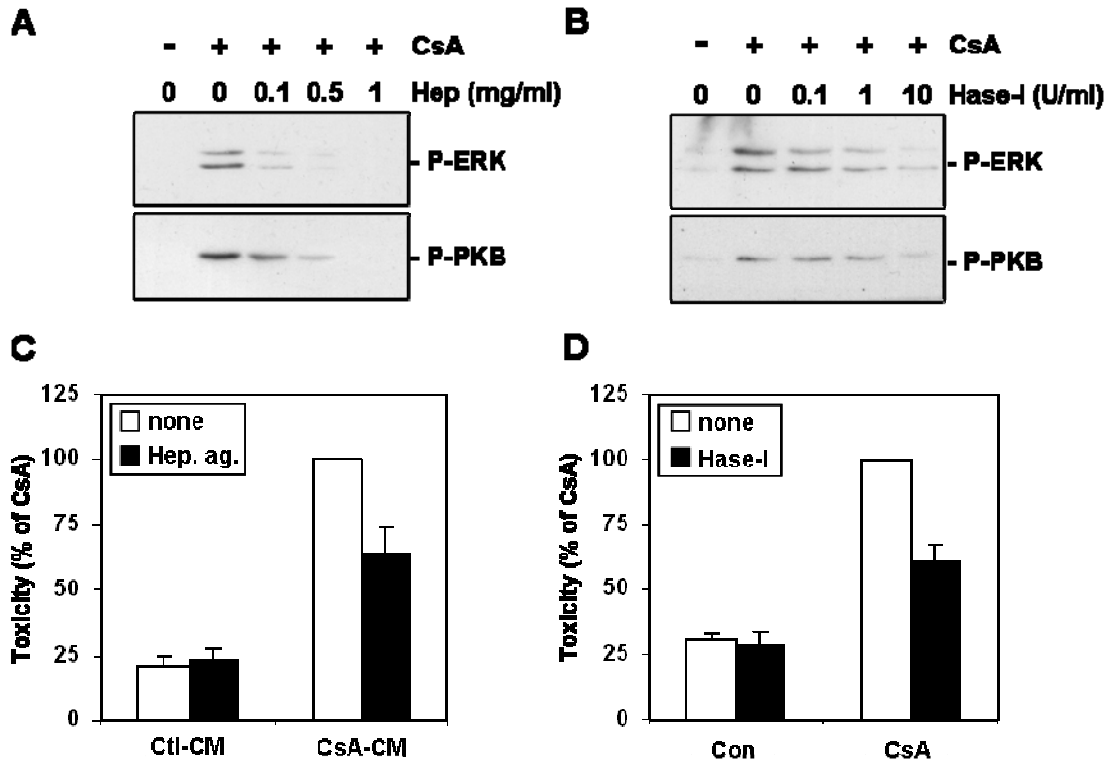


Figure 35. HSPGs are necessary for CsA-induced ERK and PKB activation and cell death. PCT3 cells were pretreated for 5 min with increasing doses of Heparin (**A**) or for 1h with increasing doses of Heparinase-I (**B**) before addition of 25 μ g/ml CsA for 6 h. ERK and PKB activation were then analyzed by Western Blot with the corresponding phospho-specific antibodies. (**C**) PCT3 cells were treated with Ctl-CM or CsA-CM for 24 h and cell cytotoxicity was measured with LDH assay as indicated in methods. When indicated, conditioned media were previously incubated for 1 h with heparin-agarose (Hep. Ag). Data are the means of three different experiments taking the value of CsA-CM treated cells as 100%. (**D**) PCT3 cells were pretreated with 10 U/ml Heparinase-I 1 h before addition of 25 μ g/ml CsA for 24 h. CsA cytotoxicity was measured with LDH assay as indicated in methods. The data are the means of three different experiments taking the value of CsA treated cells as 100%.

DISCUSSION

In autocrine signaling, cells respond to protein factors that they have released. Thus, cells participating in an autocrine mechanism both secrete the growth factor and express receptors for it on the plasma membrane. Emerging evidences indicate that EGFR could participate in cell death, in addition to its more widely accepted role in enhancing survival (Arany, 2008). In a previous report (Sarró *et al.*, 2008), we described that in kidney-derived PCT3 cells, EGFR activation in response to CsA was required for cell death. However, EGFR also mediate CsA-induced ERK and PKB activation which were not involved in CsA cytotoxicity and could probably be pro-survival signals. Thus, EGFR activation in response to CsA results in different physiological outcomes. The fact that CsA activates EGFR is also interesting since it has been suggested that cyclosporine can promote cancer progression by a direct cellular effect that is independent of its effect on the host's immune cells (Hojo *et al.*, 1999). In the present work, we have explored the mechanisms that lead to EGFR activation in response to CsA. Our results suggest that EGFR is transactivated by an autocrine loop, what is supported by two main evidences: 1) Conditioned media from CsA-treated cells (CsA-CM) is able to activate ERK and PKB and to induce cell death in an EGFR-dependent way, and 2) blockade of the secretory pathway by Brefeldin-A inhibited CsA-induced EGFR, ERK and PKB activation. CsA effects seem to be multifactorial since CsA-induced PKB activation was ROS-independent and detectable from 30 min of treatment and ERK was ROS-dependent and detectable from 1 to 3 h (Sarró *et al.*, 2008). Moreover, a longer exposure to CsA is required to obtain a conditioned medium able to activate ERK than to activate PKB. However, once secreted, factor(s) in the CsA-CM induced a rapid activation of both ERK and PKB detectable within 5 min of treatment. Then, two scenarios could be considered: 1) CsA induces the release of two different factors responsible of single pathway activation, 2) a single factor progressively accumulated in the medium leads to different consequences depending on its concentration, where the threshold concentration needed to trigger PKB activation is lower than that of ERK. In all cases, sustained exposure to this factor(s) would finally result in cell death.

MMPs act inducing cleaving/degradation of ECM components or the release of soluble factors such as TNF- α (Solorzano *et al.*, 1997). MMP-mediated shedding of EGF-like ligands has been involved in EGFR transactivation by G protein-coupled receptor (GPCR) ligands, cytokines, chemokines and cell adhesion elements (Fischer *et al.*, 2003, Gschwind *et al.*, 2001). It has been suggested that CsA treatment could enhance MMPs expression (Lohi *et al.*, 1994) and activity (Fornoni *et al.*, 2001), although others suggest that CsA downregulates MMPs (Kataoka *et al.*, 2000). Our

results show that MMPs mediate CsA-induced cell death and ERK and PKB activation. However, only CsA-CM-induced PKB activation was MMPs-dependent. These results suggest that although both effects are mediated by MMPs, they should involve different mechanisms. The function of MMPs in CsA-triggered ERK activation and cell death remains unknown, but it would be plausible that CsA-activated MMP participate in the secretion/processing of factor(s) that transactivate EGFR.

To further explore the underlying mechanism of EGFR activation in response to CsA, we tried to identify the secreted factor responsible of CsA effects. TGF- β would fit well in this model, since it has been described to be up regulated by CsA (Khanna *et al.*, 1999, Wolf *et al.*, 1995), to transactivate EGFR (Uchiyama-Tanaka *et al.*, 2002) and to be a heparin-binding protein (McCaffrey *et al.*, 1992). However, our results indicate that it is not involved, since inhibition of TGF- β type I receptor did not prevent ERK or PKB activation and did not rescue from CsA-induced cell death. Cyclophilin B (CypB), the intracellular receptor for CsA, has been previously described to be secreted in response to CsA on HeLa cells (Price *et al.*, 1994). The authors suggested that CsA would compete with newly synthesized plasma membranes proteins for binding to CypB in the ER. CsA lacks domains that would anchor bound CypB to the plasma membrane and so leads to secretion of its bound CypB. In lower eukaryotes, it has been suggested that cyclophilins mediate the cytotoxic CsA effects (Tropschug *et al.*, 1989). It has also been suggested that overexpression of KAP, a CypB binding protein, could protect PCT3 cells from CsA-induced toxicity (Cebrian *et al.*, 2001). This protective effect could be related to the ability of KAP to retain CypB in the endoplasmic reticulum. In addition to its role in protein folding and as chaperones, Cyp's have been proposed to act extracellularly as second messengers and inflammatory cytokines (Bukrinsky, 2002). Our results show that CypB but not CypA is released in PCT3 cells in response to CsA in a ROS and MMP-independent way. This specificity could be explained by different intracellular localization of both isoforms: while CypA is predominantly cytosolic, CypB possess an N-terminal signal peptide which directs it to the secretory pathway (Price *et al.*, 1994). CypB has been described to induce activation of ERK in T lymphocytes (Pakula *et al.*, 2007). In agreement with this, immunodepletion of CypB from CsA-Conditioned medium reduced both ERK and PKB activation. However, it is difficult to assume that CypB by itself triggers CsA-induced responses. This is questioned by the fact that only high doses of recombinant CypB triggered ERK and PKB activation, recombinant CypB did not produce any cytotoxic effect, and that blockade of CD-147, a receptor described to be implicated in CypB-induced ERK activation (Yurchenko *et al.*, 2001), did not block ERK or PKB activation.

Our results show that HSPG were necessary for CsA-induced ERK and PKB activation and CsA cytotoxic effects. These effects were mediated by and heparin-binding factor. How HSPG lead to EGFR activation remains unknown. HSPG have been suggested to play a role in effective presentation of ligands to their cognate signaling receptor (Yayon *et al.* 1991; Tanaka *et al.* 1993; Kuschert *et al.* 1999). Alternatively, proteoglycans may function as coreceptors. Cell surface HSPG are anchored in the plasma membrane either by a transmembrane domain (syndecans, CD44 variants, and betaglycan) or by glycosylphosphatidylinositol linkage (glypicans) (Bernfield *et al.* 1999) Interactions of cytosolic domains of syndecans with cytoskeleton and neighboring signaling molecules has been suggested to be involved in the regulation of cell adhesion, migration, and proliferation (Rapraeger and Ott 1998; Ilangumaran *et al.* 1999; Woods and Couchman 2001). In addition, the extracellular domain of syndecan-1 could be proteolytically cleaved at a juxtamembrane site by metalloproteinases in response to a variety of physiological stimulators and stress. Shedding converts syndecan-1 from a membrane-bound coreceptor into a soluble effector capable of binding the same ligands (Wang *et al.*, 2005).

CypB is likely secreted bound to CsA. Denys *et al* (1998), described that CypB-CsA complex could interact with heparin to the same extent as CypB. Cyp-CsA is in fact the active complex possessing immunosuppressive activity, and both immunosuppression and nephrotoxicity have been suggested to occur through common mechanisms (Sigal *et al.*, 1991). However, our results suggest that, although being involved, CypB is not directly responsible of CsA effects on ERK and PKB activation and cell viability. Price *et al.*, (1994) described that CsA effect on CyPB trafficking was specific and does not disturb general protein trafficking mechanisms in the secretory pathway, but we can not rule out the possibility that CsA effects could be due to a CypB partner carried out by CsA-CypB complex. In this sense, cyclophilins can act as chaperones independently of its PPIase activity (Barik, 2006). Then, CsA effects would be the result of CypB-mediated secretion of heparin-binding factor(s) that transactivate EGFR and require MMP activity.

DISCUSSIÓ GENERAL

La Ciclosporina A (CsA) és un fàrmac immunosupressor àmpliament utilitzat en el transplantament i en el tractament de malalties autoimmunes tals com la psoriasis o la artritis reumàtica (Borel *et al.*, 1976, Kahan, 1993). Malgrat tot, l'ús de la CsA s'ha vist limitat pels seus efectes tòxics, essent la principal complicació una elevada toxicitat renal que pot comportar la pèrdua de la funció renal (Olyaei *et al.*, 2001, Bennett *et al.*, 1994). La nefrotoxicitat crònica per CsA esta caracteritzada principalment per fibrosi tubulo-intersticial i atròfia tubular. La patogènesis d'aquesta condició encara no és del tot coneguda, però s'ha postulat que podria ser deguda a la persistent vasoconstricció preglomerular i la hipòxia tissular induïdes per CsA (Kopp *et al.*, 1990, Shihab *et al.*, 1996), si bé cada cop hi ha més evidències que suggereixen un efecte directe de la CsA sobre les cèl·lules tubulointersticials (Esposito *et al.*, 2000). En el ronyó s'observa una diferent sensibilitat a la CsA segons el tipus cel·lular, essent les cèl·lules del túbul proximal la principal diana de la CsA tant en models animals com en humans (Wilson *et al.*, 1988, Burdmann *et al.*, 2003). Es desconeixen però els mecanismes de dany directe i específic a les cèl·lules del túbul proximal. En aquest aspecte, les cèl·lules renals en cultiu proporcionen un bon model *in vitro* per explorar potencials mecanismes de nefrotoxicitat induïda per CsA. L'objectiu d'aquest treball ha estat intentar determinar els mecanismes moleculars per els quals la CsA causa un dany directe sobre cèl·lules del túbul proximal en cultiu.

La CsA és tòxica per les cèl·lules PCT3

En la cèl·lula tubular en cultiu s'han descrit àmpliament els efectes citotòxics de la CsA, tot i que aquests varien en funció de la dosi emprada i de la línia cel·lular. En aquest treball hem treballat amb la línia cel·lular PKSV-PCT3 (PCT3), derivada del túbul proximal contornejat de ratolins transgènics portadors de l'antigen T de SV40 sota el control del promotor del gen de la L-piruvat quinasa (Cartier *et al.*, 1993). Aquestes cèl·lules mantenen els atributs i les principals propietats de les cèl·lules parentals del túbul proximal diferenciades (Lacave *et al.*, 1993, Ouar *et al.*, 1998). Els nostres resultats mostren que els efectes de la CsA en les cèl·lules PCT3 són dosi dependents, observant-se una disminució en la proliferació cel·lular a dosis baixes (5 µg/ml) i una important disminució de la viabilitat cel·lular i un augment de la citotoxicitat a partir de 10 µg/ml o dosis més altes. La mort induïda per dosis de 25 µg/ml (21 µM) CsA és probablement causada per necrosi, doncs no s'observa fragmentació nuclear ni increment en els nivells de p53. Aquest resultat coincideixen en part amb els descrits per Healy *et al.*, (1998) en la línia cel·lular de túbul proximal LLC-PK1, on es descriu que dosis de l'ordre nanomolar (4,2 nM) causen apoptosi mentre que amb

dosis de l'ordre micromolar (a partir de 21 μM) la mort és per necrosi. En cèl·lules LLC-PK1 també s'ha descrit que dosis de 4,2 μM provoquen aturada del cicle cel·lular i un augment en l'expressió de p53 precedint la pèrdua de viabilitat cel·lular (Lally *et al.*, 1999). En els nostres experiments, els efectes citotòxics de la CsA eren clarament observables a 25 $\mu\text{g/ml}$ per el que es va fixar aquesta dosi com a dosi de treball. Si bé aquesta dosi es pot considerar alta, diferents estudis indiquen que aquestes concentracions s'aproximen al rang de concentracions amb clars efectes nefrotòxics que es troben en ronyons de pacients sotmesos al tractament amb CsA (Galletti *et al.*, 2005, McMorro *et al.*, 2005). Per altra banda s'ha descrit l'acumulació de CsA en cèl·lules del túbul proximal (von Willebrand *et al.*, 1983, Suzuki *et al.*, 1987). Per aquest fet, s'ha considerat que aquestes dosis representen una bona aproximació nefrotòxica *in vitro* amb rellevància clínica (Mead *et al.*, 1994).

Les espècies intermediàries del metabolisme de l'oxigen, també anomenades espècies reactives de l'oxigen (ROS), participen en el metabolisme i la senyalització cel·lular a dosis fisiològiques, mentre que l'elevada o excessiva generació de ROS ha estat associada a processos patològics. Ha estat àmpliament descrit que el tractament amb CsA genera ROS i que aquests ROS podrien estar implicats en la nefrotoxicitat per CsA, i més concretament en els efectes tòxics de la CsA en cèl·lules del túbul proximal (Wang *et al.*, 1994, Nishida *et al.*, 2003). Diversos articles demostren que el tractament amb antioxidants redueix els efectes tòxics de la CsA (Parra Cid *et al.*, 2003, Burdmann *et al.*, 2003). Si bé nosaltres també hem observat un increment en els nivells de radicals lliures (ROS) en el tractament de les cèl·lules PCT3 amb CsA, contràriament al que estava descrit aquests no semblen estar implicats directament en la toxicitat per CsA. En aquest sentit, els resultats de Galletti *et al.*, (2005) tampoc no sostenen un lligam directe entre la generació de ROS i els efectes renals adversos en resposta a CsA. Així, és possible que nivells elevats de ROS puguin estar implicats en altres processos de la patologia que condueix a la fallida renal, com els canvis hemodinàmics o la posterior fibrosi intersticial, però no estarien implicats en el dany directe a les cèl·lules del túbul proximal.

A part dels efectes en la viabilitat, en el tractament a dosis baixes de CsA es comencen a insinuar canvis morfològics, essent aquests canvis més pronunciats a mesura que incrementa el temps i dosis de tractament. Així, a dosis baixes de CsA es comença a observar un canvi de forma passant les cèl·lules de una típica forma epitelial cuboïdal cap a una forma més allargassada. A dosis de 25 $\mu\text{g/ml}$ CsA s'evidencia una marcada elongació amb la formació de fil·lopodis. A aquestes dosis també s'observa una disminució de l'adhesió cel·lular, doncs s'observen més cèl·lules surant en el sobrenedant. En aquest sentit s'ha descrit que la interrupció de les

interaccions entre cèl·lules epitelials i la matriu extracel·lular (ECM) pot induir l'apoptosi (Frisch *et al.*, 1994). També s'ha descrit que en cèl·lules del túbul proximal de ratolins, les adhesions cèl·lula-cèl·lula inhibeixen l'apoptosi per un mecanisme dependent de cadherina (Bergin *et al.*, 2000).

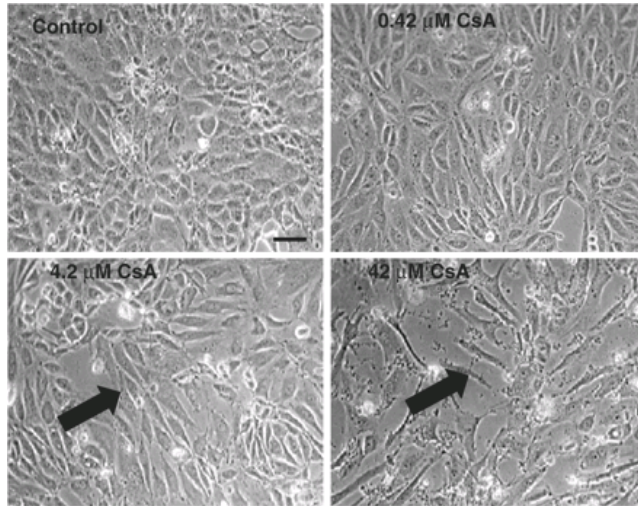


Figura 36. Efecte del tractament amb CsA en la morfologia cel·lular de HK-2. Extret de McMorrow *et al.*, (2005).

Canvis morfològics similars han estat descrits prèviament en la línia cel·lular de túbul proximal humà HK-2 (McMorrow *et al.*, 2005, Slattery *et al.*, 2005), on s'observa elongació cel·lular amb un elevat grau de desadhesió, reorganització del citoesquelet i ruptura de les unions cel·lulars després del tractament amb CsA (Fig.36). Els autors proposen que aquests canvis fenotípics podrien ser deguts a que la CsA induïx una transició epiteli-mesenquimal (EMT). La EMT és un procés del desenvolupament en el que succeeixen nombrosos canvis fenotípics que comporten la pèrdua de funcions i de marcadors epitelials i l'adquisició d'un fenotip més fibroblàstic anomenat miofibroblast (Yang *et al.*, 2001). El miofibroblast és un intermediari morfològic entre el fibroblast i cèl·lules de la musculatura llisa. En aquest sentit, McMorrow *et al.*, (2005), descriuen que el tractament amb CsA induïx la translocació a nucli de β -catenina, associant aquest fet a una pèrdua de les unions cel·lulars, disminueix els nivells de mRNA de E-cadherina i induïx l'expressió de components de la ECM i de α -SMA (α -smooth muscle actin), un marcador típic de cèl·lules de la musculatura llisa. Aquestes dades han portat als autors a reformular la hipòtesi de la fibrosi intersticial. Així, si fins ara s'havia considerat que la causa principal de la acumulació de ECM en la fibrosi tubulointersticial era la infiltració de fibroblasts que esdevenien actius en el interstici, els resultats aportats per McMorrow *et al.* (2005), suggereixen que la major font d'aquests miofibroblasts podria ser el propi epiteli. De fet, la transició epiteli-mesenquimal (EMT) juga un paper principal en la progressió i manteniment de la fibrosi tubulointersticial (Strutz i Muller, 2000, Rastaldi *et al.*, 2002). Slattery *et al.*

(2005), proposen que l'EMT contribuiria significativament a la fallida renal a través de l'acumulació de ECM i potser més significativament a través de la pèrdua de la integritat i funció epitelial.

Degut a la complexitat i naturalesa multifactorial de la nefrotoxicitat crònica per CsA i a la diversitat d'efectes descrits en cèl·lules del túbul proximal en resposta a CsA, és probable que el dany cel·lular sigui produït per la combinació de diferents efectes. En aquest sentit, varem decidir estudiar quins efectes produiria el tractament amb CsA sobre dos importants vies de senyalització com són la via de les MAPK ERK1/2 i la via PKB/PI3K. ERK i PI3K/PKB són vies tradicionalment involucrades amb proliferació, diferenciació i inhibició de l'apoptosi, tot i que també s'han descrit cassos en que la seva activació comporta mort cel·lular.

La CsA activa les vies ERK i PI3K amb diferents conseqüències

En les cèl·lules PCT3, el tractament amb CsA activa les vies de senyalització ERK i PKB/PI3K de manera dosi i temps resposta, si bé les cinètiques d'activació d'ambdues vies difereixen. Aquest fet suggereix que l'activació d'aquestes vies en resposta a CsA podria implicar diferents mecanismes.

L'activació de ERK en resposta a CsA comença a ser evident a partir de dosis de 10 µg/ml i 1 hora de tractament, amb un màxim d'activació al voltant de les 6 hores. Aquesta activació va precedida per l'activació de Raf-1 i MEK però curiosament no s'observa activació de Ras. Aquest fet suggereix la implicació d'altres proteïnes G petites, com Rac1 o Cdc42. L'activació de ERK en resposta a CsA ha estat descrita prèviament en diferents tipus cel·lulars. Paslaru *et al.* (1997), descriuen l'activació de ERK1/2 en resposta a CsA en les cèl·lules epitelials renals BSC-1 però també en cèl·lules no renals com HeLa i fibroblasts 3T3. El fet que anàlegs de la CsA amb menor capacitat immunosupressora activin amb igual intensitat ERK1/2 duu als autors a formular la hipòtesis que la activació de ERK per CsA no seria dependent de la inhibició de la calcineurina, sinó que més probablement seria causada per les variacions en els nivells intracel·lulars de calci descrits en resposta a CsA (Gordjani *et al.*, 2000, Frapier *et al.*, 2001). Nosaltres hem observat que l'activació de ERK en resposta a CsA va mediada per ROS. Com hem mencionat anteriorment, els ROS poden actuar com a intermediaris o segons missatgers en vies de senyalització. L'activació de ERK en resposta a estrès oxidatiu o H₂O₂ ha estat àmpliament descrita (Blanc *et al.*, 2003). El mecanisme pel qual elevats nivells de ROS en resposta a CsA activen ERK no ha estat establert, però s'ha descrit que Rac1, que participa en

l'activació de Raf-1 i per tant de ERK, pot ser activada en resposta a ROS (Tobar *et al.*, 2008).

S'ha descrit l'activació de ERK tant promovent supervivència com mort cel·lular dependent del context cel·lular en que ERK és activada (Ishikawa *et al.*, 1999). La intensitat i durada de la senyal determinen la resposta fisiològica. Així, s'ha descrit que quan l'activació de ERK1/2 promou la supervivència, l'activació de la via és ràpida i transitòria, mentre que en situacions pro-apoptòtiques, l'activació tendeix a ser més retardada i sostinguda (Choi *et al.*, 2004). Els nostres resultats mostren que inhibidors de la via ERK1/2 no recuperen de la toxicitat induïda per CsA, fet que ens fa pensar que l'activació de ERK no estaria implicada en la mort cel·lular induïda per CsA. Tenint en compte que s'ha descrit que en condicions d'estrès, ERK generalment participa en senyalització pro-supervivència (Xia *et al.*, 1995), podria ser que ERK s'activés en resposta al dany induït per CsA iniciant un mecanisme de supervivència o rescat. Per altra banda, l'activació de ERK en resposta a CsA ha estat implicada en l'augment de la resistència transepitelial basal (TER), i per tant en l'alteració de la barrera epitelial, induïda per CsA en cèl·lules MDCK (Kiely *et al.*). També s'ha descrit que en cèl·lules LLC-PK1, l'increment de TGF- β en resposta a CsA requereix l'activació de ERK1/2 (Keane *et al.*, 1998) i s'ha demostrat la implicació de ERK en la transició epiteli-mesenquinal induïda per CsA (Slattery *et al.*, 2005). Si a més tenim en compte que l'activació de ERK induïda per CsA és dependent de ROS, i que els ROS han estat implicats en la fibrosi intersticial que acompanya el tractament amb CsA, es podria hipotetitzar que l'activació de ERK, tot i no estar implicada directament en la toxicitat directa sobre les cèl·lules del túbul proximal, podria participar en la progressió de la fibrosi intersticial.

Com hem mencionat anteriorment, el tractament amb CsA també provoca l'activació de la via PKB/PI3K. L'activació de PKB ha estat freqüentment utilitzada com a mesura de l'activació de les PI3K, doncs és la diana més ben caracteritzada del productes lipídics derivats de l'activitat PI3K, i el seu estat de fosforilació/activació és fàcilment detectable per Western Blot. L'activació de PKB és més primerenca respecte la de ERK i s'observa ja als 30 minuts de tractament. A més, tot i que s'ha descrit que també PKB pot ser activada en resposta a estrès oxidatiu (Blanc *et al.*, 2003), l'activació de PKB en resposta a CsA és independent de la generació de ROS. Aquest fet reforça la idea que l'activació de ERK i PKB en resposta a CsA podria implicar mecanismes diferents. Per esbrinar quin paper juguen les PI3K en la citotoxicitat per CsA, es van utilitzar els inhibidors Wortmannina, LY294002 i Apigenina. La Wortmannina és un metabòlit fúngic i és el més potent dels inhibidors amb una IC₅₀ al voltant de 5 nM. Presenta una potència inhibidora similar per les PI3Ks de classe I, II i

III amb la excepció de PI3K-C2 α , que és com a mínim 10 vegades menys sensible. Degut a la vida mitja relativament curta de la Wortmannina, l'inhibidor més utilitzat de les PI3K és el LY294002, un derivat sintètic dels flavonoids i inhibidor competitiu pel lloc d'unió de l'ATP. Apart de PI3K-C2 α , les PI3Ks presenten una sensibilitat *in vitro* similar al LY294002 (IC₅₀ al voltant de 1 μ M) (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Al igual que el LY294002, el flavonoid Apigenina també competeix pel lloc d'unió de l'ATP i inhibeix les PI3K (Agullo *et al.*, 1997, Sarno *et al.*, 2003). Els nostres resultats mostren que tots tres inhibidors de la PI3K bloquen l'activació de PKB en resposta a CsA i protegeixen enfront de la toxicitat induïda per CsA, suggerint una implicació de les PI3K en la toxicitat per CsA.

L'ús d'inhibidors farmacològics sempre planteja la qüestió de si els inhibidors són selectius per a una quinasa específica. Així, la Wortmannina també pot inhibir enzims relacionats amb les PI3K tals com mTOR, DNA-PK, ATM i les PIPkins α i β de tipus II, tot i que amb IC₅₀ de 20 a 100 vegades més altes que per a les PI3K. mTOR i DNA-PK també són inhibides per LY294002 tant com les PI3Ks. Per altra banda, tant LY294002 com Apigenina també inhibeixen la proteïna quinasa CK2. Malgrat tot, el fet que tots tres inhibidors produeixin un mateix efecte, que CK2 no sigui inhibida per Wortmannina, i la utilització de Wortmannina a dosis en les que hauria d'exhibir una selectivitat relativament alta per les PI3K, constaten la implicació de les PI3K en la toxicitat induïda per CsA.

Tal i com hem mencionat anteriorment, aquests inhibidors no discerneixen entre diferents isoformes de PI3K. En un intent de realitzar una aproximació més específica, varem silenciar mitjançant RNA d'interferència (siRNA) la subunitat catalítica 110 α de les PI3K de classe IA. Les PI3K de la classe I són les més ben caracteritzades i a les que se'ls hi han atribuït la majoria de funcions conegudes de les PI3K (Wymann *et al.*, 2005). Els nostres resultats mostren que el silenciament de la subunitat 110 α inhibeix eficientment l'activació de PKB en resposta a CsA, indicant que en cèl·lules PCT3, aquesta subunitat és la responsable de l'activació de PKB induïda per CsA. Curiosament però, el silenciament d'aquesta subunitat no evita la toxicitat induïda per CsA, indicant per tant que ni la subunitat 110 α ni la consegüent activació de PKB estarien implicades en la mort cel·lular. Tenint en compte que hem demostrat per RT-PCR (Reverse-transcriptase-PCR) la presència en cèl·lules PCT3 d'altres isoformes de PI3K, aquests resultats suggereixen que el tractament amb CsA podria comportar l'activació de més d'una isoforma de PI3K: i) la isoforma 110 α que estaria implicada en la via convencional d'activació de PKB però no en la citotoxicitat, i ii) alguna altra isoforma de PI3K sensible a inhibidors que participaria en els processos de toxicitat i actuaria de forma independent a PKB. El fet que l'activació de PKB en resposta a CsA

sigui relativament ràpida però que en canvi la mort cel·lular no s'observi fins les 12-24 hores argumentaria en favor d'aquesta hipòtesi i evidenciaria una especialització funcional de les diferents isoformes. En aquest sentit, la via PI3K 110 α /PKB podria estar implicada en un hipotètic mecanisme de supervivència o rescat, tal i com ha estat descrit tradicionalment (Wymann *et al.*, 2005). Per altra banda, les PI3Ks han estat implicades en moltes malalties com al·lèrgia, inflamació, malalties cardíques i càncer, i inhibidors d'aquests enzims són considerats potencials agents terapèutics. S'ha descrit també que la inhibició de PI3K protegeix enfront la toxicitat induïda per cadmi (Liu *et al.*, 2007), arsenit (Shack *et al.*, 2003), hipòxia (Aki *et al.*, 2001), i per deprivació de glucosa (Aki *et al.*, 2003) i sèrum (Lee *et al.*, 2005). Inhibidors específics de PI3K γ redueixen la glomerulonefritis i perllonguen la vida en un model en ratolí de lupus sistèmic, suggerint que PI3K γ podria ser una diana útil en el tractament de la inflamació crònica (Barber *et al.*, 2005). Queda per determinar quina isoforma de PI3K estaria implicada en la toxicitat per CsA.

L'activació de ERK i PKB/PI3K i la mort cel·lular en resposta a CsA són per un mecanisme autocrí que implica la transactivació de EGFR

Les vies ERK i PI3K són dues de les principals vies de senyalització iniciades en el EGFR (Okano *et al.*, 2000). S'ha descrit que en ronyó, el tractament amb CsA augmenta l'activitat tirosina quinasa en membranes basolaterals però no en el "brush border" (Demeule *et al.*, 1994). En cèl·lules epitelials polaritzades, el EGFR es localitza principalment en membranes basolaterals, permetent la comunicació epitel·li-estroma. Aquesta presentació asimètrica del EGFR limita la senyalització autocrina, doncs molts d'aquests òrgans epitelials, sobretot al llarg del tracte genitourinari, secreten grans quantitats de EGF en el lumen (Konturek *et al.*, 1991). Tenint en compte aquests precedents, varem decidir estudiar els efectes de la CsA en l'activació de EGFR. Els nostres resultats mostren que el tractament amb CsA induïx l'activació del EGFR i que aquesta activació està implicada en l'activació de ERK i PKB i la mort cel·lular. El EGFR ha estat implicat en una gran diversitat de processos tals com proliferació, diferenciació i augment de la motilitat cel·lular però també en apoptosi (Fischer *et al.*, 2003). En aquest últim aspecte, a nivell renal diversos treballs han descrit que EGFR podria estar implicat en la toxicitat i mort cel·lular induïda per cisplatina (Arany *et al.*, 2004), o per condicions estressants com hipòxia/reperfusió o estrès oxidatiu sever *in vitro* (Arany *et al.*, 2005). Per contra, l'activació en resposta a un estrès oxidatiu moderat està lligada a supervivència cel·lular (Arany *et al.*, 2005). Aquests estudis suggereixen una doble funció de EGFR en el ronyó: el EGFR activat pot promoure tant

supervivència com mort dependent de la durada i intensitat de l'estrès i del tipus d'estrès implicat. Nosaltres hem observat que l'activació induïda per CsA del EGFR duu a diferents respostes fisiològiques, ja que simultàniament genera senyals no implicades directament en la citotoxicitat i que per tant podrien estar implicades en supervivència, com l'activació de ERK i PKB, i senyals de mort cel·lular, com l'activació de les PI3K implicades en la toxicitat. En aquest sentit, s'ha descrit que la varietat de respostes fisiològiques resultants de l'activació de EGFR podria ser el resultat del reclutament d'un o altre conjunt d'efectors que actuarien modulant-ne la resposta (McCole *et al.*, 2007).

Part de les funcions en les que s'ha implicat el EGFR són el resultat de la transactivació del receptor per lligands que no interactuen directament amb el seu domini extracel·lular o per estímuls tals com estrès oxidatiu (Gschwind *et al.*, 2001). Els nostres resultats mostren que el sobrenedant de cèl·lules PCT3 tractades amb CsA eren capaços de induir l'activació de ERK i PKB i de provocar mort cel·lular quan eren afegits a cèl·lules deprivades. Aquest fet suggereix la presència en el medi condicionat de cèl·lules tractades amb CsA (CsA-CM) d'algun factor soluble secretat en resposta a CsA i capaç d'induir els efectes anteriorment descrits. Curiosament, si en els tractaments "directes" amb CsA calen més de 30 minuts per detectar l'activació de PKB i més d'una hora per observar la de ERK, el tractament amb CsA-CM induïx una ràpida activació d'ambdues vies observable ja als 5 minuts d'iniciar el tractament, suggerint que, un cop secretat, aquest factor és capaç d'induir una resposta ràpida. Les diferències en les cinètiques d'activació de ERK i PKB en resposta a CsA es correlacionen amb el fet que calen exposicions més llargues a CsA per obtenir un medi condicionat capaç d'activar ERK en comparació amb PKB. Aquestes diferències aparents en el mecanisme d'activació d'ERK i PKB plantegen diferents hipòtesis: 1) que el tractament amb CsA provoqui la secreció seqüencial de dos factors diferents responsables cadascun de l'activació d'una via concreta, o 2) que el tractament amb CsA induïxi la secreció d'un sol factor que progressivament s'aniria acumulant en el sobrenedant de les cèl·lules tractades. Les cèl·lules PCT3 presentarien una diferent sensibilitat al factor present en el CsA-CM, de manera que la concentració llindar per activar PKB seria més baixa que per activar ERK. Sigui com sigui, aquests resultats suggereixen que els efectes de la CsA anirien mediat per un mecanisme autocrí/paracrí que implicaria possiblement una etapa extracel·lular en l'activació de EGFR. La possible participació d'un mecanisme autocrí/paracrí en els efectes de la CsA ve reforçat pel fet que es requereix la integritat de la via secretora per activar ERK i PKB en resposta a CsA. És més, el fet que l'activació de ERK i PKB en resposta a CsA-CM no sigui bloquejada per Brefeldina A (BF-A), suggereix que el procés de secreció

actua en una etapa inicial del mecanisme d'activació d'aquestes vies. Malauradament, el fet que l'exposició perllongada a BFA sigui tòxica per si mateixa no ens ha permès demostrar directament la implicació de la via secretora en la toxicitat per CsA.

En la senyalització autocrina, les cèl·lules responen a factors que elles mateixes han secretat. Llavors les cèl·lules que participen en un mecanisme autocrí secreten el factor de creixement i expressen receptors per aquest en la membrana plasmàtica. Les cèl·lules epitelials renals poden alliberar factors autocrins i paracrins que poden participar en processos tant fisiològics com patològics (Toback *et al.*, 1990). Diversos factors de creixement, incloent el EGF (epidermal growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), FGF (fibroblastic growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), ET (endothelin), PDGF (platelet-derived growth factor) i TGF- β (transforming growth factor β) són sintetitzats normalment en el ronyó, suggerint la potencialitat de vies autocrines/paracrines. Diferents situacions d'estrès o de dany en cèl·lules epitelials tubulars poden resultar en un major alliberament i/o síntesi d'aquests factors, que al seu torn, podrien promoure la recuperació o participar en la toxicitat. (Andreson *et al.*, 1998). A més a més, les cèl·lules epitelials tubulars esdevenen un dels principals focus de producció de quimioquines durant el dany tubular primari, les quals, al seu torn, duen a la infiltració i activació de leucòcits (Anders *et al.*, 2003). També s'ha especulat que l'augment de la producció d'endotelina a través de mecanismes autocrins podria estar implicada en el dany estructural tubular associat a CsA (Haug *et al.*, 1998). En un model *in vitro* de tubulointerstici, utilitzant cultius primaris de cèl·lules del túbul proximal (PTCs) i fibroblasts del còrtex renal (CFs), s'ha demostrat que la CsA és directament tòxica per aquestes cèl·lules i que a més promou la fibrogènesi. Aquests últim efecte serien degut a la capacitat de la CsA d'estimular la secreció autocrina de IGF-1 per CFs i la secreció paracrina de TGF- β per les PTCs (Johnson *et al.*, 1999). Així, les cèl·lules PTC modularien el comportament biològic dels fibroblasts corticals veïns a través de mecanismes paracrins. Lesions renals que resultessin en dany del túbul proximal podrien pertorbar aquesta interacció paracrina, induint una excessiva proliferació de fibroblast i la conseqüent fibrosi intersticial (Johnson *et al.*, 1998).

Les MMPs estan implicades en els efectes de la CsA

Els nostres resultats també mostren que l'activitat de les metal·loproteïnases de matriu (MMPs) és necessària per a l'activació de ERK i PKB i la mort cel·lular induïdes per CsA. No deixa de ser sorprenent que els efectes tòxics de la CsA en cèl·lules PCT3 impliquin l'activació de MMPs, quan ha estat descrit que la fibrosi intersticial induïda per CsA resultaria de la inhibició de l'activitat de les MMPs (Johnson *et al.*,

1999). Les MMPs són endopeptidases dependents de zinc que tallen components de la matriu extracel·lular tals com col·làgens, laminina, fibronectina, proteoglicans i que contribueixen en diferents processos com la migració cel·lular (Hrabec *et al.*, 2007). El paper que juguen les MMPs en l'activació de ERK i PKB o en la mort cel·lular en resposta a CsA no ha quedat aclarit, però el fet que l'activació de PKB per CsA-CM sigui blocada per la inhibició de les MMPs mentre que l'activació d'ERK o la toxicitat induïdes per CsA-CM no ho siguin, suggereix que les MMPs podrien actuar en diferents etapes en cada cas. S'ha descrit que el tractament amb CsA augmenta els nivells d'expressió (Lohi *et al.*, 1994) i activitat (Fornoni *et al.*, 2001) d'algunes MMPs. També ha estat àmpliament descrit la implicació de les MMPs en el processament proteolític dels lligands de EGFR a partir dels seus precursors transmembrana (Fischer *et al.*,). Aquest processament proteolític és un procés finament regulat, que pot ser influenciat per PKC, l'influx de calci i l'activitat fosfatasa (Fischer *et al.*). Així, podria ser que les MMPs participessin en la transactivació del EGFR per CsA. Per altra banda, les MMP podrien estar actuant per un mecanisme diferent al processament de lligands de EGFR, tals com el processament de components de la matriu extracel·lular (ECM). S'ha de considerar que la ECM no és només una bastida extracel·lular que suporta les cèl·lules, sinó que conté llocs d'unió per a factors de creixement de manera que en regula la biodisponibilitat. A més, les MMPs també tallen proteïnes que no són components propis de la ECM, tals com citoquines, quimioquines i factors de creixement, activant o inactivant-los, generant altres productes amb diferents conseqüències. En aquest sentit, l'expressió exuberant d'aquests enzims ha estat associada a una varietat de malalties destructives, tals com la progressió de tumors, malalties cardiovasculars o malalties autoimmunes (Hrabec *et al.*, 2007).

CypB és un factor secretat en resposta a CsA

Com hem mencionat anteriorment, diversos factors han estat involucrats en mecanismes autocrins en cèl·lules epitelials renals. Entre aquests, el factor de creixement transformant beta (TGF- β) és un dels principals candidats per actuar com a mediador en l'activació de ERK i PKB i la mort cel·lular induïdes per CsA, doncs ha estat implicat en la fibrosi intersticial que segueix al tractament crònic amb CsA (Wolf *et al.*, 1995) i pot transactivar el EGFR (Uchiyama-Tanaka *et al.*, 2002). Malgrat aquestes evidències, els nostres resultats suggereixen que TGF- β no estaria implicat en la toxicitat per CsA en les cèl·lules PCT3 doncs la inhibició del seu receptor específic a la superfície cel·lular no evita els efectes citotòxics de la CsA ni l'activació de ERK o PKB. La Angiotensina II (Ang II) també ha estat involucrada en la toxicitat per CsA (Sun *et al.*,

2005) i és capaç de transactivar el EGFR (Itabashi *et al.*, 2008). En els últims temps, s'ha descrit un sistema Renina-Angiotensina (RAS) local o intrarenal, en contraposició al sistema RAS endocrí. En el RAS local, les cèl·lules del túbul proximal que expressen tots els components del sistema poden produir *in situ* Ang II (Paul *et al.*, 2006). En experiments realitzats en paral·lel a aquesta tesi, hem pogut observar que ni inhibidors del receptor per Ang II ni inhibidors de ACE (Angiotensin converting enzyme) bloquen els efectes de la CsA, suggerint que Ang II tampoc estaria implicada en el dany directe de la CsA. Aquests resultats però no descarten que, tot i que TGF- β o Ang II no estiguin directament implicats en la toxicitat induïda per CsA en cèl·lules PCT3, puguin estar implicats en processos que conduirien a la fibrosi característica de la nefrotoxicitat crònica induïda per CsA.

Les ciclofilines són els receptors intracel·lulars de la CsA (Schreiber *et al.*, 1991, Liu *et al.*, 1991). Si bé els seu paper en el mecanisme immunosupressor de la CsA ha quedat ben establert, es desconeix la seva implicació en la nefrotoxicitat per CsA. En eucariotes inferiors s'ha demostrat que les ciclofilines són mediadores de la toxicitat per CsA (Tropschug *et al.*, 1989). Així, en aquells mutants de *Neurospora crassa* i *Saccharomyces cerevisiae* que són resistent a CsA, la proteïna ciclofilina és absent o si hi és, ha perdut la seva capacitat d'unir CsA. Modificacions químiques de la molècula de CsA amb la intenció de eliminar la seva toxicitat però preservant els seus efectes immunosupressors han fallat, suggerint que ambdues accions succeeixen a través de mecanismes comuns i que podrien per tant implicar les ciclofilines (Sigal *et al.*, 1991). També s'ha descrit que la ciclofilina B (CypB) és secretada en cèl·lules HeLa en resposta a CsA (Pierce *et al.*, 1994). Els nostres resultats mostren que el tractament amb CsA induïx la secreció de CypB de manera temps-resposta. Aquesta secreció es detecta amb una progressiva acumulació al sobrenedant i una disminució dels nivells intracel·lulars de CypB. En els últims temps s'ha proposat que les ciclofilines, endemés de la seva funció com xaperones i isomerasas, podrien actuar com mediadors secundaris extracel·lulars (Bukrinski *et al.*, 2002). En aquest sentit s'ha descrit que CypB extracel·lular induïx quimiotaxis i l'adhesió de cèl·lules T a la matriu extracel·lular per un mecanisme mediat per integrines (Allain *et al.*, 2002). És més, s'ha descrit que CypB exògena és capaç de induir l'activació de ERK1/2 en limfòcits T per un mecanisme que implicaria el receptor CD147 (Pakula *et al.*, 2007, Yurchenko *et al.*, 2001). Altres estudis confirmen la idea que proteïnes tradicionalment considerades com a xaperones podrien tenir un rol extracel·lular o senyalitzador. Per exemple, s'ha descrit un "loop" autocrí en el que cèl·lules A431 sotmeses a estrès tèrmic secreten HSP-70 en el medi. Un cop secretada, aquesta xaperona induïx la transactivació de EGFR (Evdonina *et al.*, 2006).

Els nostres resultats indiquen que CypB extracel·lular podria estar implicada en l'activació de ERK i PKB en resposta a CsA, doncs la immunodepleció de CypB del medi condicionats amb CsA redueix l'activació tant de ERK com de PKB induïda per CsA-CM. Malgrat tot, altres evidències posen en dubte aquesta implicació, suggerint que CypB no seria el factor que directament desencadenaria l'activació d'aquestes vies i la toxicitat en resposta a CsA. Aquest argument es basa en el fet que el tractament amb CypB exògena (recombinant) és incapaç d'induir toxicitat en cèl·lules PCT3 i només provoca una lleugera activació de ERK i PKB a dosis molt altes, i que el bloqueig de CD147 amb anticossos neutralitzants no inhibeix cap dels efectes abans mencionats. La possible implicació d'un mecanisme CypB-CD147 vindria també descartada pel fet que la presència de CsA no només interfereix la unió de CypB a CD-147, sinó que a l'inhibir l'activitat PPlasa de CypB, CsA n'evita l'activació (Pakula *et al.*, 2007).

Es possible que la CypB que trobem en el sobrenedant de cèl·lules tractades amb CsA no es trobi lliure si no unida a CsA formant un complex CsA-CypB. Per tant, no es pot descartar que els efectes observats siguin deguts a l'acció d'aquest complex sobre una diana específica. Per altra banda, l'activitat xaperona de CypB, a diferència de la seva activitat PPlasa, no es veu afectada per la unió a CsA. Així, la disminució de l'activació de ERK i PKB en resposta al tractament amb medis condicionats immunodeplecionats de CypB podrien ser deguda a la eliminació de una proteïna d'unió a CypB, més que a la eliminació de CypB per si mateixa. Per tant, no podem descartar que els efectes siguin deguts a un "partner" de la CypB secretat a l'exterior unit a CypB. En aquest punt és important recalcar que Price *et al.* (1994), demostraren que els efectes de la CsA sobre la via secretora eren específics sobre CypB i no afectaven a la secreció en general. Finalment, s'han descrit altres cassos en que les ciclofilines podrien tenir un paper secundari en l'activació de proteïnes quinases. L'activitat catalítica de ITK (IL2-inducible T-cell kinase), una proteïna tirosina quinasa no receptora, és inhibida per l'activitat PPlasa de CypA, a la que es troba unida formant un complex estable (Brazin *et al.*, 2002). El tractament amb CsA trenca aquest complex i provoca la fosforilació de ITK i dels seus substrats.

Els HSPG estan implicats en l'activació de ERK i PKB i la mort cel·lular induïda per CsA

Els proteoglicans de tipus heparan sulfat (HSPG), són molècules complexes formades per una proteïna central amb cadenes de glicosaminoglicans unides covalentment. Mentre que la part proteica determina la localització en la superfície cel·lular o en la ECM, el component glicosaminoglicà, en aquest cas l'heparan sulfat,

intervé en la interacció amb una varietat de lligands extracel·lulars tals com factors de creixement i molècules d'adhesió. A través d'aquestes interaccions, els HSPGs participen en moltes accions durant l'adhesió cel·lular, migració, proliferació i diferenciació cel·lular (Tumova *et al.*, 2000). Els HSPGs de la superfície cel·lular poden emmagatzemar varies proteïnes i actuar com a reguladors claus de la seva biodisponibilitat, modulant així importants respostes cel·lulars (de Ceuninck *et al.*, 2003). A més de controlar la disponibilitat d'aquests factors, s'ha suggerit que els HSPGs podrien actuar regulant la unió d'alguns factors de creixement als seus receptors d'alta afinitat (Aviezer *et al.*, 1994).

Els nostres resultats mostren que en cèl·lules PCT3, els HSPGs són necessaris per a l'activació de ERK i PKB i la mort cel·lular induïdes per CsA, doncs la eliminació dels HSPGs mitjançant el tractament amb heparinasa-I bloca els efectes de la CsA. Com hem mencionat anteriorment, els efectes de la CsA podrien ser deguts a la secreció d'un o més factors solubles que actuarien per un mecanisme autocrí/paracrí. Per tant, és probable que els HSPGs actuïn com a coreceptors modulant la unió d'aquest factor a un receptor funcional més que regulant-ne la biodisponibilitat. Aquesta hipòtesi ve reforçada pel fet que medis condicionats amb CsA (CsA-CM) que han estat incubats amb heparina-agarosa perden la capacitat d'activar ERK i PKB i d'induir toxicitat, suggerint que el factor present en els medis condicionats per CsA deu ser una proteïna d'unió a heparina i que per tant podria actuar a través de la unió a HSPGs. És més, la presència de heparina soluble inhibeix de manera dosi-dependent l'activació de ERK i PKB en resposta a CsA, suggerint un efecte competidor entre la heparina i els HSPGs per la unió al factor de resposta a CsA. Tot i que anteriorment hem comentat que probablement CypB extracel·lular no seria el factor directament implicat en els efectes de la CsA, és interessant comentar que CypB és una proteïna d'unió a heparina i que l'efecte d'aquesta ciclofilina promovent l'adhesió de cèl·lules T a la matriu extracel·lular es produeix a través de la unió a HSPGs (Allain *et al.*, 2002). És més, a diferència del que passava amb la unió a CD147, el complex CsA-CypB manté la mateixa capacitat que CypB d'interactuar amb heparina i amb HSPG (Denys *et al.*, 1998).

S'han descrit diferents mecanismes a través dels quals els HSPGs podrien actuar modulant la unió del factor de resposta a CsA a un receptor funcional. Originalment es va proposar que els HSPGs podrien actuar induint canvis conformacionals dels seus lligands, el que comportaria una major eficiència en la interacció amb el receptor funcional. Els HS podrien ser visualitzats com una "mà", que "presenta" correctament al seu receptor associat (Yayon *et al.*, 1991). En un segon model, dos motius d'unió HS servarien per induir la dimerització de dos lligands. El lligand homodimèric provocaria la

dimerització i activació del corresponent receptor (Schlessinger *et al.*, 2000). Diverses quimioquines i factors de creixement són biològicament actius com a dímers, formes que poden ser facilitades pels HS (Spillmann *et al.*, 1998). Una característica comuna d'aquests models és l'habilitat de l'heparina o de HS solubles de complementar l'absència de HS en la superfície cel·lular de les cèl·lules diana, indicant que els lligands poden ser presentats per HSPG de cèl·lules veïnes o de la matriu extracel·lular. En el nostre cas però el pre-tractament amb heparina soluble evita l'activació de ERK i PKB en resposta a CsA. Aquest resultat ens porta a descartar els models anteriorment descrits i suggereix que els HSPG haurien d'estar presents en la mateixa membrana de la cèl·lula receptora. Aquest fet s'ha associat a models en que la proteïna central dels HSPG està implicada en la resposta cel·lular induïda pel lligand. En un model de co-senyalització es requereix la interacció simultània del lligand amb els HSPG i el receptor funcional per permetre el "clustering" de la proteïna central del proteoglicà i el receptor funcional a prop l'un de l'altre. Aquest "clustering" facilitaria el reclutament de molècules co-senyalitzadores a través de la cua citoplasmàtica dels HSPG (Rapraeger *et al.*, 1998). En aquest sentit, s'ha descrit que syndecan-2 (un tipus de proteïna central del proteoglicà) està implicat en la unió del factor MCSF (macrophage colony stimulating factor) als osteoblasts, actuant com a co-receptor funcional modulant l'activitat mitogènica i senyalitzadora d'aquesta citoquina (Volk, 1999). Finalment, s'ha descrit que el domini extracel·lular de syndecan-1 pot ser processat proteolíticament per MMPs en resposta a una gran varietat de estímuls fisiològics i estrès. (Wang *et al.*, 2005). Aquest processament converteix syndecan-1 d'un coreceptor unit a membrana a un efector soluble capaç d'unir els mateixos lligands.

Durant les modificacions post-traduccionals dels HSPGs, es genera una gran diversitat d'estructures pel que fa als motius heparan sulfat. S'ha postulat que aquesta diversitat podria tenir un paper clau en diversos processos biològics (Vanpouille *et al.*, 2004). Per tant, no podem descartar que la presència de uns determinats motius heparan sulfats en les cèl·lules del túbul proximal fos la responsable de la especificitat que mostra la CsA per a aquestes cèl·lules durant la nefrotoxicitat.

En conjunt els resultats aportats en aquesta tesi mostren que en les cèl·lules PKSV-PCT3, el tractament amb CsA produeix diferents efectes, alguns implicats en la mort cel·lular i d'altres probablement en la supervivència. En aquest sentit, el EGFR s'erigeix com a un element central en la senyalització cel·lular en el que convergeixen multitud d'estímuls i del que en resulten diferents respostes fisiològiques, i és possible que el balanç entre aquests efectes dicti el destí de la cèl·lula. El fet que la CsA pugui induir multitud de respostes en un sol tipus cel·lular, ens dona una idea de la complexitat

de la patogènesi de la nefrotoxicitat crònica per CsA si es té en compte la totalitat del ronyó. A més a més, els nostres resultats mostren que en el nostre model cel·lular, gran part dels efectes de la CsA impliquen una etapa extracel·lular i per tant molt probablement un mecanisme autocrí/paracrí. Les cèl·lules del túbul proximal respondrien així al tractament amb CsA secretant diversos factors. Aquests, al seu torn, podrien actuar de forma autocrina sobre les pròpies cèl·lules epitelials tubulars en diversos processos que inclourien el propi dany, el rescat o la reparació enfront aquest dany, o una hipotètica transició epiteli-mesenquimal. A nivell renal, aquests factors, podria estar actuant a més a més de forma paracrina sobre altres tipus cel·lulars, com per exemple els fibroblasts, modulant-ne l'activitat. Així, per exemple, la CypB secretada en resposta a CsA, independentment de que pugui participar o no en la toxicitat de les cèl·lules del túbul proximal, podria actuar com a quimioquina reclutant limfòcits pro-inflamatoris que participarien en la fibrogènesi.

Així doncs, la nefrotoxicitat per CsA podria resultar de la combinació de diversos efectes que inclourien el dany directe sobre les cèl·lules tubulars i la progressió de la fibrosi intersticial. Aquesta última podria ser el resultat de l'alliberació paracrina de factors profibròtics combinada amb una transició epiteli mesenquimal de les cèl·lules del túbul proximal. La nefrotoxicitat seria causada per una pèrdua de funció epitelial de les cèl·lules del túbul proximal, deguda o bé a la mort directa d'aquestes cèl·lules, o deguda a una transició d'aquestes cèl·lules cap a un fenotip no epitelial. En aquest sentit, l'estudi i identificació dels components secretats en resposta a CsA per les cèl·lules epitelials del túbul proximal i la seva implicació en una o altre funció podria permetre fer un gran avanç en el tractament de la nefrotoxicitat crònica per CsA.

CONCLUSIONS

1. La Ciclosporina A (CsA) és tòxica per a les cèl·lules PKSV-PCT3 (PCT3) de manera dosi i temps resposta. Dosis de 5 µg/ml aturen la proliferació cel·lular mentre que dosis 25 µg/ml causen toxicitat i mort cel·lular per necrosi. La pèrdua de la viabilitat va acompanyada per canvis en la morfologia de les cèl·lules i per pèrdua de l'adhesió cel·lular.
2. El tractament amb CsA indueix l'activació de la via Raf-MEK-ERK per un mecanisme independent de Ras. L'activació de ERK en resposta a CsA és dependent de la generació de ROS. Ni l'augment en els nivells de ROS ni la consegüent activació de ERK estan implicats en la toxicitat per CsA en cèl·lules PCT3.
3. El tractament amb CsA indueix l'activació de diferents isoformes de PI3K per un mecanisme independent de ROS. Per un costat CsA activa la via convencional PI3K 110α que duu a l'activació de PKB i que no està implicada en la toxicitat, i per altra banda la CsA activa alguna altre isoforma de PI3K sensible a inhibidors de PI3K i que és la responsable dels efectes tòxics de la CsA.
4. L'activació de ERK i PKB i la toxicitat en resposta a CsA depenen de l'activitat tirosina quinasa del receptor de EGF (EGFR).
5. Les metal·loproteïnases de matriu (MMPs) participen en l'activació de ERK i PKB i en la toxicitat cel·lular en resposta a CsA. Aquestes MMPs actuen en diferents etapes durant l'activació de ERK i PKB.
6. El medi condicionat de cèl·lules tractades amb CsA (CsA-CM) és capaç d'induir l'activació de ERK i PKB i la toxicitat cel·lular. La inhibició de la via secretora bloca l'activació de ERK i PKB en resposta a CsA però no en resposta a CsA-CM. Aquest fet suggereix la participació de un mecanisme autocrí/paracrí en els efectes de la CsA.
7. Les cinètiques d'activació de PKB i ERK en resposta a CsA són diferents. L'activació de ERK en resposta a CsA és més retardada que l'activació de PKB. Així mateix, calen exposicions més prolongades a CsA per obtenir un medi condicionat amb capacitat d'activar ERK que per activar PKB.
8. El tractament amb CsA promou la secreció de la ciclofilina B (CypB). La immunodepleció de CypB dels medis condicionats per CsA en disminueix la capacitat d'activar ERK i PKB. Per altra banda, CypB recombinat és molt poc eficaç en activar ERK o PKB o en induir toxicitat.

9. El factor TGF- β no esta implicat en la toxicitat directa o l'activació de ERK i PKB en resposta a CsA en cèl·lules PCT3.
10. El component secretat en resposta a CsA i responsable de la activació de ERK i PKB i de la mort cel·lular en resposta a CsA és un factor d'unió a l'heparina. Aquest factor requereix els heparan sulfat proteoglicans (HSPGs) de la superfície cel·lular.

BIBLIOGRAFIA

Agullo G, Gamet-Payrastre L, Manenti S, Viala C, Rémésy C, Chap H, Payrastre B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 1997; **53**: 1649-1657.

Aki T, Mizukami Y, Oka Y, Yamaguchi K, Uemura K, Fujimiya T, Yoshida K. Phosphoinositide 3-kinase accelerates necrotic cell death during hypoxia. *Biochem J* 2001; **358**: 481-487.

Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, Mizukami Y. Phosphoinositide 3- kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene* 2003; **22**: 8529-8535.

Alfonso-Jaume MA, Mahimkar R, Lovett DH. 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* 2004; **380**: 735-747.

Allain F, Boutillon C, Mariller C, Spik G. Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *J Immunol Methods* 1995; **178**: 113-120.

Allain F, Denys A, Spik G. Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line. *J Biol Chem* 1994; **269**: 16537-16540.

Allain F, Denys A, Spik G. Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface. *Biochem J* 1996; **317**: 565-570.

Allain F, Durieux S, Denys A, Carpentier M, Spik G. Cyclophilin B binding to platelets supports calcium-dependent adhesion to collagen. *Blood* 1999; **94**: 976-983.

Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny MC, Durieux S, Spik G. 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* 2002; **99**: 2714-2719.

Amudha G, Josephine A, Varalakshmi P. Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A. *Clin Chim Acta* 2006; **372**:134-139.

Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int* 2003; **63**:401-415.

Anderson R, Van Rensburg CE, Myer MS. Alpha-tocopherol prevents cyclosporin A-mediated activation of phospholipase A2 and inhibition of Na⁺, K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase activity in cultured hamster renal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; **125**:176-183.

Anderson RJ, Ray CJ. Potential autocrine and paracrine mechanisms of recovery from mechanical injury of renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; **274**: 463-472.

Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM, Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: 543-549.

Arany I, Megyesi JK, Reusch JE, Safirstein RL. CREB mediates ERK-induced survival of mouse renal tubular cells after oxidant stress. *Kidney Int* 2005; **68**: 1573-1582.

Arany I. Dual role of the activated epidermal growth factor receptor in renal tubular cells during stress. *Kidney Int* 2008; **73**: 5-7.

Arber, S., Krause, K.H., and Caroni, P. s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J Cell Biol* 1992; **116**: 113-125.

Arcaro A, Zvelebil MJ, Wallasch C, Ullrich A, Waterfield MD, Domin J. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 3817-3830.

Aviezer D, Yayon A. Heparin-dependent binding and autophosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor by heparin-binding EGF-like growth factor but not by EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 12173-12177.

Barber DF, Bartolomé A, Hernandez C, Flores JM, Redondo C, Fernandez-Arias C, Camps M, Rückle T, Schwarz MK, Rodríguez S, Martínez-A C, Balomenos D, Rommel C, Carrera AC. PI3K γ inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* 2005; **11**: 933-935.

Barik S. Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 2889-2900.

Barnard D, Diaz B, Clawson D, Marshall M. Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene* 1998; **17**: 1539-1547.

Beckman JS, Minor RL Jr, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA. Superoxide Dismutase and Catalase conjugated to Polyethylene Glycol increases endothelial enzyme activity and oxidative resistance. *J Biol Chem* 1998; **263**: 6884-6892.

Bennett WM, Burdmann EA, Andoh TF, Houghton DC, Lindsley J, Elzinga LW. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 1994; **9**: 141-145.

Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation. *Transplant Proc* 1996; **28**: 2100-2103.

Bergin E, Levine JS, Koh JS, Lieberthal W. Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **278**: 758-768.

Bierer BE, Somers PK, Wandless PJ, Burakoff SJ, Schreiber SL. Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science* 1990; **250**: 556-559.

Billich A, Winkler G, Aschauer H, Rot A, Peichl P. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1997; **185**:975-980.

Biswas C. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **109**:1026-1034.

Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *Int J Mol Med* 2003; **1**: 229-234.

Borel JF, Feurer C, Gubler HV, and Stahelin H. Biological effect of cyclosporin A: a new anti-lymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; **6**: 468-475.

Borrell-Pagès M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J* 2003; **22**:1114-1124.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.

Bram RJ and Crabtree GR. Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* 1994; **371**: 355-358.

Brazin KN, Mallis RJ, Fulton DB, Andreotti AH. Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 1899-1904.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; **96**:857-868.

Buetler TM, Cottet-Maire F, Krauskopf A, Ruegg UT. Does cyclosporin A generate free radicals? *Trends Pharmacol Sci* 2000; **21**: 288-290.

Bukrinsky MI. Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. *Trends Immunol* 2002; **23**: 323-325.

Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM. Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; **23**: 465-476.

Buss WC, Stepanek J, Queen SA. Association of tissue-specific changes in translation elongation after cyclosporin with changes in elongation factor 2 phosphorylation. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**:1459-69.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; **296**: 1655-1657.

Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002; **41**: 391-412.

Cardenas ME, Sanfridson A, Cutler NS, Heitman J. Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. *TIBTech* 1998; **16**: 427-433.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; **282**: 1318-1321.

Caroni P, Rothenfluh A, McGlynn E, Schneider C. S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J Biol Chem* 1991; **266**: 10739-10742.

Carpentier M, Allain F, Haendler B, Denys A, Mariller C, Benaissa M, Spik G. Two distinct regions of cyclophilin B are involved in the recognition of a functional receptor and of glycosaminoglycans on T lymphocytes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 10990-10998.

Carpentier M, Allain F, Slomianny MC, Durieux S, Vanpouille C, Haendler B, Spik G. Receptor type I and type II binding regions and the peptidyl-prolyl isomerase site of cyclophilin B are required for enhancement of T-lymphocyte adhesion to fibronectin. *Biochemistry* 2002; **41**: 5222-5229.

Cartier N, Lacave R, Vallet V, Hagege J, Hellio R, Robine S, Pringault E, Cluzeaud F, Briand P, Kahn A, et al. Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci* 1993; **104**: 695-704.

Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Remuzzi G. Nephrotoxic aspects of cyclosporine. *Transplant Proc* 2004; **36**: 234S-239S. (Erratum in: *Transplant Proc* 2004; **36**: 790).

Cebrián C, Aresté C, Nicolás A, Olivé P, Carceller A, Piulats J, Meseguer A. Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 29410-29419.

Chiu D, Ma K, Scott A, Duronio V. Acute activation of Erk1/Erk2 and protein kinase B/akt proceed by independent pathways in multiple cell types. *FEBS J* 2005; **272**: 4372-4384.

Choi BK, Choi CH, Oh HL, Kim YK. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in A172 human glioma cells. *Neurotoxicology* 2004; **25**: 915-924.

Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003; **15**: 463-469.

Clements JL, Koretzky GA. Recent developments in lymphocyte activation: Linking Kinases to downstream signaling events. *J Clin Invest* 1999; **103**: 925-929.

Clevenger CV. Nuclear localization and function of polypeptide ligands and their receptors: a new paradigm for hormone specificity within the mammary gland? *Breast Cancer Res* 2003; **5**: 181-187.

Coffman TM, Carr DR, Yarger WE, Klotman PE. Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1987; **43**: 282-285.

Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U. Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays* 2003; **25**: 1085-1095.

Conger JD, Kim GE, Robinette JB. Effects of ANG II, ETA, and TxA2 receptor antagonists on cyclosporin A renal vasoconstriction. *Am J Physiol* 1994; **267**: 443-449.

Countaway JL, Nairn AC, Davis RJ. Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 1129-1140.

Crabtree GR, Clipstone NA. Signal Transduction between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994; **63**: 1045-1083.

Craddock BL, Orchiston EA, Hinton HJ, Welham MJ. Dissociation of apoptosis from proliferation, protein kinase B activation, and BAD phosphorylation in interleukin-3-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 10633-10640.

Crljen V, Volinia S, Banfic H. Hepatocyte growth factor activates phosphoinositide 3-kinase C2 beta in renal brush-border plasma membranes. *Biochem J* 2002; **365**: 791-799.

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996; **379**: 557-560.

Davé V, Childs T, Whitsett JA. Nuclear factor of activated T cells regulates transcription of the surfactant protein D gene (Sftpd) via direct interaction with thyroid transcription factor-1 in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 34578-88.

Davis TR, Tabatabai L, Bruns K, Hamilton RT, Nilsen-Hamilton M. Basic fibroblast growth factor induces 3T3 fibroblasts to synthesize and secrete a cyclophilin-like protein and beta 2-microglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1095**: 145-152.

De Ceuninck F, Allain F, Caliez A, Spik G, Vanhoutte PM. 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* 2003; **48**: 2197-2206.

de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; **35**: 333-346.

Demeule M, Giroux S, Murphy GF, Beliveau R. Cyclosporin treatment alters protein phosphorylation in kidney membranes. *Biochem. Cell Biol* 1994; **72**: 143-151.

Dempsey PJ, Garton K, Raines EW. Emerging roles of TACE as a key protease in ErbB ligand shedding. *Mol Interv* 2002; **2**: 136-141.

Denys A, Allain F, Carpentier M, Spik G. Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes. *Biochem J* 1998; **336**: 689-697.

Denys A, Allain F, Foxwell B, Spik G. Distribution of cyclophilin B-binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes. *Immunology* 1997; **91**: 609-617.

Denys A, Allain F, Masy E, Dessaint JP, Spik G. Enhancing the effect of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of cyclosporine. *Transplantation* 1998; **65**: 1076-1084.

Dethlefsen SM, Raab G, Moses MA, Adam RM, Klagsbrun M, Freeman MR. Extracellular calcium influx stimulates metalloproteinase cleavage and secretion of heparin-binding EGF-like growth factor independently of protein kinase C. *J Cell Biochem* 1998; **69**: 143-153.

Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J* 2002; **21**: 64-71.

Diaz-Rodriguez E, Esparís-Ogando A, Montero JC, Yuste L, Pandiella A. Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem J* 2000; **346**: 359-367.

Domin J, Harper L, Aubyn D, Wheeler M, Florey O, Haskard D, Yuan M, Zicha D. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2beta regulates cell migration by a PtdIns3P dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2005; **205**: 452-462.

Downward J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 33-35.

Doyle V, Virji S, Crompton M. Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem J* 1999; **341**: 127-132.

Duckworth BC, Cantley LC. Conditional inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade by wortmannin. Dependence on signal strength. *J Biol Chem* 1997; **272**: 27665-27670.

El Sheikh SS, Domin J, Tomtitchong P, Abel P, Stamp G, Lalani EN. Topographical expression of class IA and class II phosphoinositide 3-kinase enzymes in normal human tissues is consistent with a role in differentiation. *BMC Clin Pathol* 2003; **3**: 4.

Endrich MM, Gehring H. The V3 loop of human immunodeficiency virus type-1 envelope protein is a high-affinity ligand for immunophilins present in human blood. *Eur J Biochem* 1998; **252**: 441-446.

Esposito C, Fornoni A, Cornacchia F et al. Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* 2000; **58**: 123-130.

Evdonin AL, Guzhova IV, Margulis BA, Medvedeva ND. Extracellular heat shock protein 70 mediates heat stress-induced epidermal growth factor receptor transactivation in A431 carcinoma cells. *FEBS Lett* 2006; **580**: 6674-6678.

Fan Z, Lu Y, Wu X, et al: Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 27595-27602.

Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 2003; **6**: 1203-1208.

Fornoni A, Cornacchia F, Howard GA, Roos BA, Striker GE, Striker LJ. Cyclosporin A affects extracellular matrix synthesis and degradation by mouse MC3T3-E1 osteoblasts in vitro. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**: 500-505.

Foukas LC, Shepherd PR. eIF4E binding protein 1 and H-Ras are novel substrates for the protein kinase activity of class-I phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **319**: 541-549.

Fox DS, Heitman J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. *BioEssays* 2002; **24**: 894-903.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; **88**: 435-437.

Frapier JM, Choby C, Mangoni ME, Nargeot J, Albat B, Richard S. Cyclosporin A increases basal intracellular calcium and calcium responses to endothelin and vasopressin in human coronary myocytes. *FEBS Letters* 2001; **493**: 57-62.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; **124**: 619-626.

Gaido ML, Cidlowski JA. Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18580-18585.

Galat A, Bouet F. Cyclophilin-B is an abundant protein whose conformation is similar to cyclophilin-A. *FEBS Lett* 1994; **347**: 31-36.

Galletti P, Di Gennaro CI, Migliardi V, Indaco S, Della Ragione F, Manna C, Chiodini P, Capasso G, Zappia V. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 1551-1558.

Garcia R, Dhillon AD, Kolch W. Raf Kinases: A small family with wide ramifications. *Recent Res Devel Mol Cell Biol* 2002; **3**: 87-112.

García Z, Kumar A, Marqués M, Cortés I, Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J* 2006; **25**: 655-661.

Ginsberg DJ. Cyclosporine A: A double-edged sword. *J Lab Clin Med* 1991; **118**: 5-6.

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995; **1**: 1311-1318.

González-Cuadrado S, Bustos C, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Guisjarro C, Plaza JJ, Egido J. Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1996; **106**: 518-522.

Gordjani N, Epting T, Fischer-Riepe P, Greger RF, Brandis M, Leipziger J, Nitschke R. Cyclosporin-A-induced effects on the free calcium concentration in LLC-PK1-cells and their mechanisms. *Eur J Physiol* 2000; **439**: 627-633.

Göthel SF, Marahiel MA. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 423-436.

Gschwind A, Zwick E, Prenzel N, Leserer M, Ullrich A. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 2001; **13**: 1594-1600.

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4138-4142.

Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* 1998; **8**: 1195-1198.

Hamilton GS, Steiner JP. Immunophilins: beyond immunosuppression. *J Med Chem* 1998; **41**: 5119-5143.

Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1697**: 3-16.

Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984; **226**: 544-547.

Hanoulle X, Melchior A, Sibille N, Parent B, Denys A, Wieruszeski JM, Horvath D, Allain F, Lippens G, Landrieu I. Structural and functional characterization of the interaction between cyclophilin B and a heparin-derived oligosaccharide. *J Biol Chem* 2007; **282**: 34148-34158.

Harada K, Truong AB, Cai T, Khavari PA. The class II Phosphoinositide 3-kinase C2 β is not essential for epidermal differentiation. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 11122-11130.

Haug C, Grill C, Schmid-Kotsas A, Gruenert A, Jehle PM. Endothelin release by rabbit proximal tubule cells: modulatory effects of cyclosporine A, tacrolimus, HGF and EGF. *Kidney Int* 1998; **54**: 1626-1636.

Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan M. Apoptosis and necrosis: Mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Int* 1998; **54**: 1955-1966.

Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X. Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 1995; **2**: 461-472.

Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999; **397**: 530-534.

Hong F, Lee J, Song JW, Lee SJ, Ahn H, Cho JJ, Ha J, Kim SS. 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* 2002; **16**: 1633-1635.

Hrabec E, Naduk J, Strek M, Hrabec Z. Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors. *Postepy Biochem* 2007; **53**: 37-45.

Hunter T. Prolyl isomerases and nuclear function. *Cell* 1998; **92**: 141-143.

Ishikawa Y, Kitamura M. Dual potential of extracellular signal regulated kinase for the control of cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 696-701.

Itabashi H, Maesawa C, Oikawa H, Kotani K, Sakurai E, Kato K, Komatsu H, Nitta H, Kawamura H, Wakabayashi G, Masuda T. Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatol Res* 2008; **38**: 601-613.

Jennings P, Koppelstaetter C, Aydin S, Abberger T, Wolf AM, Mayer G, Pfaller W. Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: 831-838.

Jimenez C, Hernandez C, Pimentel B, Carrera AC. The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem* 2002; **277**: 41556-41562.

Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, Field MJ, Pollock CA. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. *Kidney Int* 1998; **54**: 747-757.

Johnson DW, Saunders HJ, Johnson FJ, Huq SO, Field MJ, Pollock CA. Cyclosporin exerts a direct fibrogenic effect on human tubulointerstitial cells: roles of insulin-like growth factor I, transforming growth factor beta1, and platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **289**: 535-542. (a)

Johnson DW, Saunders HJ, Johnson FJ, Huq SO, Field MJ, Pollock CA. Fibrogenic effects of cyclosporin A on the tubulointerstitium: role of cytokines and growth factors. *Exp Nephrol* 1999; **7**: 470-478. (b)

Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol* 2005; **79**: 12692-12702.

Kahan BD. Cyclosporin: The base for immunosuppressive therapy-present and future. *Transplant Proc* 1993; **25**: 508-510.

Kainer DB, Doris PA. Cyclophilin B expression in renal proximal tubules of hypertensive rats. *Hypertension* 2000; **35**: 958-964.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999; **9**: 601-604.

Kansra S, Stoll SW, Johnson JL, Elder JT. Src family kinase inhibitors block amphiregulin-mediated autocrine ErbB signaling in normal human keratinocytes. *Mol Pharmacol* 2005; **67**: 1145-1157.

Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Phunpae P. CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunology* 1999; **96**: 184-192.

Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Yamashita K, Ninomiya M, Morisaki I, Ohsaki Y, Kido JI, Nagata T. Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell Physiol* 2000; **182**: 351-358.

Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosenpud JD. Transforming growth factor (TGF)- β mimics and Anti-TGF- β antibody abrogates the in vivo effects of cyclosporine:

Demonstration of a Direct Role of TGF- β in Immunosuppression and Nephrotoxicity of Cyclosporine. *Transplantation* 1999; **67**: 882-889.

Kiefhaber T, Quaas R, Hahn U, Schmid FX. Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry* 1990; **29**: 3053-3061.

Kiely B, Feldman G, Ryan MP. Modulation of renal epithelial barrier function by mitogen-activated protein kinases (MAPKs): Mechanism of cyclosporine A-induced increase in transepithelial resistance. *Kidney Int* 2003; **63**: 908-916.

Kim SJ, Kahn CR. Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. *Biochem J* 1997; **323**: 621-627.

Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J. Role of Angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1995; **26**: 141-146.

Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992; **116**: 1071-1080.

Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med* 2002; **4**: 1-18.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; **351**: 289-305.

Konturek JW, Brzozowski T, Konturek SJ. Epidermal growth factor in protection, repair, and healing of gastroduodenal mucosa. *J Clin Gastroenterol* 1991; Suppl **1**: S88-97.

Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1990; **1**: 162-179.

Lacave R, Bens M, Cartier N, Vallet V, Robine S, Pringault E, Kahn A, Vandewalle A. Functional properties of proximal tubule cell lines derived from transgenic mice harboring L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci* 1993; **104**: 705-712.

Lally C, Healy E, Ryan M. Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int* 1999; **56**: 1254-1257.

Lane-Guermonprez L, Morot-Gaudry-Talarmain Y, Meunier FM, O'Regan S, Onofri F, Le Caer JP, Benfenati F. Synapsin associates with cyclophilin B in an ATP- and cyclosporin A-dependent manner. *J Neurochem* 2005; **93**: 1401-1411.

Le Hir M, Su Q, Weber L, Woerly G, Granelli-Piperno A, Ryffel B. In situ detection of cyclosporin A: evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins. *Lab Invest* 1995; **73**: 727-733.

Lea JP, Sands JM, McMaon SJ, Tumlin JA. Evidence that the inhibition of Na/K/ATPase activity by FK506 involves calcineurin. *Kidney Int* 1994; **46**: 647-652.

Lee DB. Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int* 1997; **52**: 248-260.

Lee SB, Cho ES, Yang HS, Kim H, Um HD. Serum withdrawal kills U937 cells by inducing a positive mutual interaction between reactive oxygen species and phosphoinositide 3-kinase. *Cell Signal* 2005; **17**: 197-204.

LeGrue SJ, Friedman AW, Kahan BD. Binding of cyclosporine by human lymphocytes and phospholipid vesicles. *J Immunol* 1983; **131**: 712-718.

Li B, Sehajpal PK, Khanna A, Vlassara H, Cerami A, Stenzel KH, Suthanthiran M.J. Differential regulation of transforming growth factor beta and interleukin 2 genes in human T cells: demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. *Exp Med* 1991; **174**: 1259-1262.

Liao DF, Jin ZG, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, Berk BC. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 189-196.

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; **66**: 807-815

Liu ZM, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, Shum CK, van Hasselt CA. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 1428-1436.

Llorens F, Miró FA, Casañas A, Roher N, Garcia L, Plana M, Gómez N, Itarte E. Unbalanced activation of ERK1/2 and MEK1/2 in apigenin-induced HeLa cell death. *Exp Cell Res* 2004; **299**: 15-26.

Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005; **7**: 575-589.

Lodish HF, Kong N. Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14835-14838.

Lohi J, Kähäri VM, Keski-Oja J. Cyclosporin A enhances cytokine and phorbol ester-induced fibroblast collagenase expression. *J Invest Dermatol* 1994; **102**: 938-944.

Lohse DL, Linhardt RJ. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *J Biol Chem* 1992; **267**: 24347-24355.

López-Ongil S, Hernández-Perera O, Navarro-Antolín J, Pérez de Lema G, Rodríguez-Puyol M, Lamas S, Rodríguez-Puyol D. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1998; **124**: 447-454.

Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 1993; **73**: 1067-1078.

Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 4637-4644.

Mariller C, Allain F, Kouach M, Spik G. Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1293**: 31-38.

Massagué J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**: 515-541.

Massagué J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; **6**: 597-641.

Matsuda S, Shibasaki F, Takehan K, Mori H, Nishida E, Koyasu S. Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep* 2000; **1**: 428-434.

Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 2002; **27**: 462-467.

McCaffrey TA, Falcone DJ, Du B. Transforming growth factor-beta 1 is a heparin-binding protein: identification of putative heparin-binding regions and isolation of heparins with varying affinity for TGF-beta 1. *J Cell Physiol* 1992; **152**: 430-440.

McCole DF, Truong A, Bunz M, Barrett KE. Consequences of direct versus indirect activation of epidermal growth factor receptor in intestinal epithelial cells are dictated by protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 2007; **282**: 13303-13315.

McCormick F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 1993; **363**: 15-6.

Mead JC, Brown PA, Whiting PH. The relationship between total kidney cyclosporin A concentrations, trough drug levels and renal function in the rat following withdrawal of treatment. *Hum Exp Toxicol* 1994; **13**: 506-511.

Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 4456-4469.

Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Morphology of cyclosporin nephrotoxicity in the rat. *Clin Nephrol* 1986; **25**: S2-S8.

Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of cyclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998; **49**: 356-363.

Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Cyclosporine nephrotoxicity. *Adv Nephrol* 1998; **17**: 303.

Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986; **261**: 11398-11403.

Miyamoto T, Fox JC. Autocrine signaling through Ras prevents apoptosis in vascular smooth muscle cells in vitro. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2825- 2830.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; **93**: 215-228.

Montague JW, Gaido ML, Frye C, Cidlowski JA. A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18877-18880.

Montague JW, Hughes FM Jr, Cidlowski JA. 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* 1997; **272**: 6677-6684.

Moodie SA, Wolfman A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet* 1994; **10**: 44-48.

Morris SM, Kepka-Lenhart D, McGill RL, Curthos NP and Adler S. Specific Disruption of renal function and gene transcription by cyclosporin A. *J Biol Chem* 1992; **267**: 13768-13771.

Moz Y, Levi R, Lavi-Moshayoff V, Cox KB, Molkenin JD, Silver J, Naveh-Many T. Calcineurin Abeta is central to the expression of the renal type II Na/Pi co-transporter gene and to the regulation of renal phosphate transport. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2972-2980.

Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perltroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 1984; **311**: 699-705.

Nagata T, Kishi H, Liu QL, Yoshino T, Matsuda T, Jin ZX, Murayama K, Tsukada K, Muraguchi A. Possible involvement of cyclophilin B and caspase-activated deoxyribonuclease in the induction of chromosomal DNA degradation in TCR-stimulated thymocytes. *J Immunol* 2000; **165**: 4281-4289.

Nast CC, Adler SG, Artishevsky A, Kresser CT, Ahmed K, Anderson PS. Cyclosporine induces elevated procollagen $\alpha 1$ (I) mRNA levels in the rat renal cortex. *Kidney Int* 1991; **39**: 631-638.

Nishida M, Ogawa H, Tamai M, Ishiwari K, Hamaoka K. Role of hydrogen peroxide in cyclosporine-induced renal tubular cell (LLC-PK1) injury. *J Pharmacol Sci* 2003; **91**: 255-258.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; **366**: 2-16.

Okano J, Gaslightwala I, Birnbaum MJ, Rustgi AK, Nakagawa H. Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 30934-30942.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; **19**: 3159-3167.

Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 2001; **7**: 384-389.

Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 7242-7251.

Ouar Z, Solé E, Bens M, Rafestin-Oblin ME, Meseguer A, Vandewalle A. Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immortalized mouse proximal tubule cells. Technical note. *Kidney Int* 1998; **53**: 59-66.

Owens-Grillo JK, Hoffmann K, Hutchison KA, Yem AW, Deibel MR Jr, Handschumacher RE, Pratt WB. The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20479-20484.

Pakula R, Melchior A, Denys A, Vanpouille C, Mazurier J, Allain F. Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* 2007; **17**: 492-503.

Parra Cid T, Conejo García JR, Carballo Alvarez F, de Arriba G. Antioxidant nutrients protect cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology* 2003; **189**: 99-111.

Paslaru L, Trigon S, Kuhlmann M, Morange M. MAP kinase activation by cyclosporine A. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **236**: 599-603.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 2004; **118**: 375-387.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; **86**: 747-803.

Pérez de Lema G, Arribas I, Prieto A, Parra T, de Arriba G, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M. Cyclosporin A-induced hydrogen peroxide synthesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life Sci* 1998; **62**: 1745-1753.

Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzzi G. Functional significance of exaggerated renal thromboxane A₂ synthesis induced by cyclosporin A. *Am J Physiol* 1986; **251**: 581-587.

Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1990; **1**: 76-83.

Pierce KL, Tohgo A, Ahn S, Field ME, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23155-23160.

Pietrangelo A, Grandi R, Tripodi A, Tomasi A, Ceccarelli D, Ventura E, Masini A. Lipid composition and fluidity of liver mitochondria, microsomes and plasma membrane of rats with chronic dietary iron overload. *Biochem Pharmacol* 1990; **39**: 123-128.

Pirola L, Zvelebil MJ, Bulgarelli-Leva G, Van Obberghen E, Waterfield MD, Wymann MP. Activation loop sequences confer substrate specificity to phosphoinositide 3-kinase alpha (PI3Kalpha). Functions of lipid kinase-deficient PI3Kalpha in signaling. *J Biol Chem* 2001; **276**: 21544-21554.

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 2002; **64**: 755-763.

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999; **402**: 884-888.

Price ER, Jin M, Lim D, Pati S, Walsh CT, McKeon FD. Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 3931-3935.

Price ER, Zydowsky LD, Jin MJ, Baker CH, McKeon FD, Walsh CT. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 1903-1907.

Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, Yurchenko V, Tang H, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 6360-6365.

Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* 2004; **303**: 1179-1181.

Rapraeger AC, Ott VL. Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 620-628.

Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Muller GA, Colasanti G, D'Amico G: Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* 2002, **62**: 137–146.

Roelle S, Grosse R, Aigner A, Krell HW, Czubayko F, Gudermann T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 2003; **278**: 47307-47318.

Rühlmann A, Nordheim A. Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology* 1997; **198**: 192-206.

Ruiz P, Coffman TM, Klotman PE, Sanfilippo F. Association of chronic thromboxane inhibition with reduced in situ cytotoxic T cell activity in rejecting rat renal allografts. *Transplantation* 1989; **48**: 660-666.

Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997; **52**: 1497-1510.

Rusnak F, Mertz, P. Calcineurin: form and function. *Physiol Review* 2000; **80**: 1483-1452.

Rycyzyn MA, Clevenger CV. The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 6790-6795.

Rycyzyn MA, Reilly SC, O'Malley K, Clevenger CV. Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 1175-1186.

Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 2004; **164**: 769-779.

San José E, Benguría A, Geller P, Villalobo A. Calmodulin inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 15237-15245.

Sarno S, de Moliner E, Ruzzene M, Pagano MA, Battistutta R, Bain J, Fabbro D, Schoepfer J, Elliott M, Furet P, Meggio F, Zanotti G, Pinna LA. Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem J* 2003; **374**: 639-646.

Sarró E, Tornavaca O, Plana M, Meseguer A, Itarte E. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death. *Kidney Int* 2008; **73**: 77-85.

Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Involvement of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in the MEK/MAPK signal transduction pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**: 33759-33767.

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2435-2444.

Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 2000; **6**: 743-750.

Schnabel FR, Wait RB, Kahng KU. The relationship of urinary thromboxane excretion to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1991; **51**: 686-689.

Schneider H, Charara N, Schmitz R, Wehrli S, Mikol V, Zurini MGM, Questiaux VFJ, Movva NR. Human cyclophilin C: primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins. *Biochemistry* 1994; **33**: 8218-8224.

Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991; **251**: 283-287.

Shack S, Wang XT, Kokkonen GC, Gorospe M, Longo DL, Holbrook NJ. Caveolin-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway increases arsenite cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2407-2414.

Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Noble NA, Border WA, Franceschini N, Bennett WM. Role of transforming growth factor-beta 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1996; **49**: 1141-1151.

Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Choi SO, Andoh TF. Sirolimus increases transforming growth factor-beta1 expression and potentiates chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2004; **65**: 1262-1271.

Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int* 1999; **56**: 2147-2159.

Sigal NH, Dumont F, Durette P, Siekierka JJ, Peterson L, Rich DH, Dunlap BE, Staruch MJ, Melino MR, Koprak SL, et al. Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A? *J Exp Med* 1991; **173**: 619-628.

Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 2005; **17**: 1183-1193.

Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 2005; **167**: 395-407.

Smith T, Ferreira LR, Hebert C, Norris K, Sauk JJ. 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* 1995; **270**: 18323-18328.

Solorzano CC, Ksontini R, Pruitt JH, Auffenberg T, Tannahill C, Galardy RE, Schultz GP, MacKay SL, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. A matrix metalloproteinase inhibitor prevents processing of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and abrogates endotoxin-induced lethality. *Shock* 1997; **7**: 427-431.

Spik G, Haendler B, Delmas O, Mariller C, Chamoux M, Maes P, Tartar A, Montreuil J, Stedman K, Kocher HP, et al. A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J Biol Chem* 1991; **266**: 10735-10738.

Spillmann D, Witt D, Lindahl U. Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J Biol Chem* 1998; **273**: 15487-15493.

Stefanelli C, Tantini B, Fattori M, Stanic' I, Pignatti C, Clo C, Guarnieri C, Caldarera CM, Mackintosh CA, Pegg AE, Flamigni F. Caspase activation in etoposide-treated fibroblasts is correlated to ERK phosphorylation and both events are blocked by polyamine depletion. *FEBS Lett* 2002; **527**: 223– 228.

Steinmann B, Bruckner P, Superti-Furga A. Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1299-1303.

Strutz F, Muller GA: Transdifferentiation comes of age. *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15**: 1729–1731.

Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1359-1368.

Sullivan KM, Rubin GM. The Ca(2+)-calmodulin-activated protein phosphatase calcineurin negatively regulates EGF receptor signaling in Drosophila development. *Genetics* 2002; **161**: 183-193.

Sun BK, Li C, Lim SW, Choi BS, Lee SH, Kim IS, Kim YS, Bang BK, Yang CW. Blockade of angiotensin II with losartan attenuates transforming growth factor-beta1 inducible gene-h3 (betaig-h3) expression in a model of chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Nephron Exp Nephrol* 2005; **99**: 9-16.

Sun H, Chen Z, Poppleton H, Scholich K, Mullenix J, Weipz GJ, Fulgham DL, Bertics PJ, Patel TB. The juxtamembrane, cytosolic region of the epidermal growth factor receptor is involved in association with alpha-subunit of Gs. *J Biol Chem* 1997; **272**: 5413-5420.

Sunnarborg SW, Hinkle CL, Stevenson M, Russell WE, Raska CS, Peschon JJ, Castner BJ, Gerhart MJ, Paxton RJ, Black RA, Lee DC. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12838-12845.

Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, Klagsbrun M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31730-31737.

Suzuki S, Oka T, Okhuma S, Kuriyama K. Biochemical mechanisms underlying cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Transplantation* 1987; **44**: 363–368.

Tebar F, Lladó A, Enrich C. Role of calmodulin in the modulation of the MAPK signalling pathway and the transactivation of epidermal growth factor receptor mediated by PKC. *FEBS Lett* 2002; **517**: 206-210.

Tegeder I, Schumacher A, John S, Geiger H, Geisslinger G, Bang H, Brune K. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *J Clin Immunol* 1997; **17**: 380-386.

Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Federici P, Grimber G, Briand P, Friedlander G. Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest* 2000; **106**: 225-234.

Toback FG, Walsh-Reitz MM, Mendley SR, Kartha S. Kidney epithelial cells release growth factors in response to extracellular signals. *Pediatr Nephrol* 1990; **4**: 363-371.

Tobar N, Cáceres M, Santibáñez JF, Smith PC, Martínez J. RAC1 activity and intracellular ROS modulate the migratory potential of MCF-7 cells through a NADPH oxidase and NFkappaB-dependent mechanism. *Cancer Lett* 2008; **267**: 125-132.

Traer CJ, Foster FM, Abraham SM, Fry MJ. Are class II phosphoinositide 3-kinases potential targets for anticancer therapies? *Bull Cancer* 2006; **93**: 53-58.

Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003; **2003**: RE5.

Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 2001; **276**: 16484-16490.

Tropschug M, Barthelmess IB, Neupert W. Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 1989; **342**: 953-955.

Tumlin JA. Expression and function of calcineurin in mammalian nephron: Physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am J Kidney Dis* 1997; **30**: 884-895.

Tumlin JA, Sands JM. Nephron segment specific inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity by cyclosporins A. *Kidney Int* 1993; **43**: 246-251.

Tumova S, Woods A, Couchman JR. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; **32**: 269-288.

Uchiyama-Tanaka Y, Matsubara H, Mori Y, Kosaki A, Kishimoto N, Amano K, Higashiyama S, Iwasaka T. Involvement of HB-EGF and EGF receptor transactivation in TGF-beta-mediated fibronectin expression in mesangial cells. *Kidney Int* 2002; **62**: 799-808.

van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13150-13156.

Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; **346**: 561-576.

Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 4330-4335.

Vanpouille C, Denys A, Carpentier M, Pakula R, Mazurier J, Allain F. Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate. *Biochem J* 2004; **382**: 733-740.

Volk R, Schwartz JJ, Li J, Rosenberg RD, Simons M. The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 1999; **274**: 24417-24424.

von Willebrand E, Hayry P. Cyclosporin-A deposits in renal allografts. *Lancet* 1983; **2**: 189-192.

Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin CG, Horvath JS, Tiller DJ. Cyclosporin A inhibits protein Kinase C activity: a contributing mechanism in the development of nephrotoxicity? *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **160**: 409-415.

Wang C and Salahudeen AK. Cyclosporine nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant-inhibitor of lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo*. *Transplantation* 1994; **58**: 940-946.

Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 39435-39443.

Wang Z, Götte M, Bernfield M, Reizes O. Constitutive and accelerated shedding of murine syndecan-1 is mediated by cleavage of its core protein at a specific juxtamembrane site. *Biochemistry* 2005; **44**: 12355-12361.

Weber JR, Bell GM, Han MY, Pawson T, Imboden JB. Association of the tyrosine kinase LCK with phospholipase C-g1 after stimulation of the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 1992; **176**: 373-379.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10079-10086.

Wilson PD, Hartz PA. Mechanisms of cyclosporine A toxicity in defined cultures of renal tubule epithelia: a role for cysteine proteases. *Cell Biol Int Rep* 1991; **15**: 1243-1258.

Wilson PD, Hreniuk D. Nephrotoxicity of cyclosporin in renal tubule cultures and attenuation by calcium restriction. *Transplant Proc* 1988; **20**: 709-711.

Wolf A, Trendelenburg C F, Diez-Fernandez C, *et al*. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280**: 1328-1334.

Wolf G, Thaiss F, Stahl RA. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells: possible mechanism of cyclosporine's antiproliferative effects. *Transplantation* 1995; **60**: 237-241.

Wolf G, Neilson EG. Increases in levels of collagen types I and IV messenger ribonucleic acid in murine kidneys after treatment with cyclosporin. *Nephron* 1992; **60**: 87-91.

- Woodgett JR. Fos and jun: two into one will go. *Semin Cancer Biol.* 1990 Dec; **1**: 389-97.
- Wymann MP, Marone R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 141-149.
- Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1436**: 127-150.
- Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling-which way to target? *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; **24**: 366-376.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; **270**: 1326–1331.
- Yang J, Liu Y: Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1465–1475.
- Yang WM, Inouye CJ, Seto E. Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity. *J Biol Chem* 1995; **270**: 15187-15193.
- Yao Q, Li M, Yang H, Chai H, Fisher W, Chen C. Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems. *World J Surg* 2005; **29**: 276-280.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991; **64**: 841-848.
- Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **288**: 786-788.
- Yurchenko V, Pushkarsky T, Li JH, Dai WW, Sherry B, Bukrinsky M. Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain. *J Biol Chem* 2005; **280**: 17013-17019.
- Zeng F, Singh AB, Harris RC. The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology. *Exp Cell Res* 2008; Doi: 10.1016/j.yexcr.2008.08.005

Zhang J, Herscovitz H. 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* 2003; **278**: 7459-7468.