



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Vall d'Hebron
Institut de Recerca



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE LA KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN (KAP)

Tesis presentada por:

Antoni Cuevas Alcalá

Para optar al grado de doctor en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina

Tesis inscrita en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la
Universidad Autónoma de Barcelona y realizada en el grupo de
Fisiopatología Renal del CIBBIM-Nanomedicina/Institut de Recerca Vall
d'Hebron (VHIR) bajo la dirección de la Dra. Anna Meseguer Navarro

Dra. Anna Meseguer Navarro

Antoni Cuevas Alcalá

Barcelona, febrero 2022

[Escriba aquí]

Agradecimientos

La escritura de la presente tesis ha sido posible por la ayuda incondicional de dos mujeres.

La primera, mi compañera en la vida, Noemí. Sin su apoyo incondicional en los numerosos malos momentos hubiera sido imposible la escritura de esta tesis. A ella debo la fuerza y determinación para poder realizarlo.

La segunda, mi tutora y directora de tesis, Ana Meseguer. Cuando le propuse rescatar mi tesis doctoral después de 10 años en el olvido ella accedió de forma inmediata e incondicional en ayudarme. Agradezco muchísimo su gesto y todo su tiempo, ya que, después de mis antecedentes de abandono, lo más normal es haberme encontrado una negativa.

Por ultimo no quisiera olvidarme de mis compañeros de laboratorio Beatriz Bardají, Conxi Jacobs, Eduard Sarrò y Joan López de Hellín. Gracias a ellos recuerdo con mucho cariño mi etapa en el laboratorio, donde fueron fundamentales las reuniones post jornada, que casualmente solían ser en algún bar y acompañada de alguna cerveza.

"En la ciencia suele ocurrir que un científico diga: "Es un buen argumento, yo estaba equivocado", que cambie de opinión y desde ese momento no se vuelva a mencionar la antigua posición. Realmente sucede. Aunque no con la frecuencia que debería suceder, ya que los científicos son humanos y el cambio a veces es doloroso, pero ocurre cada día. No recuerdo la última vez que algo así pasó en política o religión".

Carl Sagan, sobre la necesidad del cambio y la autocrítica

Índice

ABREVIACIONES.....	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El Riñón.....	6
1.1.1. Anatomía general.....	6
1.1.2. La Nefrona	7
1.1.3. Aspectos funcionales	9
1.1.4. El Túbulo Proximal	13
1.2. El riñón murino como modelo de estudio de la acción androgénica	16
1.2.1. Hormonas Esteroideas.....	16
1.2.2. Andrógenos.....	18
1.2.3. Dimorfismo sexual del riñón	24
1.3. KAP (Kidney Androgen-regulated Protein)	33
1.3.1. Estructura del gen de la KAP y localización cromosómica.....	33
1.3.2. El mRNA de KAP.....	34
1.3.3. Regulación multihormonal del gen de la KAP	37
1.3.4. La proteína deducida de KAP.....	42
1.3.5. Localización y regulación de la proteína KAP	44
1.3.6. La Ciclofilina B: Una proteína de unión a KAP	46
1.3.7. La KAP en otras situaciones fisiopatológicas.....	53
1.3.8. Homólogos de la KAP en otras especies	61
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
2.1. Hipótesis	64
2.2. Objetivos.....	65
2.2.1. Objetivo general	65
2.2.2. Objetivos específicos.....	65
3. MATERIALES Y MÉTODOS	66
3.1. Materiales.....	67
3.1.1. Material Genético.....	67

3.1.1.1.	Kidney Androgen-regulated Protein (KAP).....	67
3.1.1.2.	Ciclofilina B (Homo Sapiens).....	68
3.1.1.3.	Ciclofilina B (Mus Musculus)	69
3.1.2.	<i>Plásmidos</i>	70
3.1.2.1.	pLysS.....	70
3.1.2.2.	pCR®II-TOPO®	71
3.1.2.3.	pET-14b	72
3.1.2.4.	pGEX-6P-1.....	73
3.1.2.5.	Plásmidos del Kit InterPlay Adenoviral TAP System	74
3.1.3.	<i>Líneas celulares</i>	77
3.1.3.1.	PKSV-PCT3	77
3.1.3.2.	HK2	78
3.1.3.3.	AD-293.....	80
3.1.4.	<i>Bacterias</i>	81
3.1.4.1.	E. Coli BL21 (DE3) pLysS.....	81
	One-shot® TOP 10	81
3.1.4.2.	BJ5183-AD-1	82
3.1.4.3.	XL10-Gold ultracompetent cells	82
3.1.4.4.	Medios de cultivo para bacterias	82
3.1.5.	<i>Buffers</i>	83
3.1.5.1.	Buffer homogeneizado tejido.....	83
3.1.5.2.	Buffer homogeneizado tejido “A”	83
3.1.5.3.	Buffer lisis células BL21 (DE3).....	84
3.1.5.4.	Buffer lisis células BL21 (DE3) DUET.....	84
3.1.5.5.	Buffer lisis E. Coli	86
3.1.5.6.	Buffer lisis E. Coli NETN	86
3.1.5.7.	Buffer digestión trombina	87
3.1.5.8.	Buffer digestión trombina His-KAP (10X)	87
3.1.5.9.	Buffer lisis RIPA.....	87
3.1.5.10.	Buffer DIGNAM-D.....	88
3.1.5.11.	Buffers His-Trap FF	88
3.1.5.12.	Buffer tinción geles con Coomassie Blue	89
3.1.5.13.	Buffer destinción geles con Coomassie Blue.....	90
3.1.5.14.	Buffers para geles de acrilamida	90
3.1.5.15.	Buffers para geles 2D	91

3.1.5.16.	Cloranfenicol 25mg/ml.....	91
3.1.5.17.	Imidazol 5M.....	91
3.1.5.18.	PMSF 100mM	92
3.1.6.	<i>Anticuerpos</i>	92
3.2.	Métodos	93
3.2.1.	<i>Producción y purificación de la proteína KAP recombinante en bacteria</i>	93
3.2.1.1.	Extracción de RNA total de tejido	93
3.2.1.2.	Digestión de DNA con kit RNase-Free DNase Set (QIAGEN Cat. No. 79254)	93
3.2.1.3.	RT-PCR del gen KAP	94
3.2.1.4.	Clonación del cDNA KAP-SPS en el vector pCR®II-TOPO® y transformación en células TOP10	96
3.2.1.5.	Minipreps de bacterias transformadas	96
3.2.1.6.	Digestión con los enzimas de restricción NdeI y BamHI de pCR®II-TOPO®- KAP y pET14b.....	97
3.2.1.7.	Purificación de vector pET14b digerido e inserto (KAP-SPS).....	98
3.2.1.8.	Ligación de pET14b + KAP-SPS.....	100
3.2.1.9.	Obtención de células competentes BL21 (DE3) pLysS y su transformación con pET14b-KAP por choque térmico	100
3.2.1.10.	Secuenciación del plásmido pET14b transformado	101
3.2.1.11.	Producción de la proteína His-KAP-SPS.....	102
3.2.1.12.	Purificación de la proteína His-KAP-SPS en columna de níquel	103
3.2.1.13.	Digestión de la proteína His-KAP-SPS con trombina	105
3.2.1.14.	Purificación de la proteína KAP digerida en columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF	105
3.2.1.15.	Electroforesis monodimensional en gel de acrilamida SDS-PAGE de 7cm	107
3.2.1.16.	Tinción de geles de acrilamida con Coomassie Blue	108
3.2.2.	<i>Estructura 3D de la proteína KAP</i>	109
3.2.2.1.	Ensayo de estabilidad de la proteína	111
3.2.2.2.	Cristalización en plataforma Crystalfarm (cic bioGUNE).....	111
3.2.2.3.	Difracción de rayos X de los cristales de proteínas	113
3.2.2.4.	Análisis computacional de los patrones de difracción	114
3.2.2.5.	Dicroísmo Circular (DC)	115
3.2.2.6.	Microscopia Electrónica de Transmisión Tridimensional (3D-TEM)	117
3.2.2.7.	Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (RMN-1D).....	118
3.2.3.	<i>Identificación de proteínas de unión con KAP: Pull-down</i>	119

3.2.3.1.	Clonación del gen KAP, CypB murina (mCypB) y CypB humana (hCypB) en el plásmido pGEX-6P-1 y su expresión en BL21 (DE3) pLysS.....	120
3.2.3.2.	Purificación de las proteínas GST, GST-KAP, GST-mCypB y GST-hCypB en columnas de afinidad de glutathione.....	121
3.2.3.3.	Digestión de la proteína GST-mCypB y GST-hCypB y segunda purificación con columna de glutathione.	122
3.2.3.4.	Purificación de las proteínas GST, GST-KAP-SPS, mCypB-SPS y hCypB-SPS en columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF.....	123
3.2.3.5.	Construcción de las columnas de unión covalente con GST y GST-KAP....	123
3.2.3.6.	Extracción proteica de riñón murino.....	125
3.2.3.7.	Pull-down con las columnas GST/GST-KAP	126
3.2.3.8.	Electroforesis bidimensional (2D) (tiras de 7 y 24 cm).....	126
3.2.3.9.	Tinción de geles de acrilamida con plata	131
3.2.4.	<i>Identificación de proteínas de unión con KAP: Tandem Affinity Purification (TAP).....</i>	<i>132</i>
3.2.4.1.	Clonar KAP en pCTAP/pNTPA Shuttle.....	135
3.2.4.2.	Transformación de Células BJ5183-AD-1 para producir el plásmido recombinante pAdEasy-1	137
3.2.4.3.	Amplificación plásmidos pAdEasy-1 recombinantes con células ultracompetentes XL10-Gold	138
3.2.4.4.	Descongelación de células.....	139
3.2.4.5.	Congelación de células	140
3.2.4.6.	Pases de células AD-293	140
3.2.4.7.	Preparación del estoc primario de adenovirus con plásmido pAdEasy-1 recombinado	140
3.2.4.8.	Condiciones de infección y amplificación del estoc viral primario	142
3.2.4.9.	Expresión de la proteína de interés en el tipo celular escogido	143
3.2.4.10.	Control LacZ: Detección y aplicaciones	143
3.2.4.11.	Reactivos protocolo TAP	144
3.2.4.12.	Protocolo TAP	146
3.2.5.	<i>Western Blot (WB).....</i>	<i>148</i>
3.2.6.	<i>Test de lactato deshidrogenasa (LDH).....</i>	<i>150</i>
3.2.7.	<i>Producción de lentivirus e infección en células huésped.....</i>	<i>150</i>
4.	RESULTADOS.....	156
4.1.	Interacción de KAP y CypB humana por técnica de Pull-down ...	157
4.1.1.	<i>Producción y purificación de proteínas recombinantes GST, GST-KAP, mCypB y hCypB.....</i>	<i>157</i>

4.1.2.	<i>Pull-down con mCypB y hCypB recombinantes</i>	161
4.2.	Identificación de proteínas de unión con KAP y hCypB: Tandem Affinity Purification (TAP)	164
4.2.1.	<i>Análisis diferencial de los perfiles proteicos</i>	168
4.3.	Experimentos funcionales con KAP y hCypB en HK2	171
4.3.1.	<i>Papel de la KAP y hCypB en la diferenciación celular</i>	172
4.3.2.	<i>Papel de la KAP y hCypB en la proliferación</i>	174
4.3.2.1.	Cálculo de la proliferación.....	174
4.3.2.2.	Marcadores del ciclo celular.....	179
4.3.3.	<i>Papel de la KAP y hCypB en la citotoxicidad por CsA</i>	183
4.3.3.1.	Test de LDH.....	183
4.3.3.2.	Marcador de apoptosis: PARP Cleavage	183
4.3.4.	<i>Papel de la KAP y hCypB en la activación de STAT3</i>	185
4.4.	Producción y purificación de la proteína KAP sin péptido señal recombinante en bacteria	186
4.4.1.	<i>Producción y purificación de His-KAP-SPS en columna HisTrapTM FF 1 ml</i>	186
4.4.2.	<i>Digestión de His-KAP-SPS con trombina</i>	187
4.4.3.	<i>Purificación KAP-SPS digerido con HiTrapTM Q FF</i>	188
4.4.4.	<i>Producción y purificación de His-KAP-SPS en columna HisTrapTM FF 5 ml</i>	189
4.4.5.	<i>Prueba de estabilidad de His-KAP-SPS Vs KAP-SPS</i>	190
4.4.6.	<i>Purificación de KAP-SPS digerido con columna intercambio aniónico Mono Q HPLC</i>	191
4.4.7.	<i>Purificación de His-KAP-SPS con columna gel filtración Superdex G-200 HPLC</i>	193
4.5.	Estructura 3D de la proteína KAP	194
4.5.1.	<i>Producción de cristales de His-KAP-SPS en el Crystalfarm</i>	194
4.5.2.	<i>Difracción de rayos X de los cristales de proteínas</i>	198
4.5.2.1.	Análisis computacional de los patrones de difracción	199
4.5.3.	<i>Dicroísmo Circular (DC)</i>	201
4.5.3.1.	Estudio de Desnaturalización Térmica	202
4.5.4.	<i>Microscopia Electrónica de Transmisión Tridimensional (3D-TEM)</i>	203
4.5.5.	<i>Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (RMN-1D)</i>	204

5. Discusión	205
5.1. Interacción de KAP con CypB humana.....	209
5.2. Interacción de KAP y hCypB con otras proteínas.....	210
5.3. KAP y hCypB en diferenciación/desdiferenciación celular	215
5.4. KAP y hCypB en proliferación, ciclo celular y apoptosis.....	217
5.5. KAP y hCypB en procesos inflamatorios	223
5.6. Estructura 3D de KAP	226
5.7. Opciones de futuro con la KAP	235
Bibliografía.....	237
Anexo I: Publicación “Kidney Androgen-Regulated Protein (KAP) Transgenic Mice Are Protected Against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome”	258

ABREVIACIONES

1 α ,25(OH) ₂ D	1 α ,25-Dihidroxi Vitamina D
17 β HSD	17- β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasas
α -SMA	Alfa-Actina del Músculo Liso
3D	Tridimensional
ABP	Proteína Transportadora de Andrógenos
ADF	Factor Despolimerizante de Actina
AFs	Funciones Transactivadoras
APRT	Adenina Fosforibosiltransferasa
AS	<i>Splicing</i> Alternativos
ASCVD	Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica
BER	Reparación por Escisión de Bases
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Ca ²⁺	Ion Calcio
CaN	Calcineurina
CAP1	Proteína 1 Asociada a Adenilil Ciclasa
CBG	Globulina Transportadora de Corticosteroides
CCC	Conducto Colector Cortical
CCME	Conducto Colector Medular Externo
CCMI	Conducto Colector Medular Interno
CCMIi	Conducto Colector Medular Interno inicial
CCMit	Conducto Colector Medular Interno terminal
CDK	Quinasas Dependientes de Ciclina
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate N-Succinimidyl Ester
Cl ⁻	Ion Cloruro
cm	Centímetro
CMV	Cuerpos MultiVesiculares
CK2	Caseína Quinasa 2
CKI	Proteínas Inhibidoras de CDK
CRPC	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración
CsA	Ciclosporina A
CypB	Ciclofilina B
DBD	Dominios de Unión al ADN
DBS	Base de Doble Hebra
DE	Desviación Estándar
DHA	2,8-Dihidroxiadenina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
DHT	5 α -Dihidrotesterona
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DR	Repeticiones Directas

E2	Estradiol
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial
EHHADH	Enoil-CoA Hidratasa-L-3-Hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa
EI	Espacio Inter celular
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERK	Quinasa Regulada por señal Extracelular
EvR	Repeticiones Evertidas
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
AG	Aparato de Golgi
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropina
GPCR	Receptores Acoplados a Proteína G
GRE	Elemento de Respuesta a Glucocorticoides
GST	Glutathione S-transferases
GUS	β -Glucuronidasa
HCO ₃ ⁻	Ion Bicarbonato
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HFD	Dieta Rica en Grasas
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRE	Elementos de Respuesta Hormonal
HSC	Células Estrelladas Hepáticas
HTA	Hipertensión Arterial
IDP	Proteína Intrínsecamente Desestructurada
IDR	Región Intrínsecamente Desestructurada
IEF	Iso Electro Enfoque
IF	Filamentos Intermedios
IP	Índice de Proliferación
IR	Repeticiones Invertidas
M	Mitocondria
MCS	MultiCloning Site
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
MMTV	Virus del Tumor Mamario de Ratón
μ m	micrómetro
MUP	Major Urinary Protein
Mv	Microvellosidad
Na ⁺	Ion Sodio
Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa	Adenosina Trifosfatasa de Sodio-Potasio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducida
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cell

ng	Nanogramo
NLS	Secuencia de Localización Nuclear
nm	Nanómetro
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NTD	Dominio N-Terminal
NR	Receptor Nuclear
L	Lisosoma
LBD	Dominios de Unión al Ligando
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LT	Lumen Tubular
OATP	Proteínas del Polipéptido Transportador de Aniones Orgánicos
ODC	Ornitina Decarboxilasa
PARP-1	Poly(ADP-ribose) Polymerase
pb	Pares de Bases
PDM	Modificaciones Postraduccionales
PHB	Prohibitina
PHB1	Prohibitina-1
PHB2	Prohibitina-2
PI	Punto Isoeléctrico
PI	Yoduro de Propidio
PLD1	Fosfolipasa D1
PM	Membrana Plasmática
PO ₄ ³⁻	Ion Fosfato
PKC	Proteína Quinasa C
K ⁺	Ion Potasio
KAP	Kidney Androgen-regulated Protein
RA	Receptor de Andrógenos
RAG	Rama Ascendente Gruesa
RAS	Sistema Renina-Angiotensina
Rb	Retinoblastoma
RE	Receptor de Estrógenos
RF	Rama Fina
RGAC	Rama Gruesa Ascendente Cortical
RGAM	Rama Gruesa Ascendente Medular
RI	Resistencia a la Insulina
RIF	Fibrosis Intersticial Renal
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RM	Resonancia Magnética
RXR	Receptor de Retinoide X
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SADE	SAGE Adaptation for Downsized Extracts
SHBG	Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales

SHBG-R	Receptor de Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SR	Receptores de Hormonas Esteroideas
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SRB	Sulforhodamine B
SR-B1	Receptor Scavenger Clase B Tipo 1
SSH1L	Slingshot 1L
STAT3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
SULT2A1	Sulfotransferasa Citosólica
TC	Túbulo Conector
TCA	Ácido Tricloroacético
TCD	Túbulo Contorneado Distal
TCP	Túbulo Contorneado Proximal
TCR	Receptor de Células T
TeBG	Globulina Transportadora de Testosterona-estradiol
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TRP	Túbulo Recto Proximal
V	Vesículas
VA	Vacuolas Apicales

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Riñón

El riñón está considerado como una compleja maquinaria de purificación, tiene una función tanto de eliminación como de regulación de los líquidos internos. Excreta agua, pero también la conserva; elimina a través de la orina todos los productos del metabolismo que pueden ser potencialmente dañinos, antes de que alcancen niveles tóxicos y devuelve a la sangre: agua, glucosa, sal, potasio y otras muchas sustancias vitales en las cantidades adecuadas para mantener el medio interno estable a pesar de las variaciones de clima, dieta y otros factores externos.

1.1.1. Anatomía general

Los riñones se encuentran en la parte posterior del abdomen entre las vértebras T12 y L3. El riñón derecho está ligeramente más bajo que el izquierdo para dejar lugar al hígado. Ambos riñones tienen forma de judía y tienen aproximadamente el tamaño del puño de un adulto.

Cada riñón está compuesto por una corteza renal externa, una médula renal interna y una pelvis renal. La sangre se filtra en la corteza renal. La médula renal contiene las pirámides renales, en las que se lleva a cabo la formación de la orina. La orina pasa de las pirámides renales a la pelvis renal. Esta estructura con forma de embudo ocupa la cavidad central de cada riñón y luego se estrecha al salir para unirse con el uréter. La orina se drena desde la pelvis renal hacia el uréter (Figura 1.1).

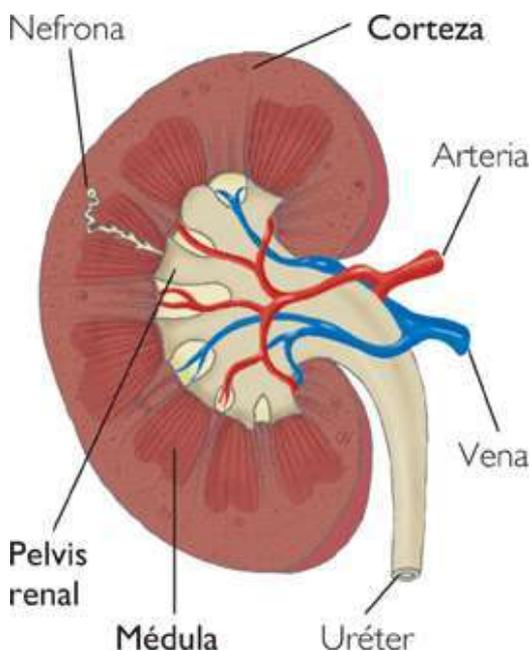


Figura 1.1 Diagrama de la superficie de corte de un riñón bisecado, que muestra las estructuras anatómicas importantes.

La sangre ingresa a los riñones por las arterias renales, las cuales se ramifican en capilares diminutos que interactúan con las estructuras funcionales del riñón conocidas como **nefronas**, donde se filtra la sangre, se eliminan los residuos y se reabsorben las sustancias vitales que son devueltas al torrente sanguíneo. La sangre filtrada sale a través de las venas renales. Toda la sangre del cuerpo entra y sale de los riñones cientos de veces al día, aproximadamente 190 litros cada 24 horas.

1.1.2. La Nefrona

La nefrona es la unidad funcional del riñón. Aunque el número medio de nefronas por riñón en humanos adultos es de aproximadamente 900.000 a 1 millón, las cifras de los riñones individuales oscilan entre aproximadamente 200.000 y más de 2,5 millones (Hughson M, 2003; Bertram JF, 2011). Los componentes esenciales de la nefrona incluyen el corpúsculo renal o Malpighi (que comprende el glomérulo y la cápsula de Bowman), el túbulo proximal, las ramas del asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector (Figura 1.2). El sistema de conductos colectores, que incluye el túbulo/conducto colector inicial, el conducto colector cortical (CCC), el conducto colector medular externo (CCME) y el conducto colector medular interno (CCMI), no se considera parte de la nefrona, porque surge embriológicamente de la yema ureteral. Sin embargo, todos los componentes de la nefrona y del sistema de conductos colectores están funcionalmente interrelacionados.

En el riñón se reconocen varias poblaciones de nefronas con una longitud variable del asa de Henle (Figura 1.2). El asa de Henle se compone de la porción recta del túbulo proximal, los segmentos de la rama delgada y la porción recta del túbulo distal. La longitud del asa de Henle suele estar relacionada con la posición de su correspondiente corpúsculo renal en la corteza. La mayoría de las nefronas que se originan en ubicaciones superficiales y mediocorticales tienen asas de Henle más cortas que se doblan dentro de la franja interna de la médula externa, cerca de la médula interna. Unas pocas especies, incluida la humana, también poseen nefronas corticales con asas extremadamente cortas que nunca entran en la médula, sino que se devuelven dentro de la corteza (Christensen EI, 2012). Las nefronas que se originan en la región yuxtamedular, cerca del límite corticomédular, tienen asas de Henle largas con largos segmentos de ramas delgadas descendentes y ascendentes que entran en la médula interna.

Sobre la base de la segmentación de los túbulos renales, la médula puede dividirse en una zona interna y una zona externa, y la zona externa se subdivide a su vez en una franja interna y una franja externa (Figura 1.2). La médula interna contiene ramas delgadas descendentes y ascendentes y grandes conductos colectores, incluidos los conductos de Bellini. En la franja interna de la médula externa, además de los conductos finos descendentes y los conductos de Bellini, se encuentran los conductos colectores. La franja exterior de la médula externa del riñón humano contiene los segmentos

terminales de la pars recta del túbulo proximal, las RAG's (pars recta del túbulo distal) y los conductos colectores. Por otro lado, la corteza renal contiene los corpúsculos renales, segmentos de los túbulos proximales y distales, así como los conductos colectores, pero no contiene las extremidades delgadas del asa de Henle. La división del riñón en zonas cortical y medular y la posterior subdivisión de la de la médula en zonas internas y externas son de considerable importancia para relacionar la estructura renal con la capacidad de un animal para formar una orina de máxima concentración.

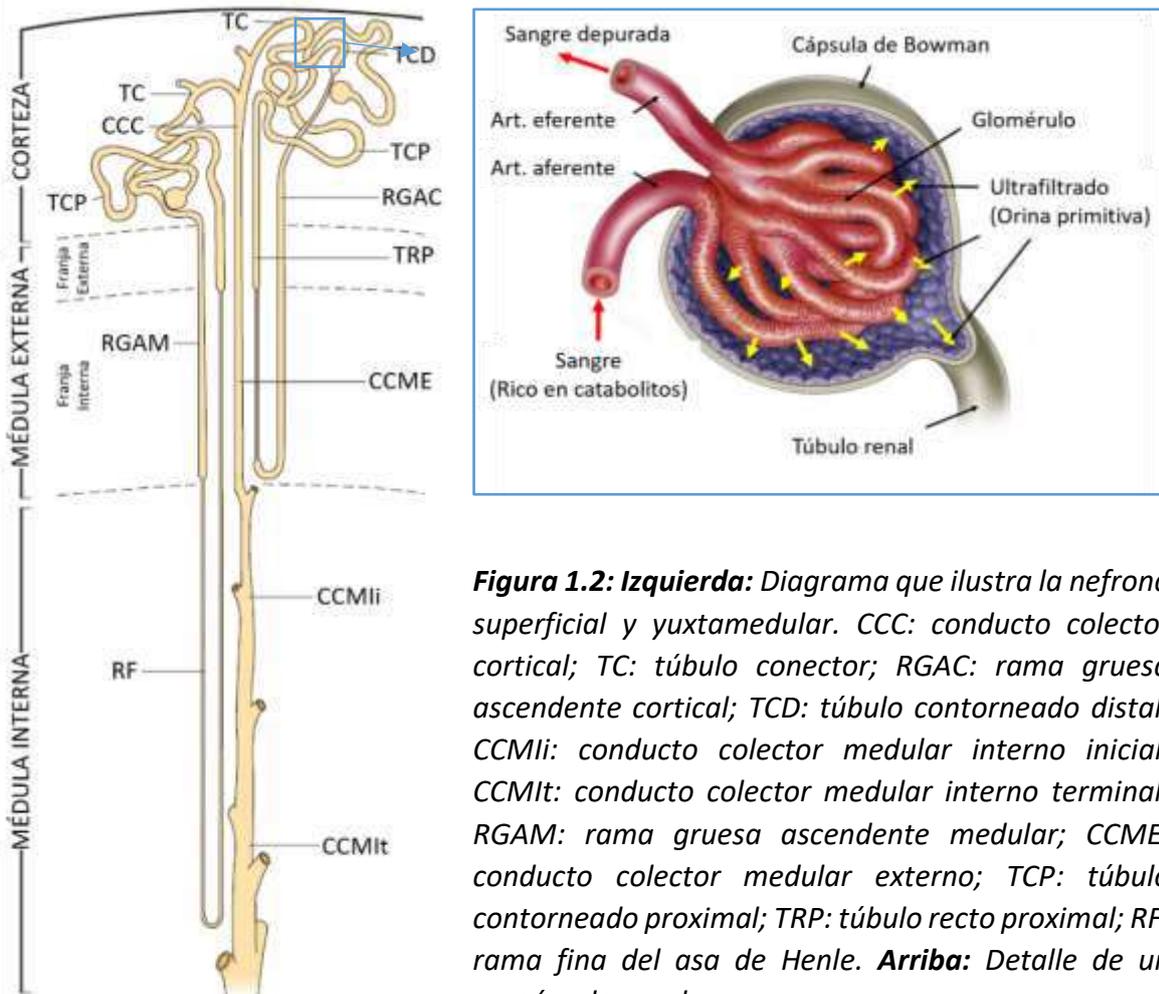


Figura 1.2: Izquierda: Diagrama que ilustra la nefrona superficial y yuxtamedular. CCC: conducto colector cortical; TC: túbulo conector; RGAC: rama gruesa ascendente cortical; TCD: túbulo contorneado distal; CCMIi: conducto colector medular interno inicial; CCMIt: conducto colector medular interno terminal; RGAM: rama gruesa ascendente medular; CCME: conducto colector medular externo; TCP: túbulo contorneado proximal; TRP: túbulo recto proximal; RF: rama fina del asa de Henle. **Arriba:** Detalle de un corpúsculo renal

1.1.3. Aspectos funcionales

Las funciones básicas del riñón son tres:

- 1) La excreción de productos de desecho del metabolismo como la urea, la creatinina, el fósforo, etcétera.
- 2) La regulación del medio interno, la estabilidad es imprescindible para la vida. Equilibrio hidroelectrico y ácido-base.
- 3) La función endocrina: síntesis de metabolitos activos de la vitamina D, el sistema renina-angiotensina, la síntesis de eritropoyetina, quinina y prostaglandinas.

Estas funciones se llevan a cabo en diferentes zonas del riñón. Las dos primeras, la excretora y reguladora del medio interno, se consiguen con la formación y eliminación de una orina de composición adecuada a la situación y necesidades del organismo. Tras formarse en el glomérulo un ultrafiltrado del plasma, el túbulo se encarga, en sus diferentes porciones, de modificar la composición del ultrafiltrado hasta formar una orina de composición definitiva que se eliminará a través de la vía excretora en el exterior.

Filtración glomerular y transporte tubular

La filtración en los capilares glomerulares es un proceso pasivo de presión. La presión sanguínea en el interior de los capilares favorece la filtración, mientras que la presión oncótica ejercida por las proteínas del plasma y la presión hidrostática del espacio de Bowman actúan en contra de la filtración. La resultante de este conjunto de fuerzas condicionará una mayor o menor cantidad de filtrado producido por cada glomérulo.

El procesamiento del ultrafiltrado (Figura 1.5) en los túbulos renales consigue: 1) conservar los nutrientes esenciales como glucosa, aminoácidos, vitaminas y iones, entre otros, 2) eliminar los compuestos de desecho y las sustancias potencialmente tóxicas para el organismo como creatinina, urea, ácido úrico, fosfatos, amonio, etcétera y 3) reducir al máximo la cantidad de agua y de sales (Na^+ y Cl^-) excretadas, normalmente hasta menos de un 1% del filtrado.

En el proceso de reabsorción de agua participan los segmentos aislados de la nefrona de manera muy diferente. Ya en el túbulo proximal se reabsorbe el 65% del volumen del filtrado:

1. **Recuperación de grandes moléculas:** Por término medio, se filtran al día unos 30 g de proteínas con peso molecular inferior a 70.000 Da, que se recuperan en su totalidad en el túbulo proximal por endocitosis en el borde en cepillo de la cara apical.
2. **Recuperación de otras moléculas del ultrafiltrado:** En el túbulo proximal se recuperan de forma prácticamente total las moléculas que tienen utilidad para

el organismo, especialmente glucosa, aminoácidos y vitaminas, por un mecanismo de transporte activo secundario, de cotransporte con el sodio. La glucosa plasmática es filtrada y recuperada por completo.

3. Recuperación de iones y agua: La reabsorción de sodio es el principal motor para la reabsorción de agua y solutos; ya que a él se acoplan sustancias como glucosa, aminoácidos, bicarbonato, fosfato, lactato, etc. En cuanto al agua, es arrastrada osmóticamente por la reabsorción de solutos principalmente a través de la vía paracelular. Este flujo de agua sirve para mantener el líquido tubular con la misma osmolaridad.

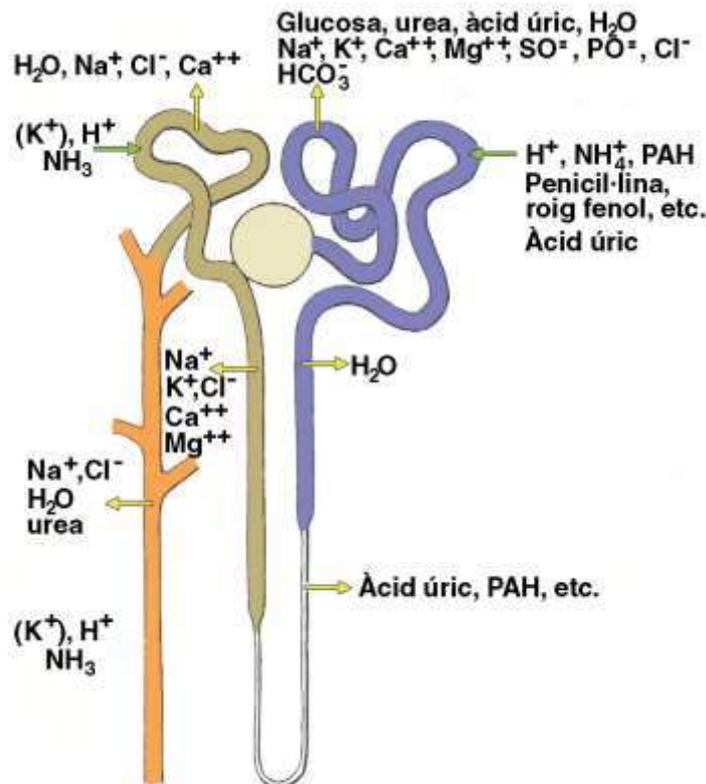


Figura 1.5: Transporte tubular. Localización de los principales procesos de transporte en la nefrona. En azul se muestra el túbulo proximal, en marrón el túbulo distal y parte del asa de Henle y en calabaza el tubo colector. Las flechas amarillas señalan las sustancias reabsorbidas y las flechas verdes las sustancias secretadas.

La reabsorción continúa en la rama descendente del asa de Henle, pero se detiene en la rama ascendente ya que ésta es prácticamente impermeable al agua. Al inicio del túbulo distal aún se encuentra aproximadamente el 20% del volumen del filtrado original, del cual se reabsorbe la mitad hasta el inicio del tubo colector. Un volumen aproximadamente igual se reabsorbe durante el trayecto por el tubo colector.

La reabsorción de la gran mayoría de electrolitos y otras sustancias se produce en el túbulo proximal. También es aquí donde se da de manera más importante la secreción de iones hidrógeno y amonio y la única capacidad para segregar ácidos

orgánicos débiles y bases. La mayor parte de los solutos del ultrafiltrado son sales de sodio, su reabsorción es, pues, una tarea importante por el riñón y es considerada el motor del resto de procesos de transporte tubulares. Aproximadamente 2/3 del sodio filtrado se reabsorben en el túbulo proximal ya sea como NaCl o como NaHCO³. Dado que el agua le sigue con la misma proporción, el líquido tubular se mantiene isotónico a lo largo del túbulo proximal, es decir, conserva la misma presión osmótica que el plasma sanguíneo. Así pues, el fluido que abandona el túbulo proximal tras recorrerlo es una solución de NaCl con pequeñas cantidades de K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, urea, HCO³⁻ y sustancias orgánicas secretadas.

La rama gruesa ascendente del asa de Henle es otro lugar clave para la función renal. Su epitelio puede transportar muy eficientemente iones Na⁺ de forma paracelular, pero es prácticamente impermeable al agua, por lo que el líquido tubular se hace hipotónico. Por otra parte, el líquido absorbido que llega al intersticio es hipertónico. Esta disociación osmótica en la médula renal permite al riñón eliminar, según las necesidades, una orina final osmóticamente concentrada o diluida.

La capacidad de reabsorción de los segmentos más distales de la nefrona es cuantitativamente mucho menor. No obstante, es aquí donde se localiza el ajuste fino de la reabsorción o eliminación de los electrolitos más importantes. Los procesos de reabsorción predominantes son los del NaCl, los cuales habilitan otras funciones de transporte paralelas como la reabsorción de Ca²⁺ y Mg²⁺ y la secreción de K⁺.

Funciones endocrinas del riñón

El riñón es también un órgano endocrino capaz de sintetizar sustancias con actividad hormonal. Algunas de estas se resumen a continuación.

Eicosanoides

Los eicosanoides son un grupo de compuestos derivados del ácido araquidónico, entre los que se incluyen las prostaglandinas E₂ y F₂, la prostaciclina y el tromboxano. Se sintetizan en diferentes estructuras renales como el glomérulo, arterias y arteriolas, el tubo colector y el asa de Henle. Determinadas sustancias o situaciones aumentan su producción como la angiotensina II, la hormona antidiurética, las catecolaminas y la isquemia renal, otros en cambio, inhiben su producción como los antiinflamatorios no esteroideos. Actúan sobre el mismo riñón de diferentes maneras: 1) controlan el flujo sanguíneo y el filtrado glomerular, generalmente producen vasodilatación, 2) ejercen un efecto natriurético, inhibiendo la reabsorción tubular de cloruro sódico 3) aumentan la excreción de agua interfiriendo en la acción de la hormona antidiurética y 4) estimulan la secreción de renina.

Eritropoyetina

Se sintetiza en un 90% en el riñón, probablemente en células endoteliales de los capilares periglomerulares. El principal estímulo para su síntesis y secreción es la hipoxia. La eritropoyetina estimula la diferenciación y velocidad de proliferación de las células precursoras de eritrocitos en la médula ósea y, por lo tanto, necesaria para el mantenimiento de la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre. Otras hormonas como los andrógenos, la tiroxina y la hormona del crecimiento, refuerzan la acción de la eritropoyetina, aumentando su actividad.

Metabolismo de la vitamina D

La vitamina-D-hormona activa o 1,25-dihidroxicolecalciferol se sintetiza en el riñón por la acción de una enzima que hidroxila el 25-hidroxicolecalciferol proveniente del hígado. La hipocalcemia promueve la liberación de la paratohormona, que a su vez estimula la producción renal del metabolito activo de la vitamina D. Esta actúa sobre el riñón aumentando la reabsorción de calcio y fósforo, sobre el intestino favoreciendo la reabsorción de calcio y sobre el hueso permitiendo que la paratohormona active los osteoclastos y libere así, iones calcio y fosfato en sangre. La vitamina-D-hormona actúa también sobre las células epiteliales de la tiroides inhibiendo la secreción de paratohormona.

Sistema renina-angiotensina

La renina es una enzima proteolítica secretado por las células granulares del aparato yuxtglomerular. En el corriente sanguíneo cataliza la conversión del angiotensinógeno de origen hepático en angiotensina I. La hormona convertidora de angiotensina elimina dos aminoácidos de la angiotensina I para dar lugar a la angiotensina II, forma activa de la enzima. El control de la secreción de renina la ejercen las propias células granulares que detectan cambios en el volumen vascular, la mácula densa, los nervios simpáticos renales y la misma angiotensina II que inhibe la secreción.

La angiotensina II es un potente vasoconstrictor, sobre todo a nivel de arteriolas eferentes. Estimula también la liberación de aldosterona de la corteza suprarrenal. Esta aumenta la reabsorción de Na⁺ en la nefrona distal, probablemente estimulando la síntesis de proteínas de membrana que impulsan un contra transporte de Na⁺/H⁺ en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, o que funcionan como canales específicos de Na⁺ en los túbulos distales y colectores. Esta entrada de Na⁺ a la célula estimula la ATPasa Na⁺/K⁺ de la membrana basolateral. La reabsorción de Na⁺ está ligada osmóticamente con una mayor reabsorción de agua.

El sistema renina-angiotensina participa, pues, en el control de los niveles de Na⁺, del volumen del líquido extracelular y de la presión arterial.

El péptido ANF (atrial natriurético factor) inhibe la secreción de renina y de aldosterona contribuyendo indirectamente en la excreción de Na^+ . Este péptido, que es sintetizado y secretado por las células auriculares del corazón, puede también directamente aumentar el filtrado glomerular y frenar la reabsorción de sodio a nivel de los tubos colectores medulares. La secreción de la ANF es estimulada por distensión de la aurícula como consecuencia de un aumento en el volumen plasmático. Dado que el volumen extracelular depende de las existencias de Na^+ en el organismo, la ANF juega también un papel importante en la regulación del volumen extracelular, y, por tanto, del volumen sanguíneo.

1.1.4. El Túbulo Proximal

La presente tesis estudia una proteína regulada por andrógenos, y dentro del riñón, el principal sitio de acción de los andrógenos son las células epiteliales del túbulo proximal donde estimulan la hipertrofia (Berger FG, 1989). El túbulo proximal consta de una porción inicial contorneada (túbulo contorneado proximal, TCP), que es una continuación directa del epitelio parietal de la cápsula de Bowman, y una porción recta (túbulo recto proximal, TRP), que se encuentra en el límite medular (Figura 1.2), y tiene 14 mm de longitud en los humanos. Se han identificado tres segmentos morfológicamente distintos: S1, S2 y S3 (Figura 1.3).

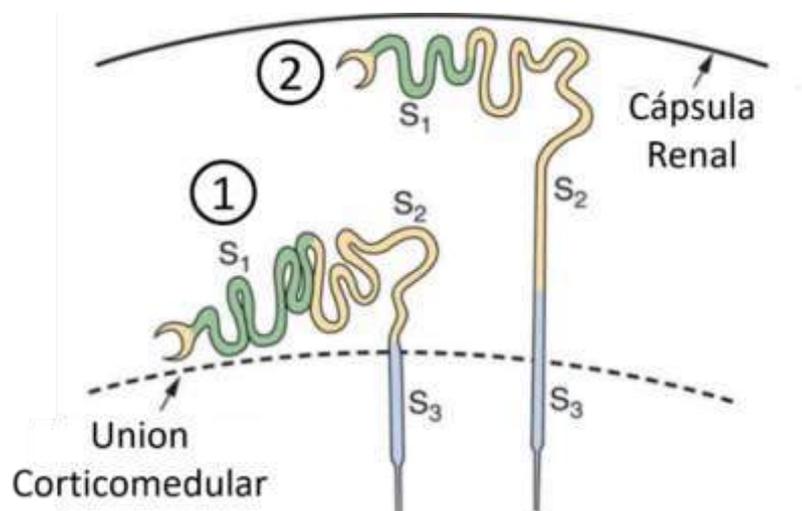


Figura 1.3: Segmentos del túbulo proximal. Se aprecian los segmentos S1 y S2 propios de la corteza, y el segmento S3 que se introduce en la franja externa de la médula externa. También vemos los segmentos representados en una nefrona yuxtamedular [1] y una superficial [2].

El segmento S1 es la porción inicial del túbulo proximal; comienza en el glomérulo y constituye aproximadamente dos tercios de la parte contorneada. El segmento S2 contiene el último tercio de la parte contorneada y la porción inicial de la parte recta. El segmento S3 es el resto del túbulo proximal, situado en la corteza interna profunda y en la franja externa de la médula externa. Estos segmentos pueden distinguirse morfológicamente por sus células estructuralmente únicas (Maunsbach AB, 1966; Faarup P, 2011). Las células del segmento S1 tienen un borde en cepillo alto y un sistema vacuolar-lisosomal bien desarrollado. La membrana plasmática basolateral forma extensas invaginaciones laterales, y los procesos celulares laterales que se extienden desde la superficie apical a la basal se interdigitan con procesos similares en células adyacentes. Las mitocondrias alargadas se encuentran en los procesos celulares laterales en la proximidad de la membrana plasmática. La ultraestructura de las células del segmento S2 es similar a la del segmento S1; sin embargo, el borde en cepillo es más corto, las invaginaciones basolaterales son menos prominentes y las mitocondrias son más pequeñas. El compartimento endocítico es menos prominente que en el segmento S1, con un número y tamaño de los lisosomas que varía entre especies y entre machos y hembras (Madsen KM, 1987; Maunsbach AB, 1966).

En las células del segmento S3, la longitud del borde en cepillo difiere según la especie y puede ser más bien corto (en humanos) o largo (en ratas). Los procesos celulares laterales y las invaginaciones están esencialmente ausentes, y las mitocondrias son pequeñas y distribuidas al azar dentro de la célula. En el segmento S3 también se observa variación entre especies en el compartimento vacuolar-lisosómico. Los peroxisomas están presentes en todo el túbulo proximal, con cantidades progresivamente mayores hacia el segmento S3. Existen contrastes con la morfología descrita en diferentes especies. En los conejos, el segmento S2 representa una transición entre los segmentos S1 y S3 (Kaisling B, 1979; Woodhall PB, 1978), mientras que en los ratones no existe una segmentación estructural a lo largo del túbulo proximal (Zhai XY, 2003).

Las células epiteliales del túbulo proximal tienen en su membrana luminal (la que está en contacto con la orina en la luz del túbulo) un desarrollado ribete en cepillo, que indica el intenso proceso de absorción que tiene lugar a este nivel (Figura 1.4). La gran cantidad de mitocondrias que poseen viene a subrayar la elevada tasa metabólica que hay en ese tramo del epitelio tubular.

El paso del segmento S1 a S2 es progresivo, mientras que el de S2 a S3 es abrupto en diferentes especies, entre ellas, rata y ratón. A lo largo del túbulo se produce una disminución de la maquinaria de transporte y del aparato endocítico y lisosomal que se corresponde con los cambios que sufre el filtrado.

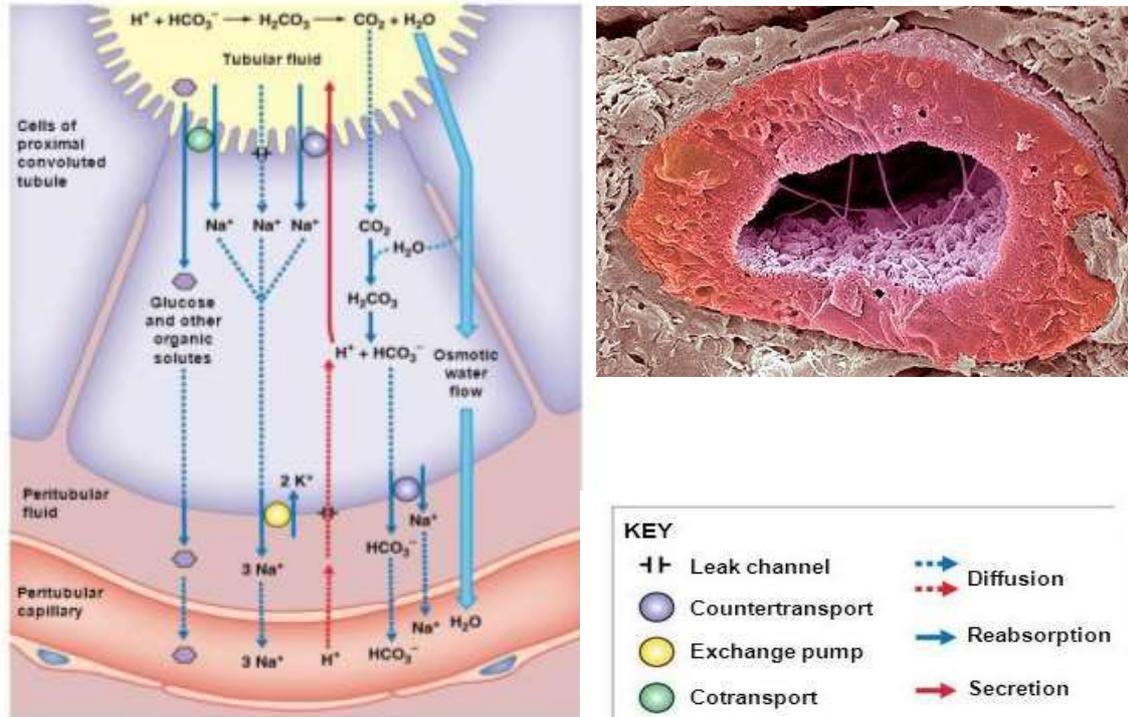


Figura 1.4: *Izquierda:* Esquema general del funcionamiento de una célula del túbulo contorneado proximal. *Derecha:* Microfotografía de la sección del túbulo contorneado proximal

1.2. El riñón murino como modelo de estudio de la acción androgénica

1.2.1. Hormonas Esteroideas

Los esteroides juegan un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos y, en consecuencia, han ganado un interés sustancial en la investigación durante el último siglo. La primera hormona esteroidea, la estrona, se aisló en 1929, antes de que se dilucidara la estructura de anillo característica del núcleo de los esteroides (Miller WL, 1988). Hoy en día se han aislado y caracterizado químicamente más de 230 esteroides naturales. Además, un número incontable de esteroides y análogos de esteroides han sido sintetizados químicamente y evaluados por sus propiedades farmacológicas. La base de estos desarrollos recientes se encuentra en los artículos escritos por el profesor Adolf O.R. Windaus (1876-1959), químico alemán que definió la determinación estructural del colesterol. El profesor Windaus fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1928 “por los servicios prestados a través de su investigación sobre la constitución de los esteroides y su conexión con las vitaminas”.

Los esteroides tienen una estructura compleja de anillos fusionados, que pueden estar sujetos a una amplia gama de modificaciones mediante la introducción de sustituyentes hidroxilo o carbonilo e insaturaciones (enlaces dobles o triples). Además, los heteroátomos tales como nitrógeno o azufre pueden reemplazar los carbonos del anillo, y los halógenos y los grupos sulfhidrilo o amino pueden reemplazar los restos hidroxilo. Además, el tamaño del anillo se puede expandir o contraer mediante la adición o eliminación de átomos de carbono. Una característica estructural importante de cualquier esteroide es la presencia de átomos de carbono asimétricos y la designación en la nomenclatura formal del isómero estructural que está presente. Los esteroides se derivan de una estructura de anillo de fenantreno a la que se ha unido un anillo de pentano; esto da lugar a la forma completamente hidrogenada, ciclopentanoperhidrofenantreno, o a la estructura de anillo de esterano (Figura 1.6).

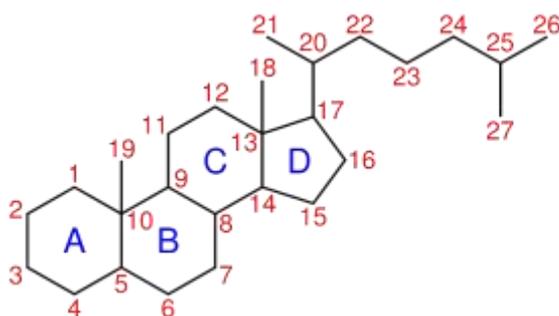


Figura 1.6 Numeración de los átomos de Carbono en un esterano. La cadena lateral en C-17 puede variar.

Los tres anillos de ciclohexano de seis carbonos se denominan anillos A, B y C, y el anillo de ciclopentano de cinco carbonos se denomina anillo D. Los seis átomos de carbono de un anillo de ciclohexano no están fijados rígidamente en el espacio, pero son capaces de intercambiarse girando entre varias disposiciones estructurales en el espacio (conformaciones de silla y bote). El enfoque del análisis conformacional de esteroides ha sido de gran valor para la química orgánica como herramienta para predecir o comprender el curso de las reacciones químicas orgánicas sintéticas. También se sabe que las consideraciones conformacionales desempeñan un papel cada vez más útil en la comprensión de las interacciones entre las hormonas esteroides y el receptor (Fieser LF, 1959).

La diversidad de estructuras de esteroides abarca desde hormonas esteroides de insectos (ecdisona) hasta el mundo de los reguladores del crecimiento de las plantas (brasinólidos). En los sistemas de mamíferos, hay seis familias de hormonas esteroides que se pueden clasificar tanto en base química (estructura) como biológica (hormonal) (Tabla 1.1). Son los estrógenos, progestágenos, andrógenos, mineralocorticoides, glucocorticoides y vitamina D. Además, los ácidos biliares están relacionados estructuralmente con el colesterol y, por tanto, podrían constituir un séptimo miembro de la familia de los esteroides.

Tabla 1.1 Clases de hormonas esteroideas

Clase de esteroide	Nº átomos de C.	Principal esteroide activo en humanos	Nombre sistemático IUPAC
Estrógenos	18	17 β -estradiol	(8R, 9S, 13S, 14S, 17S) -13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-Decahidrociclopenta[a]fenantreno-3,17-diol
Andrógenos	19	Testosterona	(8R, 9S, 10R, 13S, 14S, 17S) -17-Hidroxi-10,13-dimetil-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidrociclopenta[a]fenantren-3-ona
		Dihidrotestosterona	(5S, 8R, 9S, 10S, 13S, 14S, 17S) -17-Hidroxi-10,13-dimetil-1,2,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahidrociclopenta[a]fenantren-3-ona
Progestinas	21	Progesterona	Pregn-4-eno-3,20-diona
Glucocorticoides	21	Cortisol	11 β -11,17,21-Trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona
Mineralocorticoides	21	Aldosterona	11 β -11,21-Dihidroxi-3,20-dioxopregn-4-en-18-al
Vitamina D	27	1,25-dihidroxitamina D3 (colecalfierol)	9,10-Seco-5,7,10 (19) -Cholestatriene-3 β -ol
Ácido Biliar	24	Ácido cólico	Ácido 3 α , 7 α , 12 α -Trihidroxi-5 β -colan24-oico

1.2.2. Andrógenos

Biosíntesis de los Andrógenos

La esteroidogénesis implica procesos mediante los cuales el colesterol se convierte en hormonas esteroides biológicamente activas. Históricamente, la síntesis de hormonas esteroides solo ocurría en las glándulas esteroidogénicas (es decir, glándulas suprarrenales, gónadas y placenta) (Figura 1.7). Actualmente, un número significativo de estudios ha desafiado este punto de vista al demostrar que varios órganos, incluidos el cerebro, el tejido adiposo y el intestino, son capaces de producir hormonas esteroides. Estos se denominan tejidos no esteroidogénicos o intracrinos. Los tejidos intracrinos no tienen la capacidad de transformar el colesterol en hormonas esteroides activas, pero dependiendo de las enzimas que se expresan en los tejidos, los esteroides activos se producen a partir de varios precursores de esteroides (Luu-The V, 2013). Mientras que la mayoría de los textos sobre endocrinología discuten los procesos suprarrenales, ováricos, testiculares, placentarios y otros procesos esteroidogénicos de una manera específica de la glándula, según el punto de vista de Walter L. Miller, la esteroidogénesis se entiende mejor como un proceso único que se repite en cada glándula con variaciones específicas del tipo celular (Miller WL, 2011).

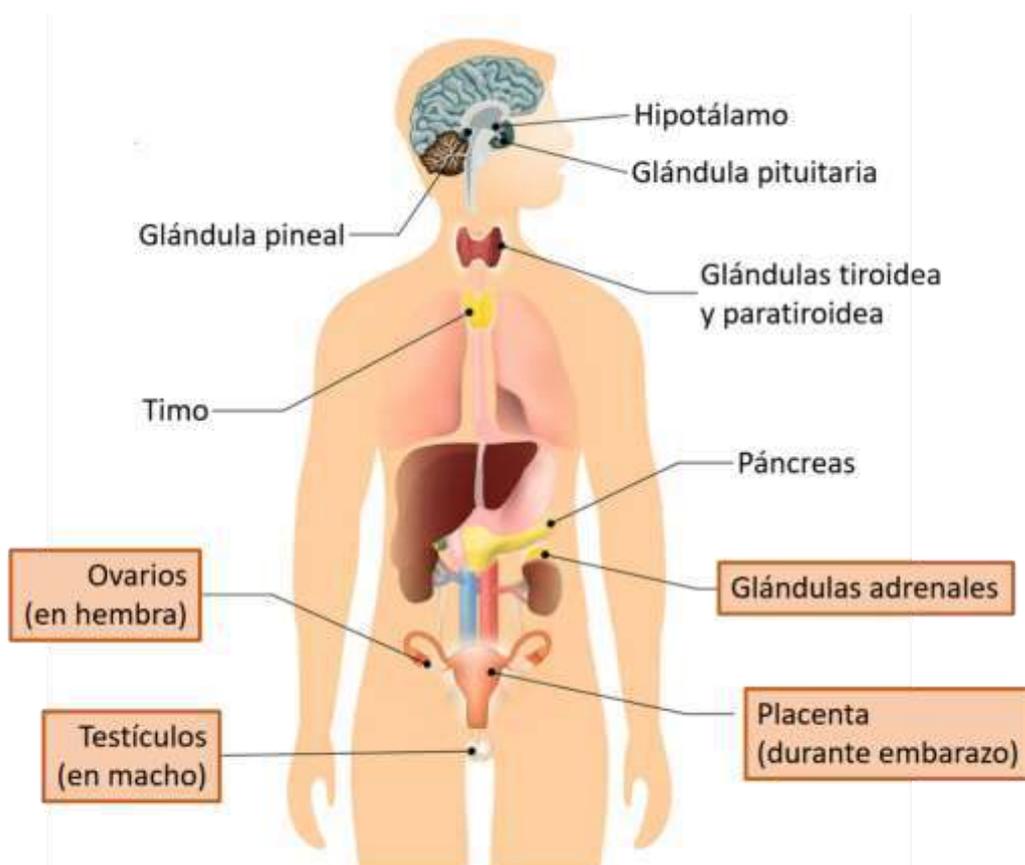


Figura 1.7. Sistema endocrino general. En marrón las glándulas esteroidogénicas.

Las acciones biológicas de los andrógenos pueden dividirse en las dirigidas al desarrollo y mantenimiento del sistema reproductor masculino y las que tienen efectos anabólicos en otros órganos, como el músculo esquelético y el cerebro.

La testosterona 5 α -reductasa

La testosterona es el principal andrógeno masculino (300-1100 ng/dl en plasma). Un importante metabolito biológicamente activo de la testosterona, producido en ciertos tejidos diana, es la 5 α -Dihidrotestosterona (DHT). La DHT es un potente andrógeno con importantes roles fisiológicos distinguibles de los de la testosterona. La actividad enzimática responsable de la generación de DHT a partir de la testosterona es la 5 α -reductasa (Figuras 1.8 y 1.9), enzima implicada en la fisiología, farmacología y biología del desarrollo masculino. Tanto en humanos como en roedores existen dos isoenzimas de la 5 α -reductasa, la tipo I y la tipo II, codificados por dos genes independientes y con una homología del 50%.

Se ha postulado que la isoenzima II es el más relevante metabólicamente en la generación de andrógenos activos, mientras que el de tipo I no está directamente implicado en la amplificación en los tejidos diana de los efectos de la testosterona vía DHT.

El órgano principal de producción no testicular es la próstata donde aproximadamente el 95% de los andrógenos corresponden a la DHT. En la mayoría de órganos reproductivos masculinos con presencia de 5 α -reductasa, la testosterona es transformada a DHT, lo que se considera una activación metabólica in situ de capital importancia en fenómenos como el desarrollo de la próstata y los genitales externos, el patrón masculino de crecimiento de pelo y la calvicie. Paralelamente, la testosterona por sí misma parece ser la responsable del desarrollo de los órganos derivados del conducto Wolff, las acciones anabólicas en músculo y riñón y del estímulo del comportamiento psicosexual masculino.

La testosterona aromatasa

La enzima responsable de la aromatización de la testosterona en estradiol es el citocromo P450 19 (Figuras 1.8 y 1.9) conocido también como Testosterona aromatasa. Esta enzima es el responsable en el hipocampo de la determinación sociomental sexual. Los tejidos dotados de aromatasa tienen la posibilidad de extender o transducir los efectos de la testosterona vía estradiol y su receptor correspondiente, la ER. En algunas circunstancias, estos metabolitos esteroideos ejercen acciones locales en los tejidos que los producen, mientras que, en otros, pueden reincorporarse a la circulación sanguínea actuando a distancia.

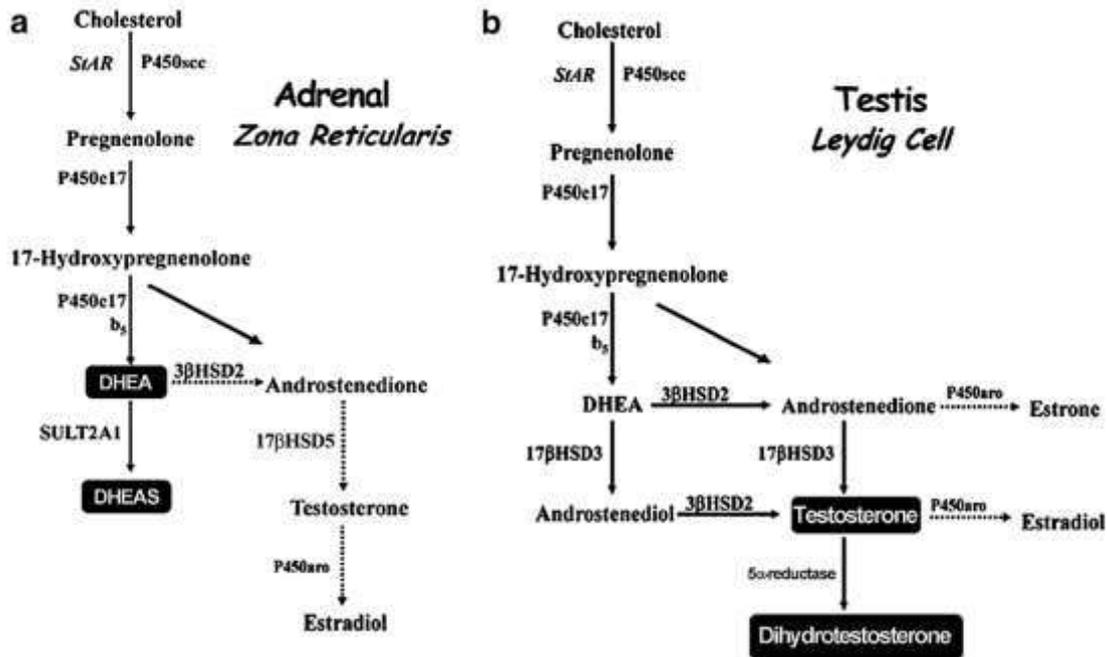


Figura 1.8: Principales vías esteroidogénicas de la síntesis de DHEA y testosterona. (a) La zona reticular suprarrenal tiene grandes cantidades de *P450_{c17}* y citocromo *b₅* (*b₅*) pero poca *3βHSD2*, de modo que la pregnenolona se oxida secuencialmente a 17-hidroxipregnenolona y luego a DHEA. La zona fasciculada suprarrenal contiene poca *b₅*, lo que minimiza la actividad 17,20-liasa de *P450_{c17}*, y se produce poca DHEA a partir de 17β-hidroxipregnenolona. *SULT2A1* sulfato DHEA y el DHEAS resultante se libera a la circulación para tejidos no esteroidogénicos. La síntesis de testosterona y estradiol son vías menores (flechas discontinuas). **(b)** En las células de Leydig testiculares, el colesterol se convierte en DHEA por las mismas enzimas que utilizan los mismos cofactores que en la zona reticular suprarrenal. Las células de Leydig contienen abundante *17βHSD3*, de modo que las células de Leydig producen testosterona de manera eficiente, vía androstenediona y / o androstenediol. La síntesis de estradiol es una vía menor (flechas discontinuas) en las células de Leydig.

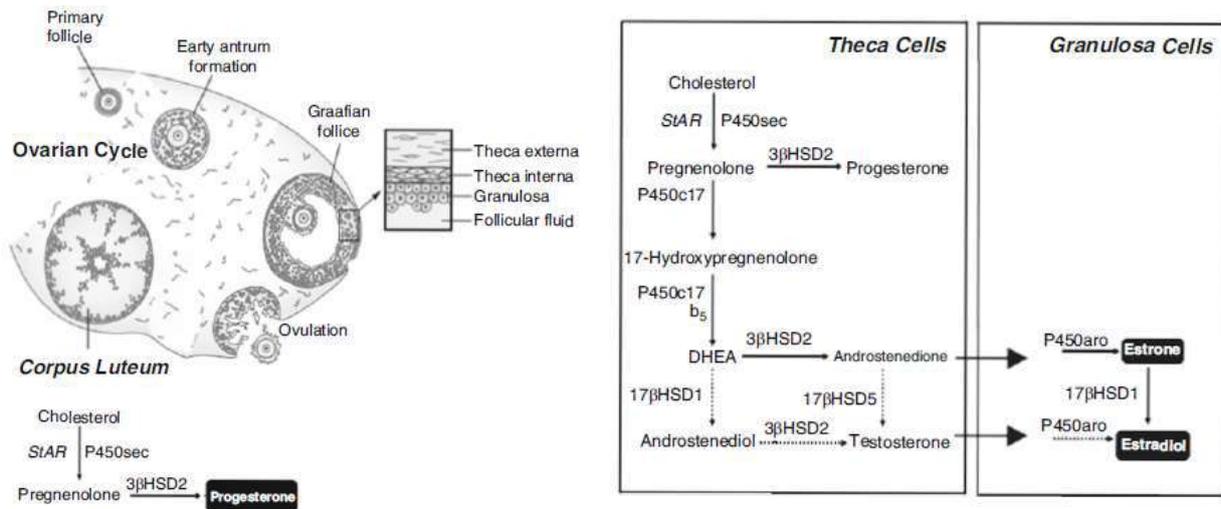


Figura 1.9: Principales vías esteroidogénicas de las hormonas esteroides ováricas. Las células de la teca ovárica expresan StAR, P450scc y P450c17 y, por tanto, producen andrógenos C19. Las células de la teca no expresan aromatasa (P450aro); por lo tanto, la androstenediona y la testosterona deben regresar a las células de la granulosa, que contienen abundante aromatasa y 17βHSD1, completando la síntesis de estradiol (el modelo de dos células de la esteroidogénesis ovárica). En la fase lútea, 3βHSD2 en el cuerpo lúteo metaboliza la pregnenolona naciente a progesterona, el producto final. Las vías secundarias se muestran con flechas discontinuas.

El receptor de andrógenos

Las acciones fisiológicas de los andrógenos se hallan mediadas por el receptor de andrógenos (AR), ocurriendo el mecanismo de acción principalmente a través de la activación transcripcional de los elementos de respuesta a andrógenos de los diferentes genes diana (McPhaul MJ, 1993).

El receptor de andrógenos es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que actúan de factores de transcripción inducibles por la unión de su ligando hormonal (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Se muestra la especificidad de ligando del receptor de andrógenos para diferentes substratos.

Esteroido	Índice competitivo relativo (%)*
DHT	100
Testosterona	44
Acetato de cyproterona	21
Progesterona	10
Estradiol	10
Cortisol	< 0,0001

* El índice competitivo relativo o RCI es la medida de la habilidad de cada ligando por competir por la unión con 3H-DH.

El receptor de andrógenos modula la expresión génica mediante la interacción con elementos específicos presentes en las regiones reguladoras de los genes diana que modula (Riegman PHJ, 1991) (Androgen Response Element (ARE), Figura 1.10).

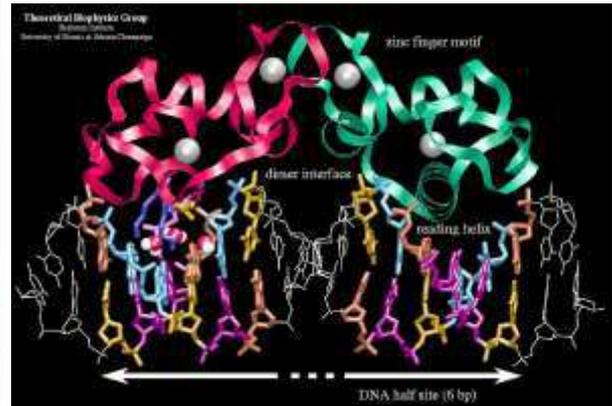
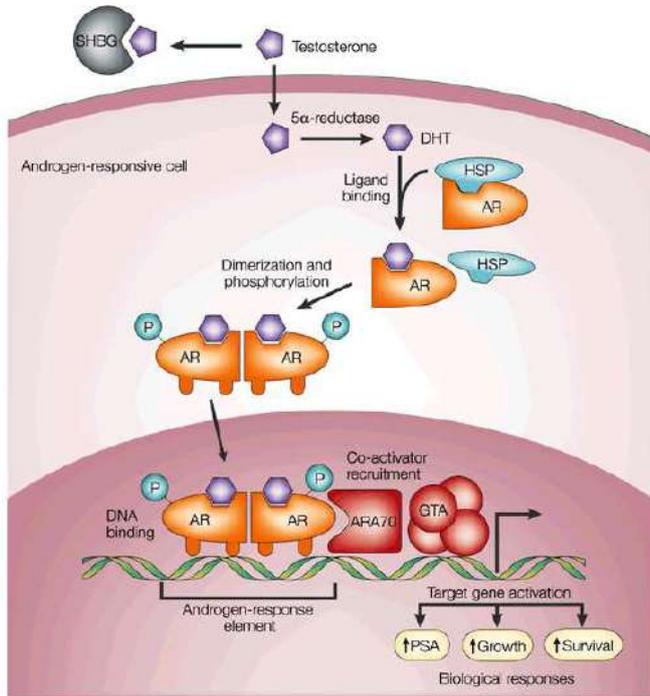


Figura 1.10: *Izquierda:* Mecanismo general de acción de las hormonas esteroideas a través de la interacción con su receptor específico y la transactivación de su gen diana. *Derecha:* Detalle de la interacción entre un ARE y un AR.

El gen que codifica para el AR se localiza en el cromosoma X. La secuencia aminoacídica de la proteína deducida contiene 919 residuos y su peso molecular es de 100KDa en el caso del AR humano y de rata. Su secuencia aminoacídica es similar a la de otros receptores esteroideas, aunque se encuentra más próximo al receptor de progesterona.

De forma similar a otros receptores nucleares, el receptor de andrógenos presenta una disposición estructural modular que consiste en los dominios de unión a hormona, unión a DNA, transactivación, dimerización y localización nuclear (Figura 1.10) (Mangelsdorf DJ, 1995). Para el receptor de andrógenos se han caracterizado dos funciones transactivadoras (AF's) en su secuencia: AF1, en su dominio terminal y AF2, en su dominio de unión a ligando (LBD).

Acciones biológicas de los andrógenos

Las funciones de los andrógenos en los machos se extienden a lo largo de toda su vida, desde la diferenciación sexual heterogamético del embrión, pasando por el desarrollo sexual secundario, hasta el establecimiento y mantenimiento de la función sexual y la fertilidad en el adulto. Sus acciones se distribuyen también entre una amplia variedad de tejidos diana, tanto reproductores como no reproductores. Entre estos últimos se encuentra el tejido óseo, el adiposo, el nervioso, el músculo esquelético, el hígado y el riñón (Bardin CW, 1981; Wu FCW, 1997). Es sorprendente que estas acciones tan diversas estén mediadas por un único mecanismo de acción en el que una sola especie molecular de receptor unido a la hormona active transcripcionalmente los diferentes genes diana (McPhaul MJ, 1993).

Los receptores nucleares de hormonas esteroideas actúan incrementando o disminuyendo la expresión de sus genes diana. Una vez unidos a la hormona adquieren un nuevo estado conformacional que les habilita para poder translocarse del citoplasma al núcleo para interactuar con sus elementos de respuesta específicos situados en las regiones promotoras de sus genes diana. En el caso de los andrógenos este elemento de respuesta se conoce con el nombre de ARE (Androgen Response Element, Figura 1.10). El receptor unido es capaz también de interactuar con otros factores de transcripción y activadores transcripcionales. Los coactivadores asociados pueden reclutar complejas con actividad remodeladora de la cromatina, por lo que uno de los mecanismos propuestos para la coactivación es la modificación dirigida de la estructura de la cromatina. Se conoce un gran número de genes que poseen ARE en sus regiones reguladoras, la expresión de estos genes se ve influenciada por la presencia de los andrógenos. Uno de los últimos reviews que agrupa hasta la fecha los 9 estudios con microarrays más importantes para identificar genes regulados por andrógenos señala que hay al menos 1,785 genes humanos, 583 de rata y 993 de ratón regulados por éstos (Jin HJ, 2013). Algunos ejemplos de estos genes se pueden ver en la tabla 1.3. Existen, pero, efectos de los andrógenos independientes de su acción a nivel de DNA. Así se ha descrito la implicación de estas hormonas en la regulación postranscripcional principalmente a través de un mecanismo de estabilización del mRNA (Paek I, 1987). Además, algunos de los aspectos de la acción androgénica tejido-específica pueden explicarse también por la conversión de la testosterona a metabolitos más activos o específicos, tales como la DHT y el estradiol (Wilson WD, 1993; Gilling-Smith G, 1994; Morishima A, 1995).

Los andrógenos actúan también sobre órganos no reproductores, provocando una serie de respuestas que conducen a un fenotipo sexualmente dimórfico. El dimorfismo sexual es obvio en la mayoría de especies de mamíferos, consecuencia del desarrollo diferencial de los genitales internos y externos, así como de las características sexuales secundarias. El término "dimorfismo sexual", pero, hace referencia a cualquier diferencia de forma, independientemente de que se manifieste a nivel morfológico o molecular.

Tabla 1.3: Algunos genes en los que se ha identificado elementos de respuesta a andrógenos (ARE's).

ESPECIE	GEN	EXPRESIÓN	REFERENCIA
RATA	<i>Prostatein/prostatic binding protein (C3 (1) subunit) (C3)</i>	Próstata ventral	Tan et al., 1992
	<i>Probasin (PB)</i>	Próstata dorsolateral	Rennie et al., 1993
	<i>Cystatin-related protein 2 (crp2)</i>	Próstata ventral Glándula lagrimal	Devos et al., 1997
HUMANO	<i>Prostate-specific antigen (PSA)</i>	Próstata	Cleutjens et al., 1996 y 1997
	<i>Glandular kallikrein (hK2)</i>	Próstata	Murtha et al., 1993
	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor p21 (p21)</i>	Próstata	Lu et al., 1999
RATÓN	<i>Sex limited protein (Slp)</i>	Riñón	Adler et al., 1993
	<i>β-glucuronidase (GUS)</i>	Riñón	Lund et al., 1991
	<i>Kidney androgen-regulated protein (KAP)</i>	Riñón	Soler et al., 2002
	<i>Mouse seminal vesicle secretory protein 99 (MSVSP99)</i>	Vesícula seminal	Brochard et al., 1997
	<i>androgen-regulated murine epidermal protein of 24 KDa (arMEP24)</i>	Epidídimo	Ghyselincx et al., 1993
	<i>glutathion peroxidase 5 (GPX 5)</i>	Epidídimo	Lareyre et al., 1997
	<i>Pem homeobox gene (Pem)</i>	Testículo Epidídimo	Barbulescu et al., 2001
	<i>Ornithine decarboxilase (ODC)</i>	Riñón	Crozat et al., 1992

1.2.3. Dimorfismo sexual del riñón

Los tejidos diana de los andrógenos pueden responder a nivel celular con hiperplasia (incremento del número de células mediante división y multiplicación), hipertrofia (agrandamiento de las células) o ambas. Los órganos sexuales accesorios del tracto reproductivo masculino, como la próstata y las vesículas seminales, son ejemplos de tejidos que generan tanto respuestas hiperplásticas como hipertróficas, mientras que en otros tejidos como el riñón predominan las segundas, con mínimas variaciones en la síntesis de DNA (Catterall JF, 1986; Ouar Z, 1998).

El riñón de ratón es uno de los tejidos extragonadales más andrógeno-dependiente (Lund SD, 1991) y ofrece una serie de características que facilitan el estudio de los efectos androgénicos a nivel de transcripción génica:

- 1) Los andrógenos en el riñón promueven un efecto hipertrófico con baja estimulación de la síntesis de DNA (Berger FG, 1989). Esto facilita el estudio de los efectos de los andrógenos sobre la expresión génica ya que descarta el incremento debido a un aumento en el número de células.
- 2) La actividad testosterona 5α-reductasa es mínima, por lo que la generación de DHT en el riñón murino es inapreciable. Es, pues, la testosterona el efector

fisiológico que induce un fenotipo androgénico (Catterall JF, 1986), simplificando la interpretación de los datos en el estudio de los efectos primarios de los andrógenos en las células diana.

- 3) Los andrógenos inducen la expresión de un número variado de genes hasta niveles óptimos para ser analizados. Dentro del riñón, el principal sitio de acción de la hormona son las células epiteliales del túbulo proximal donde estimulan la hipertrofia (Berger FG, 1989).
- 4) Existe una amplia disponibilidad de cepas murinas genéticamente defectivas para determinados genes, como la TFM que presenta una alteración en el receptor de andrógenos (AR) que lo hace insensible a la hormona. Por otro lado, el ratón ha demostrado ser útil en el análisis de la expresión génica, permite una fácil manipulación y la posibilidad de realizar múltiples intervenciones quirúrgicas y farmacológicas.

El fenotipo masculino de un determinado tejido diana puede interpretarse como la consecuencia de la suma de expresiones de los diferentes genes regulados por los andrógenos. Cabe mencionar que dentro de una misma célula existen variaciones en las cinéticas de respuesta y tiempo de inducción entre los diferentes genes regulados por los andrógenos (Catterall JF, 1986), sugiriendo que la interacción del receptor de andrógenos con cada gen diana es única ya sea por la diferente afinidad de unión, la configuración local de la cromatina, o por el requerimiento de diferentes cantidades de receptor y proteínas accesorias para inducir cada respuesta.

El dimorfismo sexual en el riñón se manifiesta en diferentes aspectos tanto a nivel morfológico como molecular, así existen diferencias entre sexos de tamaño, ultraestructurales, en el metabolismo y excreción de aniones y cationes orgánicos, en la aclaración y farmacocinética de diferentes fármacos, en las respuestas de crecimiento compensatorio, en las respuestas frente al daño renal, etcétera. Aquí sólo se desarrollará parte de los aspectos más importantes de algunas de ellas.

Dimorfismo sexual en el crecimiento y tamaño renal

Influencia de los andrógenos en el tamaño y la ultraestructura renales.

En muchas especies animales, como los ratones, el riñón de los machos es mayor que el de las hembras (Selye H, 1939). Las diferencias observadas en el tamaño renal se atribuyen al estatus androgénico del ratón, así la castración de los machos y la administración de testosterona a hembras o machos castrados disminuye o aumenta el tamaño de los riñones, respectivamente (Jean-Faucher C, 1987).

El dimorfismo anatómico va más allá de las diferencias en el tamaño. Se han descrito también diferencias entre ratones machos y hembras de varias cepas en el diámetro del glomérulo y el porcentaje de corpúsculos renales (Yabuki A, 1999; Okada H, 2005). A nivel ultraestructural el dimorfismo sexual se hace evidente a lo largo de

todo el túbulo proximal renal murino, pero de manera más acusada en las células de los segmentos S2 y S3 (Koenig H, 1980; Yabuki A, 2001). En hembras, las mitocondrias de las células epiteliales del segmento S2 son alargados y electrodensos, el contenido de los lisosomas es básicamente granular y las vacuolas autofágicas son relativamente infrecuentes, y tanto el retículo endoplasmático como el aparato de Golgi se encuentran dispersos. En machos, en cambio, las mitocondrias del segmento S2 son mayores y los lisosomas más numerosos con el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi más prominentes.

Situaciones de hipertrofia renal.

Los procesos de hipertrofia y de crecimiento compensatorio se dan en situaciones fisiológicas como el embarazo y en situaciones patológicas como la nefropatía diabética o la enfermedad renal crónica (para compensar la pérdida de tejido renal funcional).

Para mimetizar los procesos de crecimiento renal se han desarrollado en rata y ratón diferentes modelos de hipertrofia renal mediante intervenciones quirúrgicas o tratamientos farmacológicos, que permiten caracterizar los mecanismos de crecimiento renal, así como la implicación de los andrógenos, entre otros factores, en este. Algunos de estos modelos son:

- 1) Hipertrofia compensatoria promovida por nefrectomía parcial o unilateral.
- 2) Diabetes experimental inducida con stanozolol para reproducir la nefropatía diabética.
- 3) Hipertrofia renal inducida por tratamiento androgénico.
- 4) Crecimiento renal asociado a hipertiroidismo (tratamiento con tiroxina).
- 5) Crecimiento hiperplásico, modelo de daño y regeneración renal inducido por folato o drogas análogas.

En la rata se desarrolla un modelo de crecimiento renal compensatorio postnefrectomía unilateral. La eliminación quirúrgica de uno de los dos riñones promueve un agrandamiento y un aumento de la capacidad del otro riñón para compensar la pérdida de funcionalidad. Los mecanismos que conducen al crecimiento renal compensatorio varían según se trate de ratas machos adultas o prepuberales y/o hembras adultas, y, por tanto, los andrógenos presentes en la circulación (Karp R, 1971; Mulroney SE, 1996; Mulroney SE, 1999; Mulroney SE, 2000). Así en ratas prepuberales, ya sean machos o hembras, y en ratas hembras adultas se da una fase inicial con un crecimiento hiperplásico rápido, y una fase más tardía donde la tasa de crecimiento es menor y de componente hipertrófica. En ratas machos adultas, en cambio, la fase inicial es claramente hipertrófica mientras que en la fase tardía se describe una pequeña componente hiperplásica. Así, la testosterona produce un cambio en el mecanismo de respuesta compensatoria. Además, en machos se da también un mayor crecimiento del riñón y un aumento del volumen glomerular, apareciendo daño tubular y glomerular, ausente en hembras.

En el modelo de la nefrectomía parcial de 5/6 partes del riñón se produce fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis con una progresiva pérdida de la función renal. Se identifica una primera fase rápida de crecimiento hipertrófico con hiperfiltración glomerular, que evoluciona hacia una fase esclerótica tardía de progresivo detrimento renal. Diferentes estudios han sugerido que los animales machos son más susceptibles que las hembras a desarrollar esclerosis glomerular con la edad o después de una reducción de la masa renal, proponiendo los andrógenos como promotores del daño renal. De acuerdo con ello, un estudio realizado para identificar genes sobreexpresados en el modelo de nefrectomía parcial pone de manifiesto el posible rol de dos genes dependientes de andrógenos, el de la KAP (Kidney Androgen-regulated Protein) y el de la MUP (Major Urinary Protein), por otro lado, proteínas de función desconocida, como mediadores del daño renal inducido por andrógenos (Zhang et al., 1999).

En el modelo de daño tubular inducido por folato o por el fármaco CB3717 (Manteuffel-Cymborowska M, 1993; Manteuffel-Cymborowska M, 1997) se da una respuesta reparadora de crecimiento que se caracteriza por una hiperplasia y una inducción tiempo y dosis-dependiente de la enzima ODC (ornitina decarboxilasa), un gen de respuesta androgénica. Se desconoce el mecanismo inducido por folato que conduce a la sobreexpresión de la ODC. En este modelo de crecimiento hiperplásicos se describe también la intervención del HGF (hepatocyte growth factor) y su receptor c-met, implicados en regeneración tisular, embriogénesis y reparación de heridas entre otros. Tanto el HGF como c-met aumentan su expresión en presencia de los inductores del daño renal (Figuras 1.11A y 1.11B), y se demuestra una interacción entre las vías de señalización activadas por folato o CB3717 (a través de HGF y c- met) y las vías activadas por testosterona (a través del receptor de andrógenos) en riñón de machos y hembras, donde el origen de la testosterona es endógeno o exógeno, respectivamente. Esta interacción entre ambas vías se traduce en una disminución en la expresión renal tanto de c-met como del ODC (Figuras 1.11B y 1.11C) (Dudkowska M, 2001). Una de las consecuencias de esta interacción antagónica podría ser un retraso en la regeneración del riñón lesionado por folato o CB3717 en machos.

El crecimiento renal como respuesta adaptativa a diferentes situaciones fisiopatológicas es un proceso complejo que depende del programa genético intrínseco de cada tipo celular establecido durante el desarrollo y la pubertad, así como de factores endocrinos, paracrinos y otros factores de crecimiento presentes en determinadas circunstancias.

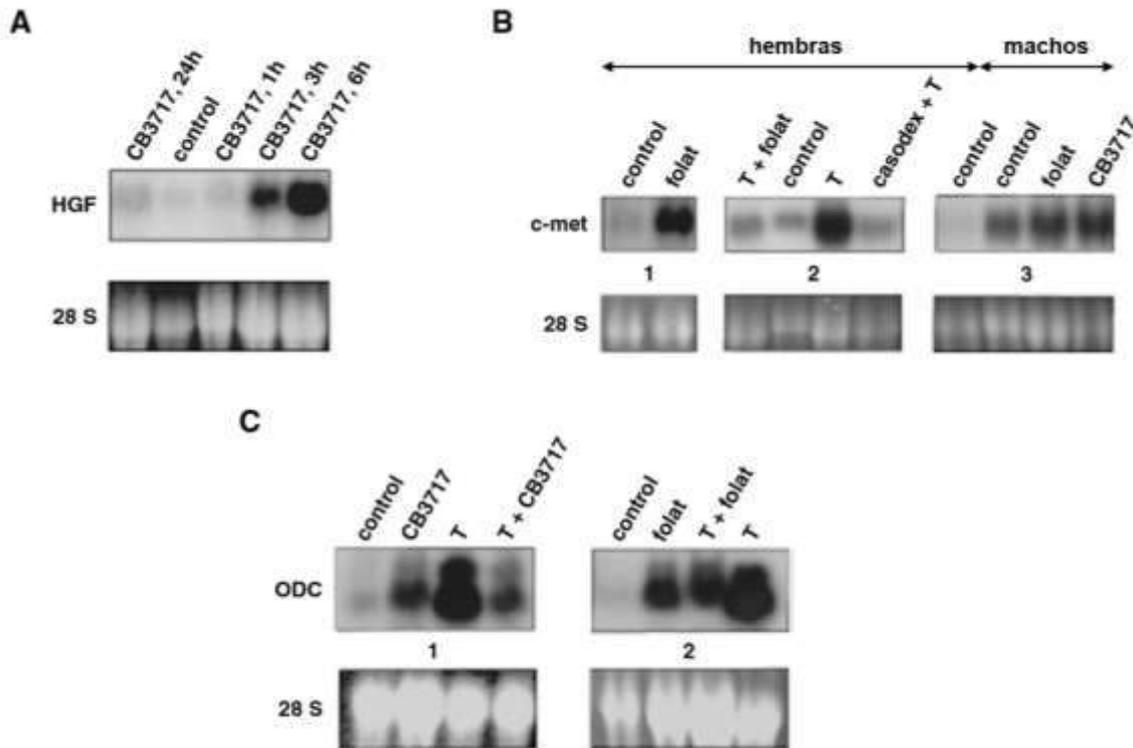


Figura 1.11: Interacción entre la vía de señalización activada por andrógenos y la activada por los inductores de daño renal folato o CB3717. A) Inducción tiempo dependiente del mRNA de HGF por CB3717. B) Efecto del CB3717/folato y/o testosterona (T) en la expresión renal del mRNA de c-met en ratones hembra (1 y 2) y en ratones machos (3). La T se administra durante 5 días, y tanto el folato como el CB3717 durante 1 día. En (2), el pretratamiento con T dura 4 días y en el 5º día se administra el folato. El casodex es un antiandrógeno y se administra 1 h antes que la T. C) Expresión del mRNA de la ODC en ratones hembra tratados con CB3717/folato y/o T al igual que en B. En todos los casos el 28 S se utiliza de control interno.

Testosterona y daño renal

En enfermedades crónicas renales el sexo contribuye con una pérdida acelerada de nefronas donde la progresión es más rápida en machos que en hembras. Los mecanismos específicos que conducen a este fenómeno pueden estar relacionados con diferencias determinadas genéticamente entre sexos en la estructura y función renal y/o con los efectos de las hormonas sexuales en el riñón. Aunque se conoce que los estrógenos poseen un efecto protector contra determinadas situaciones patológicas, varios estudios han sugerido que las hormonas masculinas juegan un papel importante en las diferencias de género en cuanto a la susceptibilidad a diferentes enfermedades (Neugarten J, 2000; Silbiger SR, 2003).

Como se ha descrito previamente, algunas situaciones de hipertrofia en el riñón van acompañadas de la aparición de daño tubular y glomerular, y éste se da con más frecuencia y severidad en machos que en hembras (Dudkowska M, 1999; Mulrone SE, 1999).

El daño renal agudo **promueve respuestas inflamatorias mediadas por la IL-6, que a través de la unión paracrina a su receptor desencadena una cascada de señalización vía los factores de transcripción STAT**. Entre otros genes, se induce la expresión de HGF y c-met que estimulan la síntesis de ADN y la división celular para reparar el daño renal. Los andrógenos, vía la sobreexpresión de c-met, pueden intervenir en estos procesos, lo que sugiere una respuesta sexualmente diferenciada en los riñones de ratón frente al daño sufrido (Dudkowska M, 2001).

Se conoce también que las hembras son más resistentes al daño renal **inducido por isquemia y reperfusión (I/R)** en comparación con los ratones macho. En estos se da un mayor daño en el túbulo proximal renal, y **un aumento de la apoptosis y de la inflamación** (Figura 1.12) (Park K, 2004). Los autores demuestran que es la testosterona la responsable de la mayor susceptibilidad al daño en machos observando que:

- 1) la administración de testosterona a hembras aumenta el daño renal por isquemia.
- 2) La castración reduce el daño renal inducido por I/R.
- 3) La ovariectomía no modifica el daño renal inducido por la isquemia en hembras.

El óxido nítrico (NO), producto del óxido nítrico sintasa (NOS), es un importante mediador endógeno del daño inducido por I/R. El NO posee actividad antiinflamatoria y vasodilatadora, y a través de la vía de señalización de Akt actúa como antiapoptótico. La testosterona inhibe la activación de la NOS, la fosforilación de la Akt y el incremento postisquémico de la ratio de activación ERK/JNK, disparando así una respuesta inflamatoria más importante y un aumento del daño renal.

En ratas, donde la disfunción renal postisquemia también se ha asociado al sexo, se observa una supervivencia del 8% de los machos respecto al 75% de hembras pasados 7 días de la isquemia. En machos se ha descrito que los efectos de los andrógenos en el daño renal podrían venir dados por cambios vasculares inducidos por la endotelina, la expresión de la cual aumenta significativamente en machos, pero no en hembras después de la isquemia. Además, un antagonista del receptor de la endotelina A iguala la tasa de supervivencia entre machos y hembras después de la isquemia (Müller-Steinhardt M, 2002).

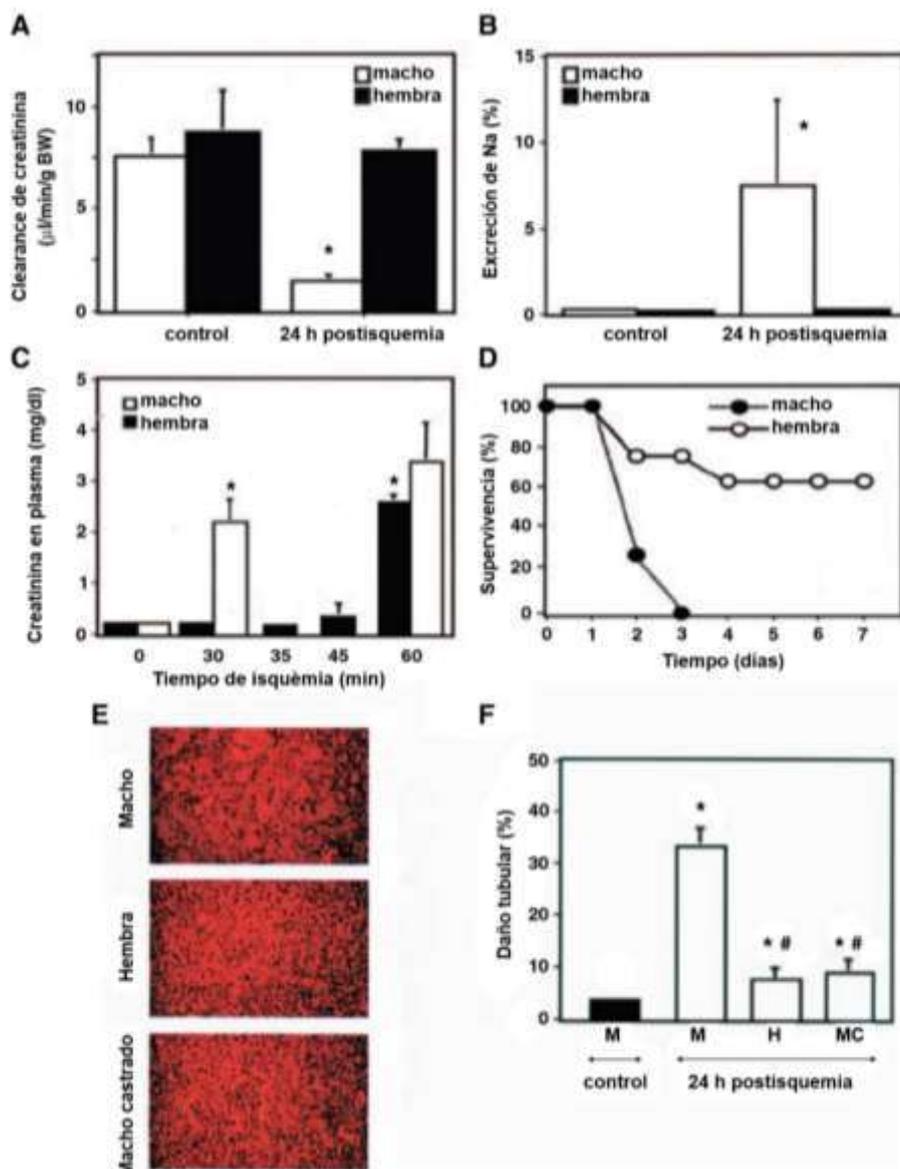


Figura 1.12: Efectos del género en el daño renal inducido por isquemia. Excepto cuando se indica, ratones de la cepa Balb/c se someten a 30 min de isquemia bilateral a 36-38°C. Algunos se someten a castración (E y F) 15 días antes de la isquemia. Pasadas 24 horas de la isquemia se evalúa el clearance de creatinina (A), la excreción de sodio (B), la concentración de creatinina en plasma (C), y daños morfológicos (E y F). En D se exponen los ratones a 60 min de isquemia y se observa la supervivencia durante 7 días. *, $P < 0,05$ versus control; #, $p < 0,05$ versus isquemia en MC, macho castrado; H, hembra; M, macho.

La apoptosis es un tipo de muerte celular que participa en los procesos de remodelación en la fisiología renal y se cree que contribuye también a la pérdida celular y el daño estructural del riñón en enfermedades renales crónicas. La pérdida de nefronas en estas enfermedades es más rápida en machos que en hembras (Neugarten J, 2002). Se ha descrito que los andrógenos pueden inducir la apoptosis en células endoteliales vasculares contribuyendo así a un mayor riesgo vascular en hombres (Ling S, 2002). De todos modos, la interacción andrógenos con supervivencia celular y muerte parece variar entre los diferentes tejidos del organismo. En el riñón, diferentes estructuras

renales estarían particularmente implicadas en procesos apoptóticos. En el riñón de rata se observa que el principal lugar de expresión de Fas y FasL, los cuales promueven la apoptosis por un mecanismo dependiente de caspasas, es el epitelio del túbulo proximal (Boonstra JG, 1997). Además, el sistema Fas/FasL se encuentra sobreexpresados durante el daño renal (Lorz C, 2000). En modelos de enfermedad renal crónica, la apoptosis tiene más peso que la proliferación, favoreciendo así la pérdida celular y la progresión de la atrofia tubular (Thomas SE, 1998). Finalmente, en pacientes con glomerulonefritis ha detectado un incremento en la apoptosis de las células tubulares (Sugiyama H, 1996). Se ha demostrado que la testosterona, a través de su receptor, en células del túbulo proximal renal en cultivo promueve la apoptosis vía Fas y la activación de caspasas, mecanismo que podría interactuar con otros activados en enfermedades renales crónicas y que promueven la pérdida celular (Verzola D, 2004).

Genes regulados por andrógenos en el riñón

Los andrógenos inducen en el riñón la expresión de una serie de genes principalmente a las células del túbulo proximal. Los primeros estudios dirigidos a caracterizar la acción androgénica en el riñón identifican un grupo de genes que aumentan su expresión en el túbulo proximal en respuesta a la testosterona (Berger FG, 1989). Entre ellos se encuentran enzimas como la β -glucuronidasa (GUS), el alcohol deshidrogenasa, y la ornitina decarboxilasa (ODC), o genes que codifican para proteínas de función desconocida, como la D7Rp2 y la Kidney Androgen-Regulated protein (KAP), siendo la última objeto de estudio en esta tesis. En los últimos años se han ido añadiendo también nuevos genes, tanto en rata como ratón, que presentan una expresión renal dimórfico entre sexos caracterizada por un aumento en los machos.

Todos estos genes andrógeno-dependientes en el riñón (Tabla 1.4) poseen funciones diversas, así se encuentran enzimas del metabolismo oxidativo, enzimas del metabolismo de aminoácidos y síntesis de poliaminas, enzimas hidrolíticas o del metabolismo de ácidos grasos, receptores de factores de crecimiento, transportadores de membrana, y genes implicados en el sistema de regulación de la presión arterial.

Por un lado, el estudio de la regulación de la expresión génica en riñón de estos genes andrógeno-dependientes permite identificar y caracterizar aquellos elementos moleculares célula y tejido específicos. Sin embargo, el esclarecimiento de estos mecanismos generales para la respuesta androgénica en el riñón ha resultado costoso, y aún ahora se desconocen muchas cuestiones sobre los posibles factores y mecanismos moleculares responsables de las respuestas de inducción. En primer lugar, a pesar de disponer de un número elevado de genes, estos muestran respuestas androgénicas heterogéneas tanto en cuanto a la cinética de inducción como para la participación de otros factores hormonales en su regulación (Lund SD, 1991; Berger FG, 1989; Melanitou E, 1987; Solé E, 1994; Meseguer A, 1990). Además, ha sido muy difícil disponer de un sistema celular apropiado que respondiera eficientemente a la estimulación con

andrógenos para poder realizar estudios con genes reporteros bajo el control de promotores andrógeno-dependientes. El establecimiento de dos líneas epiteliales inmortalizadas, las PKSV-PCT y PKSV-PR, derivadas de túbulo proximal de ratón, y que corresponden al segmento contorneado y al segmento recto, respectivamente (Cartier N, 1993; Lacave R, 1993), ha proporcionado un sistema celular adecuado para el estudio de la regulación androgénica. Estas líneas celulares retienen muchas de las características de las células parentales de las que derivan y se ha demostrado que responden eficientemente a los andrógenos (Ouar Z, 1998).

Tabla 1.4: Algunos genes murinos regulados por andrógenos en el riñón

CATEGORIA FUNCIONAL	GEN	REFERENCIA
Enzimas hidrolíticas	β -Glucuronidasa (Gus)	Bardin et al., 1978
Metabolismo aminoácidos / poliaminas	Ornitina decarboxilasa (Odc)	Pajunen et al., 1982
	Arginasa	Swank et al., 1997
	Spermidine/Spermine N1-acetyltransferase (SSAT)	Bettuzzi et al., 2001
Enzimas de la fase I del metabolismo oxidativo	Citocrom P450 2c1 (Cyp2e1)	Davis et al., 1993
	Citocrom P450 4b1 (Cyp4b1)	Imakoa et al., 1995
	Citocrom P450 4a12 (Cyp4a12)	Holla et al., 2001
	Alcohol deshidrogenasa (Adh-1)	Felder et al., 1988
Enzimas de la fase II del metabolismo oxidativo	Arilamina N-acetiltransferasa (Nat2)	Smolen et al., 1993
	UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs)	Rush et al., 1983
Metabolismo lipídico	SA (acil-CoA sintetasa)	Melià et al., 1998
Sistema renina-angiotensina	Angiotensinogen (Ang-n)	Ellison et al., 1989
Transporte de aniones y cationes orgánicos	Organic anion transporting polipeptide 1 (Oatp1)	Isern et al., 2001
	Organic anion transporting polipeptide-d (Oatp-d/MJAM)	Isern, Tesi doctoral, 2003
	Organic cation transporter 2 (Oct2)	Urakami et al., 2000
Señalización celular	c-met	Dudkowska et al., 2001
Otros	Sex-limited protein (Slp)	Nelson et al., 1997
	Kidney androgen-regulated protein (Kap)	Meseguer et al., 1987
	Androgen-inducible RP2 mRNA (D7Rp2e)	King et al., 1986

Por otro lado, la profundización en el estudio funcional de todos estos genes andrógeno-dependientes permitirá conocer el significado fisiopatológico de la acción androgénica en el riñón y el porqué de este dimorfismo sexual.

Las líneas PKSV-PCT y PKSV-PR han resultado de gran utilidad en nuestro laboratorio para el estudio tanto de los elementos en cis y en trans involucrados en la regulación de la expresión de la KAP (Soler M, 2002; Teixido N, 2006), los Oatp1 y Cyp4b1 (Isern J, 2001; Isern J, 2003) y el SA (Aresté C, 2004), así como en la caracterización funcional de los mismos, sobre todo de la KAP (Cebrian C, 2001), proteína que, como ya se ha mencionado anteriormente, es el objeto de estudio de esta tesis.

1.3. KAP (Kidney Androgen-regulated Protein)

La búsqueda de proteínas reguladas por andrógenos en el riñón murino llegó a la identificación, por traducción *in vitro*, de la Kidney Androgen-regulated Protein (KAP) (Held A, 1979). Inicialmente fue descrita como una proteína de 20.000 daltons, codificada por un mRNA relativamente abundante (entre el 4 y el 5% del mRNA del riñón de ratón macho) que presentaba un claro dimorfismo sexual en su expresión. Así, el máximo de expresión se encuentra en machos intactos seguidos de hembras, y finalmente los machos castrados con los niveles de expresión más bajos. El tratamiento con testosterona de estos dos últimos grupos recupera los niveles de expresión, equiparándolos al de los machos intactos. El análisis de su expresión puso de manifiesto que era prácticamente indetectable en otros tejidos que no fueran el riñón. Así pues, el estudio de la regulación y función de KAP promete avances en el conocimiento de los factores que regulan la expresión y la especificidad tisular de genes andrógeno-dependientes, al tiempo que permite elucidar algunos de los efectos fisiológicos de esta hormona en el riñón.

1.3.1. Estructura del gen de la KAP y localización cromosómica

La estructura genómica de la KAP ha sido igualmente objeto de estudio. Identificado como un gen de copia única (Held A, 1979), el gen de la KAP obtenido a partir de DNA de ratones BALB/c contiene un total de 3.807 nucleótidos estructurados en 4 exones (de 120, 177, 63 y 251 nucleótidos respectivamente) y 3 intrones (de 1450, 126 y 1620 nucleótidos) (Niu EM, 1991) (Figura 1.13).

Las uniones entre intrones y exones presentan las secuencias canónicas consenso de *splicing* de los transcritos primarios eucarióticos. El primer intrón contiene dos regiones de DNA repetitivo (ag)₃₃ entre las posiciones 674-739, y (gt)₁₆ entre los nucleótidos 1013-1044.

El estudio de los polimorfismos de los fragmentos de restricción del gen de la KAP en las cepas C57BL/6 y BALB/c indica un elevado polimorfismo entre ambas (Niu EM, 1991).

Según el análisis de la localización cromosómica, el gen KAP se sitúa en el cromosoma 6 de ratón, entre los genes de la GAPD y Kras-2 (Melanitou E, 1991). Estudios posteriores discriminan una región más pequeña: actualmente se ha acotado la localización del gen KAP en la posición 63,7 cM del cromosoma 6 de ratón.

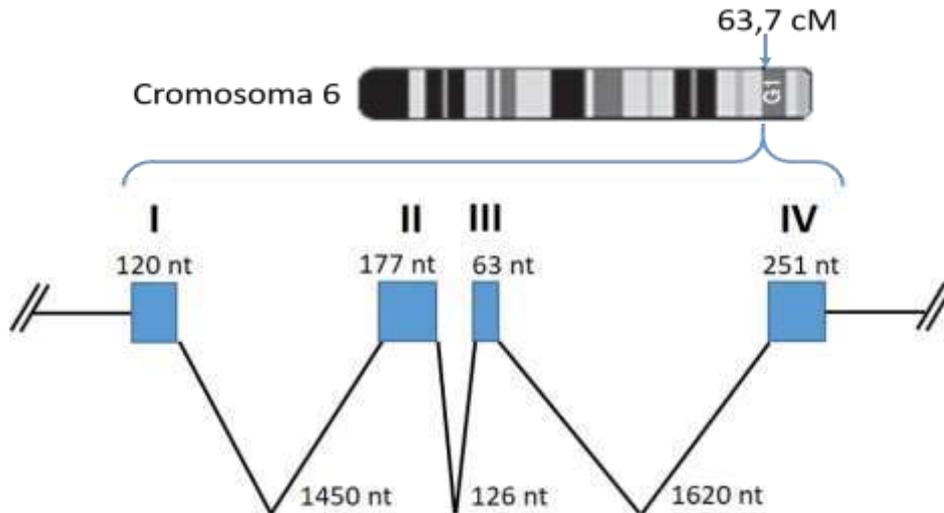


Figura 1.13: Estructura del gen KAP. Se señalan los 4 exones y los 3 intrones.

1.3.2. El mRNA de KAP

El cDNA de KAP se obtuvo a partir de mRNA de riñón de ratón hembra (cepa A/J) tratada con testosterona (Meseguer A, 1989) (Figura 1.14).

```

1  atttctttctcctggttcaactggttgcccttaaccctactaaagc
44  atgatgcttttcaaggctcctggtgatcactgtcttctgtgggtctg
   M M L F K V L V I T V F C G L
89  actgtggctttcccccctgtcagaattagtttcaatcaataaagaa
   T V A F P L S E L V S I N K E
134 ctacagaattcaatcattgacctactaaactcagtctttgaccaa
   L Q N S I I D L L N S V F D Q
179 ctgggatcatacagagggacaaaagctcctctagaggattataca
   L G S Y R G T K A P L E D Y T
224 gatgatgatttaagcactgactctgagcagatcatggacttcacg
   D D D L S T D S E Q I M D F T
269 ccagccgcaaacaaacagaattctgagttctctactgatggttgag
   P A A N K Q N S E F S T D V E
314 acagtctcctccggctttctggaagaattcactgagaacacagac
   T V S S G F L E E F T E N T D
359 atcacagtgaaaattccattagctgggaatccagtctcccctact
   I T V K I P L A G N P V S P T
404 tcttgagaagactccaactttgaataaacctgcgactgccattc
   S *
   aggatattgtctttgtagaaaatgatataaatctaagatgctccc
   agcaaagaagaagaacgaggaagtgatcctggatgagaaatgct
   gtgccaggcatctctaagctctacccttactctgtgtgggtttaa
   gaaataaacgttcatttgaattgc

```

Figura 1.14: Secuencia nucleotídica del cDNA de la KAP y proteína deducida (GenBank M22810)

Este cDNA de 607 nucleótidos presenta una región 5' no codificante de 43 nucleótidos que contiene dos codones de *stop* a 5' del primer ATG, y una región 3' no codificante de 198 nucleótidos que incluye la señal de poliadenilación a 23 nucleótidos 5' del lugar de poliadenilación.

Des de su identificación (Held A, 1979) el mRNA de KAP se ha considerado una especie considerablemente abundante en el riñón de ratón macho. La aplicación de nuevas tecnologías de análisis a gran escala, SAGE (*serial análisis of gene expresión*), SADE (*SAGE adaptation for downsized extracts*) y comparación de perfiles de expresión génica (*expresión profile*), permitieron confirmar la abundancia del mRNA de KAP en el riñón murino (El-Meanawy MA, 2000; Virlon B, 1999; Takenaka T, 1998).

Mediante técnicas de hibridación *in situ*, Meseguer y colaboradores (Meseguer A, 1987) demostraron la presencia de mRNA de KAP en las células del túbulo proximal renal de manera exclusiva. (figura 1.15).

En lo referente a la especificidad tisular, la expresión de KAP está restringida al riñón (Held A, 1979; Ding Y, 1997; Melia MJ, 1998). La utilización de RT-PCR confirmó la ausencia de KAP en otros (Cebrián C, 2001) (Figura 1.16).

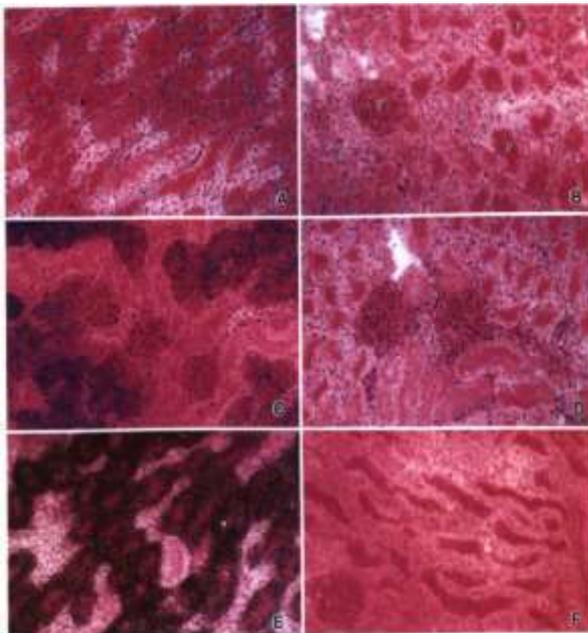


Figura 1.15: Identificación histológica de la estructura renal después de la hibridación *in situ*. Se hibridaron secciones de riñón de ratones macho castrados (A, B), intactos (C, D) y tratados con andrógenos (E, F) con transcripciones marcadas con ^{35}S de los plásmidos pKAP3 (A, C, E) o pKAP4 (B, D, F). La reacción PAS se llevó a cabo en estas secciones para identificar estructuras morfológicas del riñón. La sección en B que fue negativa para la hibridación se presenta como un ejemplo de la identificación PAS de glomerulos (g), túbulos proximales (p) y túbulos distales (d).

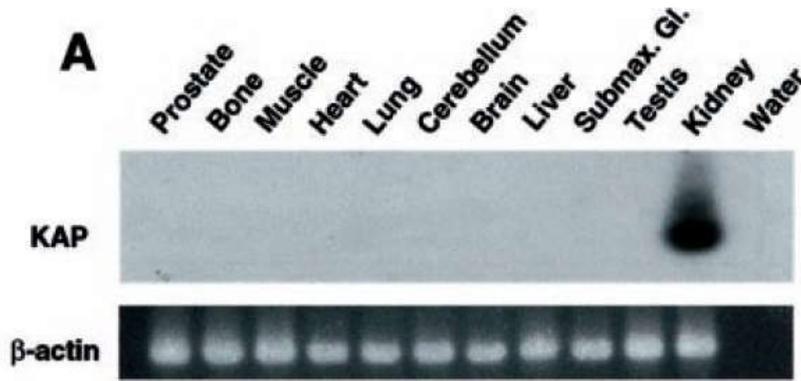


Figura 1.16: RT-PCR/Southern a partir de mRNA de diferentes tejidos de ratón.

El útero es el único tejido extrarenal donde se ha descrito la presencia de mRNA de KAP (Kasik JW, 1993). Se ha demostrado por Northern Blot (Kasik JW, 1993) y por RT-PCR (Cebrián C, 2001) (Figura 1.17) que, en el caso de los ratones, el mRNA está presente única y exclusivamente en los úteros de hembras gestantes durante 3 días previos al parto. No hay expresión de KAP en la placenta, ni tampoco en el útero fuera de los días mencionados.

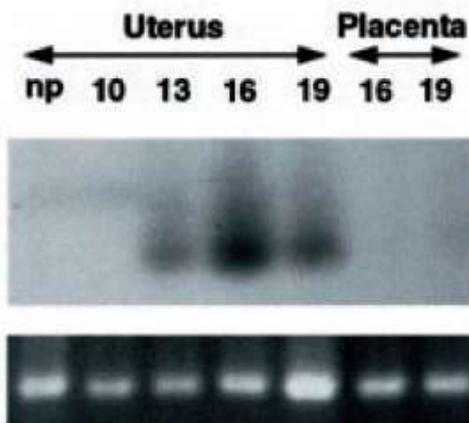


Figura 1.17: RT-PCR a partir de mRNA de útero en diferentes días de gestación. np: no gestante.

En ratas, contrariamente a lo observado en ratón, se ha detectado la presencia de KAP en el útero de hembras no gestantes, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Runic R, 1996), disminuyendo de forma drástica su expresión a partir del día 1 de gestación. Los autores observaron un pico de expresión el día 5, para volver a disminuir hasta casi ser indetectable entre los días 11 y 15 de gestación. a partir del día 19 y de manera previa al parto (día 22) los niveles de mRNA de la KAP aumentan hasta el valor inicial.

1.3.3. Regulación multihormonal del gen de la KAP

Tanto la especificidad tisular como la regulación por andrógenos hicieron de la KAP un muy buen modelo para estudiar los mecanismos de regulación hormonal tejido-específicos. Desde su identificación, han sido muchas las aproximaciones al estudio de la regulación hormonal de la KAP: diferentes tratamientos quirúrgicos, tratamientos farmacológicos, así como la utilización de transgénicos y cepas de ratón deficientes por una u otra hormona, han hecho posible el conocimiento actual de la regulación de la KAP.

Regulación por andrógenos y estrógenos en el riñón

La KAP se identificó en base a su regulación por andrógenos (Held A, 1979). Mediante cinéticas de hibridación, los autores asignaron una concentración de mRNA de KAP en machos BALB/c 10 veces superior que, en hembras, y 200 veces superior que en machos castrados. Asimismo, el análisis de una cepa de ratón, C57BL/6, demuestra que, mientras los machos intactos de las dos cepas presentan valores parecidos de mRNA de la KAP, los castrados C57BL/6 contienen sólo 20 veces menos mRNA que los machos intactos.

Diferencias de los niveles de inducción entre cepas murinas se han descrito también para otros genes regulados por andrógenos, como la ornitina descarboxilasa (ODC) (Melanitou E, 1987) y la β -glucuronidasa (Catterall JF, 1986).

El tratamiento de hembras y machos castrados con andrógenos provoca un aumento de la expresión del mRNA de la KAP hasta valores descritos en machos intactos. Esta inducción es evidente a las 6 horas de iniciarse el tratamiento, y alcanza su máximo a las 24 horas (Watson CS, 1984; Catterall JF, 1986). Estudios posteriores (Watson G, 1988) de la tasa de síntesis del mRNA de la KAP sugiere una elevada estabilidad, ya que su concentración aparece desproporcionadamente elevada en comparación con su tasa de síntesis; ahora bien, el estudio también demostró que el aumento en la expresión del mRNA de KAP en respuesta a los andrógenos es de origen transcripcional, y no debido exclusivamente a la estabilización del mensajero.

Según unos estudios con ratón deficientes para el receptor de andrógenos (Tfm), la testosterona aumenta la expresión de la KAP en ausencia de su receptor (Watson CS, 1984). Posteriormente se hizo evidente que no se trataba de un efecto directo de los andrógenos; En el riñón la testosterona se puede aromatizar a estrógeno y activar la expresión de la KAP en ausencia de un receptor de andrógenos funcionales en ratones Tfm. La no activación de la expresión de la KAP utilizando DHT (metabolito androgénico no aromatizable) en ratones Tfm, conjuntamente con la activación obtenida en tratar estos ratones con β -estradiol (Meseguer A, 1989) demuestra la implicación de los estrógenos en la regulación de KAP. Así, los estrógenos también aumentan la expresión

de la KAP, aunque con una menor intensidad que los andrógenos, en machos, hembras y castrados (Meseguer A, 1992).

La utilización de la técnica de hibridación *in situ* ha aportado información valiosa para la comprensión de la regulación hormonal de la KAP. Así, se ha demostrado que los andrógenos controlan la distribución tisular del mRNA de la KAP (Meseguer A, 1987; Meseguer A, 1989) (Figura 1.21).

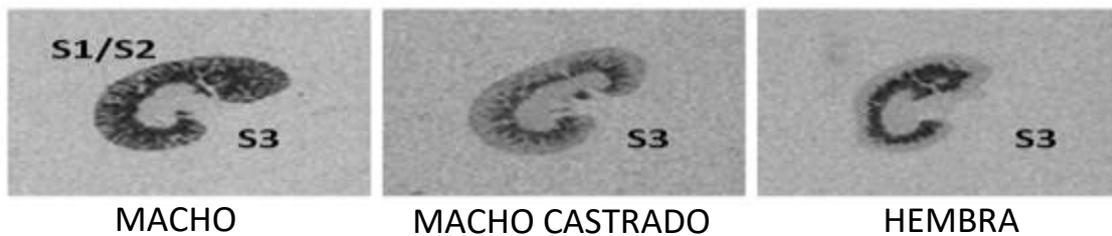
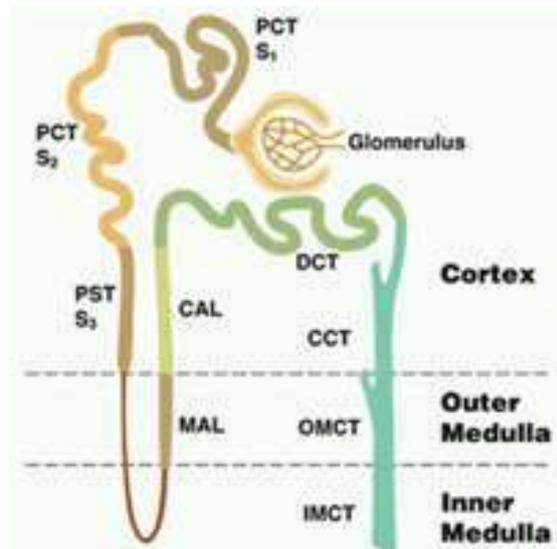


Figura 1.21: Cortes transversales de riñón murino donde se ha utilizado la técnica de hibridación *in situ* con sondas de KAP-mRNA de cadena sencilla. Se observa como en presencia de andrógenos (macho) la KAP se expresa en todo el túbulo, mientras que sin andrógenos (Macho castrado y hembra) sólo se expresa en S3.



Los machos castrados y las hembras expresan el mRNA de la KAP a las células epiteliales de la región yuxtamedular (zona externa de la médula externa, o segmento S3). Los machos intactos presentan, además, un claro marcaje cortical (segmento S1/S2). El tratamiento de hembras y machos castrados con andrógenos provoca la aparición de señal cortical en las hibridaciones *in situ* de los riñones de estos animales (Meseguer A, 1990).

Los estrógenos, en cambio, afectan la expresión de la KAP en el segmento S3, tanto en hembras como en machos, como en machos castrados (Meseguer A, 1992).

Regulación por hormonas tiroideas en el riñón

Si la presencia de andrógenos es la responsable de la expresión del mRNA de la KAP por parte de la célula epitelial de la región cortical, la expresión en la región yuxtaglomerular no es dependiente de andrógenos, ya que la extirpación de las gónadas y las glándulas suprarrenales no elimina la expresión de la KAP en el segmento S3 (Meseguer A, 1990). La ausencia de expresión en S3 en animales hipofisectomizados apunta a la participación de algún factor hipofisario (Meseguer A, 1990). La utilización de ratones deficientes en diferentes hormonas hipofisarias indicó que la expresión en la región yuxtaglomerular depende de la presencia de T_3 . La implicación directa de la T_3 se demostró con los ensayos con ratones *Hyt/Hyt* (que presentan hipotiroidismo congénito) y con animales tiroidectomizados o tratados con perclorato sódico (de esta forma se impide la entrada de iodo en la tiroide y la formación de T_3). En estos animales desaparece completamente la señal yuxtaglomerular de las hembras y los machos castrados, recuperándose con el tratamiento con T_3 (Solé E, 1994) (Solé E, 1996).

Sin embargo, diferentes modelos de hipotiroidismo han indicado que la hormona tiroidea también podría contribuir a la respuesta androgénica en las células PCT (Pars convoluta, segmentos S1/S2). Estudios posteriores han confirmado que la TH y la GH (Hormona del crecimiento) modulan la proteína C/EBP (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*) que, a su vez, controlan la expresión de KAP en las células PCT de una manera dependiente del desarrollo, demostrando que estos factores se unen a sitios en el promotor KAP proximal, colaborando así con los andrógenos para la expresión completa de KAP (Teixido N, 2006).

Regulación en el útero

La regulación hormonal de la expresión de la KAP en el útero se ha estudiado en el modelo de rata, observándose una clara dependencia de los estrógenos y un patrón de expresión diferente al del ratón (Runic R, 1996). Por un lado, los autores evaluaron los niveles de mRNA de la KAP a lo largo del ciclo estrogénico de la rata, identificándose una ligera disminución durante el diestro.

Asimismo, los estrógenos indujeron la expresión uterina del mRNA de la KAP en hembras de ratas ovariectomizadas, mientras que un inhibidor de la acción estrogénica (tamoxifeno) inhibió la expresión uterina, tanto en hembras gestantes como en no gestantes.

El promotor de la KAP

La región promotora de la KAP fue clonada y analizada por la presencia de respuesta a diferentes factores de transcripción en un primer momento por Niu y colaboradores (Niu EM, 1991). Posteriormente, estudios in vitro utilizando las células del túbulo proximal renal PKSV-PCT y PKSV-PR (Cartier N, 1993; Lacave R, 1993), únicas en su capacidad de responder a andrógenos en un sistema celular aislado (Ouar Z, 1998), permitieron refinar los mecanismos moleculares que subyacen a la expresión de KAP en el riñón. Asimismo, experimentos clásicos de transfección transitoria con fragmentos truncados y/o mutados del promotor de KAP, junto con ensayos de shift y supershift han permitido observar la existencia de distintos elementos de respuesta funcionales para c/EBPs y Sp1/Sp3, junto con una caja TATA y un ARE también funcionales (Teixido N, 2006) (Figura 1.20). En el extremo 5' se encuentra la caja TATAAA (nucleótidos -28 a -23), así como la secuencia CCAAC (nucleótidos -69 a -65). Esta distribución de los elementos TATA y CAAT es típica de muchos genes eucarióticos que son transcritos por la RNA polimerasa II. Hay repeticiones de estos elementos a lo largo de la secuencia de DNA, localizados más a 5' del inicio de transcripción, pero no presentan la orientación correcta ya sea entre ellos o respecto al inicio de la transcripción. Se han identificados otras secuencias que pueden funcionar como elementos reguladores en *cis*. Entre ellos se encuentran un elemento de respuesta a andrógenos (ARE), situado al nucleótido -39 y solapado con la caja TATAAA, un posible elemento de respuesta a hormona tiroidea a -609, varios lugares putativos de unión para C/EBP y un lugar de unión para AP-2 a -261. También se han descrito medios elementos de respuesta a estrógenos en -604 y -264 (Tora L, 1988).



Figura 1.20: Promotor del gen KAP con elementos de respuesta funcionales identificados.

Todos estos elementos, situados en los primeros 600 pares de bases del promotor, cooperan de forma aditiva y/o sinérgica formando un enhanceosoma en el promotor proximal que facilita la transcripción del gen. La pérdida de alguno de los

lugares de unión a Sp1, TATA, ARE o la de un elemento situado en la posición -429 del promotor, cuyo factor de unión resta por confirmar, compromete de forma absoluta la transactivación del promotor de KAP. Además de estos elementos esenciales, se conoce que la GH, a través de IGF-1 (Soler M, 2002), y los glucocorticoides (Teixidor N, 2007) sinergizan con el receptor de andrógenos y Sp1 en la activación transcripcional de KAP. En resumen, estos experimentos indican que existe un estricto y coordinado control multifactorial de la expresión del gen KAP en las células del túbulo proximal, lo que probablemente sugiere la conveniencia de mantener sus niveles de expresión en un estricto rango fisiológico.

Estudios posteriores en nuestro grupo demostró que los diferentes lugares putativos de unión para C/EBP son funcionales y su integridad condiciona de forma importante la expresión de la KAP (Teixido N, 2006).

Uso del promotor del gen de la KAP en transgénicos

La especificidad celular y la regulación androgénica de la expresión de la KAP hacen de su promotor una herramienta útil a la hora de dirigir la expresión de transgenes en el túbulo proximal renal. En la construcción de estos modelos se han utilizado los primeros 1542 pb del promotor proximal del gen de la KAP, unidos a elementos enhancer del gen del angiotensinógeno (Ding Y, 1997; Ding Y, 2001). Este fragmento ha conducido a la expresión del correspondiente transgén exclusivamente en las células epiteliales de la región cortical del túbulo proximal y de manera andrógeno dependiente. Los transgénicos, por tanto, han permitido profundizar en el comportamiento del promotor *in vivo* y han mostrado que en los primeros 1542 pb se encuentran los elementos reguladores suficientes para dirigir la expresión célula específica y dependiente de andrógenos que se observa en las células S1/S2 para la KAP. Sin embargo, la ausencia de expresión en S3 denota la ausencia en este fragmento proximal del promotor de los elementos reguladores responsables de la expresión de KAP en esta zona.

Estudios posteriores han demostrado que con únicamente los primeros 224 pb del promotor proximal del gen de la KAP es suficiente para la transactivación dependiente de andrógenos y del AR (Soler M, 2002).

pKAP2-KAP (KAP tg)

Nuestro grupo generó un ratón transgénico que sobreexpresaba el mRNA de la proteína KAP en el riñón. Los ratones transgénicos se generaron a partir de la construcción pKAP2-KAP que contenía el propio promotor de KAP, 1542 pares de bases (pb) de la región 5' del gen de KAP, fusionado a elementos enhancer contenidos en el gen del angiotensinógeno humano. Esta construcción permitió la expresión del gen KAP heterólogo de forma tejido-específica, célula-específica y regulada por andrógenos (Tornavaca O, 2009; Grande MT, 2011).

1.3.4. La proteína deducida de KAP

La secuencia del mRNA de la KAP, de 607 nucleótidos, permite identificar una pauta abierta de lectura de 363 nucleótidos con el ATG de inicio en la posición 44 y el codón STOP a la posición 407 del mRNA (Meseguer A, 1989) (Figura 1.14). La secuencia de la proteína deducida consta de 121 aminoácidos entre los que los autores identifican un posible péptido señal entre los residuos 1 y 18, así como una región rica en prolina, ácido aspártico y glutámico, serina y treonina (PEST) entre los aminoácidos 83 y 102. La secuencia aminoacídica deducida codifica para una proteína de 13,3 KDa, con un punto isoeléctrico teórico de 3,92, y de la escisión del putativo péptido señal resultaría una proteína madura con un peso molecular de 11 KDa. Sin embargo, el peso aparente de la proteína KAP en un gel de SDS-PAGE es de aproximadamente 20 KDa, y se da tanto en la proteína obtenida de extractos de riñón, como la expresada de manera heteróloga en bacteria o sintetizada in vitro en un sistema de reticulocito de conejo (Held A, 1979) (Cebrián C, 2001). Así pues, la diferencia entre el peso molecular aparente y el deducido de la secuencia de aminoácidos en la proteína KAP no es atribuible a posibles modificaciones postraduccionales sino más bien a las características físico-químicas de su composición aminoacídica. Ya en 1989, A. Meseguer y colaboradores apuntaban que el contenido inusualmente alto de prolina, serina, treonina, ácido glutámico y ácido aspártico (42% del total) en la proteína podría explicar su migración aberrante en SDS-PAGE.

El análisis posterior de la secuencia primaria de la proteína KAP mediante el programa PESTfind desarrollado por Rechsteiner y Rogers y de libre acceso a EMBnet AUSTRIA, señala una secuencia PEST potencial entre las posiciones 53 y 80, pero inválida en la región situada entre los aminoácidos 80 y 109 (Figura 1.22). Rechsteiner y Rogers proponen que secuencias polipeptídicas ricas en prolina, serina, treonina, ácido glutámico y ácido aspártico conducen a la proteína a una rápida degradación (Rogers S, 1986; Rechsteiner M, 1990; Rechsteiner M, 1996). En los últimos años, muchos científicos han aportado fuertes evidencias de que las regiones PEST, en efecto, funcionan como señales de proteólisis. Este dato sugiere que KAP es una proteína de vida media corta.

El programa PROSITE aporta datos respecto a las posibles modificaciones postraduccionales que pueden llevarse a cabo en la proteína KAP (Figura 1.22). Así predice, por un lado, diferentes sitios de fosforilación consenso para las quinasas CK2 y PKC. Concretamente describe cinco posibles sitios de fosforilación para la quinasa CK2, dos serina y tres treonina, los cuales se han demostrado como verdaderas dianas de estas quinasas y como las responsables de promover la degradación de la KAP (Tornavaca O, 2007) (Figura 1.23), y dos dianas para la PKC, una serina y una treonina. Por otra parte, el programa también señala un posible lugar de sulfatación en la tirosina 59. Tanto la fosforilación como la sulfatación son de primordial relevancia para la función y/o estructura de las proteínas.

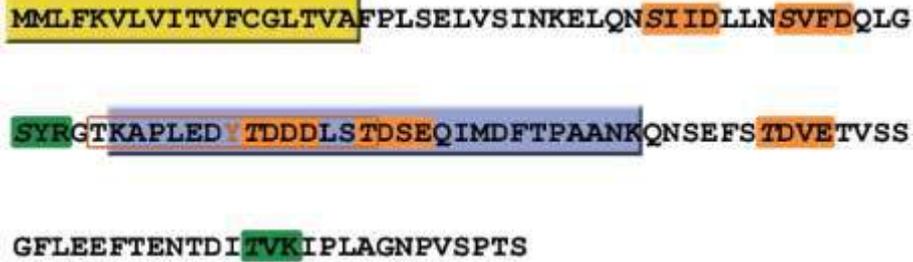


Figura 1.22: La proteína KAP. Secuencia de la proteína KAP deducida a partir de su mRNA donde se señalan las diferentes predicciones obtenidas con los programas de análisis detallados en el texto. El péptido señal se indica con un recuadro amarillo. La región PEST enmarca con un recuadro azul. Los sitios de fosforilación para la CK2 señalan con un recuadro color calabaza, y los sitios de fosforilación para la PKC con un recuadro verde. En ambos casos, el aminoácido fosforilable está en letra itálica. Un recuadro vacío de color marrón indica el lugar de sulfatación donde se señala, también en marrón, la tirosina modificada.

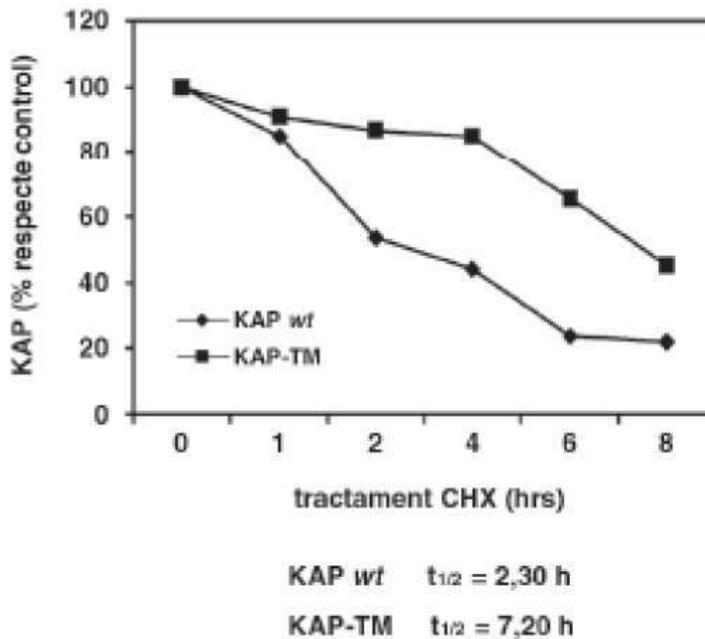


Figura 1.23: La mutación de los dominios de fosforilación estabiliza la KAP. La versión mutada KAP-TM presenta una vida media muy superior a la salvaje KAP-wt que disminuye más rápidamente sus niveles delante de un inhibidor de la síntesis proteica (CHX) (Tornavaca O, 2007).

El análisis computacional de señales de localización subcelular, así como de dominios de unión a RNA, DNA o actina en KAP mediante el programa PSORT II no revela ningún dato significativo a excepción de un posible péptido señal en los primeros 18 aminoácidos de la proteína (Figura 1.22) ya descrito por Meseguer y colaboradores en 1989. en base a esta información, el programa resuelve que en un 55,6% de probabilidades se trata de una proteína extracelular.

La búsqueda de motivos o dominios funcionales o estructurales en KAP por diferentes programas como el MotifScan y el InterProScan, entre otros, ha sido infructuosa, por lo que no existen indicios indirectos de la posible función de la proteína en el riñón.

1.3.5. Localización y regulación de la proteína KAP

Para poder estudiar la localización de la proteína KAP y la regulación de su expresión nuestro laboratorio generó anticuerpos monoclonales contra KAP (Figura 1.24), que reconocía específicamente una proteína de un peso molecular aparente de 20KDa en homogenados de riñón (Cebrian C, 2001).

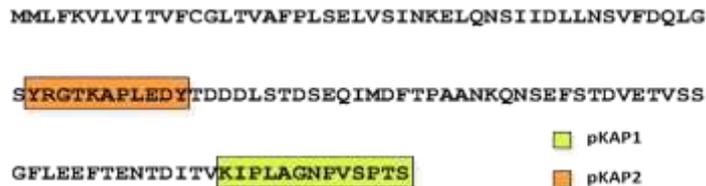


Figura 1.24: Secuencia de los dos péptidos utilizados para generar los anticuerpos α -KAP.

La proteína KAP en el riñón

El estudio de la distribución de la proteína KAP en cortes histológicos de riñón por inmunohistoquímica reveló que la proteína se localiza en los túbulos proximales renales siguiendo el mismo patrón de distribución que su mRNA (Cebrián C, 2001). La proteína sigue también el mismo perfil andrógeno-dependiente que su mRNA, así por Western blot se demuestra que los niveles de proteína son claramente más abundantes en riñón de ratón macho que en hembra o macho castrado, y es en este último donde se observan los niveles más bajos de expresión (Figura 1.25A). La distribución de la proteína a lo largo del túbulo proximal renal también se encuentra bajo el control androgénico. En cortes histológicos de riñón se evidencia que, mientras hembras y machos castrados muestran una expresión restringida al segmento S3 del túbulo proximal, el macho intacto presenta, además, un claro marcaje cortical correspondiente a los segmentos S1/S2 (Figura 1.25B).

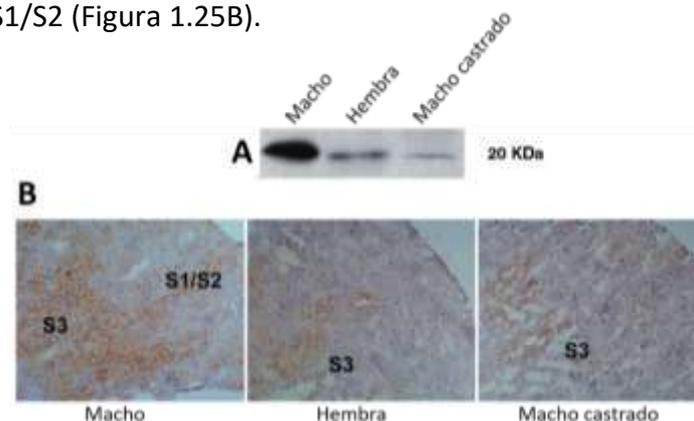


Figura 1.25: Regulación y distribución andrógeno-dependiente de la proteína KAP en riñón. **A)** Análisis por Western blot de extractos de riñón de macho, hembra y macho castrado. **B)** Inmunohistoquímica de criosecciones de riñón de ratón bajo diferentes condiciones hormonales.

La proteína KAP en células epiteliales del túbulo proximal renal murino en cultivo

El nivel de expresión del mRNA de KAP en líneas celulares derivadas del túbulo proximal renal murino como PKSV-PCT y PKSV-PR es prácticamente indetectable, aunque en riñón represente uno de los mRNA más abundantes. Sin embargo, no siempre ha sido de esta manera, inicialmente ambas líneas presentaban altos niveles de expresión del mRNA de KAP detectables por Northern blot (Ouar Z, 1998), con el tiempo y las sucesivas siembras se ha ido perdiendo la expresión y actualmente se necesitan técnicas de detección sensibles como la RT-PCR para observar cierta expresión del mRNA de KAP en células en cultivo. Las técnicas empleadas hasta el momento, Western blot e inmunocitoquímica, no han conseguido demostrar la presencia de la proteína en estas mismas células.

La utilización de proteínas de fusión ha permitido observar tanto el patrón de distribución de KAP en células en cultivo como su secreción al medio. La construcción GFP-KAP transfectadas transitoriamente en la línea PKSV-PCT adopta un patrón claramente reticular citoplasmático y alrededor del núcleo, a diferencia de la GFP que se distribuye uniformemente en el citoplasma (Cebrián C, 2001) (Figura 1.26).

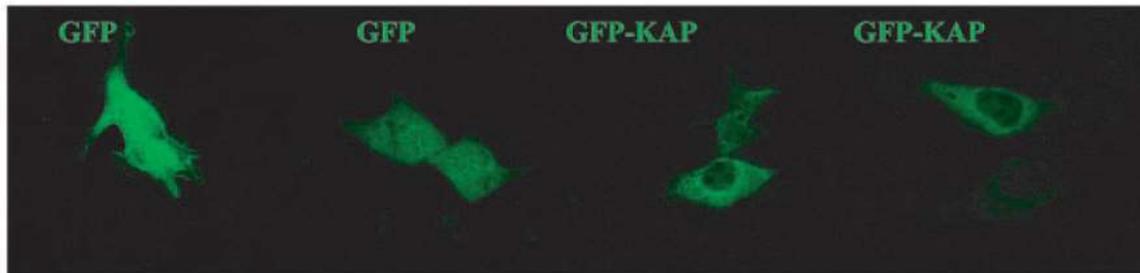


Figura 1.26: Células PCT transfectadas con plásmidos que codifican GFP sola o proteína de fusión GFP-KAP.

1.3.6. La Ciclofilina B: Una proteína de unión a KAP

Interacción y colocalización con KAP

A pesar de los avances en el estudio de la expresión y la regulación del mRNA de KAP desde el momento de su primera descripción en 1979, la función de la proteína sigue siendo desconocida. Dada la falta de dominios funcionales o estructurales que sugirieran un posible rol de la proteína en las células del túbulo proximal, nuestro laboratorio centró los esfuerzos en identificar proteínas capaces de interactuar con KAP que pudieran proporcionar nueva información sobre su función. La técnica del doble híbrido permitió identificar la interacción de KAP con la Ciclofilina B (CypB) (Cebrián C, 2001) (Figura 1.28), un miembro de la familia de las inmunofilinas que exhibe actividad peptidil-prolil cis/trans isomerasa y que posee la capacidad de unirse al potente inmunosupresor ciclosporina A (CsA). En un primer intento de delimitar los dominios responsables de esta interacción tanto en KAP como en CypB se demuestra que los últimos 46 aminoácidos de la región C-terminal de CypB son suficientes para la interacción, y que ésta depende de los primeros 92 aminoácidos de la región N-terminal de KAP, sabiendo que los primeros 51 no son suficientes, pero podrían ser necesarios (Cebrián C, 2001). La CypB en la línea celular PKSV-PCT se distribuye siguiendo un patrón reticular alrededor del núcleo, así como en la membrana celular. Sólo en los orgánulos intracelulares se da la colocalización con la proteína de fusión GFP-KAP. Es interesante remarcar que en aquellas células donde se da la expresión recombinante de GFP-KAP hay una disminución de la CypB endógena de membrana en comparación con las células no transfectadas (Figura 1.27). Se sugiere que la interacción de KAP con CypB podría contribuir a retener la Ciclofilina en el interior de la célula con las implicaciones funcionales para la CypB que esto podría reportar.

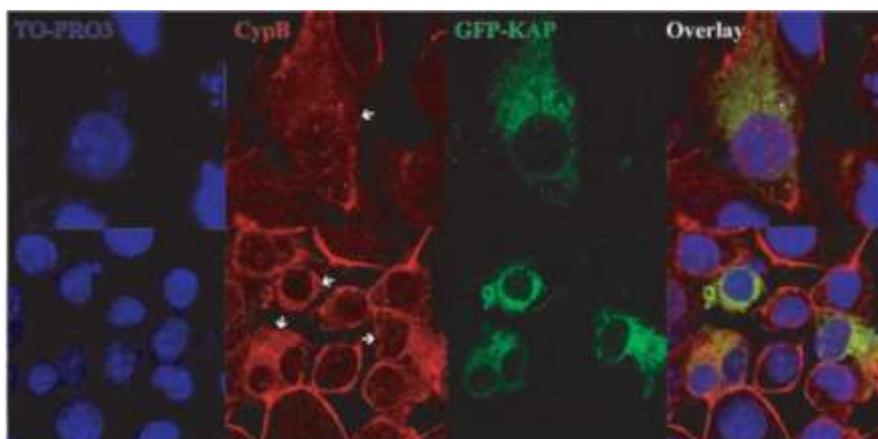


Figura 1.27: Colocalización de GFP-KAP y CypB. Inmunocitoquímica con anti-CypB en células PCT transfectadas con GFP-KAP. Los núcleos se tiñen con TO-PRO3. Las flechas señalan la reducción de CypB a la membrana plasmática en las células transfectadas con GFP-KAP.

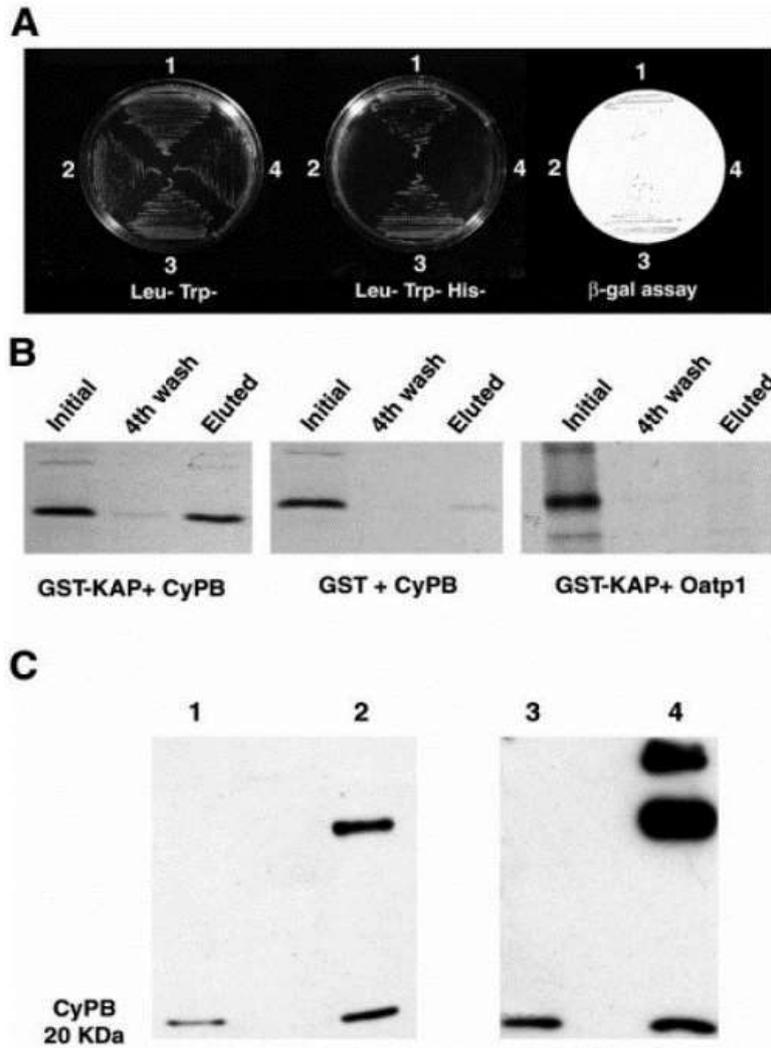


Figura 1.28: Ensayos de interacción entre KAP y CypB. **A)** Las células de levadura YRG-2 que expresan tanto GAL4BD-KAP como GAL4AD-CypB pudieron crecer en medios nutricionalmente restrictivos (Leu– Trp– His–) y mostraron expresión de b-galactosidasa. Sección 1, pBD-KAP1 pAD-CypB; sección 2, pBD-KAP1 pAD-SV40; sección 3, pBD-P531 pAD-SV40 (control positivo); sección 4, pBD-P531 pAD-CypB. **B)** Ensayos de reducción de GST. La proteína de fusión GST-KAP o GST sola se inmovilizó en Sepharose 4B y se incubó con CyPB o Oatp1 marcada con ³⁵S-metionina traducida in vitro. **C)** Ensayos de coimmunoprecipitación. Se inmunoprecipitaron extractos brutos de riñón de ratón macho con abCyPB (carriles 2 y 4), abKAP1 (carril 1) y abKAP2 (carril 3) y se transfirieron contra abCyPB.

La Ciclofilina B

La CypB fue el segundo miembro de la familia de las ciclofilinas clonado y caracterizado (Price ER, 1991). Muestra 64% de homología con la CypA y se distingue por presentar extremos N- y C- terminales específicos. Los primeros 25 aminoácidos consisten en un péptido señal que dirige la proteína en la vía secretora mientras que en el extremo C-terminal se describe una señal de retención en retículo endoplasmático (Arber S, 1992). Los 165 aminoácidos centrales de la CypB contienen el dominio peptidil-prolil cis/trans isomerasa (Figura 1.29), como el resto de las ciclofilinas, y el dominio de unión a la CsA, que inhibe la actividad isomerasa (Price ER, 1991).

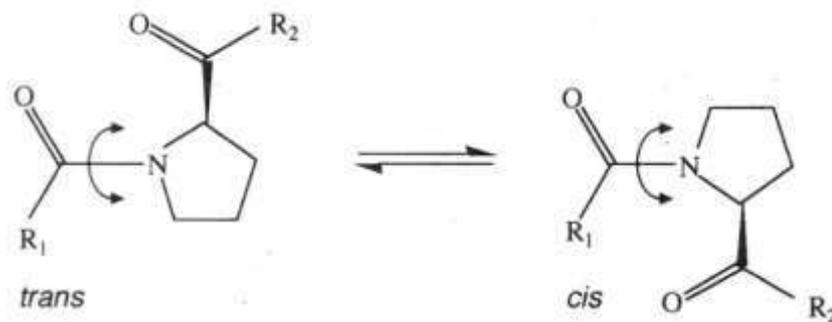


Figura 1.29: Isomerización cis/trans de una unión peptidil-prolil

El análisis del perfil de expresión de la CypB demuestra que se trata de una proteína ampliamente distribuida en todo tipo de células y tejidos sanos con una elevada expresión en células de origen linfocítico (Price ER, 1991; Bergsma DJ, 1991; Caroni P, 1991), y siendo también especialmente abundante en el riñón, sobre todo en el túbulo proximal contorneado. Su mRNA se expresa también en diferentes líneas tumorales (Gomi S, 1999).

Estudios de localización subcelular demuestran que la CypB en células en cultivo se distribuye en el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y membrana plasmática, a la vez que se detecta también, secretada en el medio de cultivo. Algunos autores describen también la presencia de CypB al núcleo celular (Le M, 1995) a la vez que se demuestra la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) situado en el extremo N-terminal de la proteína madura.

Otros autores han descrito también la presencia de la CypB en diferentes fluidos biológicos como la leche (Spik G, 1991) y el plasma (Allain F, 1995; Denys A, 1998), demostrando así que in vivo existe una forma secretada de esta Ciclofilina.

Algunos roles fisiopatológicos de la Ciclofilina B en la célula incluyen: Plegamiento de proteínas, transducción de señal del calcio, infección por HIV, proliferación celular, actividad nucleasa y apoptosis, procesos inflamatorios y estrés oxidativo.

La Ciclosporina A

La Ciclosporina A (CsA) es un undecapéptido cíclico liposoluble aislado del hongo *Tolypocladium inflatum* (Figura 1.30) que actúa como agente anti linfocítico (Borel JF, 1977). Su potente efecto inmunosupresor se debe al bloqueo de la activación del linfocito T (Hess AD, 1986; Liu J, 1991; Sigal NH, 1992). Desde el momento de su aprobación para el uso clínico en 1983, la CsA ha supuesto una revolución en el trasplante de órganos debido al uso generalizado para la prevención del rechazo agudo de los órganos trasplantados. Sus aplicaciones se han extendido más allá del uso en trasplantes, utilizándose con éxito en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Talal N, 1998) (Kahan BD, 1993). A pesar de su importante impacto clínico, su uso se ha visto limitado por la marcada toxicidad renal que presenta (Bennett WM, 1983; Mihatsch MJ, 1989; de Mattos AM, 2000).

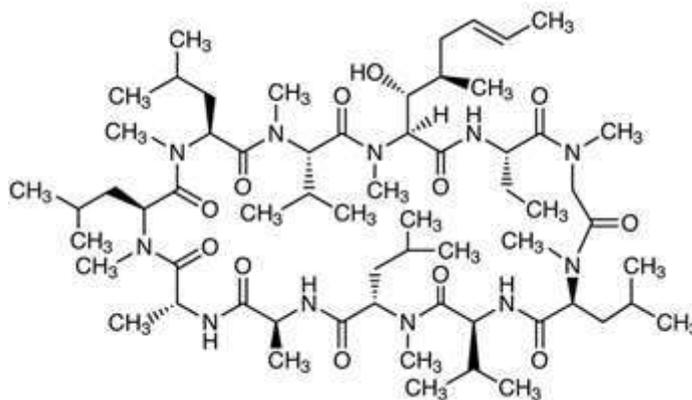


Figura 1.30: Estructura del fármaco inmunosupresor CsA aislado del hongo *Tolypocladium inflatum*

Mecanismo inmunosupresor de la CsA

El mecanismo por el que la CsA ejerce su efecto inmunosupresor sobre el linfocito T es bien conocido. De la activación del linfocito T por un determinado antígeno resulta la síntesis y secreción de una batería de citoquinas y la expresión en la superficie de moléculas inmunorreguladoras que serán las responsables de iniciar y coordinar la respuesta capaz de luchar eficazmente contra los elementos extraños que han provocado la respuesta.

A nivel molecular, la CsA ejerce su efecto inmunosupresor al unirse a sus ligandos intracelulares, las ciclofilinas. Los complejos CsA-ciclofilina pueden unirse a la calcineurina e inactivar-la (Figura 1.31). Esta inhibición imposibilita la transmisión de las señales generadas en el Receptor de Células T (TCR), ya que los factores de transcripción NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*) no se defosforilan y por tanto no se translocan al

núcleo, impidiendo así la expresión de la IL-2 (Liu T, 1992; Swanson SK, 1992; Bram RJ, 1993). No todas las ciclofilinas muestran la misma afinidad por la CsA ni la misma eficiencia en inhibir la calcineurina. Así, la CypB presenta una afinidad relativa por la CsA 10 y 20 veces superior a la de la CypA y CypC, respectivamente (Schneider H, 1994), lo que se traduce en una mayor inhibición de la calcineurina por parte de la CypB (Swanson SK, 1992).

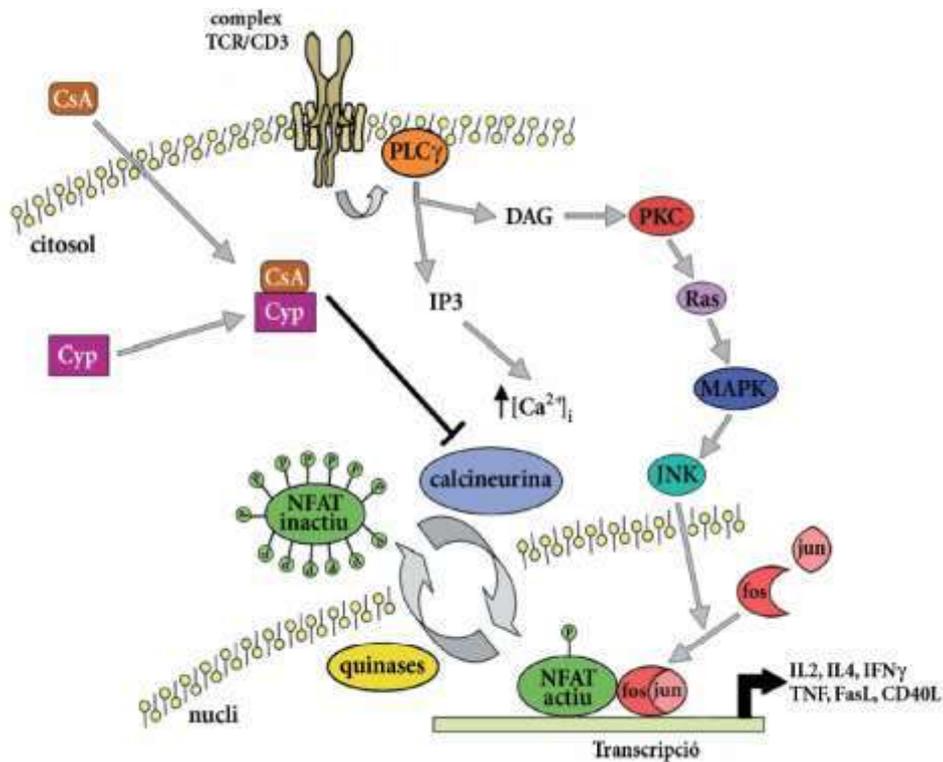


Figura 1.31: Señales intracelulares generados en la activación del linfocito T. La activación a través del TCR y de las señales coestimuladoras apropiadas (no se indican en la figura) movilizan el calcio intracelular y activan la PKC, para finalmente activar la expresión de genes como la IL2, la IL4, el IFN γ , etcétera. La presencia de CsA acompañada con ciclofilinas inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina.

Nefrotoxicidad producida por CsA

A pesar de su amplia utilización como inmunosupresor en el trasplante de órganos, el uso de la CsA se ha visto limitado por su efecto secundario más común, la nefrotoxicidad, causando la pérdida de la función tubular renal (Bennett WM, 1983). En el riñón se observa una diferente sensibilidad a la CsA según el tipo celular, así las células de los túbulos proximales contorneado y recto son más sensibles al daño producido por la CsA que las células del asa de Henle o los tubos colectores (Wilson SE, 1988). Aunque el mecanismo de acción de la CsA sobre el sistema inmunitario ha sido bien caracterizado, poco se conoce sobre los mecanismos tejido y célula específicos implicados en el daño renal inducido por la CsA.

Relación funcional CsA-KAP

Cebrián y colaboradores, después de describir la interacción de KAP con uno de los receptores de la CsA, la inmunofilina CypB, estudian los efectos que este inmunosupresor ejerce tanto sobre los niveles de KAP en el riñón como en la interacción y/o colocalización de KAP y CypB:

- Efectos transcripcionales y postranscripcionales de la CsA en el riñón murino: La CsA promueve un descenso en los niveles de la proteína KAP en las células de la región juxtamedular, segmento del túbulo proximal diana de la acción nefrotóxica del inmunosupresor como se demuestra por la aparición de grandes vacuolas y la alteración estructural del retículo endoplasmático (Mihatsch MJ, 1986). Dado que los niveles del mRNA de KAP en los animales tratados con CsA son iguales o mayores que en los controles, la disminución de proteína en el segmento S3 inducida por la CsA se dará por un mecanismo a nivel traduccional o postraduccional, que más recientemente ha sido descrito: la fosforilación de residuos PEST por CK2 (Tornavaca O, 2011).
- Efectos de la CsA en la interacción y colocalización de KAP con CypB: La CsA promueve la secreción de la CypB, efecto que en las células en cultivo se traduce en un cambio en el patrón de distribución celular de la inmunofilina (Price ER, 1994). En células de las líneas PKSV-PCT y HK2, el tratamiento con CsA también promueve la secreción de la CypB al medio de cultivo (Suñé G, 2010), sin embargo, la inmunofilina mantiene el patrón reticular alrededor del núcleo descrito en células sin tratar. El tratamiento con CsA de estas células, previamente transfectadas con GFP-KAP, no interfiere en la colocalización de GFP-KAP y CypB en el interior celular (Cebrián C, 2001).
- Efectos de KAP en la toxicidad inducida por la CsA: El análisis de los efectos de la expresión de KAP en la toxicidad producida por la CsA se realizan en una línea celular derivada de la línea parental PKSV-PCT que expresa de manera estable y regulada la proteína KAP. Aquellas células que sobreexpresan KAP muestran una mayor resistencia a la mortalidad inducida por el fármaco a las 24 horas de tratamiento que aquellas donde la sobreexpresión se encuentra inhibida (Figura 1.32). Así pues, la expresión de la proteína KAP reduce la toxicidad inducida por la CsA en las células epiteliales del túbulo proximal renal (Cebrián C, 2001). Se desconoce el mecanismo por el que la proteína KAP ejerce este efecto protector y si este es específico de la CsA o se da también en otros tipos de daño celular.

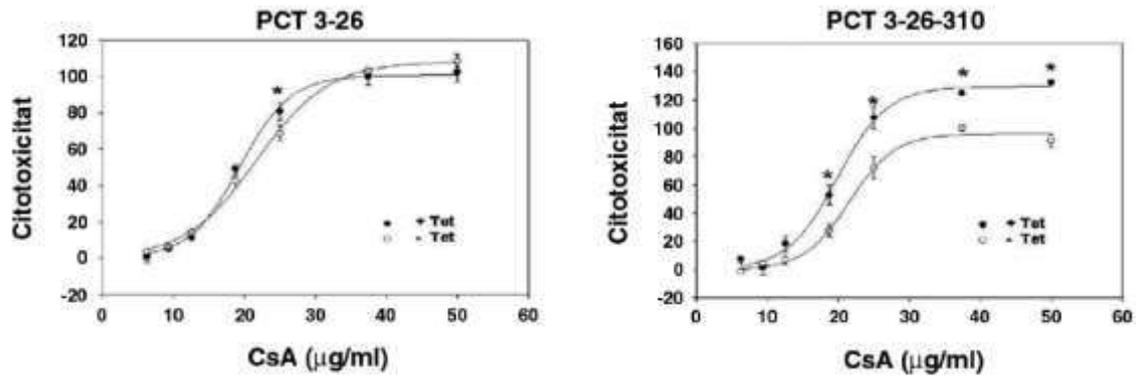


Figura 1.32: La expresión de la proteína KAP protege de la toxicidad inducida por la CsA. Células de túbulo proximal renal (PCT) se someten a dosis crecientes de CsA durante 24 horas y determinándose la toxicidad inducida por el fármaco midiendo la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivo. El clon PCT 3-26 utiliza como control del efecto de la tetraciclina (Tet). El clon 3-26-310 sobreexpresa la proteína KAP en ausencia de Tet en el medio (sistema Tet-Off™ de transfección estable y regulada). *, $P < 0.001$.

Mecanismo de la lesión del túbulo proximal inducida por CsA. Efecto protector de KAP “in vivo”

Un estudio de nuestro grupo utilizando el modelo Tg de KAP reveló un mecanismo novedoso para la lesión del túbulo proximal inducida por CsA a través de la degradación de KAP por parte de la calpaína asociada con la fosforilación de residuos PEST por CK2 (Ver las 5 dianas de fosforilación por CK2 que posee la KAP en “1.3.4. La proteína deducida de KAP”) (Tornavaca O, 2011). Dado que ya se sabía que KAP protege contra la toxicidad de CsA en células cultivadas del túbulo proximal, este trabajo planteó la hipótesis de que los niveles bajos de KAP encontrados en los riñones de los ratones tratados con CsA podrían correlacionarse con la lesión de las células del túbulo proximal. Para probar esta hipótesis, se utilizaron los ratones KAP Tg y se demostró que estos ratones son más resistentes a la lesión tubular inducida por CsA que los compañeros de camada control. Además, encontramos que la calpaína, que se activa por CsA en cultivos celulares y riñón, está involucrada en la degradación de KAP y observamos que la fosforilación de los residuos de serina y treonina encontrados en las secuencias PEST de KAP por la proteína quinasa CK2 promueve la degradación de KAP por la calpaína. Además, también observamos que la inhibición de CK2 protegía contra la citotoxicidad inducida por CsA. Estos hallazgos apuntan a un mecanismo novedoso para la toxicidad renal inducida por CsA que podría ser útil en el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a prevenir el daño de las células tubulares mientras se mantienen los efectos inmunosupresores de la CsA (Tornavaca O, 2011).

1.3.7. La KAP en otras situaciones fisiopatológicas

El modelo de la nefrolitiasis

La Adenina Fosforibosiltransferasa (APRT) es una enzima de expresión ubicua que cataliza la formación de AMP a partir de adenina y 5-fosforibosil-1-pirofosfato. En la deficiencia de APRT humana, se promueve la excreción de cristales de 2,8-dihidroxiadenina (DHA) a orina y la deposición de piedras en el riñón.

El ratón knock-out para APRT desarrolla una DHA nefrolitiasis muy parecida a la humana, y resulta más severa en machos que en hembras. Como consecuencia de la formación de piedras en el riñón se da un extenso daño estructural (inflamación, dilatación y atrofia tubular, necrosis y fibrosis intersticial) y pérdida de la función renal. Wang y colaboradores identifican por *Differential Display Polymerase Chain Reaction* (DD-PCR) aquellos genes diferencialmente expresados en riñón de ratones knock-out para APRT. De los 63 cDNA identificados, 21 corresponden a genes conocidos que codifican para proteínas de la matriz extracelular, transportadores de membrana, enzimas metabólicas y proteínas reguladas por hormonas entre las que se encuentra la KAP. En machos, el mRNA de la KAP disminuye unas 4 veces mientras que en hembras alcanza 10 veces (Wang L, 2000). Los autores sugieren que los cambios hormonales que se dan en la nefrolitiasis inducida por DHA son los responsables, al menos en parte, de la disminución del mRNA de KAP en los ratones knock-out para APRT. Se desconoce si se da ningún cambio a nivel de proteína y las implicaciones de esta expresión diferencial en el progreso de la nefrolitiasis.

Esclerosis glomerular y fibrosis intersticial

La hiperfiltración glomerular se ha considerado uno de los pasos iniciales en el desarrollo de la glomeruloesclerosis. La ablación parcial del riñón (nefrectomía de 5/6 partes) se utiliza como modelo de estudio para explorar los mecanismos de la hiperfiltración e hipertrofia glomerular. Los estudios histopatológicos en tejido renal nefrectomizado revelan una respuesta compleja que consiste principalmente en tres pasos (Waldherr R, 1988):

- 1) Una fase hipertrófica rápida (de 2 a 4 semanas después de la ablación).
- 2) Una fase quiescente con alteraciones histológicas mínimas (de 4 a 10 semanas después de la ablación).
- 3) Desarrollo de esclerosis glomerular y fibrosis intersticial (10 semanas después de la ablación).

En el periodo hipertrófico y asociado con la hiperfiltración ha descrito un aumento de la expresión de diferentes genes que podrían estar implicados en la

progresión de la glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial subsiguiente. Uno de los mediadores más importantes es el TGF- β implicado en la regulación de la producción y degradación de glicoproteínas de la matriz extracelular. Otros genes son el IGF-1, el EGF, el PDGF, la angiotensina II, la endotelina-1, los protooncogenes c-fos y c-jun y la Ciclina E. En la fase esclerótica se ha encontrado una expresión aumentada de colágeno I, III y IV, fibronectina, laminina y proteoglicanos, y por inmunohistoquímica se ha observado una expansión de la matriz mesengial e intersticial y una acumulación de glicoproteínas de la matriz (Zhang H, 1999).

Mediante cDNA-RDA (*Representational Difference Analysis of cDNA*) se ha identificado un grupo de genes que aumentan su expresión a las dos semanas de una nefrectomía de 5/6 partes y que, por lo tanto, podrían estar implicados en el proceso patológico de la hiperfiltración e hipertrofia iniciales. Estos genes pueden agruparse en cinco categorías: genes regulados por andrógenos, genes relacionados con el metabolismo de la matriz y las interacciones célula-matriz, genes mitocondriales, genes implicados en la señalización intracelular, y genes relacionados con la regulación transcripcional o traduccional. Dentro de la primera categoría se identifica la KAP. Diferentes estudios sugieren que los ratones machos son más susceptibles de desarrollar daño renal y este fenómeno se ha asociado a la presencia de los andrógenos. El aumento de expresión del mRNA de KAP podría actuar como mediador en el daño tisular dependiente de andrógenos en el riñón nefrectomizado (Zhang H, 1999).

Hipertensión, estrés oxidativo y daño renal

Los ratones transgénicos para KAP mostraron hipertensión desde su quinto mes de vida (Figura 1.35). También presentaron daño renal (fibrosis, glomeruloesclerosis segmental focal y daño tubular, figura 1.36) y estrés oxidativo (Tornavaca O, 2009).

Este trabajo demostró que la sobreexpresión de KAP específica en las células de los túbulos proximales se asocia con hipertensión, regulación de Cyp4A, aumento de la síntesis de 20-HETE y aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, probablemente debido al aumento de la actividad oxidasa NADPH y la actividad enzimática antioxidante disminuida en el riñón de ratones transgénicos. La hipertensión parece estar causada por un mayor estrés oxidativo y una mayor producción de 20-HETE. Debido a que la activación de estas vías y su resultado final se han atribuido clásicamente a los andrógenos, se postuló que la propia KAP es, al menos en parte, un mediador de los efectos dependientes de los andrógenos sobre el sistema cardiovascular. De esta forma, se divulgó por primera vez que una ligera sobreexpresión de una proteína específica del riñón y regulada por andrógenos se asocia con hipertensión y enfermedad renal (Tornavaca O, 2009).

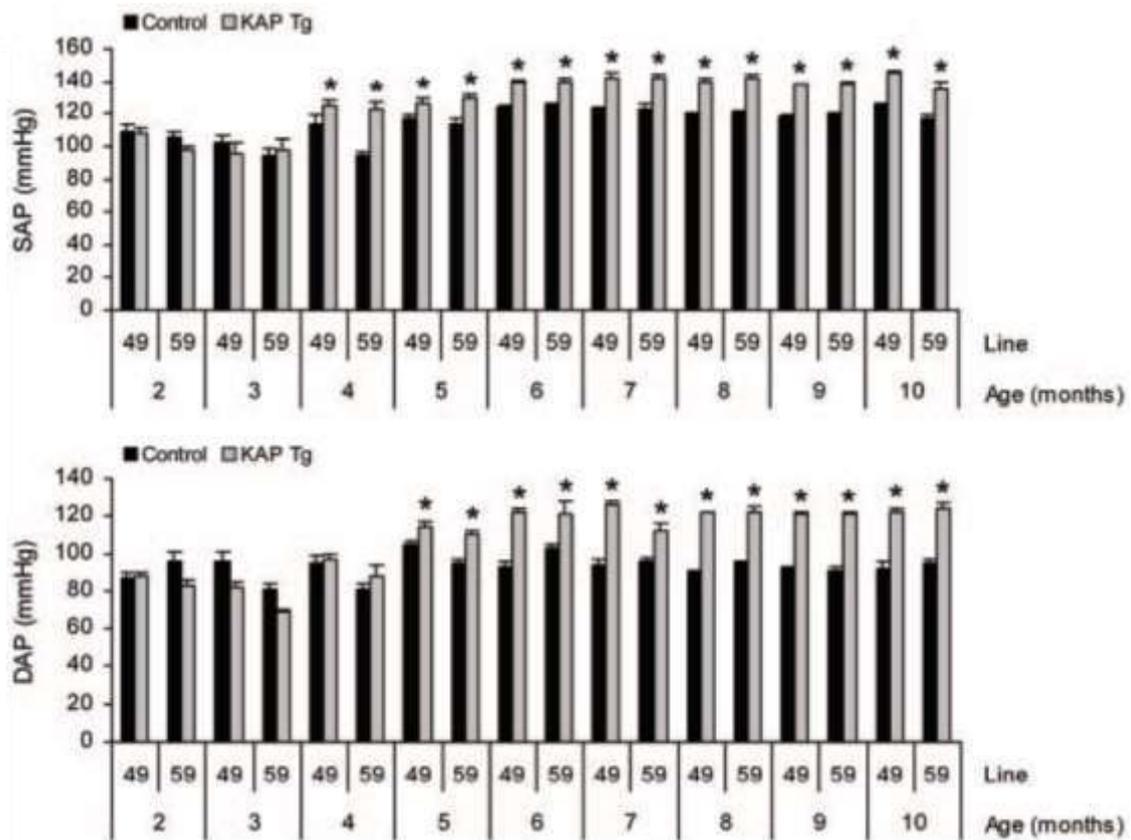


Figura 1.35: Registros de presión arterial sistólica (SAP) y diastólica (DAP) en ratones control ($n=4$ y 7) y ratones transgénicos ($n=8$ y 7) de las cepas L-49 y L-59, respectivamente, desde los 2 hasta los 10 meses de edad. Se muestran las medias y el error estándar de la media (SEM). * Diferencia significativa ($P \leq 0.05$, ANOVA de 2 factores) entre grupos.

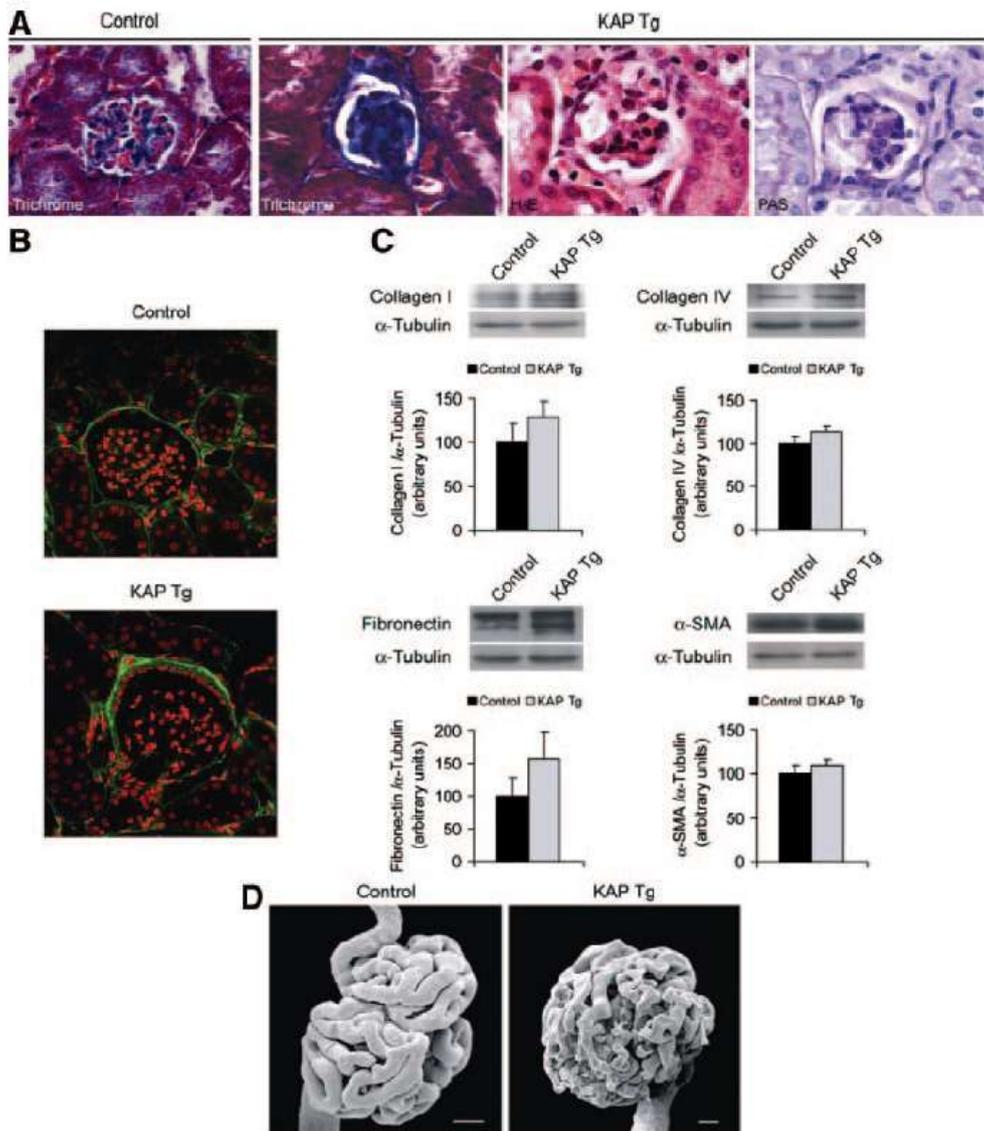


Figura 1.36: Evaluación histológica y patológica de riñones transgénicos KAP. A) Examen histológico. Se tiñeron secciones de riñón congeladas de ratones macho control y transgénicos (Tg) con tricrómico de Masson, hematoxilina-eosina (H-E) y reacción de ácido peryódico-Schiff (PAS) (6 a 8 meses de edad). Los ratones transgénicos mostraron dilatación de arteriolas aferentes y glomeruloesclerosis focal en comparación con los ratones control (izquierda). **B-D) Evaluación de glomeruloesclerosis.** **B)** Análisis confocal de barrido láser que muestra la expresión de colágeno IV en secciones de riñón representativas de ratones macho control y transgénicos de 6 a 8 meses de edad; **C)** Western blot de homogenizados crudos de riñón de compañeros de camada machos transgénicos y de control con anti-colágeno I y anti-colágeno IV, fibronectina y actina anti- α -músculo liso. Se utilizó anti- α -tubulina como control de carga. Los valores se expresan como unidades arbitrarias. **D)** Microscopía electrónica de barrido de cilindros de corrosión vascular que muestran glomérulos afectados representativos de ratones macho control y transgénicos de 6 a 8 meses de edad. Para todos los experimentos, se utilizaron al menos 6 animales diferentes por grupo.

Trabajos posteriores han demostrado que los niveles plasmáticos de angiotensina II y catecolaminas aumentaron en los ratones KAP Tg, en comparación con los animales de tipo salvaje (Grande MT, 2011). La administración sistémica de Tempol, un mimético de Superóxido Dismutasa que permea la membrana, redujo la presión arterial y la excreción urinaria de marcadores de estrés oxidativo y redujo los niveles plasmáticos de angiotensina II y norepinefrina en ratones KAP Tg. La administración intracerebroventricular de Tempol también redujo la presión arterial en ratones Tg. Además, la administración de apocinina y DPI, inhibidores de NADPH oxidasa, una fuente principal de especies reactivas de oxígeno (ROS), también redujo la presión arterial y los niveles plasmáticos de angiotensina II y norepinefrina en ratones Tg. Así, se analizó la implicación del sistema renina-angiotensina (RAS) y del sistema nervioso simpático en la hipertensión del ratón KAP Tg. Tanto el captopril como losartán redujeron la presión arterial en ratones Tg, como también ocurrió después del bloqueo β -adrenérgico con atenolol. Además, la administración de losartán intracerebroventricular redujo la presión arterial en ratones KAP Tg. Se demostró que la hipertensión en ratones machos KAP Tg se basa en un aumento del estrés oxidativo, aumento de la actividad simpática y activación de RAS. Además, estos resultados sugirieron un papel del aumento del estrés oxidativo en el sistema nervioso central (SNC) como una de las principales causas de hipertensión en estos animales.

Protección contra el Síndrome Metabólico inducido por dieta rica en grasa

El Síndrome Metabólico (SM)

El Síndrome Metabólico (SM) se define por una constelación de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos interconectados que aumentan directamente el riesgo de Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica (ASCVD) y Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Wilson PWF, 2005) (Figura 1.37). El SM afecta a más del 20% de los adultos en las poblaciones occidentales y está alcanzando una proporción epidémica a nivel mundial (Ford ES, 2005).

Uno de los principales factores de riesgo subyacentes del SM es la obesidad (Carr DB, 2004). La evidencia acumulada sugiere que la inflamación crónica en el tejido adiposo es fundamental en el desarrollo de disfunción metabólica relacionada con la obesidad (Hotamisligil GS, 2006; Lumeng CN, 2011). La hiperinsulinemia y la hiperglucemia resultantes, así como la liberación de citoquinas de los adipocitos, desempeñan un papel fundamental en la disfunción endotelial vascular, el perfil lipídico anormal, la Hipertensión Arterial (HTA) y la inflamación vascular, que trabajan en conjunto para aumentar la aterosclerosis (Lindsay RS). Otros trastornos relacionados con la obesidad asociados con el SM como la enfermedad del hígado graso, la hiperuricemia y la Enfermedad Renal Crónica (ERC), definida como una Tasa de Filtración Glomerular (TFG) por debajo de 60 ml/min por 1,73 m², son las principales causas de morbilidad y mortalidad.

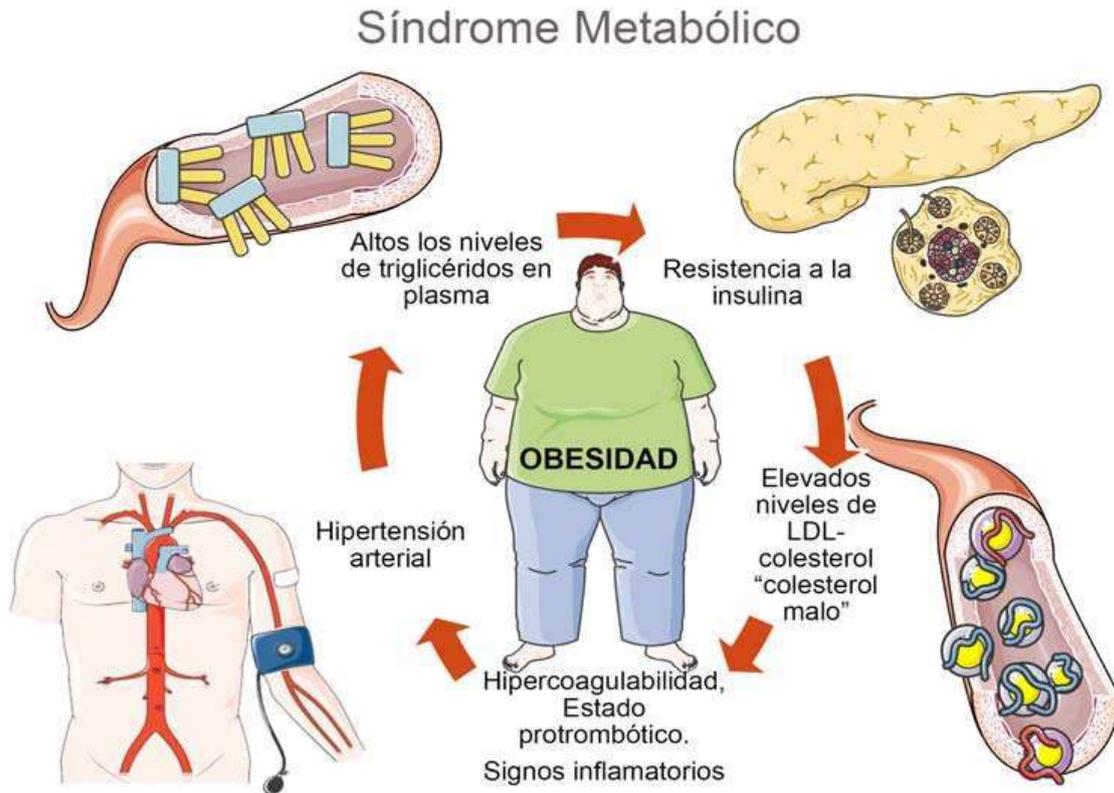


Figura 1.37: Principales alteraciones clínicas que definen el SM derivado de una dieta rica en grasas (obesidad).

Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que los pacientes con SM también tienen un mayor riesgo de microalbuminuria, un marcador temprano de lesión glomerular, disfunción endotelial y/o ERC. Los datos de la base de datos NHANES III, que incluye a más de 6.000 adultos, revelaron que el riesgo multivariable ajustado tanto para microalbuminuria como para ERC aumentó significativamente en individuos con SM, y que este riesgo aumentó progresivamente con el número de componentes del síndrome detectados en cada uno de ellos (Chen J, 2004).

La forma en que los cambios funcionales en el riñón afectan la fisiopatología del SM sigue siendo especulativa. Factores como la Resistencia a la Insulina (RI), inflamación, disfunción del endotelio renal, estrés oxidativo, alteración de la hemodinámica renal, activación del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) y del Sistema Nervioso Simpático (SNS) (Raimundo M, 2011) pueden desempeñar un papel.

KAP, SM e inflamación

Como se ha introducido anteriormente, la KAP, que es uno de los genes más abundantes y específicos expresados en las células epiteliales del túbulo proximal (Meseguer A, 1990), sufre una regulación estricta y única por las hormonas esteroideas tiroideas y sexuales, principalmente andrógenos, en los túbulos proximales (Teixido N, 2006).

Estudios preliminares dentro de nuestro grupo demostraron que estos ratones transgénicos que sobreexpresan la KAP muestran hipertensión y alteraciones renales mediadas por estrés oxidativo, el sistema renina-angiotensina y la hiperactividad simpática (Tornavaca O, 2009; Grande MT, 2011).

Un estudio posterior con este modelo de ratón fue la base de una tesis doctoral en nuestro grupo de investigación, estudiando de forma amplia el papel que la KAP tiene en el síndrome metabólico (Bardají B, 2013). Para ello se trabajó con el ratón transgénico que sobreexpresa la KAP y con su variante salvaje (WT) con expresión basal de KAP. Estos dos tipos de ratón se alimentaron, a su vez, con dieta normal y dieta rica en grasas (HFD). El ratón WT alimentado con HFD mostró un fenotipo de SM que incluye hipertensión severa y aumento de peso corporal significativo asociado a un aumento de masa grasa, adipocitos altamente hipertrofiados, homeostasis de glucosa alterada y resistencia a la insulina (IR), así como una manifiesta esteatosis hepática (Bardaji B, 2017). Los ratones transgénicos alimentados con pienso normal mostraron hipertensión, proteinuria, glucosuria y glomeruloesclerosis focal y segmentaria, unos resultados acordes con lo visto en los trabajos anteriores en este modelo, y parecidos a los observados en los ratones WT con HFD pero en menor medida (Bardaji B, 2017). Es decir, la sobreexpresión de KAP produce algunas de las alteraciones definidas en el SM, aunque estas alteraciones son mayores en las provocadas por una dieta HFD que por la sobreexpresión de KAP. La lógica nos diría que, si los animales transgénicos que sobreexpresan KAP fueran alimentados con HFD, mostrarían las alteraciones asociadas al SM de manera más potente que los hermanos controles de camada. Trabajos de nuestro grupo demostraron **de forma inesperada** que los animales Tg no empeoraban por efecto de la dieta y que los WT alimentados con dieta rica en grasa presentaban un fenotipo más agresivo que los Tg en las mismas condiciones. Se concluyó que, aunque **la sobreexpresión de KAP en animales alimentados con dieta normal produce alteraciones reminiscentes del SM, también es capaz de prevenir el daño inducido por la dieta rica en grasa** (Bardaji B, 2017).

El estudio bioquímico y molecular de estos animales reveló que los ratones WT con dieta HFD mostraban niveles séricos más altos de leptina, insulina, resistina y marcadores inflamatorios como IL-6, que se correlacionó con el fenotipo de SM. La hipertrofia de adipocitos resultó en una up-regulación significativa de los niveles de ARNm de apelina, leptina y AT1; así como expresión aumentada de marcadores inflamatorios en el tejido adiposo, incluidos TNF, IL-6 y CCL2/MCP-1, que se correlacionaron con el mayor contenido de macrófagos, como indica la sobreexpresión de CD68 (Bardaji B, 2017). Estos resultados concuerdan con trabajos que describen que

la sobreactivación del RAS en el tejido adiposo tiene un impacto metabólico e inflamatorio en la obesidad (Frigolet ME, 2013; Yvan-Charvet L, 2011; Skurk T, 2005; Azrak Z, 2016), así como un efecto sobre la diferenciación de los monocitos de los progenitores hematopoyéticos (Tsubakimoto Y, 2009), influyendo en su quimiotaxis, a través de la regulación positiva de CCR2/CD68 (Swirski FK, 2009). El bloqueo de RAS con inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) y bloqueadores de AT1 representa una terapia establecida para la hipertensión, la nefropatía diabética y la arteriosclerosis (Prasad A, 2004). La dieta HFD provocó una esteatosis hepática manifiesta en ratones WT que se correlacionó con un incremento significativo de lípidos hepáticos y niveles aumentados del ARNm de los genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos, esteroides y colesterol Cyp4A14 y Acaa1b, en el hígado (Hardwick JP, 2009; Fidaleo M, 2011). Aunque los mecanismos subyacentes que relacionan la obesidad con la acumulación de lípidos hepáticos y la RI no se comprenden completamente, la producción de TNF- α e IL-6 en el tejido adiposo son fundamentales para el desarrollo de esteatohepatitis y se ha reconocido al NF κ B como un mediador obligatorio de la mayoría de estas respuestas de TNF- α (Ruan H, 2002).

Comparando los ratones WT con los transgénicos que sobreexpresan KAP, y ambos con dieta HFD, se observó que los altos niveles de ARNm de IL-6 en el tejido adiposo y altos niveles séricos de IL-6 están significativamente reducidos en los ratones KAP Tg, lo que indica que los efectos beneficiosos de KAP que previenen la esteatosis hepática y la IR podrían estar relacionados con su capacidad de alterar la producción de IL-6, inactivando el eje IL6/gp130 en ratones alimentados con dieta HFD (Bardaji B, 2017). Para evaluar si la disminución de IL-6 en el ratón KAP Tg alimentado con dieta HFD podría atribuirse a la acción directa de KAP en la expresión de IL-6 o a otros efectos sistémicos indirectos que ocurren en el transgénico, se utilizaron células HK-2 que sobreexpresan KAP proteína, para observar el impacto putativo de KAP en la expresión de IL-6, tras el tratamiento con TNF- α . Los resultados demostraron claramente que la sobreexpresión de KAP en células HK-2 tiene un efecto directo sobre la producción de IL-6 por TNF- α , dejándolo a niveles casi inexistentes (Bardaji B, 2017). Dado que el TNF- α induce la vía de NF κ B, que tiene un papel clave en el desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a la inflamación (Baker RG, 2011), se postuló que los efectos positivos de KAP pueden estar relacionados con la regulación a la baja de la vía de señalización de NF κ B.

1.3.8. Homólogos de la KAP en otras especies

- Homólogo en rata: El KAP de rata (GenBank U25808) presenta una baja homología con el KAP murino (Figuras 1.18 y 1.19). Las dos secuencias presentan un 82% de homología a nivel nucleotídico. El análisis de homología a nivel aminoacídico, en cambio, revela una homología inferior: 54% de identidad y 67% de positivos, siendo la región del péptido señal la que representa una homología mayor. La organización genómica, en cambio, es idéntica a la de ratón. La expresión está igualmente restringida al riñón, donde se regula por los mismos factores hormonales que la KAP murina, y al útero (Niu EM, 1996).
- Homólogo humano: A finales de los años 90, con el aumento exponencial de secuencias introducidas en la base de datos de *est* (*expressed sequence tags*), aparecieron secuencias obtenidas a partir de librerías de expresión humanas, con una homología elevada (98-100%) con la KAP de ratón. Posteriormente se advirtió que había indicios de que las mencionadas librerías estaban contaminadas con cDNA murino. Actualmente no existe ninguna homología relevante del gen KAP en el genoma humano.
- Isoformas en ratón: Mediante traducción *in vitro* de mRNA de riñón de ratones de diferentes especies se ha observado la aparición de diferentes formas de la KAP caracterizadas por pequeñas variaciones en su peso molecular (Melanitou E, 1992). En el caso de la cepa OF1 de ratón, se confirma la presencia de dos formas de la proteína. Estas dos formas alélicas se diferencian en 3 nucleótidos que dan lugar a dos cambios aminoacídicos responsable de las diferencias migratorias.

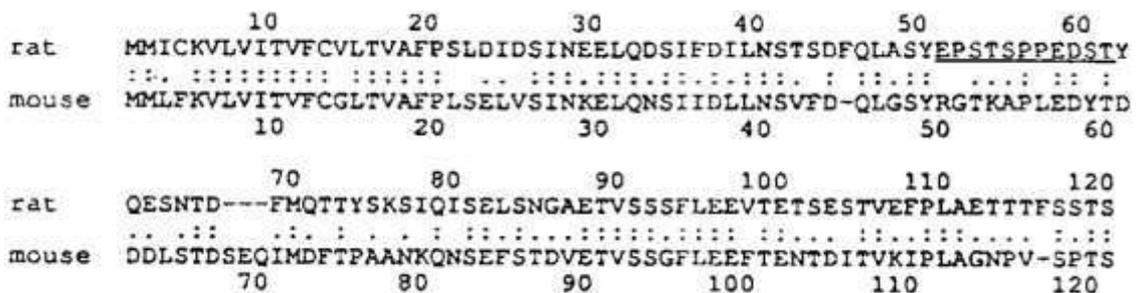


Figura 1.18: Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas KAP de rata y ratón: secuencias de aminoácidos deducidas. La proteína de rata tiene 120 aminoácidos y la de ratón 121. En cada secuencia "-" indica un espacio insertado para maximizar la alineación de ambas secuencias, ":" indica dos aminoácidos idénticos y "." indica un cambio conservador. El motivo PEST está subrayado. La secuencia de KAP de rata muestra un 53% de identidad con la secuencia de ratón.

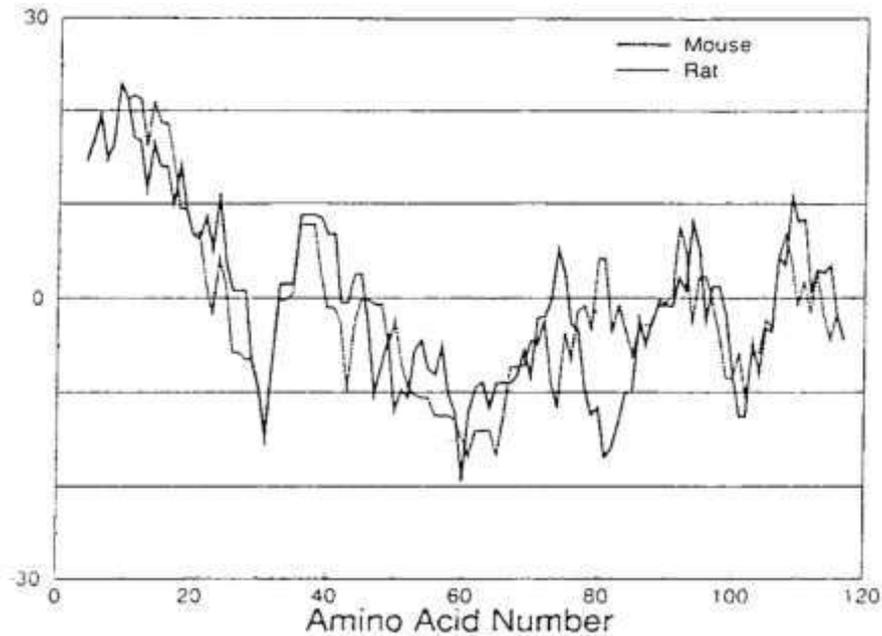


Figura 1.19: Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas KAP de rata y ratón: Regiones de hidropatía. Gráficos generados por computadora de ambas proteínas mediante el método de Kyte y Doolittle, utilizando un tamaño de ventana de 7 aminoácidos. Las regiones por encima del eje horizontal (0) son hidrófobas, mientras que las regiones por debajo del eje horizontal son hidrófilas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La proteína KAP, tal como ha sido extensamente explicado en la Introducción de esta tesis, ha mostrado tener un papel relevante en la protección del daño renal por CsA, tanto in vivo como in vitro. El uso de la CsA como potente fármaco inmunosupresor que permite la supervivencia del injerto tras un trasplante, se ha visto limitado por la toxicidad que el fármaco produce en las células del túbulo proximal renal, de ahí la importancia del papel protector de KAP. Además, hemos demostrado que KAP interacciona con la CypB, uno de los receptores de CsA que, a su vez, está implicada en la diferenciación epitelial del túbulo proximal, tal como ha sido recientemente publicado por nuestro grupo.

La KAP también ha mostrado un efecto preventivo en el desarrollo del síndrome metabólico producido por una dieta rica en grasa, el cual ha sido reconocido como la epidemia del siglo XXI, constituyendo un grave problema de salud en el mundo occidental.

La falta de homología de la secuencia de KAP con cualquier otra proteína depositada en las bases de datos y su ausencia en humanos descarta a KAP como diana terapéutica modulable per se, pero no la descarta como fármaco.

2.1. Hipótesis

Las interacciones de KAP con proteínas como CypB, u otras proteínas todavía por determinar, pueden explicar en qué procesos moleculares y celulares interviene. Ello nos permitirá identificar moléculas y vías relacionadas con KAP que, a diferencia de ella, estén presentes en humanos y que puedan ser moduladas en situaciones patológicas en las que KAP ha mostrado tener un efecto terapéutico.

Además del efecto protector en modelos murinos, KAP ha mostrado tener un potente efecto anti-inflamatorio, evitando la producción de IL-6 por TNF alfa y la activación de STAT-3, en células derivadas de túbulo proximal humano con expresión ectópica de KAP. Hipotetizamos que KAP, en colaboración con CypB, interviene en éste y otros procesos celulares de relevancia para el funcionamiento del túbulo proximal renal como son la proliferación diferenciación y apoptosis, entre otros. El conocimiento de la estructura tridimensional de KAP permitirá la identificación de posibles dominios funcionales, el análisis de su actividad terapéutica en modelos animales y celulares y, eventualmente, el uso de KAP o péptidos derivados de la misma como posibles fármacos en humanos.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Generar conocimiento sobre la estructura tridimensional de KAP, las proteínas con las que interacciona y los procesos biológicos en los que participa, con el fin de promover el posible valor traslacional de KAP en salud humana.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Estudiar el interactoma de KAP y CypB

- 1.1. Determinar la capacidad de interacción de la proteína KAP con las proteínas CypB murina (mCypB) y humana (hCypB) recombinantes.
- 1.2. Identificar proteínas de unión con KAP y hCypB en células derivadas de túbulo proximal humano.
- 1.3. Analizar el perfil diferencial de los resultados obtenidos en 1.2.

2. Estudiar los efectos de KAP y hCypB, de forma aislada y combinada, en células derivadas de túbulo proximal humano, en relación a:

- 2.1. Diferenciación celular.
- 2.2. Proliferación celular.
- 2.3. Toxicidad por CsA.
- 2.4. Activación de STAT3.

3. Analizar la estructura 3D de la proteína KAP

- 3.1. Producción y purificación de la proteína KAP recombinante para análisis cristalográfico.
- 3.2. Producción de cristales de KAP en la plataforma Crystalfarm.
- 3.3. Difracción de rayos X de los cristales obtenidos y análisis de patrones.
- 3.4. Dicroísmo Circular (DC).
- 3.5. Microscopía Electrónica de Transmisión Tridimensional (3D-TEM).
- 3.6. Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (RMN-1D).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material Genético

3.1.1.1. *Kidney Androgen-regulated Protein (KAP)*

Secuencia Nucleotídica (cDNA)

```

atgtctcttctcctgcttcaactggttgcccttaaccctactaaagc atgatgcttttcaaggt
      10      20      30      40      50      60
LEU VAL ILE THR VAL PHE CYS GLY LEU THR VAL ALA PHE PRO LEU SER GLU LEU VAL SER
cctggatgactgctcttctgtgggtctgactgtggct ttccccctgtcagaattagtttc
      70      80      90      100     110     120
ILE ASN LYS GLU LEU GLN ASN SER ILE ILE ASP LEU LEU ASN SER VAL PHE ASP GLN LEU
aatcaataaagaactacagaattcaatcattgacctaactcagtccttgaccaact
      130     140     150     160     170     180
GLY SER TYR ARG GLY THR LYS ALA PRO LEU GLU ASP TYR THR ASP ASP ASP LEU SER THR
gggatcatacagagggacaaaagctcctctagaggattatacagatgatgatttaagcac
      190     200     210     220     230     240
ASP SER GLU GLN ILE MET ASP PHE THR PRO ALA ALA ASN LYS GLN ASN SER GLU PHE SER
tgactctgagcagatcatggacttcacgccagccgcaaacaacagaattctgagttctc
      250     260     270     280     290     300
THR ASP VAL GLU THR VAL SER SER GLY PHE LEU GLU GLU PHE THR GLU ASN THR ASP ILE
tactgatggttgagacagtctcctccggctttctggaagaattcactgagaacacagacat
      310     320     330     340     350     360
THR VAL LYS ILE PRO LEU ALA GLY ASN PRO VAL SER PRO THR SER ***
cacagtgaaaattccattagctgggaatccagctctcccctacttcc tg g g a a g a c t c c a
      370     380     390     400     410     420
ctttgaaataaacctgcgactgccattcaggatattgtctttgtagaaaatgatataaat
      430     440     450     460     470     480
ctaagatgctcccagcaaagaagaagaacgaggaagtgatcctggatgagaaatgctgt
      490     500     510     520     530     540
gccaggcatctctaagctctacccttactctgtgtgggtttaagaaataaacgttcattt
      550     560     570     580     590     600
gaattgc
      607

```

Péptido señal

KAP (Proteína madura)

STOP

Secuencia aminoacídica

10 20 30 40 50 60
MMLFKVLVIT VFCGLTVAFP LSELVSINKE LQNSIIDLLN SVFDQLGSYR GTKAPLEDYT
70 80 90 100 110 120
DDDLSTDSEQ IMDFTPAANK QNSEFSTDVE TVSSGFLEEF TENTDITVKI PLAGNPVSPT

Péptido señal

KAP (Proteína madura)

3.1.1.2. *Ciclofilina B (Homo Sapiens)*

Secuencia Nucleotídica (cDNA) (accesión AAA52150.1)

1 cggaacgca acatgaaggt gtccttgcc gccgccctca tcgcggggtc cgtcttcttc
.61 ctgctgctgc cgggaccttc tgcggccgat gagaagaaga aggggcccaa agtcaccgtc
121 aaggtgtatt ttgacctacg aattggagat gaagatgtag gccgggtgat ctttggctc
181 ttcggaaaga ctgttccaaa aacagtggat aattttgtgg ccttagctac aggagagaaa
241 ggatttggct acaaaaacag caaattccat cgtgtaatca aggacttcat gatccagggc
301 ggagacttca ccaggggaga tggcacagga ggaagagca tctacggtga gcgcttcccc
361 gatgagaact tcaaactgaa gcactacggg cctggctggg tcagcatggc caacgcaggc
421 aaagacacca acggctcca gttcttcatc acgacagtca agacagcctg gctagatggc
481 aagcatgtgg tgtttgcaa agttctagag gccatggagg tggcgcgaa ggtggagagc
541 accaagacag acagccggga taaaccctg aaggatgtga tcatcgaga ctgcccgaag
601 atcgagggtg agaagccctt tgccatcgcc aaggagtag gcacagggac atctttcttt
661 gagtgaccgt ctgtgcaggc cctgtagtcc gccacagggc tctgagctgc actggccccg
721 gtgctggcat ctggtggagc ggaccactc cctcacatt ccacagggcc atggactcac
781 ttttgaaca aactcctacc aactgacc aataaaaaaa aatgtgggtt tttttttttt
841 ttaataaaaa a

Péptido señal

Ciclofilina B humana (proteína madura)

STOP

Secuencia aminoacídica

1 mkvllaaali agsvfflllp gpsaa dekkk gpkvtvkvyf dlrigdedvg rvifglfgkt
61 vpktvdnfv latgekfgfy knskfhrvik dfmiqggdft rgdgtggksi ygerfpdenf
121 klkhygpgwv smanagkdt ngsqffittvk tawldgkhv fgkvlegmev vrkvestktd
181 srdkplkdvi iadcgkieve kpfaiake

Péptido señal

Ciclofilina B humana (proteína madura)

3.1.1.3. *Ciclofilina B (Mus Musculus)*

Secuencia Nucleotídica (cDNA) (accesión AAA37498.1)

```
1 ttgctgctgc cggtgatgc tgcgcctctc ggagcgcaat atgaaggatgctcttgcgcg  
61 cgcctcctcgc gtgggctccg tcttcttctt tttgctgccc ggacctctcg tggccaacga  
121 taagaagaag ggacctaaag tcacagtcaa ggtatacttt gatttataaa ttggagatga  
181 atctgtagga cgagtcgtct ttggactctt tggaaagact gttccaaaaa cagtgataa  
241 tttttagtagcc ttagctacag gagagaaagg atttggctac aaaaacagca agttccatcg  
301 tgtcatcaag gacttcatga tccagggtgg agacttcacc aggggagatg gcacaggagg  
361 aaagagcatc tatggtgagc gcttcccaga tgagaacttc aagctgaagc actacgggcc  
421 tggctgggtg agcatggcca atgcaggcaa agacaccaat ggctcacagt tcttcataac  
481 cacagtcaag acctcctggc tggatggcaa gcatgtggtt ttcggcaaag ttctagaggg  
541 catggatgtg gtacggaagg tggagagcac caagacagac agccgggaca agccactgaa  
601 ggatgtcatc attgtcgact ccggcaagat cgaagtggag aaacccttcg ccattgcaa  
661 ggagtagaga gcctggggga cctcatcctt ctaagcagct gtctgtgtgg gtctctgtcaa  
721 tccccacaca gacgaaggta gccagtcaca aggttctgtg ccacctggc ctagtgctt  
781 ccatctgatg gggtgaccac acccctcaca ttccacaggc ctgattttta taaaaaacta  
841 ccaatgctga tcaataaagt gggttttttt tat
```

Péptido señal

Ciclofilina B murina (proteína madura)

STOP

Secuencia aminoacídica

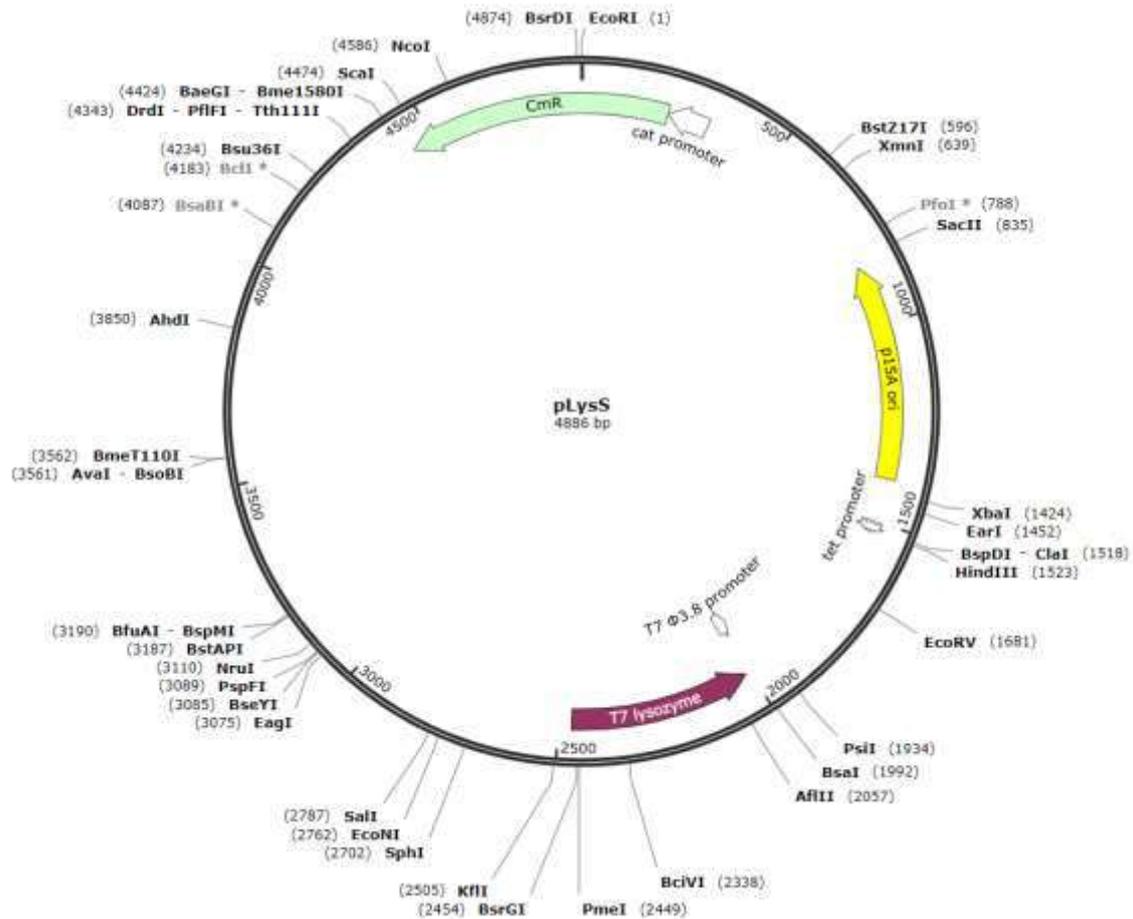
```
1 mkvlfaaali vgsvvflllp gpsv andkkk gpkvtvkvyf dlqigdesvg rrvfglfgkt  
61 vpktvdnfva latgekfgfy knskfhrvik dfmiqggdft rgdgtggksi ygerfpdenf  
121 klkhygpgwv smanagkdt ngsqffittvk tswldgkhv fgkvlegmdv vrkvestktd  
181 srdkplkdvi ivdsgkieve kpfaiake
```

Péptido señal

Ciclofilina B murina (proteína madura)

3.1.2. Plásmidos

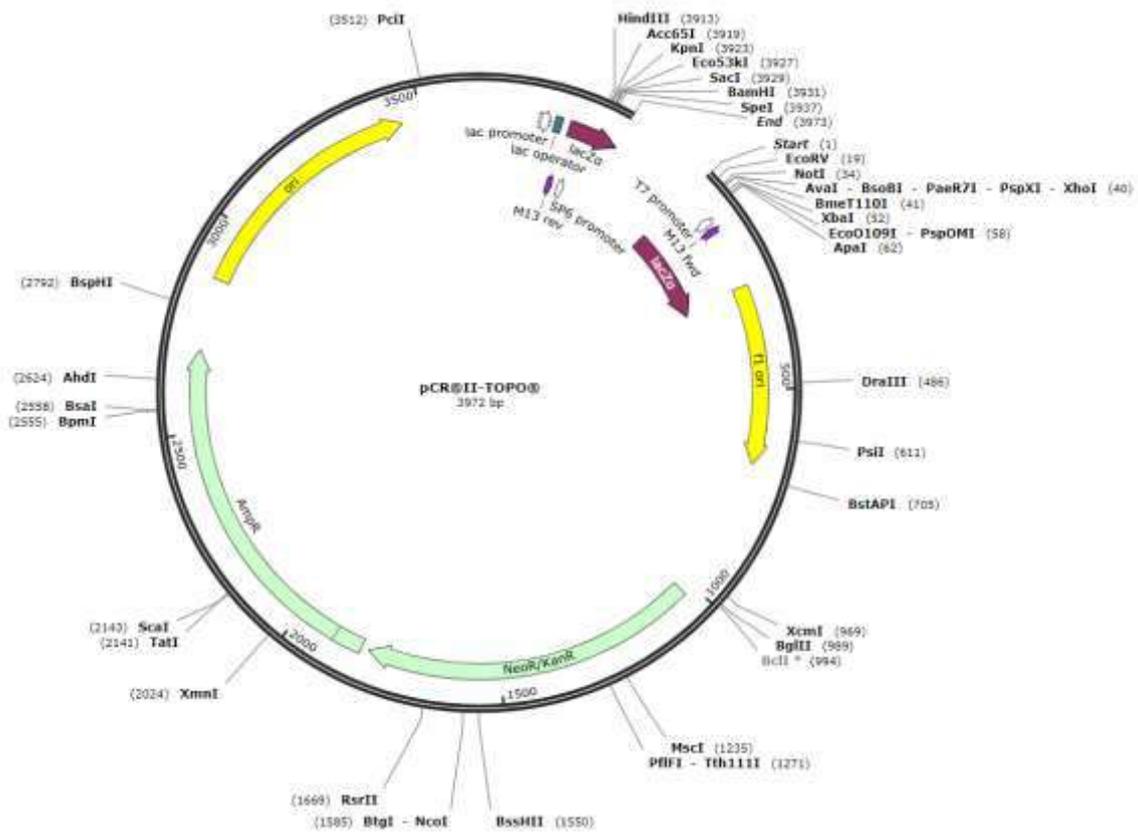
3.1.2.1. *pLysS*



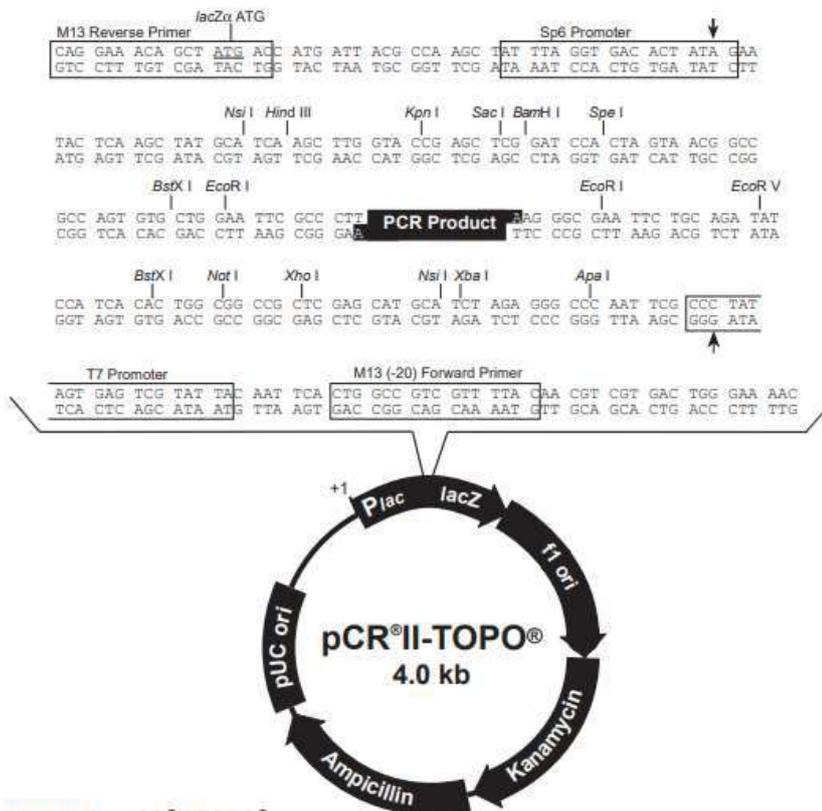
pLysS es un plásmido que expresa un nivel bajo de la proteína lisozima T7, un inhibidor de la ARN polimerasa T7. Este plásmido se añade a líneas bacterianas de expresión heteróloga de proteínas que contienen vectores de expresión que utilizan la ARN polimerasa T7 con expresión inducida (normalmente por IPTG). Estos tipos de vectores presentan una pequeña expresión basal de la proteína a producir, aunque no esté su producción inducida, que puede ser contraproducente para la bacteria. Para evitar eso se puede utilizar este plásmido *pLysS* que inhibe esta pequeña producción basal (si la hubiera).

DETALLE DE TODA LA SECUENCIA NUCLEOTIDA

3.1.2.2. *pCR®II-TOPO®*

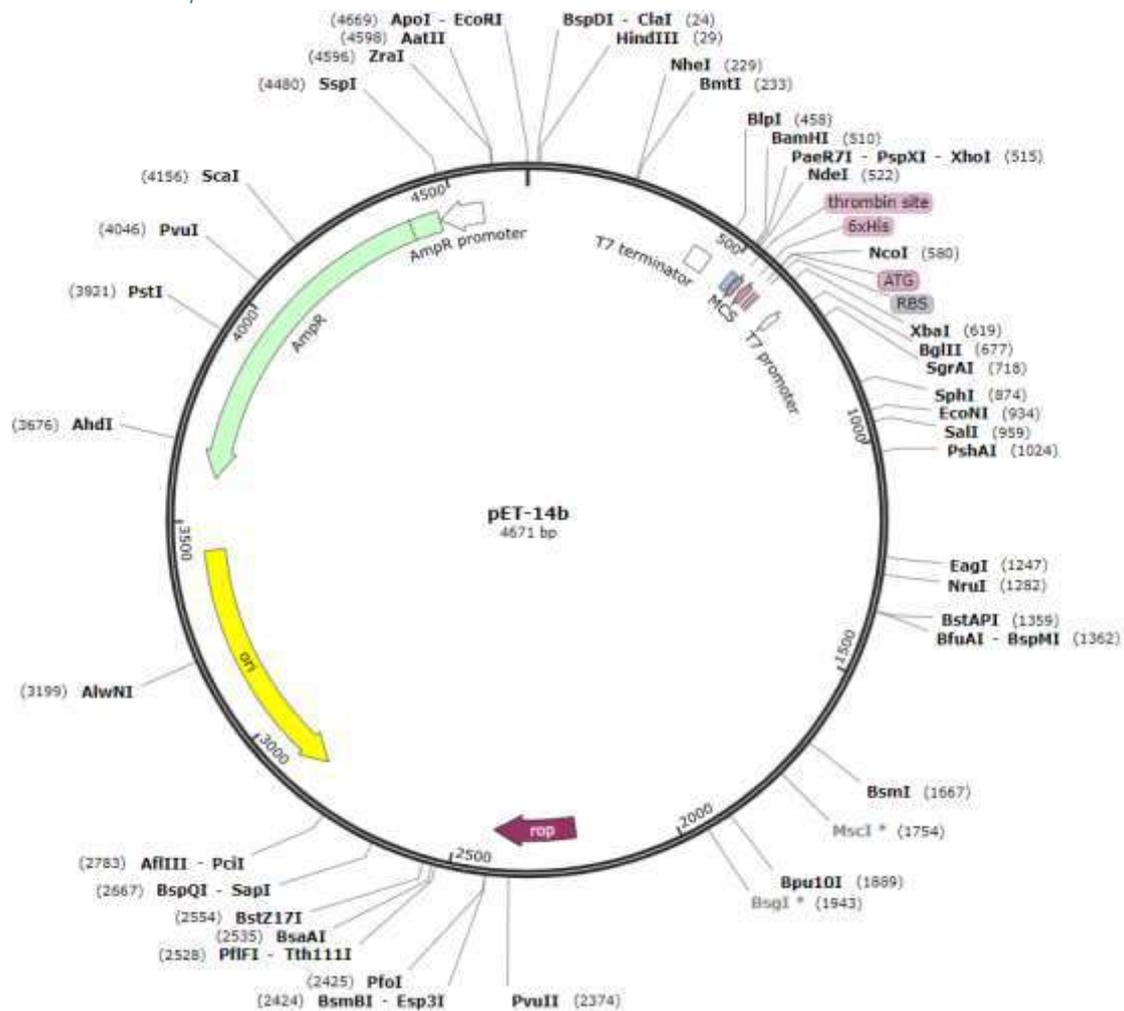


DETALLE DE TODA LA SECUENCIA NUCLEOTIDA



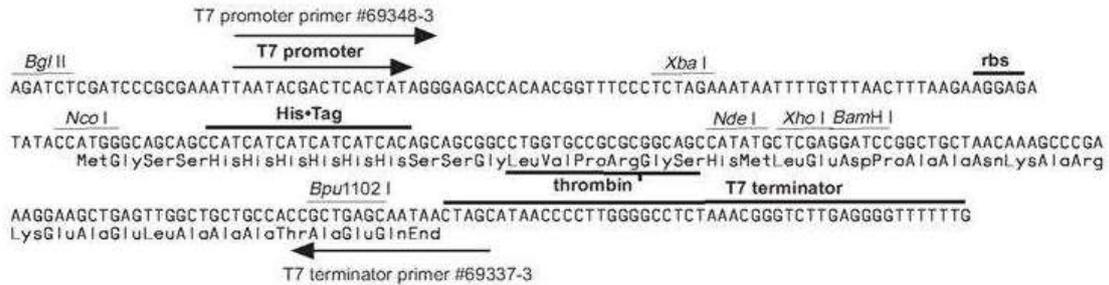
El plásmido pCR®II-TOPO® forma parte del kit de Invitrogen TOPO® TA Cloning® Kit for subcloning (Invitrogen, Cat. No. K4500-40). Se utiliza para subclonar cualquier gen diana que queramos introducir en un plásmido de expresión heteróloga. Es decir, permite insertar directamente el producto de una RT-PCR (gen capturado/clonado), dotando a los extremos del gen clonado un soporte físico para que los enzimas de restricción escogidos puedan actuar correctamente. Este plásmido se suministra linealizado con salientes simples de 3'-timidina para TA Cloning® y topoisomerasa I unida covalentemente al vector (denominado vector "activado"). La polimerasa Taq tiene una actividad transferasa terminal no dependiente de la plantilla que añade una única desoxiadenosina a los extremos 3' del producto de PCR. El vector linealizado suministrado en este kit tiene residuos de desoxitimidina 3' colgantes individuales. Esto permite que los insertos de PCR se ligen eficazmente con el vector.

3.1.2.3. pET-14b



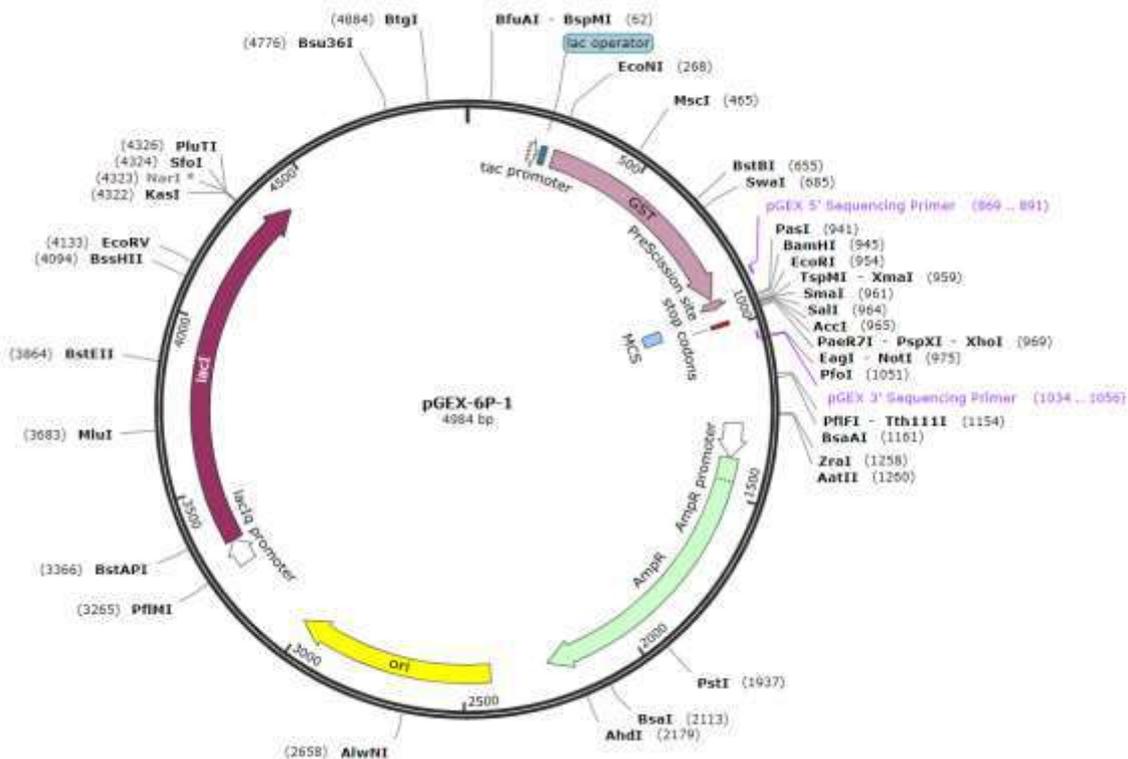
DETALLE DE TODA LA SECUENCIA NUCLEOTIDA

El vector pET-14b lleva una secuencia *His-Tag*[®] N-terminal seguida de un sitio de trombina y tres sitios de clonación. Es decir, permite expresar proteínas de forma heteróloga añadiéndole una cola de 6 histidinas (diana de purificación por afinidad) junto con una diana de trombina (para deshacernos de esta cola de histidinas). Utiliza un promotor la ARN polimerasa de T7. A continuación detalle de su *Multicloning Site*:



pET-14b cloning/expression region

3.1.2.4. pGEX-6P-1



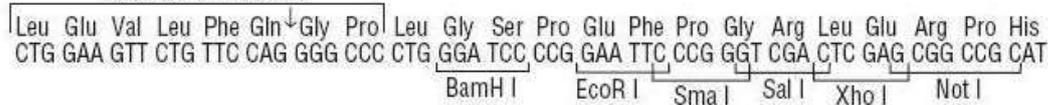
DETALLE DE TODA LA SECUENCIA NUCLEOTIDA

Este vector permite expresar proteínas de forma heteróloga unida a GST (*Glutathione S-Transferase*). Es decir, el resultado es una proteína de fusión con GST + proteína diana. Este tipo de proteínas de fusión se producen cuando, por ejemplo, queremos unir una proteína diana covalentemente a una resina y no queremos unirla directamente, para no comprometer su actividad. De esta forma, lo que se une covalentemente es otra proteína (GST), y nuestra proteína diana queda "libre". Además,

existe una diana de una proteasa (*PreScission Protease*) entre las dos proteínas para liberar la nuestra. A continuación, detalle del *Multicloning Site*;

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

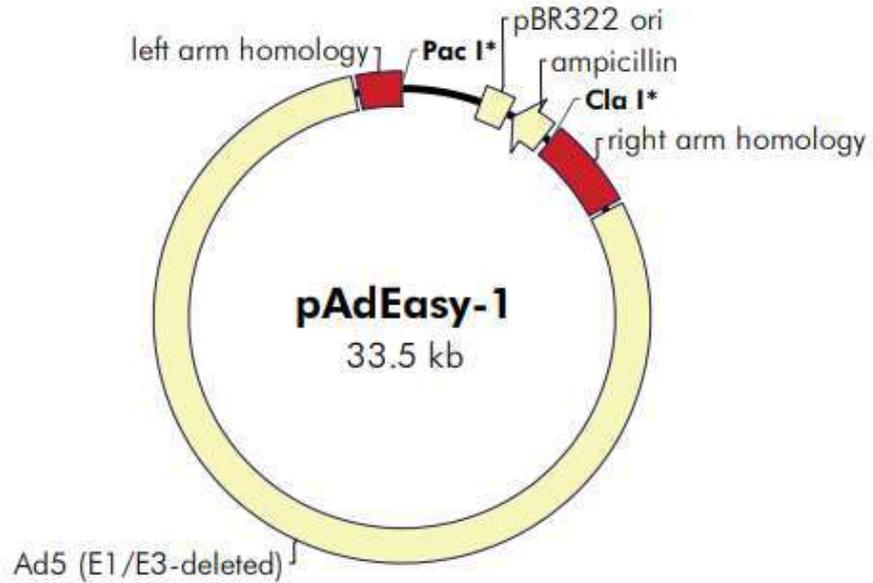
PreScission Protease



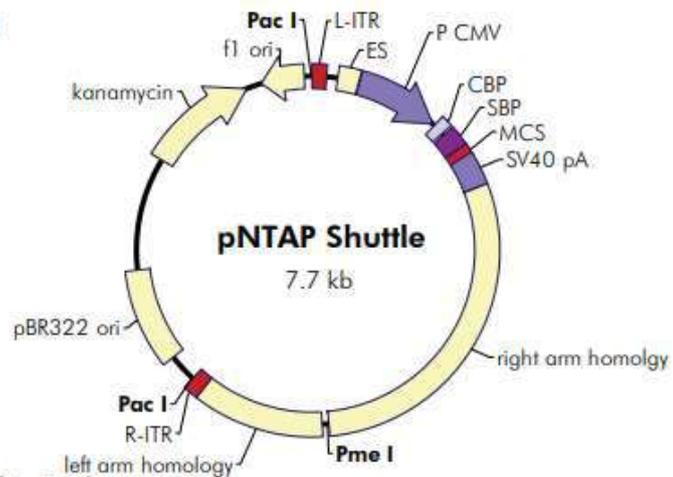
3.1.2.5. *Plásmidos del Kit InterPlay Adenoviral TAP System*

Como se explicará más adelante, este kit se ha utilizado para realizar un ensayo de *Tandem Affinity Purification* (Purificación por afinidad en tándem, Interactómica). La idea es producir proteínas heterólogas de fusión: nuestra proteína diana + dos péptidos de unión por afinidad a diferentes resinas (CBP, *Calmodulin Binding Peptide*, y SBP, *Streptavidin Binding Peptide*). El Kit consta de 5 vectores: 4 vectores *Shuttle* (dos de unión de nuestra proteína diana a los dos péptidos de purificación, uno poniendo los péptidos en N-terminal (pNTAP-Shuttle) y el otro en C-terminal (pCTAP Shuttle); otro unido a la *chloramphenicol acetyltransferase* (CAT) que servirá para realizar el *background* del ensayo de Interactómica (pTAP Shuttle-CAT); y por último otro que tiene el gen *LacZ* que se utilizará para controlar la producción de adenovirus recombinantes), todos ellos con un promotor CMV (*human citomegalovirus*) de expresión constitutiva; y un vector con secuencias homologas de recombinación (que también tiene los *Shuttle*) y fusionarse con los vectores *Shuttle* (pAdEasy-1). En la sección "Métodos" se explica con detalle el protocolo y la función de cada vector.

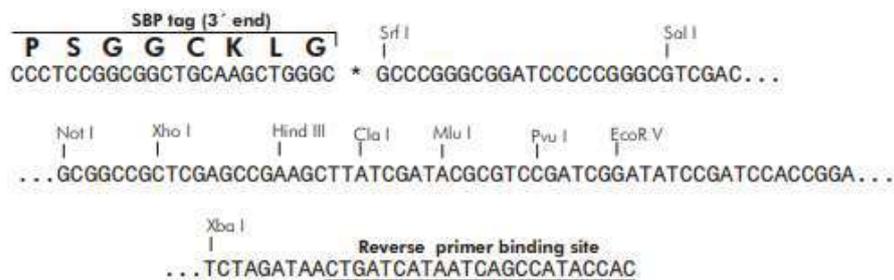
pAdEasy-1 Vector Map



pNTAP Shuttle Vector Map

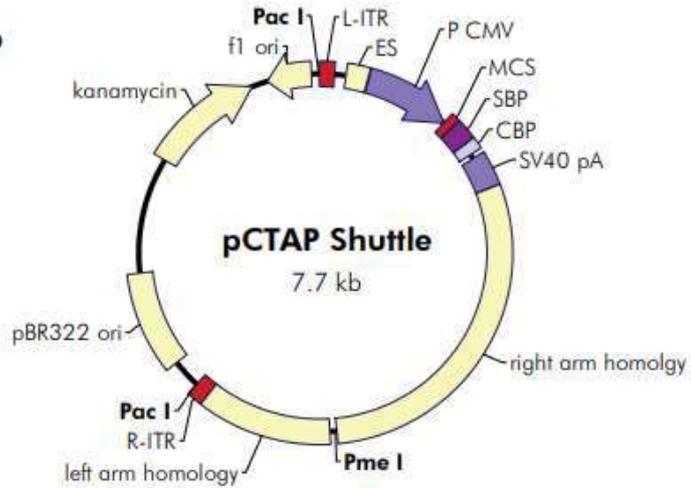


pNTAP-Shuttle Multiple Cloning Site Region (sequence shown 1156-1297)



* In pNTAP-A, no bases inserted; in pNTAP-B, T inserted; in pNTAP-C, TT inserted

pCTAP Shuttle Vector Map



pCTAP-Shuttle Multiple Cloning Site Region (sequence shown 888–1034)

Forward primer binding site

GGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAG...

Bgl II Kpn I Sal I Not I Xho I Hind III Cla I Mlu I Pvu I
 ... AGATCTGGTACCGTCGACGCGGCCGCTCGAGCCTAAGCTTATCGATACGCGTCCGATCG* ...

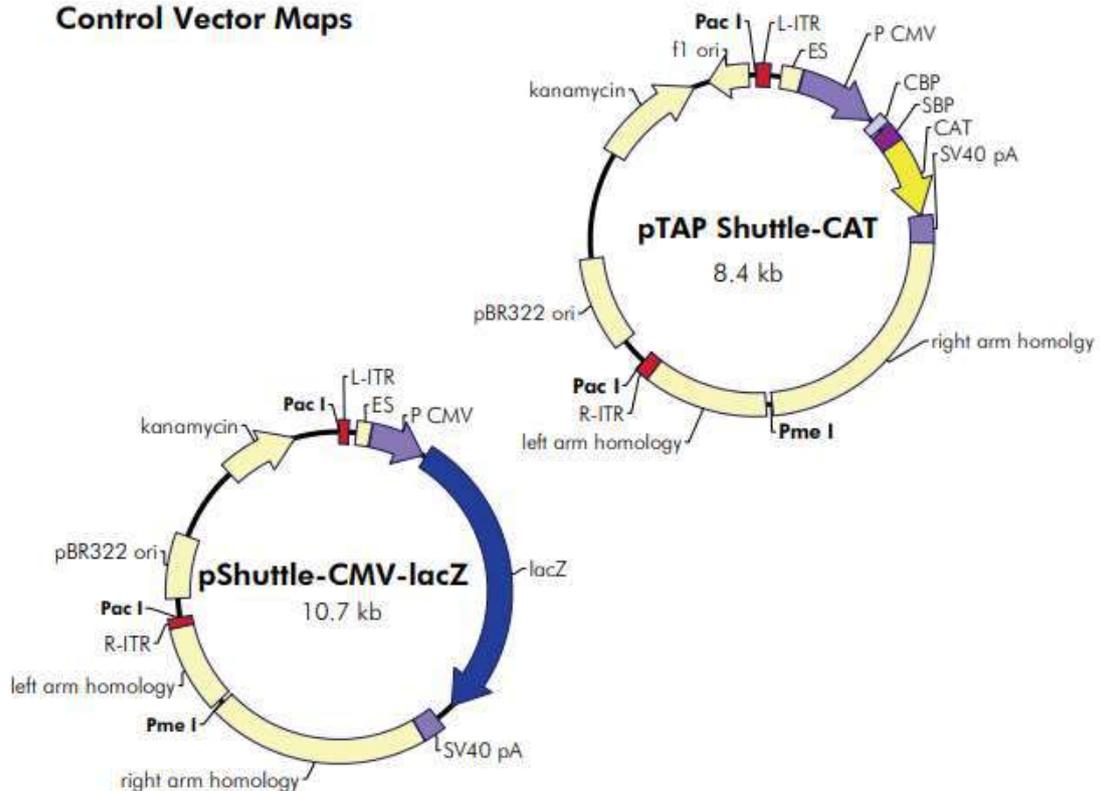
SBP tag (5' end)

M D E K T T G W R G G H

... GCAGCAATGGACGAGAAGACCACCGGCTGGCGGGGCGGCCAC

* In pCTAP-A, no bases inserted; in pCTAP-B, A inserted; in pCTAP-C, GA inserted

Control Vector Maps



3.1.3. Líneas celulares

3.1.3.1. PKSV-PCT3

Se trata de una línea celular epitelial inmortalizada que se deriva del segmento contorsionado del túbulo proximal del riñón (pars convoluta, PCT). Se obtuvieron de ratones machos transgénicos para el antígeno T grande y T pequeño del virus de simio 40 (SV40) bajo el control del promotor de la piruvato quinasa (Cartier N, 1993). Esta línea celular presenta una morfología epitelial, siendo células adherentes que crecen en monocapa y poseen la capacidad de formar domos después de varios días en postconfluencia (cuando se han diferenciado completamente) (Lacave R, 1993). La línea celular se clonó en dilución límite para obtener las células PCT3 (clon 3 de PKSV-PCT) que mantienen el fenotipo de las células parentales de las que proceden (Soler M, 2002). La línea celular original fue cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Alain Vandewalle (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France).

Medio rico para células PCT3

Producto	Preparación y alícuotas	Guardar a	[final]	Volumen
DMEM (Gibco ref: 11880-036)		4°C		250 ml
HAM F12 (Gibco ref: 31765-068)		4°C		250 ml
HEPES buffer (Gibco 1M-100 ml)		RT	20 mM	10 ml
Glutamina (Gibco 200 mM)	Alícuotas de 10 ml. Añadir cuando se empiece el uso del medio.	-20°C	2 mM	5 ml
Glucosa anhidra (Sigma G-7021)	Disolver 1,12 g de glucosa en 20 ml de DMEM/F12 a 37°C y agitar suavemente hasta total disolución. Añadir al medio.	RT	2,24 g/l	1,12 g
Apo Transferrina (Sigma T-8027)	Disolver 100 mg en 20 ml de H ² O. Alícuotas de 0,5 ml	-20°C	5 µg/ml	500 µl
Insulina (Sigma I-6634 50 mg)	Resuspender en 5 ml de H ₂ O mQ y añadir 5 µl de HCl concentrado (humeante). Alícuotas de 1 ml.	-20°C	5 µg/ml	250 µl
Dexametasona 10-3M (Sigma D-8893)	Disolver 1 mg en 2,5 ml de EtOH 95%. Alícuotas de 0,5 ml.	4°C	5·10 ⁻⁸ M	25 µl
T3 10 ⁻⁴ M (Sigma T-5516)	Disolver 1 mg en 15 ml de KOH 10 mM. Alícuotas de 1,5 ml.	4°C	10 ⁻⁹ M	5 µl
EGF (Sigma E-4127)	Disolver 100 µg en 1 ml de H ² O mQ. Alícuotas de 50 µl.	-20°C	10 ng/ml	50 µl

Selenio (Sigma (S-9133))	Disolver 1 mg en 20 ml de H ² O mQ EN CABINA EXTRACTORA. Alícuotas de 1 ml.	4°C	60 nM	100 µl
Sérum fetal bovino descomplementado. (Biological Industries ref: 04-007-1A)	Descomplementar el sérum calentándolo a 56°C durante 30 min. Alícuotas de 40 ml.	-20°C	2%	10 ml
Antibiótico- Antimicótico (Gibco ref: 15240-062)	Alícuotas de 10 ml.	-20°C	1%	5 ml

Volumen final = 530 ml

- Mezclar todos los componentes en un recipiente apropiado en una cabina.
- Filtrar con un filtro de 0,22 µm de poro (Millipore Stericup[®] and Steritop[™], PR01925).
- Dividir el volumen final en botellas de 500 ml.
- Guardar a 4°C.

3.1.3.2. HK2

HK-2 (*Human Kidney 2*) es una línea de células tubulares proximales (PTC) derivada del riñón norma.

Las células se immortalizaron mediante transducción con genes E6 / E7 del virus del papiloma humano 16 (HPV-16) (Ryan MJ, 1994).

La línea celular parece derivar de una sola célula basada en análisis Southern y FISH. Igual que las PCT3, presenta una morfología epitelial, siendo células adherentes que crecen en monocapa.

Medio rico para células HK-2

Producto	Preparación y alícuotas	Guardar a	[final]	Volumen
DMEM (Gibco ref: 11880-036)		4°C		250 ml
HAM F12 (Gibco ref: 31765-068)		4°C		250 ml
HEPES buffer (Gibco 1M-100 ml)		RT	20 mM	10 ml
Glutamina (Gibco 200 mM)	Alícuotas de 10 ml. Añadir cuando se empiece el uso del medio.	-20°C	2 mM	5 ml
Glucosa anhidra (Sigma G-7021)	Disolver 1,12 g de glucosa en 20 ml de DMEM/F12 a 37°C y agitar suavemente hasta total disolución. Añadir al medio.	RT	2,24 g/l	1,12 g
Apo Transferrina (Sigma T-8027)	Disolver 100 mg en 20 ml de H ₂ O. Alícuotas de 0,5 ml	-20°C	5 µg/ml	500 µl
Insulina (Sigma I-6634 50 mg)	Resuspender en 5 ml de H ₂ O mQ y añadir 5 µl de HCl concentrado (humeante). Alícuotas de 1 ml.	-20°C	5 µg/ml	250 µl
Dexametasona 10-3M (Sigma D-8893)	Disolver 1 mg en 2,5 ml de EtOH 95%. Alícuotas de 0,5 ml.	4°C	5 · 10 ⁻⁸ M	25 µl
T3 10 ⁻⁴ M (Sigma T-5516)	Disolver 1 mg en 15 ml de KOH 10 mM. Alícuotas de 1,5 ml.	4°C	10 ⁻⁹ M	5 µl
EGF (Sigma E-4127)	Disolver 100 µg en 1 ml de H ₂ O mQ. Alícuotas de 50 µl.	-20°C	10 ng/ml	50 µl
Selenio (Sigma (S-9133)	Disolver 1 mg en 20 ml de H ₂ O mQ EN CABINA EXTRACTORA. Alícuotas de 1 ml.	4°C	60 nM	100 µl
Sérum fetal bovino descomplementado. (Biological Industries ref: 04-007-1A)	Descomplementar el sérum calentándolo a 56°C durante 30 min. Alícuotas de 40 ml.	-20°C	2%	10 ml
Antibiótico-Antimicótico (Gibco ref: 15240-062)	Alícuotas de 10 ml.	-20°C	1%	5 ml

Volumen final = 530 ml

- Mezclar todos los componentes en un recipiente apropiado en una cabina.
- Filtrar con un filtro de 0,22 µm de poro (Millipore Stericup[®] and Steritop[™], PR01925).
- Dividir el volumen final en botellas de 500 ml.
- Guardar a 4°C.

3.1.3.3. AD-293

Las células AD-293 (Figura 3.3) se derivan de la línea celular HEK293 comúnmente utilizada, pero tienen propiedades mejoradas de adherencia celular y formación de placa. Las células HEK293 son células renales embrionarias humanas transformadas por ADN de adenovirus tipo 5 cortado (Graham FL, 1977). Las células AD-293, como las células HEK293, producen el gen de adenovirus E1 en trans, lo que permite la producción de partículas de virus infecciosos cuando las células se transfectan con vectores de adenovirus con delección de E1 como el vector pAdEasy-1. Las células HEK293 estándar no se adhieren bien a las placas de cultivo de tejidos, lo que dificulta los procedimientos de ensayo de placa y cultivo celular adherente. Las células AD-293 demuestran una mejor adherencia a las placas de cultivo de tejidos, lo que hace que las monocapas de células AD-293 sean menos susceptibles a la rotura.

Medio rico para células AD-293

	Preparación y alícuotas	Guardar	Cf	Vf
DMEM High Glucose (4,5g/l) (Biological Industries cat.: 01-055-1A) 500 ml		4°C		500 ml
Glutamina (Gibco 200 mM)	Alícuotas de 11 ml. Añadir justo antes de empezar a usar el medio.	-20°C	4 mM	11 ml
Piruvato sódico (Biological Industries cat: 03-042-1B) 100 mM (11g/l)	Alícuotas de 11 ml.	-20°C	110 mg/l	5,5 ml
Aminoácidos no esenciales MEM-EAGLE 100x (Biological Industries cat.: 01-340-1B) 100 ml	No alícuotas.	4°C	1 %	5,5 ml
Suero fetal bovino descomplementado (Biological Industries cat.: 04-007-1A) 500 ml	Descomplementar el suero calentando a 56 °C 30 min. Alícuotas de 40 ml.	-20°C	10 %	55 ml
Antibiótico-antimicótico (Gibco cat.: 15240-062) 100 ml	Alícuotas de 11 ml.	-20°C	1 %	5,5 ml

Volumen final = 577,5 ml

- Mezclar todos los componentes en un recipiente apropiado en una cabina.
- Filtrar con un filtro de 0,22 µm de poro (Millipore Stericup[®] and Steritop[™], PR01925).
- Dividir el volumen final en botellas de 500 ml.
- Guardar a 4°C.

3.1.4. Bacterias

3.1.4.1. *E. Coli BL21 (DE3) pLysS*

la línea bacteriana de *E. Coli BL21 (DE3) pLysS*. Las bacterias BL21 son ideales para la expresión de proteínas y usan el promotor T7. La designación (DE3) indica que el anfitrión es un lisogénico del profago (DE3), y por tanto lleva una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 (inducible por adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) o el uso de un medio autoinducible). BL21 (DE3) es el anfitrión más ampliamente utilizado para la expresión de proteínas, ya que es deficiente en las proteasas Lon y OmpT. Gracias al sistema de inducción de la expresión IPTG/T7, podemos activar esta expresión cuando más nos convenga, en nuestro caso cuando el cultivo bacteriano se encuentre en la fase exponencial de crecimiento (A_{600} entre 0,6-0,7). Pero el promotor T7 presenta una leve activación basal de la expresión de la proteína que puede ser perjudicial para la bacteria (dependiendo del nivel de toxicidad de la proteína), por eso nuestra línea bacteriana contiene además el plásmido pLysS (Ya descrito en la sección de “Los Plásmidos”) que codifica para la expresión a un nivel bajo de la proteína lisozima T7, un inhibidor de la ARN polimerasa T7, evitando así la expresión basal sin inducción de nuestra proteína. Como la expresión de la lisosoma T7 es baja, cuando inducimos con IPTG el promotor T7, la expresión normal de la ARN polimerasa T7 supera esta inhibición. Además, el plásmido pLysS confiere a la bacteria resistencia contra el antibiótico Cloranfenicol (rCAM), pudiendo seleccionar así las colonias de BL21 (DE3) que lo contengan.

One-shot® TOP 10

Línea bacteriana de *E. Coli* comercial químicamente competente (Invitrogen, ref: C4040-10) que se transforma fácilmente y se utiliza para la clonación.

Las células de *E. Coli* de One Shot® TOP10 son similares a las de la línea DH10B™ y poseen las características siguientes:

- hsdR para una transformación eficaz de ADN no metilado procedente de amplificaciones de PCR.
- mcrA para una transformación eficaz de ADN metilado procedente de preparaciones genómicas.
- lacZ Δ M15 para el cribaje de color azul/blanco de clones recombinantes.
- endA1 para preparaciones de ADN de limpiador y una mejora de los resultados en las aplicaciones posteriores gracias a la eliminación de la digestión inespecífica por parte de Endonuclease I.
- recA1 para reducir los casos de recombinación inespecífica en ADN clonado.

3.1.4.2. BJ5183-AD-1

BJ5183-AD-1 es una línea bacteriana comercial (Agilent, ref: 200157). Es una línea BJ5183 pretransformada con el vector pAdEasy-1 (Ver sección “Los Plásmidos”). La línea BJ5183-AD-1 es competente en *recA* y proporciona la maquinaria necesaria para ejecutar el proceso de recombinación entre el vector *Shuttle* y el vector pAdEasy. La eficiencia de recuperación de vectores recombinantes mejora enormemente mediante el uso de la línea BJ5183-AD-1 que se pretransforma con el vector pAdEasy-1 hasta un 80-90% de las colonias resistentes a kanamicina son recombinantes que utilizan este sistema de transformación única, en comparación con el 20% recombinantes utilizando el procedimiento de cotransformación tradicional.

3.1.4.3. XL10-Gold ultracompetent cells

XL10-Gold ultracompetent cells es una línea comercial (Agilent, ref: 200314). XL10-Gold se utiliza para amplificar vectores, en nuestro caso el vector de adenovirus recombinado (Ver “Metodos: Tandem Affinity Purification (TAP)”. Esta línea bacteriana es deficiente en endonucleasa (*endA1*) y deficiente en recombinación (*recA*). La mutación *endA1* mejora en gran medida la calidad del ADN de minipreparación del plásmido y la mutación *recA* ayuda a garantizar la estabilidad del inserto.

3.1.4.4. Medios de cultivo para bacterias

Las bacterias se cultivaron de forma rutinaria en un medio Luria Broth (+/- agar) con 50 µg/ml de ampicilina.

- **LB-ampicilina líquida:** Las colonias de bacterias aisladas fueron cultivadas, de forma general, con un medio líquido de 25% Luria Broth suplementado con 50 µg/ml de ampicilina (Invitrogen ref: 11593-019) y con algún otro antibiótico de selección (si fuera necesario).
- **LB-ampicilina sólida:** Las bacterias fueron sembradas en un medio sólido de 25% Luria Broth/15% agar suplementado con 50 µg/ml de ampicilina (Invitrogen ref: 11593-019) y con algún otro antibiótico de selección (si fuera necesario), para poder seleccionar colonias transformadas.
- **Medio S.O.C.:** Medio rico comercial para la siembra bacteriana de células competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen ref: 15544-034).
- **Medio NZY+:** Medio rico comercial para la siembra bacteriana de células competentes XL10-Gold (Fisher Scientific ref: BP2465500).

3.1.5. Buffers

3.1.5.1. Buffer homogeneizado tejido

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	20 ml (ml SM)	50 ml (ml SM)
Sacarosa	0.32 M	3.2 M (40ml→43.81 gr)	2 ml	5 ml
Azida Sódica	0.01 %	10 %	20 µl	50 µl
TritonX-100	0.1 %	-	20 µl	50 µl
PMSF (*)	1mM	100 mM (5ml-isop→0,3484gr)	200 µl	500 µl
Aprotinina (*)	0.5 µg/ml	1 mg/ml	10 µl	25 µl
Leupeptina (*)	10 µg/ml	5 mg/ml	40 µl	100 µl

(*) Añadir al momento de utilizar el buffer

Reactivo	Empresa	Ref.
Sacarosa	SIGMA	S9378-1KG
Azida Sódica	Merck	6688.0100
TritonX-100	SIGMA	X-100
PMSF	Boheringer-Mann	837 091
Aprotinina	-	-
Leupeptina	-	-

3.1.5.2. Buffer homogeneizado tejido "A"

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	5 ml (ml SM)	100 ml (ml SM)
HEPES-KOH pH=7.6	50 mM	500 mM (100ml→11.9155 gr)	500 µl	10 ml
KCl	50 mM	2 M (40ml→5.9648 gr)	125 µl	2.5 ml
EGTA (1)	1 mM	100 mM (40ml→1.5214 gr)	50 µl	1 ml
MgCl ₂	1 mM	100 mM (40ml→0.8132 gr)	50 µl	1 ml
Glicerol	10 %	-	500 µl	10 ml
TritonX-100	0.1 %	-	5 µl	100 µl
PMSF (*)	1mM	100 mM (5ml-isop→0,3484gr)	50 µl	1 ml
Aprotinina (*)	0.5 µg/ml	1 mg/ml	2.5 µl	50 µl
Leupeptina (*)	10 µg/ml	5 mg/ml	10 µl	200 µl

Ajustar a pH=7,6

(1) Basificar con unas gotas de NaOH 5M (*) Añadir al momento de utilizar el buffer

Reactivo	Empresa	Ref.
HEPES	SIGMA	H-4034-100G
NaCl	SIGMA	S-7653
EGTA	SIGMA	E-3889-25G
MgCl ₂	Merck	5833.0250
Glicerol	SIGMA	G-7757
TritonX-100	SIGMA	X-100
PMSF	Boheringer-Mann	837 091
Aprotinina	-	-
Leupeptina	-	-

3.1.5.3. Buffer lisis células BL21 (DE3)

Reactivo	[Final]	1 L
NaCl	0,5 M	29,22 gr
HEPES	20 mM	4,7662 gr
Glicerol	20 %	200 ml
EDTA	1mM	0,3722 gr
β -Mercaptoetanol	15 mM	(1)
PMSF	1mM	(2)
NP-40	0,1 %	1 ml

Ajustar a pH=8,0

(1) Añadir al momento de utilizar el buffer a partir de solución comercial 14,2M (1:1000)

(2) Añadir al momento de utilizar el buffer a partir de solución PMSF 100 mM (1:100)

Reactivo	[Final]	10ml (en isopropanol)
PMSF	100 mM	0,1742 gr

Reactivo	Empresa	Ref.
NaCl	SIGMA	S-7653
HEPES	SIGMA	H-4034-100G
Glicerol	SIGMA	G-7757
EDTA	SIGMA	E-5134
β -Mercaptoetanol	SIGMA	M3148-100ML
PMSF	Boheringer-Mann	837 091
NP-40	-	-
Isopropanol	MERCK	1.09634.1000

3.1.5.4. Buffer lisis células BL21 (DE3) DUET

Buffer lisis "500"

Reactivo	[Final]	250 ml
NaCl	500 mM	7,31 gr
HEPES	20 mM	1,19 gr
NP-40	0,1 %	250 μ l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 mM	0,0184 gr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 mM	0,0254 gr
β -Mercaptoetanol	15 mM	(1)
PMSF	1mM	(2)
DNase	5 u/Litre BL	(3)

Ajustar a pH=8,0

Buffer lisis "150"

Reactivo	[Final]	250 ml
NaCl	150 mM	2,193 gr
HEPES	20 mM	1,19 gr
NP-40	0,1 %	250 µl
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 mM	0,0184 gr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 mM	0,0254 gr
β-Mercaptoetanol	15 mM	(1)
PMSF	1mM	(2)
DNase	5 u/Litre BL	(3)

Ajustar a pH=8,0

Buffer lisis "150 SD"

Reactivo	[Final]	250 ml
NaCl	500 mM	2,193 gr
HEPES	20 mM	1,19 gr
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 mM	0,0184 gr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 mM	0,0254 gr
β-Mercaptoetanol	15 mM	(1)
PMSF	1mM	(2)
DNase	5 u/Litre BL	(3)

Ajustar a pH=8,0

- (1) Añadir al momento de utilizar el buffer a partir de solución comercial 14,2M (1:1000)
- (2) Añadir al momento de utilizar el buffer a partir de solución PMSF 100 mM (1:100)
- (3) Añadir al momento de utilizar el buffer a partir de solución DNase 1 µg/µl: 5 µl por litro BL

Reactivo	[Final]	10ml (en isopropanol)
PMSF	100 mM	0,1742 gr

Reactivo	Empresa	Ref.
NaCl	SIGMA	S-7653
HEPES	SIGMA	H-4034-100G
NP-40	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	MERCK	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O	MERCK	-
β-Mercaptoetanol	SIGMA	M3148-100ML
PMSF	Boheringer-Mann	837 091
Isopropanol	MERCK	1.09634.1000
DNase	QIAGEN	79254

3.1.5.5. Buffer lisis *E. Coli*

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	20 ml (ml SM)
STE	1X	1X	20 ml
Sarkosil	1 % o 0.1 % (1)	-	0.2 gr o 0,02 gr
DTT	5 mM	1 M (40ml→6,16 gr)	100 µl
PMSF (*)	1mM o 0,1 mM (1)	100 mM (5ml-isop→0,3484gr)	200 µl o 20 µl

(1) Buffer lisis o equilibrar resina Ni-NTA

(*) Añadir al momento de utilizar el buffer

Reactivo	Empresa	Ref.
STE	SIGMA	85810
Sarkosyl (N-lauroylsarcosine)	SIGMA	61739 5gr
DTT	SIGMA	D-0632
PMSF	Boheringer-Mann	837 091

3.1.5.6. Buffer lisis *E. Coli* NETN

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	10 ml (ml SM)
TRIS-HCl pH = 8,0	20 mM	200 mM (40ml→0.9688 gr)	1 ml
NaCl	100 mM	5 M (40ml→11.688 gr)	200 µl
EDTA	1mM	100 mM (40ml→1.4888 gr)	100 µl
Glicerol	10 %	-	1 ml
NP-40	0.5 %	-	50 µl
PMSF (*)	1mM	100 mM (5ml-isop→0,3484gr)	100 µl
Aprotinina (*)	0.5 µg/ml	1 mg/ml	5 µl
Leupeptina (*)	10 µg/ml	5 mg/ml	20 µl

Ajustar a pH=8,0

(*) Añadir al momento de utilizar el buffer

Reactivo	Empresa	Ref.
Trizma base	SIGMA	T-1503-1KG
NaCl	SIGMA	S-7653
EDTA	SIGMA	E-5134
Glicerol	SIGMA	G-7757
NP-40	-	-
PMSF	Boheringer-Mann	837 091
Aprotinina	-	-
Leupeptina	-	-

3.1.5.7. *Buffer digestión trombina*

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	5 ml (SM)	10 ml (SM)
TRIS-HCl pH = 8,0	50 mM	1 M (0,5l→60,58 gr)	0,25 µl	0,5 ml
CaCl ₂	10 mM	1 M (40 ml → 8,76 gr)	50 µl	100 µl

Ajustar a pH=8,4

Reactivo	Empresa	Ref.
Trizma base	SIGMA	T-1503-1KG
CaCl ₂	MERCK	2386.1000

3.1.5.8. *Buffer digestión trombina His-KAP (10X)*

Reactivo	[Final]	1 L
TRIS HCl (Trizma base)	200 mM	24,228 gr
NaCl	1,5 M	87,66 gr
CaCl ₂	25 mM	2,7748

Ajustar a pH=8,4

Reactivo	Empresa	Ref.
Trizma base	SIGMA	T-1503-1KG
NaCl	SIGMA	S-7653
CaCl ₂	MERCK	2386.1000

3.1.5.9. *Buffer lisis RIPA*

Reactivo	[Final]	100 ml
TRIS HCl (Trizma base)	50 mM	0,6057 gr
NaCl	150 mM	0,8766 gr
EDTA	1 mM	0,0372 gr
Nonidet P-40	1%	1 ml
DOC (Sodium Desoxycholat)	0,5%	0.5 gr
SDS	0,1%	0,1 gr

Ajustar a pH=7,5

Reactivo	Empresa	Ref.
Trizma base	SIGMA	T-1503-1KG
NaCl	SIGMA	S-7653
EDTA	SIGMA	E-5134
NP-40	-	-
DOC	MERCK	-
SDS	Amersham Biosciences	17-1313-01

3.1.5.10. Buffer DIGNAM-D

Reactivo	[Final]	1 L
NaCl	0,5 M	29,22 gr
HEPES	20 mM	4,7662 gr
Glicerol	20 %	200 ml
EDTA	0,2mM	0,0744 gr
PMSF	0,1mM	(1)
DTT	0,5mM	0,0771 gr

Ajustar a pH=7,9

(1) Alicuotar al momento de utilizar el buffer a partir de solución PMSF 200 mM:

Reactivo	[Final]	5ml (en isopropanol)
PMSF	200 mM	0,1742

Reactivo	Empresa	Ref.
NaCl	SIGMA	S-7653
HEPES	SIGMA	H-4034-100G
Glicerol	SIGMA	G-7757
EDTA	SIGMA	E-5134
PMSF	Boheringer-Mann	837 091
DTT	SIGMA	D-0632
Isopropanol	MERCK	1.09634.1000

3.1.5.11. Buffers His-Trap FF

Buffer Binding HisTrap FF

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	5 ml (ml SM)	10 ml (ml SM)
Sodium Phosphate pH = 7,4	20 mM	200 mM (0,5 l → 6gr monobasic → 7,1gr dibasic)	0,5 ml	1 ml
NaCl	0,5 M	5 M (0,5 l → 146,1 gr)	0,5 ml	1 ml
Imidazol (*)	1-5 mM	5 M (10ml → 3,404 gr)	1-5 µl	2-10 µl

Ajustar a pH=7,4

(*) Alícuotas de 1 ml i a -20°C. Solubilizar con isopropanol (alternativamente metanol)

Reactivo	Empresa	Ref.
Sodium Phosphate Monobasic	SIGMA	S-0751
Sodium Phosphate Dibasic	SIGMA	S-0876
NaCl	Panreac	131.659.1214
Imidazol	SIGMA	I-2399

Buffer Elution HisTrap FF

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	5 ml (ml SM)	10 ml (ml SM)
Sodium Phosphate pH = 7,4	20 mM	200 mM (0,5 l → 6gr monobasic → 7,1gr dibasic)	0,5 ml	1 ml
NaCl	0,5 M	5 M (0,5 l → 146,1 gr)	0,5 ml	1 ml
Imidazol (*)	100-500 mM	5 M (10ml → 3,404 gr)	100-500 µl	200-1000 µl

Ajustar a pH=7,4

(*) Alícuotas de 1 ml i a -20°C. Solubilizar con isopropanol (alternativamente metanol)

Reactivo	Empresa	Ref.
Sodium Phosphate Monobasic	SIGMA	S-0751
Sodium Phosphate Dibasic	SIGMA	S-0876
NaCl	Panreac	131.659.1214
Imidazol	SIGMA	I-2399

Buffer Stripping HisTrap FF

Reactivo	[Final]	Solución Madre (SM)	5 ml (ml SM)	10 ml (ml SM)
Sodium Phosphate pH = 7,4	20 mM	200 mM (0,5 l → 6gr monobasic → 7,1gr dibasic)	0,5 ml	1 ml
NaCl	0,5 M	5 M (0,5 l → 146,1 gr)	0,5 ml	1 ml
EDTA	50 mM	100 mM (40 ml → 1,49 gr)	2,5 ml	5 ml

Ajustar a pH=7,4

Reactivo	Empresa	Ref.
Sodium Phosphate Monobasic	SIGMA	S-0751
Sodium Phosphate Dibasic	SIGMA	S-0876
NaCl	Panreac	131.659.1214
EDTA	SIGMA	E-5134

0,1 M de NiSO₄

Reactivo	[Final]	10 ml (gr)
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0,1 M	0,2629

Reactivo	Empresa	Ref.
NiSO ₄ ·6H ₂ O	AppliChem	A3516,0250

3.1.5.12. Buffer tinción geles con Coomassie Blue

Reactivo	[Final]	1L	200 ml
Blau brillant coomassie	0,25 %	2,5 gr	0,5 gr
Metanol	45 %	450 ml	90 ml
Ácido acético glacial	10 %	100 ml	20 ml
Agua BD	-	Hasta 1 L	Hasta 200 ml

Reactivo	Empresa	Ref.
Blau brillant coomassie	Pierce	20278
Metanol	Prolabo	20846.292
Ácido acético glacial	Merck	1.00063.1000

3.1.5.13. Buffer destinció gels con Coomassie Blue

Reactivo	[Final]	1L	200 ml
Metanol	50 %	500 ml	100 ml
Ácido acético glacial	10 %	100 ml	20 ml
Agua BD	-	Hasta 1 L	Hasta 200 ml

Reactivo	Empresa	Ref.
Metanol	Prolabo	20846.292
Ácido acético glacial	Merck	1.00063.1000

3.1.5.14. Buffers para gels de acrilamida

Separating gel

Stock solutions	Concentración final de acrilamida									
	5	6	7	7,5	8	9	10	12	13	15
30% acryl/0.8% bis	2,5	3,0	3,5	3,75	4,0	4,5	5,0	6,0	6,5	7,5
4x Tris/SDS pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
H2O	8,75	8,25	7,75	7,5	7,25	6,75	6,25	5,25	5,25	3,75
10% APS (1) (*)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED (*)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Cantidades en ml para hacer 2 gels

(1) Preparar justo antes de utilizar

(*) Añadir justo antes de utilizar

Stacking gel

Stock solutions	Geles de 0,75 i 1 mm	Geles de 1,5 mm
30% acryl/0.8% bis	0,65	1,3
4x Tris/SDS pH 8,8	1,25	2,5
H2O	3,05	6,1
10% APS (1) (*)	0,025	0,05
TEMED (*)	0,01	0,02

Cantidades en ml para hacer 2 gels

(1) Preparar justo antes de utilizar

(*) Añadir justo antes de utilizar

Reactivo	Empresa	Ref.
30% acrylamide	BioRad	161-0158
TEMED	SIGMA	T9281-25ML

3.1.5.15. Buffers para geles 2D

Solución de lisis	Solución de rehidratación	Solución de equilibrado
8,5 M Urea 4% Chaps 40 mM TRIS ○ 2% Anfólitos	8,5 M Urea 2% Chaps IPG buffer* 0,002% Azul de Bromofenol	50 mM TRIS pH 8,8 6 M Urea 30% Glicerol 2% SDS 0,002% Azul de Bromofenol

*De igual rango de pH que la tira

Solución de sellado de agarosa*	Gel segunda dimensión tiras 24 cm (6 geles)			
0,5% Agarosa 0,002% Azul de Bromofenol	Concentración final de acrilamida (%)			
	Reactivo	10	TRICIN 12,5	12,5
*En tampón de electroforesis elegido	30% acryl/2,7% bis (ml)	150	187,5	187,5
	4X 1,5 M Tris pH 8,8 (ml)	112,5	TRICIN 150	112,5
	H ₂ O MQ (ml)	180,9	108	145,4
	10% SDS (ml)	4,5	4,5	4,5
	10 % APS (ml)* ⁽¹⁾	2,25	2,25	2,25
	TEMED (μl)*	225	225	225

(1) Preparar justo antes de utilizar

*Añadir justo antes de utilizar

3.1.5.16. Cloranfenicol 25mg/ml

Reactivo	[Final]	10 ml (EtOH)
CAM	25 mg/ml	0,25 gr

Dilución con EtOH absoluto

Reactivo	Empresa	Ref.
CAM	-	-
Etanol absoluto	MERCK	1.00983.1000

3.1.5.17. Imidazol 5M

Reactivo	[Final]	10ml
Imidazol	5 M	3,404 gr

Solución en isopropanol, alternativamente con metanol.

Reactivo	Empresa	Ref.
Imidazol	SIGMA	I-2399

3.1.5.18. PMSF 100mM

Reactivo	[Final]	10ml (en isopropanol)
PMSF	100 mM	0,1742 gr

Reactivo	Empresa	Ref.
PMSF	Boheringer-Mann	837 091

3.1.6. Anticuerpos

Anticuerpos primarios			
Antígeno	Especie	Marca	Referencia
Ciclofilina B	Rabbit	Thermo Scientific	PA1-027A
E-cadherina	Mouse	BD Transduction Labs	610181
α -SMA	Mouse	Sigma-Aldrich	A2547
Vimentina	Mouse	Sigma-Aldrich	V6630
Actina	Rabbit	Sigma-Aldrich	A5060
HA	Rat	Roche	1867423
PARP	Rabbit	Cell Signaling	9542
PARP Cleavage	Rabbit	Cell Signaling	9544
STAT3	Rabbit	Cell Signaling	9132
pSTAT3-Tyr705	Mouse	Cell Signaling	9138
p21	Rabbit	Santa Cruz	Sc-397
CDK2	Mouse	Santa Cruz	sc-6248
CDK4	Mouse	Santa Cruz	sc-56277
CDK6	Mouse	Santa Cruz	sc-53638
Ciclina-D	Mouse	Santa Cruz	sc-450
Ciclina-E	Mouse	Santa Cruz	sc-247
KAP	Rabbit	Cebrian, 2001	
Anticuerpos secundarios			
Antígeno	Especie	Marca	Referencia
Anti-rabbit	Goat	Dako	P 0448
Anti-mouse	Rabbit	Dako	P 0260
Anti-rat	Rabbit	Dako	E 0468

3.2. Métodos

3.2.1. Producción y purificación de la proteína KAP recombinante en bacteria

3.2.1.1. Extracción de RNA total de tejido

Se ha realizado la extracción del RNA total de riñón murino con el kit *RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN, Cat. No. 74104) y, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el siguiente protocolo:

1. Sacar el tejido del congelador de -80°C y ponerlo en hielo seco.
2. Pesarse no más de 30 mg de tejido y ponerlo en un tubo eppendorf pre-enfriado en hielo seco (realizar esta operación evitando lo máximo posible la descongelación del tejido).
3. Añadir al tubo buffer RLT aditivado con β -Mercaptoetanol:

Tejido (mg)	Buffer RLT (μ l)	β -Me (μ l)
<20	350-600	3,5-6
20-30	600	6

4. Homogeneizar muy bien con un bastoncito homogeneizador previamente limpiado (RNase free): Over Night (O/N) en 5M NaOH i lavado con H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato \rightarrow elimina ribonucleasas).
5. Centrifugar 3 min. a 16000g \rightarrow recoger el sobrenadante en un nuevo tubo (si se observa turbulencia volver a centrifugar).
6. Añadir 1 volumen de etanol 70% y mezclar por pipeteo (puede observarse precipitación).
7. Transferir 700 μ l (incluido el precipitado) en una columnita RNeasy Spin.
8. Centrifugar 15 seg. a 8000g \rightarrow Descartar flow trough (FT).
9. Repetir paso 7 y 8 en el caso de que aún quede muestra.

3.2.1.2. Digestión de DNA con kit *RNase-Free DNase Set* (QIAGEN Cat. No. 79254)

Se ha realizado la digestión de DNA del extracto de RNA del paso anterior con el kit *RNase-Free DNase Set* (QIAGEN Cat. No. 79254) y, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el siguiente protocolo:

1. Añadir a la columnita 350 µl de Buffer RW1 → Centrifugar 15 seg. a 8000g → Descartar FT
2. Preparar DNase Incubation Mix: Añadir 10 µl de DNase I a 70 µl de buffer RDD → mezclar por inversión y hacer un spin.
3. Añadir a la columnita los 80 µl de DNase Incubation Mix i dejar incubar 15 min. a temperatura ambiente (TA).
4. Añadir a la columnita 350 µl de buffer RW1 → centrifugar 15 seg. a 8000g → descartar FT.
5. Añadir a la columnita 700 µl de buffer RW1 → centrifugar 15 seg. a 8000g → descartar FT.
6. Añadir a la columnita 500 µl de buffer RPE (con etanol) → centrifugar 15 seg. a 8000g → Descartar FT.
7. Añadir a la columnita 500 µl de buffer RPE (con etanol) → centrifugar 2 min. a 8000g → Descartar FT.
8. **Opcional:** Secar columnita → ponerla en un nuevo tubo colector i centrifugar 1 min. a 16000g.
9. Poner la columnita en un nuevo tubo eppendorf.
10. Añadir a la columnita 30-50 µl de RNase-free water (según la cantidad de tejido pesado) → incubar 2 min. a TA.
11. Centrifugar 1 min. a 8000g → Elución de RNA total.
12. Coger el eluido y volverlo a poner a la columnita.
13. Centrifugar 1 min. a 8000g → Elución de RNA total (mayor rendimiento).
14. Cuantificar con el Nanodrop (Blanco: RNase-free water) y congelar la solución de RNA total a -80°C.

3.2.1.3. RT-PCR del gen KAP

Para clonar el gen KAP (secuencia nucleotídica y peptídica en “Materiales: Material Genético”) sin péptido señal (KAP-SPS) se ha hecho una RT-PCR (Figura 3.1) sobre el extracto de RNA total de riñón murino realizado anteriormente. Para ello se ha utilizado el kit *SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum®Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Cat. No. 10928-042).

La RT-PCR se ha realizado siguiendo las instrucciones del fabricante, con el siguiente protocolo:

Mezcla de reacción

2x Reaction Mix	25 µl
10 µM primer UP	1 µl
10 µM primer LO	1 µl
RT/Platinum Taq	1 µl
1 µg RNA (+H ₂ O fins 22)	22 µl
VOLUMEM TOTAL	50 µl

Programa RT-PCR

48° C	30'
94° C	2'
94° C	15"
55° C	30"
72° C	1' x kb
72° C	7'
4° C	∞

X40 ciclos

Se ha diseñado los primers con ayuda del programa en línea Primer3. Se han añadido en los extremos oligonucleótidos para los enzimas de restricción NdeI en 5' y BamHI en 3'. A continuación, la secuencia de los primers:



UPPER:

5' CATATGCCCCTGTCAGAATTAGTTTC 3'

STOP

LOWER:

5' GGATCCTCAGGAAGTAGGGGAGACTGG 3'

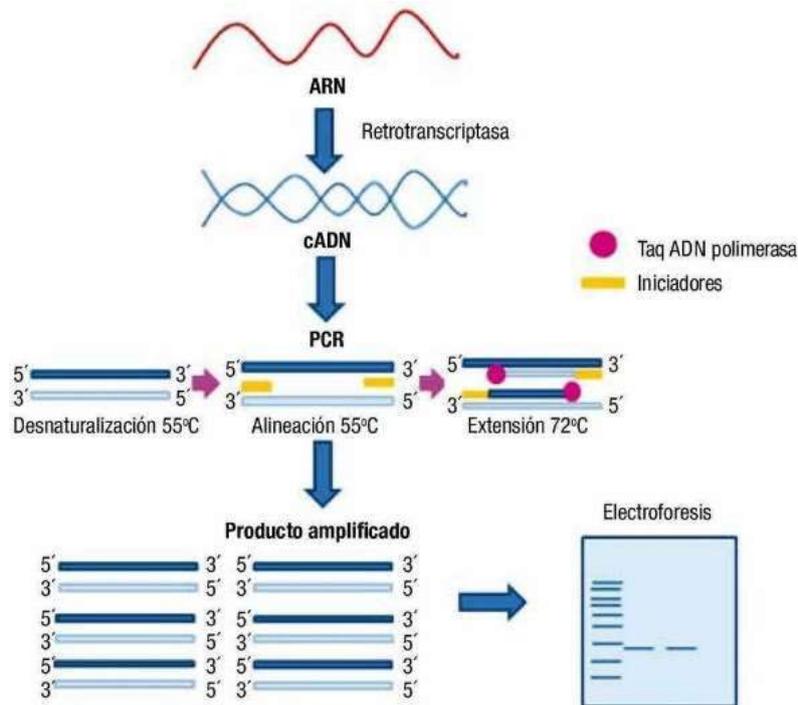


Figura 3.1: Etapas de una RT-PCR: El RNA total purificado de un extracto de tejido pasa por una primera etapa, donde una retrotranscriptasa (RT) convierte todo este RNA en cDNA. Luego hay una segunda etapa, donde se amplifica el gen diana gracias a unos primers de clonación específicos del gen y una PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la Polimerasa)

3.2.1.4. *Clonación del cDNA KAP-SPS en el vector pCR[®]II-TOPO[®] y transformación en células TOP10*

Se ha realizado la clonación del producto de la RT-PCR (KAP-SPS) en este vector para facilitar la digestión de las dianas de restricción de los enzimas de restricción NdeI y BamHI, ya que de esta forma se dota a los extremos del gen clonado un soporte físico para que estos enzimas puedan actuar correctamente. Para ello se ha utilizado el kit *TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for subcloning* (Invitrogen, Cat. No. K4500-40) y, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el siguiente protocolo:

1. Se añade en un eppendorf (Mezcla de ligación):
 - a. 4 µl del producto de la RT-PCR.
 - b. 1 µl Salt Solution.
 - c. 1 µl TOPO[®] Vector.
2. Agitar por pipeteo e incubar 5 min. a TA.
3. Descongelar una alícuota de células competentes One Shot[®] TOP10 en hielo.
4. Añadir 4 µl de la mezcla de ligación al tubo de células competentes.
5. Incubar 30 min. en hielo.
6. Realizar un choque térmico: 30 seg. a 42°C (Baño de agua) → No agitar.
7. Llevarlo a hielo nuevamente y añadir 250 µl de S.O.C. Medium a las células a TA y en condiciones de esterilidad (CE).
8. Incubar 45 min. -1 h. a 37°C en agitador shaker.
9. Sembrar en placa LB-agar-ampicilina (50 µg/ml) 80 µl del mix de transformación en CE.
10. Incubar O/N a 37°C (Estufa).
11. Poner parafilm a la placa y guardar a 4°C.

3.2.1.5. *Minipreps de bacterias transformadas*

Se hicieron minipreps de las colonias de las placas. Para eso se utilizó el kit *illustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE, Cat. No. 28-9042-70) con el siguiente protocolo (optimizado para condiciones de alta copia de plásmidos y 5 ml de cultivo):

1. Picar y sembrar una de las colonias que hayan crecido en la placa (o varias si se quiere) en 5 ml de medio LB aditivado con ampicilina (50 µg/ml).
2. Incubar O/N a 37°C en shaker. Idealmente, los 5 ml de cultivo ha de tener una A600 de aproximadamente 2,5 y una A260/A280 mayor de 1,8.
3. Transferir 1,5 ml en un eppendorf y centrifugar 30 seg. a 16000g → Descartar el sobrenadante. → Repetir hasta agotar los 5 ml de cultivo.
4. Resuspender el pellet con 175 µl de buffer lysis #7.
5. Añadir 175 µl de buffer lysis #8 (Lisis) → invertir el tubo con suavidad 5 veces. La solución ha de quedar clara y viscosa.

6. Añadir 350 µl de buffer lysis #9 (Neutralización) → invertir el tubo con suavidad hasta que el precipitado esté dispersado uniformemente → Centrifugar 5 min. a 16000g.
7. Transferir el sobrenadante a una columnita con el tubo colector → Centrifugar 1 min. a 16000g.
8. Para mejorar el rendimiento volver a pasar por la columnita el FT 2 o 3 veces.
9. Añadir a la columnita 350 µl de wash buffer → Centrifugar 1 min. a 16000g.
10. Descartar el FT y centrifugar de nuevo (secado).
11. Colocar la columnita en un tubo eppendorf nuevo y añadir 50-80 µl de H₂O MQ autoclavada (elución).
12. Dejar incubar 1 min. a TA.
13. Centrifugar 30 seg. a 16000g.
14. Para mejorar el rendimiento volver a pasar el eluido por la columnita 2 o 3 veces.

3.2.1.6. *Digestión con los enzimas de restricción NdeI y BamHI de pCR®II-TOPO®-KAP y pET14b*

Se realizó la digestión con NdeI y BamHI del vector pCR®II-TOPO®-KAP para obtener el gen KAP-SPS y del vector pET14b (Ver vectores en “Materiales: Los Plásmidos”), para poder ligar posteriormente el gen KAP-SPS en este vector. pET14b es un vector de expresión de proteínas recombinantes que además añade una cola de 6 histidinas como tag en el extremo N-terminal y una diana de restricción por trombina entre el tag y la proteína.

De esta forma se podrá posteriormente purificar la proteína recombinante His-KAP en una columna de resina Ni-NTA. Las dos enzimas de restricción utilizadas son de Roche, y la digestión se realizó simultáneamente con las dos enzimas a la vez en un buffer de reacción compatible para las dos. La mezcla de reacción es la siguiente:

Mezcla de reacción

Elución miniprep	40 µl
Buffer 10x	7,5 µl
BSA 100x	0,75 µl
1-2 U/µg DNA de <i>NdeI</i> (10.000 U/ml)	x µl
1-2 U/µg DNA de <i>BamHI</i> (10.000 U/ml)	x µl
H ₂ O hasta VOLUMEN TOTAL	75 µl

1. Incubar O/N a 37°C (Baño agua).
2. Realizar un gel de agarosa 1% 200 µg/ml bromuro de etidio con 2 µl de la mezcla de reacción y 2 µl de vector sin digerir para comprobar que se ha realizado la digestión correctamente. Si se ha digerido correctamente, la banda del vector digerido aparecerá con una longitud aparente más larga que sin digerir (banda digerido más alta en el gel que sin digerir).
3. Si la digestión ha sido la correcta, realizar otro gel de agarosa 1% 200 µg/ml bromuro de etidio con el resto de la mezcla de reacción a fin de purificar el vector digerido (pET14b) y el inserto (KAP-SPS).

3.2.1.7. Purificación de vector pET14b digerido e inserto (KAP-SPS)

Se hizo un gel de agarosa 1% 200 µg/ml bromuro de etidio y se cargó el total de los productos de las digestiones, junto con un patrón de tamaño de cadena nucleotídica. El objetivo es purificar las bandas que contengan el vector pET14b digerido (4.400 nucleótidos) y el inserto de KAP-SPS (320 nucleótidos). De esta forma se obtuvo purificados estos fragmentos de DNA sin los fragmentos residuales de la digestión, ya que si éstos últimos están presentes en el momento de la ligación del inserto KAP-SPS con pET14b, podrían interferir en esta ligación, porque competirían con la ligación deseada. Una vez hecha la electroforesis, colocar el gel en una fuente de UV (con la protección de pantalla facial correspondiente) y cortar el gel con las bandas de producto genético según su tamaño (con apoyo del marcador) (Figura 3.2). Para purificar estas bandas de gel de agarosa recortadas se utilizó el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE, Cat. No. 28-9034-71) con el siguiente protocolo:

1. Pesar un tubo eppendorf DNase-free.
2. Recortar la banda de interés del gel de agarosa e introducirlo en el tubo.
3. Pesar el tubo más el trozo de agarosa → calcular por resta el peso del trozo de agarosa.
4. Añadir al tubo 10 µl de Capture buffer type 2 por cada 10 mg de agarosa.
5. Mezclar por inversión.
6. Incubar el tubo a 60°C (Termobloc) y mezclar el tubo por inversión cada 3 min. hasta que toda la agarosa se haya desecho.
7. Pipetear 600 µl de la mezcla Capture buffer type 2-muestra y colocarlos dentro de una columnita GFX MicroSpin™ con su tubo colector.
8. Incubar 1 min. a TA → Centrifugar 30 seg. a 16000g → Descartar el FT.
9. Repetir los pasos 7 y 8 hasta agotar toda la mezcla.
10. Añadir a la columnita 500 µl de Wash buffer type 1 → Centrifugar 30 seg. a 16000g.
11. Colocar la columnita en un tubo eppendorf DNase-free nuevo.
12. Añadir 10-50 µl de H₂O MQ autoclavada a la columnita (elución).
13. Incubar 1 min. a TA → Centrifugar 1 min. a 16000g.
14. Guardar el eluido (DNA purificado) a -20°C.

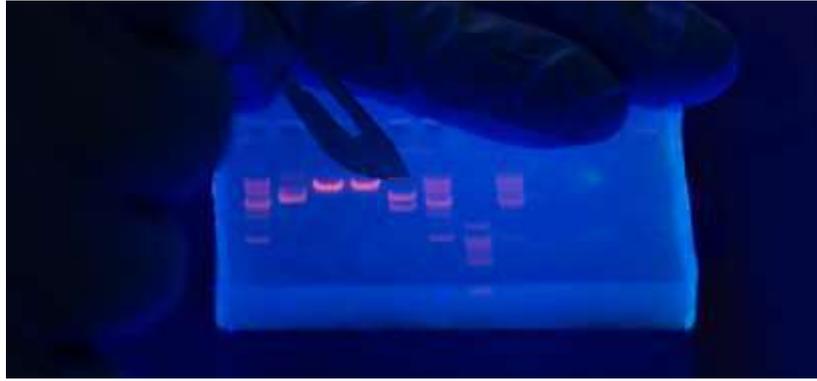


Figura 3.2: Ejemplo de recorte de un gel de agarosa, recogiendo la banda específica. Para visualizar las bandas se utiliza una fuente de UV, con el que el bromuro de etidio unido al DNA reacciona y se vuelve fluorescente.

Desfosforilación de pET14b digerido:

Con el fin de aumentar el rendimiento de la ligación pET14b + cDNA KAP-SPS se desfosforiló el vector pET14b digerido. En este paso se desfosforila el extremo 3' del vector linealizado y evita religaciones no deseadas de éste. Éste paso puede ser opcional, ya que de hecho el fenómeno de religación ocurriría mucho más probablemente en el caso de que los extremos de vector digerido tuvieran la misma diana de restricción y sus extremos fueran cohesivos. Éste no es nuestro caso, ya que los extremos del vector contienen dos dianas digeridas no cohesivas (2 dianas de restricción diferentes) y es difícil que se produzca la religación no deseada. Aun así, se hizo para asegurar el resultado. La desfosforilación se hizo con el kit *Phosphatase, Alkaline (AP)* (Roche, Cat. No. 1 097 075). La mezcla de reacción es la siguiente:

Mezcla de reacción

Vector digerido	25 µl
AP Buffer 10x	5 µl
AP (20.000 U/ml)	2 µl
H ₂ O MQ autoclavada	18 µl
VOLUMEN TOTAL	50 µl

1. Incubar 1 h. a 37°C (Baño de agua)
2. Incubar 15 min. a 65°C (Termobloc) → Desactivar la AP

3.2.1.8. *Ligación de pET14b + KAP-SPS*

Una vez que se tuvo el inserto KAP-SPS digerido y purificado y el vector pET14b digerido, purificado y desfosforilado se procedió a hacer la ligación con el kit *T4 DNA Ligase* (Roche, Cat. No. 10 799 009 001). Primero hay que preparar una mezcla de vector e inserto (DNA mix) donde la proporción molar entre vector:inserto ha de ser 1:2 con una cantidad total de DNA de 1 µg. La mezcla de reacción es la siguiente:

Mezcla de reacción

DNA mix (1 µg)	x µl
Ligation buffer 10x	3 µl
5 U T4 DNA Ligase (5 U/µl)	1 µl
H ₂ O MQ autoclavada hasta VOLUMEM TOTAL	30 µl

1. Incubar O/N 4°C.

3.2.1.9. *Obtención de células competentes BL21 (DE3) pLysS y su transformación con pET14b-KAP por choque térmico*

Para la obtención de células competentes de la línea BL21 (DE3) pLysS rCAM, se sigue el siguiente protocolo:

1. Se prepara un minicultivo (5 ml de medio LB, 50 µg/ml de CAM) inoculando una punta de pipeta del glicerolado de células y se deja incubar over-night en un Shaker a 37°C. Se pasa 1 ml del minicultivo a 200 ml de medio LB autoclavado, 50 µg/ml CAM en un erlenmeyer. Se deja crecer en agitación (Shaker) a 37°C hasta que la OD600 = 0.3 (Se utiliza agua como blanco).
2. Se pone el cultivo en hielo para que se enfríe.
3. Centrifugamos 10 'en 4000 r.p.m. 4°C.
4. Resuspender en 100 ml de CaCl₂ 50 mM (estéril) en CE.
5. Centrifugamos 10 'en 4000 r.p.m. 4°C.
6. Resuspender en 16 ml de CaCl₂ 50 mM/15% glicerol (estéril) en CE.
7. Hacer alícuotas de 200 µl en condiciones de esterilidad.
8. Precongelar en nieve carbónica y conservar a -80°C.

Una vez que ya tenemos las células competentes, hay que transformarlas con el plásmido pET14b-KAP obtenido anteriormente. En nuestro caso hemos utilizado el método de choque térmico:

1. Descongelar una alícuota de células competentes BL21 (DE3) pLysS en hielo

2. Añadir 400 ng de la mezcla de ligación pET14b + KAP SPS (12 µl de ligation mix) al tubo de células competentes.
3. Incubar 30 min. en hielo.
4. Realizar un choque térmico: 30 seg. a 42°C (Baño de agua) → No agitar.
5. Llevarlo a hielo nuevamente y añadir 250 µl de S.O.C. Medium a las células a TA y en condiciones de esterilidad (CE).
6. Incubar 45 min. -1 h. a 37°C en agitador shaker.
7. Sembrar en placa LB-agar-ampicilina 100 µl del mix de transformación en CE.
8. Incubar O/N a 37°C (Estufa).
9. Poner parafilm a la placa y guardar a 4°C.

3.2.1.10. Secuenciación del plásmido pET14b transformado

Nuestro grupo externaliza el servicio de secuenciación, que se hace por el método Sanger (o fragmentos de Sanger); y siempre secuenciamos en los dos sentidos, tanto la cadena sense como antisense, por lo tanto, para cada muestra hacemos dos tubos de reacción (un primer por cada tubo de reacción, por cada muestra, un tubo con el primer upper y otro con el primer lower). En el caso de secuenciar en inserto dentro del *Multi Cloning Site* (MCS) de pET14b, se utilizan los primers indicados en el MCS de este plásmido (Ver "Materiales: Los Plásmidos"), que coincide con el promotor y terminador T7 utilizados.

<u>Mezcla de reacción</u>		<u>Programa PCR</u>		
Primer 10 µM	1 µl	96° C	1'	} X25 ciclos
BigDye® enzyme	2 µl	96° C	10"	
Muestra (900 ng DNA) + H ₂ O	17µl	50° C	5"	
VOLUMEM TOTAL	20 µl	60° C	4'	
		4° C	∞	

UPPER:

5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

LOWER:

5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

Una vez realizada la reacción de PCR hay que precipitar el producto de la reacción, ya que la plataforma de genómica requiere que se le entreguen las muestras a secuenciar en precipitado en seco. Para ello, seguimos el siguiente protocolo:

1. Añadir en un eppendorf:
 - a. 16 μ l H₂O MQ auto.
 - b. 64 μ l EtOH 95%.
 - c. Volumen total de la PCR.
2. Vortexar.
3. Dejar precipitar 15' a TA.
4. Centrifugar 20' a 16000g (proseguir inmediatamente al paso siguiente, sino centrifugar previamente 2').
5. Descartar sobrenadante.
6. Añadir 250 μ l de EtOH 70%.
7. Centrifugar 10' a 16000g.
8. Descartar sobrenadante.
9. Secar muestras (TA o en estufa de 37 ° C).
10. Llevar a secuenciar.

3.2.1.11. Producción de la proteína His-KAP-SPS

1. Hacer un minicultivo de las células transformadas picando con una punta de pipeta el glicerolado en 5 ml de LB, 50 μ g/ml CAM, 50 μ g/ml Amp (doble selección por antibiótico, ya que deben contener tanto el plásmido pET14b rAmp como el pLysS rCAM).
2. Incubar over-night a 37°C (Shaker).
3. Inocular los 5 ml del minicultivo en un erlenmeyer con 500 ml de medio LB previamente autoclavado, 50 μ g/ml CAM, 50 μ g/ml Amp. Dejar crecer hasta que la OD600 sea 0,6-0,7 (blanco con agua) (Fase exponencial).
4. Añadir 500 μ l IPTG 1 M para tener una concentración final de 1 mM (Inducción expresión).
5. Incubar 2 h a 37°C (Shaker).
6. Poner el cultivo en hielo.
7. Repartir el cultivo en dos tubos de centrifuga de 250 ml.
8. Centrifugar 10' 5000 rpm 4°C.
9. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 100 ml de buffer STE.
10. Centrifugar 10 ' 5000 rpm 4°C.
11. Descartar el sobrenadante (Las células se pueden congelar a -80 ° C o se puede continuar con el proceso) y resuspender con 10 ml de buffer lisis células BI21 (ED3) (Ver "Materiales: Los Buffers") (por cada tubo de 250 ml).
12. Pasar el lisado a un tubo falcon de 15 ml (x2) en hielo y sonicar (100 W potencia) 5-10 ciclos de 30" + 30" reposo hasta que no sea viscosa.
13. Ultracentrifugar 1h 30 min. a 38.000 rpm (rotor basculante Sorvall TH-641) 4°C al vacío.
14. Transferir sobrenadante a un solo tubo falcon de 50 ml (se puede congelar el extracto a -80°C o continuar el protocolo).

3.2.1.12. Purificación de la proteína His-KAP-SPS en columna de níquel

Para purificar la proteína KAP-SPS se utilizó una técnica cromatográfica: Una columna con resina afín al tag de purificación, en este caso, una columna HisTrap™ FF Columns (GE Healthcare Cat. No. 17-5319-01) (Figura 3.3). Este tipo de columna tiene una resina que inmoviliza átomos de níquel (de resina Ni-NTA ya empaquetada), que son afines a los tags de 6 histidinas (Figura 3.4). Para utilizar estas columnas tenemos que tener en cuenta que su velocidad de flujo recomendada es de 1 ml/min, por ello se utilizó una bomba peristáltica (velocidad 8,50 → 1 ml/min) y que todo lo que pase por la columna (muestra, buffers, etc.) debe ser filtrado previamente con un filtro de poro de 0,22 o 0,45 µm.



Figura 3.3: Columnas HisTrap™ de 1 y 5 ml empaquetadas

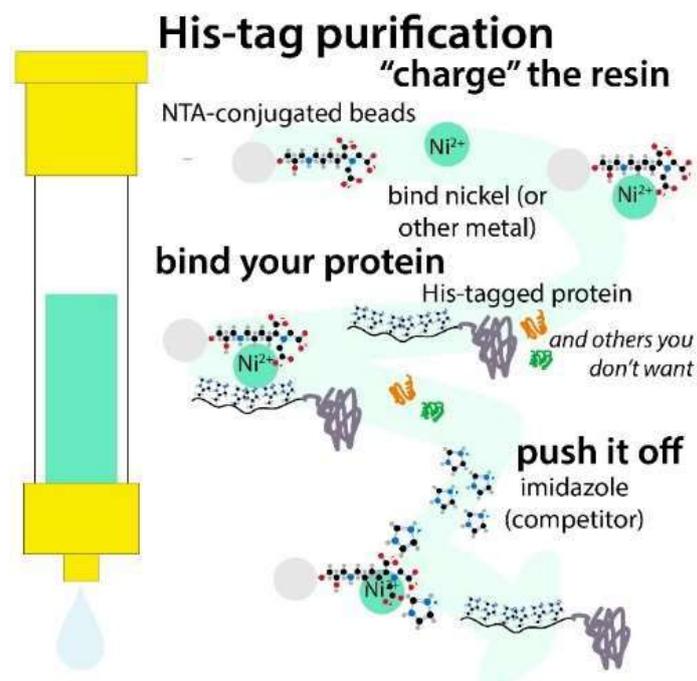


Figura 3.4: Principio de funcionamiento de una purificación His-tag. Las columnas contienen bolas de resina NTA conjugado con níquel. Este níquel es afín a péptidos de 6 histidinas (His tag). Las proteínas que contengan este tag de purificación quedan unidas a la resina. El resto de proteínas no se fijan y son eluidas con un buffer de lavado. Para poder eluir la proteína unida a la resina, se utiliza un buffer con imidazol, el cual compite con las histidinas en su unión al níquel y las libera.

1. Hacer montaje sin dejar aire tanto en el circuito como la entrada de la columna.
2. Lavar con 5 ml H₂O MQ.
3. Lavar con 5 ml Elution Buffer 500 mM imidazol (sólo si la columna no es nueva).
4. Equilibrar con 10 ml Binding Buffer.
5. Aplicar muestra (Bajar bomba a la mitad) aditiva con 1 mM imidazol (se recomienda que la concentración de la His-ORF no sea superior a 1mg/ml) [FT](*).
6. Lavar con 100 ml Binding Buffer [L](*) (1).
7. (Opcional): Praeluir con 5ml de Elution Buffer 5-40 mM imidazol (En His-KAP no) [P](*) (1).
8. Eluir con 10 ml Elution Buffer 100-500 mM imidazol (en el caso de His-KAP 200 mM) [E](*) (1).
9. (Opcional): Si se ha eluido con [imidazol] bajo, posteluir con 5 ml de Elution Buffer 500 mM [Post](*) (1).

(*) Tomar alícuotas de 1 en 1 ml para posterior análisis en gel de acrilamida + tinción coomassie

(1) Puede utilizarse como buffer alguno que vaya bien para siguientes manipulaciones, como por ejemplo un buffer adecuado para una posterior digestión con trombina. Éste es nuestro caso, ya que entre la cola de Histidina y la KAP-SPS hay una diana de digestión de trombina que utilizaremos para deshacernos de este tag. Así, en este caso, tanto el Elution Buffer como el Binding Buffer son los siguientes:

Elution Buffer
50 mM TRIS·HCl
10 mM CaCl ₂
100-500 mM Imidazol

Binding Buffer
50 mM TRIS·HCl
10 mM CaCl ₂
1-5 mM Imidazol

Regeneración de la columna:

10. Lavar con 10 ml de Stripping Buffer.
11. Lavar con 10 ml Binding Buffer.
12. Lavar con 10 ml H₂O MQ.
13. Añadir 0,5 ml de 0,1 M NiSO₄. (RECARGAR).
14. Lavar con 10 ml H₂O MQ.
15. Lavar con 5 ml H₂O MQ 20% EtOH.
16. Poner parafilm en la entrada y salida de la columna y guardar en nevera.

3.2.1.13. Digestión de la proteína His-KAP-SPS con trombina

El kit *Thrombin CleanCleave™ Kit* (SIGMA, Cat. No. RECOMT-1KT) consta de una resina de agarosa con trombina recombinante unida covalentemente. Esto es una ventaja, ya que usaremos esta resina en batch para digerir la cola de Histidinas y a la vez no “contaminaremos” el sobrenadante, que contiene la proteína KAP SPS, con trombina, ya que esta permanecerá unida a la resina. Para ello se realizó el siguiente protocolo:

1. Descongelar una alícuota de 200 µl de la resina y centrifugarla 5' a 500 g → Descartar sobrenadante.
2. (2X) Lavar la resina con 1 ml de Cleavage Buffer (CB) → Centrifugar 5 'a 500 g → Descartar sobrenadante.

Cleavage Buffer
50 mM TRIS·HCl
10 mM CaCl ₂

3. Añadir muestra (debe estar ya en CB).
4. Incubar en agitador orbital O/N 4°C (Tomar antes 5 µl de muestra).
5. Centrifugar 5' a 500 g → Recuperar sobrenadante.
6. Añadir 1 ml de CB → Centrifugar 5' a 500 g → Recuperar sobrenadante y añadir al anterior. (Tomar 5 µl → hacer gel acrilamida Antes Vs Después digestión).
7. Lavar resina con 1 ml de 50 mM TRIS-HCl pH = 8.0, 500 mM NaCl → Centrifugar 5 'a 500 g → Descartar sobrenadante.
8. (3X) Lavar resina con 1 ml de 50 mM TRIS-HCl pH = 8.0 → Centrifugar 5' a 500 g → Descartar sobrenadante.
9. Guardar resina a -20 ° C con 50% suspensión (200 µl aprox) de:
 - a. 50% glicerol.
 - b. 20 mM TRIS-HCl pH = 8.0

3.2.1.14. Purificación de la proteína KAP digerida en columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF

Se trata de una cromatografía en la cual en la columna hay una resina cargada positivamente en donde se enganchan por interacción electroestática proteínas cargadas negativamente (de ahí el nombre de aniónico). Recordemos que la carga total de una proteína depende de su punto isoeléctrico (PI) y del pH del medio. Si en el medio hay un pH superior al PI de nuestra proteína, ésta estará cargada negativamente e interaccionará con la resina (junto con otras proteínas contaminantes que también tengan carga negativa en ese pH). Por lo general se recomienda usar un buffer de trabajo con un pH una unidad por encima del PI de la proteína a purificar (En nuestro caso se desconoce el PI de la KAP, sólo su PI predicho por programas, que lo sitúan aprox. en 2,9

(tiene muchos aminoácidos ácidos), aunque en algunos casos experimentales no concluyentes lo sitúa alrededor de 7. Por tanto, y para asegurar, hice la cromatografía con 50 mM de TRIS·HCl pH= 8,0). Para eluir se utiliza un gradiente de fuerza iónica (Por ejemplo 0-1000 mM de NaCl). Esta fuerza iónica apantalla las cargas responsables de la interacción electrostática entre la resina y las proteínas. Cuanto mayor sea la diferencia entre el pH del medio i el PI de la proteína, más fuerza iónica hará falta para eluir la proteína. Por tanto, el orden de elución de las proteínas en la columna será directamente proporcional a cuanto mayor sea la diferencia de su PI con el pH del medio (Figura 3.5).

Para hacer esta cromatografía de intercambio aniónico he utilizado también columnas con 1 ml de resina preempaquetada, esta vez resina aniónica: *HiTrap™ Q FF columns* (GE Healthcare, Cat. No. 17-5053-01). El gradiente salino de elución lo he hecho por etapas de incrementos de 100 mM. Igual que en la HisTrap, la velocidad del flujo recomendado es de 1 ml/min y hay que filtrar todos los componentes (buffers y muestra) a 0,22-0,45 μ m. El protocolo es el siguiente:

1. Hacer montaje sin dejar aire tanto en el circuito como la entrada de la columna.
2. Lavar con 5 ml buffer.
3. Lavar con 5 ml buffer 1M NaCl ☐ lavado de proteínas contaminantes enganchadas.
4. Equilibrar con 10 ml buffer.
5. Aplicar muestra (Bajar bomba a la mitad).
6. Lavar con 10 ml buffer.
7. Eluir secuencialmente con alícuotas de 5 ml de buffer con NaCl de 100 a 1000 mM (con incrementos de 50 o 100 mM).
8. Lavar con 5 ml buffer 1M NaCl (En caso de no llegar a eluir con 1 M NaCl).
9. Lavar con 10 ml buffer.
10. Lavar con 10 ml H₂O MQ.
11. Lavar con 5 ml H₂O MQ 20% EtOH.
12. Poner parafilm en la entrada y salida de la columna y guardar en nevera.
13. Hacer un gel de acrilamida 15% con alícuotas de FT, lavados y eluciones y teñir con coomassie blue.

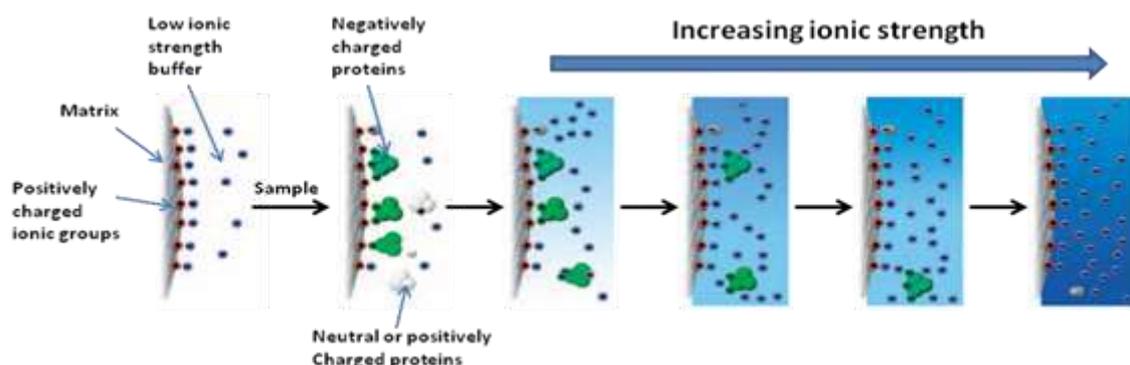


Figura 3.5: Esquema del funcionamiento de una cromatografía de intercambio aniónico.

3.2.1.15. Electroforesis monodimensional en gel de acrilamida SDS-PAGE de 7cm

Para analizar las alícuotas FT, lavados y eluciones de las diferentes cromatografías realizadas se hicieron electroforesis en geles de acrilamida SDS-PAGE monodimensionales de 7 cm.

Preparar gel/sistema electroforesis:

1. Lavarlos los cristales (Principal con espaciadores y cubre) con agua destilada y luego con etanol. Utilizar siempre guantes sin talco. Usar NaOH para lavado profundo.
2. Montar los cristales sobre una superficie plana en el marco alineador y apretar las pinzas laterales.
3. Montar los marcos con los cristales en el soporte de montaje.
4. Echar agua entre los dos cristales y mirar que no pierda.
5. Eliminar el agua y secar con papel de filtro.
6. Poner en 2 falcons de 30 ml (uno para el stacking gel y otro para el separating gel) los diferentes componentes y por orden (Ver "Materiales: Los Buffers: Buffers gel acrilamida).
7. Mezclar suavemente para no airear la mezcla
8. Llenar los cristales con el separating gel hasta 1 cm antes del límite superior del cristal cubre.
9. Aplicar por encima del separating gel isopropanol (3 o 4 mm).
10. Cuando el separating gel haya polimerizado, vaciar y secar el isopropanol y llenar hasta el límite del cristal cubre con stacking gel.
11. Inmediatamente poner el peine espaciador, que creará los pocillos de aplicación de la muestra. El peine tiene que ser del mismo ancho que el gel y puede ser de 10 o 15 pocillos.

Preparar muestras

12. Poner en un eppendorf el volumen de muestra necesario. La cantidad de muestra varía según el tipo de muestra y el tratamiento posterior del gel: Tinción (coomassie blue, plata), western blot, etc. En este caso he aplicado 10 µl de cada alícuota de las purificaciones (FT, lavados, eluciones, etc.).
13. Añadir al eppendorf el volumen necesario de 3X Sample Buffer.

3X Sample Buffer
188 mM TRIS·HCl pH= 6,8
200 mM SDS
30% Glicerol
2 M β-Mercaptoetanol
0,000006% blue bromophenol

14. Hervir durante 5 min a 96°C (termobloc) → Hacer un spin.
15. Insertar los geles en el cassette de la cuba de electroforesis.
16. Llenar con tampón de electroforesis el depósito del electrodo superior (entre los dos geles) hasta el límite del cristal superior. Rellenar la cubeta con el tampón, pero sin que llegue a la altura del depósito del electrodo superior.

Tampón de electroforesis
25 mM TRIS base
192 mM Glicina
0,1% SDS

17. Quitar el peine de los geles y aplicar la muestra con una jeringa Hamilton del volumen apropiado → Cargar siempre en el primer pocillo un marcador de pesos moleculares teñidos (para poder seguir la evolución de la electroforesis). En mi caso cargo 7,5 µl de *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (BIO-RAD, Cat No, 161-0374).
18. Cerrar la tapa y conectar a la fuente. La condición eléctrica es 20-30 mA constantes por gel.
19. Cuando se considere que la electroforesis ha concluido (seguimiento marcador peso molecular) desconectar la fuente, sacar tapa y procesar los geles según el tratamiento posterior (en este caso tinción con coomassie blue).

3.2.1.16. Tinción de geles de acrilamida con Coomassie Blue

El azul de Coomassie (en inglés, *Coomassie blue* o *Coomassie Brilliant blue*) es un colorante derivado del trifenilmetano. Originalmente se utilizó en la industria textil, pero actualmente se emplea principalmente en bioquímica para teñir proteínas en geles de electroforesis (Figura 3.6), y en la estimación de concentraciones de proteína empleando el método de Bradford. Ambas aplicaciones se basan en la capacidad de este colorante para unirse a todo tipo de proteínas.



Figura 3.6: ejemplo de un gel de acrilamida teñido con Coomassie Blue

Fijador Coomassie coloidal
50 % Etanol
2,55% Ácido Ortofosfórico

1. Fijar 30 min. con fijador para coomassie coloidal (cubrir los geles) en agitación (dancer shaker).
2. Lavar tres veces 20 min. con H₂O (Opcional).
3. Teñir con Buffer tinción geles con Coomassie Blue (Ver "Materiales: Los Buffers") durante 30 min. (cubrir geles) en agitación (dancer shaker).
4. Desteñir con Buffer destinción geles con Coomassie Blue (Ver "Materiales: Los Buffers") tres veces 20 min. o hasta desaparición del background.

3.2.2. Estructura 3D de la proteína KAP

Para poder obtener la estructura tridimensional de la proteína KAP recombinante se ha elegido la técnica de cristalización más difracción de rayos X (Figura 3.7), en colaboración con el servicio de Cristalografía Macromolecular del Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (cic bioGUNE) de Vizcaya (País Vasco).

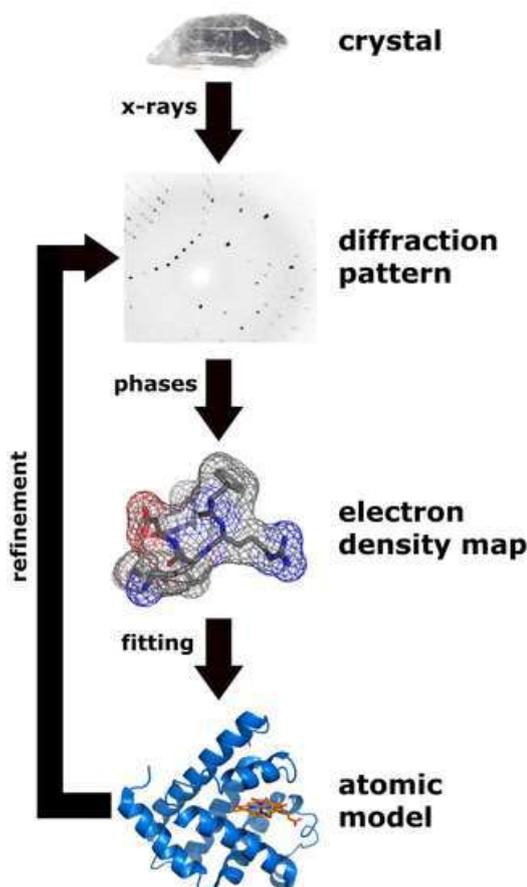


Figura 3.7: Esquema resumen de la cristalografía de rayos X. Se debe obtener un cristal puro de la proteína diana. Cuando se obtiene, se realiza un ensayo de difracción de rayos X (normalmente en un sincrotrón). Con el patrón de difracción se realiza un trabajo *in silico*, que primero nos permite obtener un mapa de densidades electrónicas, y posteriormente un modelo atómico tridimensional de la proteína. Es normal realizar varios bucles de refinamiento de la estructura.

Para poder cristalizar la proteína, ésta debe ser purificada lo más posible (paso clave), ya que cualquier contaminante puede hacer que no se forme el cristal. Por tanto, los métodos de purificación tienen que ser de una gran resolución. Se han realizado, después de la digestión con trombina, una cromatografía de intercambio aniónico con una columna Mono Q seguida de otra cromatografía de gel filtración con una columna Superdex G-200. Ambas cromatografías, realizadas en alta presión (HPLC) y con una gran resolución, han sido realizadas en cic bioGUNE siguiendo protocolos estándar.

Las proteínas, al igual que muchas moléculas, pueden formar cristales cuando están en las condiciones adecuadas. Con el fin de cristalizarla, la proteína purificada se somete a la precipitación lenta de una solución acuosa. Como resultado, las moléculas de proteínas individuales, se suman en una serie repetitiva de “celdas unitarias” mediante la adopción de una orientación coherente. La red cristalina (Figura 3.8) que se forma se mantiene unida por interacciones no covalentes (Gale R, 1993).

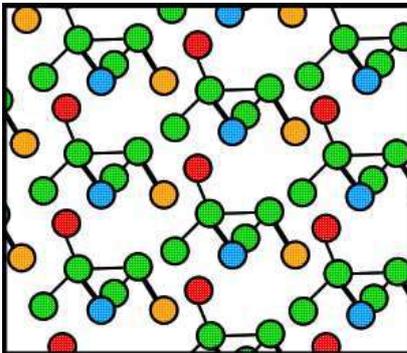


Figura 3.8: Esquema de una hipotética red cristalina. Los colores han sido añadidos como puntos de referencia.

Los cristales de macromoléculas pueden ser equiparables a geles ordenados que poseen cavidades que se convierten en extensos canales de solvente. El alto contenido de solvente de los cristales de proteínas no es, sin embargo, un rasgo completamente negativo. Las estructuras moleculares son muy similares a las existentes en condiciones fisiológicas debido a la hidratación del cristal. Dado que los cristales se comportan como una rejilla tridimensional de difracción para los rayos x, es posible determinar la densidad electrónica del cristal a partir de las intensidades de difracción. La cristalización de proteínas es difícil debido a las propiedades fisicoquímicas de las macromoléculas y su flexibilidad conformacional. La gran variación que hay entre las proteínas hace que se requiera para cada una condición única para la cristalización. Los parámetros más críticos que intervienen en la cristalización de una macromolécula son la pureza, la solubilidad y concentración de la misma, así como la concentración de sales y agentes precipitantes del solvente (polietilenglicol, sulfato de amonio, etc.), la temperatura y el pH. Encontrar las condiciones para que se forme un cristal implica hacer numerosos ensayos variando sistemáticamente estos parámetros (Figura 3.9).

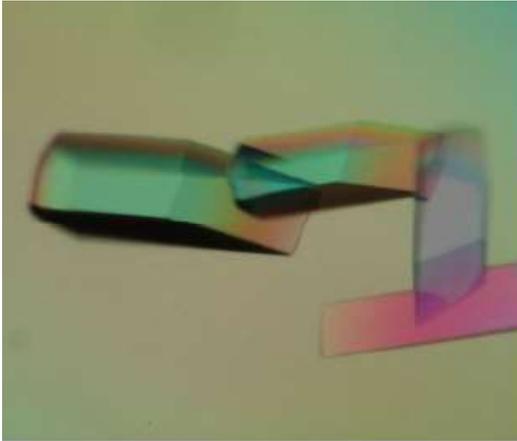


Figura 3.9: Ejemplo de cristales de proteína.

3.2.2.1. Ensayo de estabilidad de la proteína

Antes de empezar la cristalización se realizaron ensayos de estabilidad, consistentes en monitorizar la degradación de la proteína a lo largo del tiempo en diferentes condiciones: 4°C, temperatura ambiente y en fases de congelación/descongelación.

Estos ensayos de estabilidad son importantes, ya que el proceso de cristalización puede durar semanas (hasta un mes) y se debe realizar en condiciones donde la proteína sea estable. Para ello se preparó quince alícuotas de 20 µl de proteína KAP-SPS ultrapurificada a una concentración de 5,75 mg/ml y se separaron en tres grupos de cinco. Un grupo se colocó en la nevera a 4°C, otro encima de la poyata a TA y otro al congelador de -20°C. En los dos primeros, se cogieron secuencialmente una alícuota en los días 1, 2, 3, 4 y 7, se les puso 10 µl de 3x SDS-Sample Buffer y se guardaron en el congelador a -20°C. Con el tercer grupo, a cada alícuota le realizaron diferente número de ciclos de congelación/descongelación (con un día entre cada ciclo): 3, 4, 5, 6 y 7. Finalmente, se hicieron electroforesis de las alícuotas en geles de acrilamida SDS-PAGE 15% (un gel por condición) y se tiñeron en Coomassie Blue.

3.2.2.2. Cristalización en plataforma Crystalfarm (cic bioGUNE)

Se han desarrollado diferentes técnicas para cristalizar proteínas, dentro de las cuales las basadas en difusión de vapor, son las más utilizadas. Los métodos de la gota colgante y la gota sentada (Hanging-Drop/Sitting-Drop, figura 3.10) permiten hacer numerosas pruebas con poca cantidad de proteína. Estos son los métodos que se utilizan en la plataforma del CIC bioGUNE para los ensayos de cristalización de KAP.

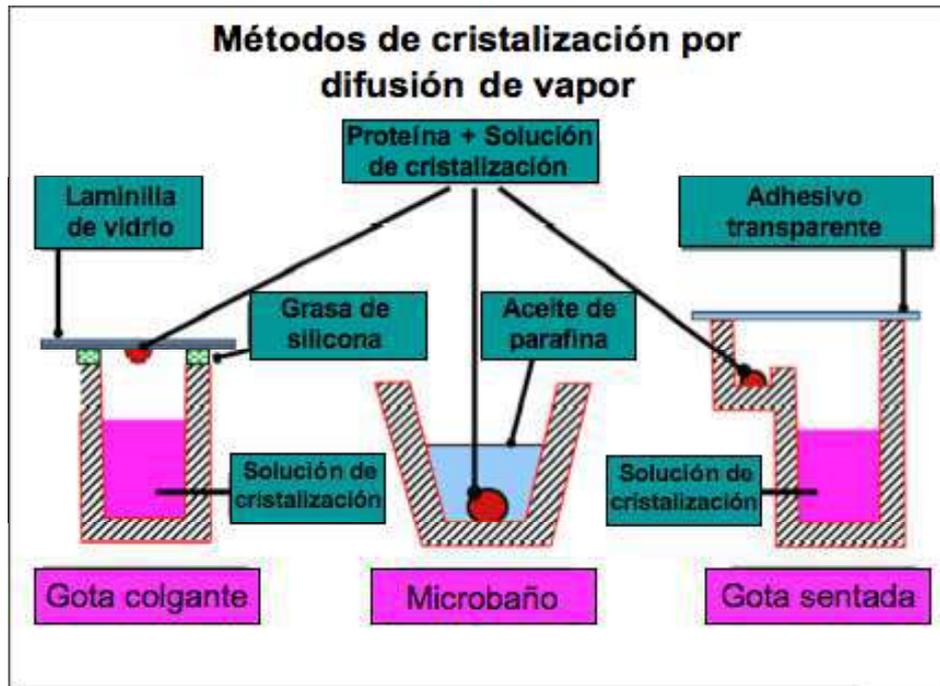


Figura 3.10: Esquema de los métodos de cristalización por difusión de vapor.

La gota colgante o sentada está compuesta por la proteína de interés más una solución compuesta principalmente por un tampón (pH constante) y un agente precipitante. Éste último debe exceder los otros solutos para determinar la presión de vapor de la solución. En el caso de la gota colgante ésta se suspende de una laminilla de vidrio que se usa para tapar un pozo que contiene la solución de cristalización. Inicialmente, la gota contiene una concentración menor de agente precipitante que el pozo. Ésta diferencia de concentraciones hace que el vapor de agua se difunda desde la gota hasta el pozo y luego se condense en él. El equilibrio se alcanza cuando la presión de vapor se iguala, esto es, cuando la concentración del agente precipitante en la gota y en el pozo es igual. El proceso de cristalización es lento y puede durar días, semanas o meses.

Un aspecto inevitable de la cristalización de una proteína a partir de cero (como es nuestro caso) es la necesidad de un gran número de experimentos para explorar las diversas condiciones, por lo que en la plataforma del CIC bioGUNE se utiliza un método de alto rendimiento de procesamiento; se utilizan diversos kits comerciales que consisten en soluciones que previamente han sido testadas con éxito con otras proteínas. Éstas son dispensadas con la ayuda de la robótica (Figura 3.11) en placas de 96 pocillos, cada pocillo contiene 70 μ l de solución, y el procedimiento de colocar gotas del mix muestra/solución precipitante en placas se hace con otro robot (Figura 3.11) en volúmenes de 100 nl.



Figura 3.11: *Izquierda:* Robot dispensador de soluciones precipitantes. *Derecha:* Robot dispensador de gotas.

Las placas son almacenadas en un Crystalfarm donde cada experimento es monitorizado por una cámara que realiza fotos periódicamente de cada gota, pudiéndose consultar las fotos vía Internet.

3.2.2.3. Difracción de rayos X de los cristales de proteínas

Una vez conseguido el cristal de KAP-SPS se procede a la difracción de rayos X. Para ello, se hará un primer screening en la misma CIC bioGUNE con un generador de rayos X: X8-PROTEUM, de BRUKER, con dos detectores (un CCD y un Mar345) (Figura 3.12). Los cristales serán testados inicialmente en la plataforma del CIC bioGUNE y luego en el sincrotrón de Grenoble (Francia, figura 3.12), donde se obtienen el conjunto de datos para determinar las fases del factor de estructura y así calcular el mapa de densidad electrónica.



Figura 3.12: *Izquierda:* Generador de rayos X X8-PROTEUM; *Derecha:* Sincrotrón de Grenoble.

El coste de enviar uno o varios cristales de proteína a analizar en el sincrotrón de Grenoble es bastante alto. Por eso se realiza un screening inicial con un generador de rayos X que hay en el mismo CIC bioGUNE. Este análisis inicial no tiene, por mucho, la resolución que puede dar un sincrotrón, pero sí que nos permite indicar si el cristal que estamos analizando es realmente un cristal de proteína, o un cristal de alguna de las sales existentes en las soluciones precipitantes (Figura 3.13). Es importante realizar este screening, ya que, aunque en principio las soluciones precipitantes comerciales utilizadas están optimizadas para evitar la formación de cristales de alguna de sus sales, esto puede ocurrir. Con este screening se asegura que los cristales que se llevan a analizar al sincrotrón están formados realmente por proteína.

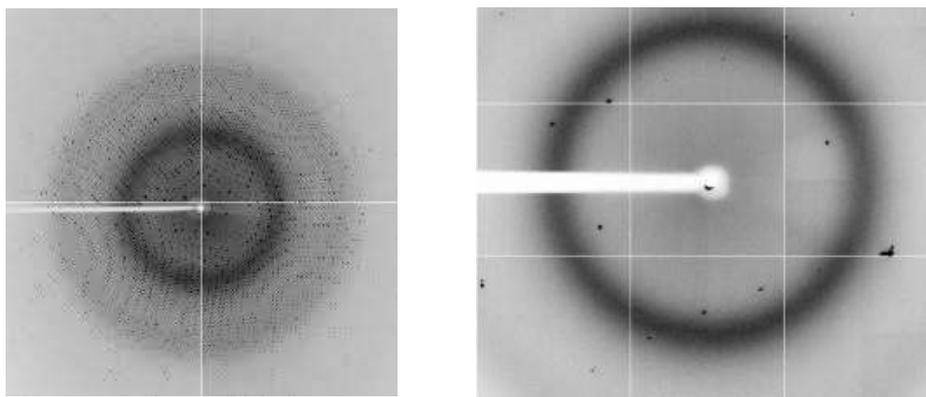


Figura 3.13: *Izquierda)* Patrón de difracción de rayos X típico de un cristal de proteína. *Derecha)* Patrón de difracción típico de un cristal de sales.

3.2.2.4. Análisis computacional de los patrones de difracción

HKL2000

La suite HKL es un paquete de programas destinados al análisis de datos de difracción de rayos X recopilados de monocristales. Consta de tres partes:

- **XdisplayF** para visualización del patrón de difracción.
- **Denzo** para la reducción e integración de datos.
- **Scalepack** para fusionar y escalar las intensidades obtenidas por Denzo u otros programas.

El análisis de datos de difracción de rayos X realizado por el paquete HKL (Otwinowski, 1993; Otwinowski & Minor, 1997) o programas similares, se utiliza para obtener los siguientes resultados:

- Determinación de la simetría cristalina (primero celosía de Bravais, luego clase de Laue, el grupo espacial).
- Estimaciones de los parámetros de la celda unitaria.
- Estimaciones de las intensidades de reflexión (equivalentes al cuadrado de las amplitudes de los factores de estructura).

- Estimaciones de error de las intensidades.
- Calibración del detector.
- Detección de un mal funcionamiento del hardware.

Coeficiente de Matthews

La estimación del número de moléculas en la unidad asimétrica cristalográfica es uno de los primeros pasos en la determinación de la estructura macromolecular. La distribución de V_M (Volumen de cristal por unidad de peso molecular de proteína) es también conocido como **coeficiente de Matthews**. Un porcentaje significativo del volumen de cristales de proteína está ocupado por solvente en un rango de 27% a 78%, siendo el valor más común alrededor del 43%. [Matthews 1968]. El coeficiente de Matthews y el contenido de disolvente se calculan a partir de la **celda unitaria** y el peso molecular de las moléculas en la celda unitaria.

3.2.2.5. Dicroísmo Circular (DC)

La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Biot Neumann y Fresnel Snatzke (1990). Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfaseamiento y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse (Figura 3.14).

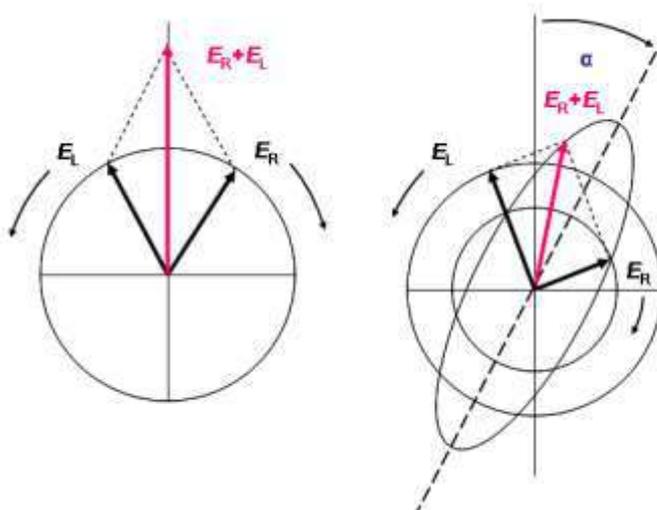


Figura 3.14: Izquierda) La suma de los dos componentes polarizados circularmente de un rayo de luz da como resultado un plano de polarización. Cuando esta luz polarizada pasa por una muestra (**Derecha**), la interacción de la radiación provoca una rotación en el plano de polarización en un ángulo α .

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además, las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación.

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otros tipos estructurales) (Figura 3.15).

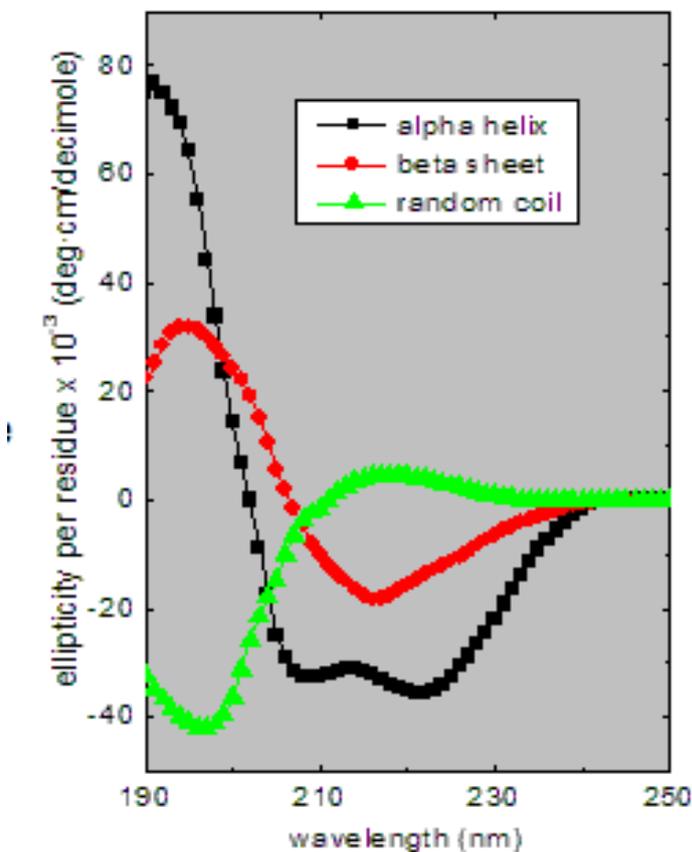


Figura 3.15: Espectros de dicroísmo circular típicos de cada conformación estructural.

3.2.2.6. Microscopia Electrónica de Transmisión Tridimensional (3D-TEM)

3D-TEM, es una técnica para determinar estructuras 3D de baja resolución, pero resulta una buena aproximación. El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre una CCD que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

La imagen del TEM tal como se ha descrito ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta es amorfa o cristalina.

Además, si la muestra es cristalina, es decir, hay una estructura de planos periódica, puede ocurrir que varias familias de esos planos cumplan la condición de Bragg y difracten de forma coherente la onda electrónica incidente. Esto da lugar a un diagrama de difracción, que es una imagen de distintos puntos ordenados respecto a un punto central (electrones transmitidos no desviados) que nos aportan información sobre la orientación y estructura del/los cristales presentes (Figura 3.16).

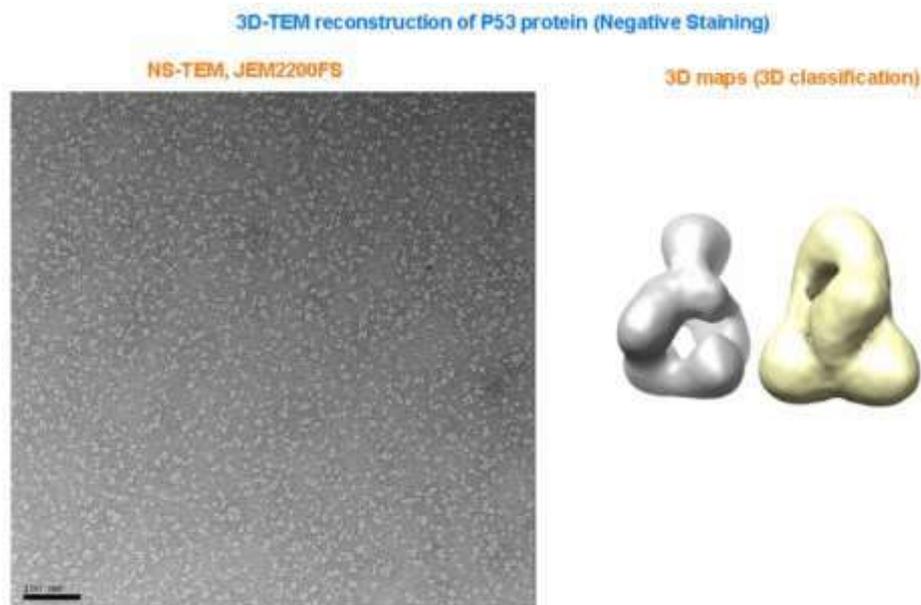


Figura 3.16: Ejemplo de la determinación de la estructura 3D de la proteína p53 a baja resolución mediante la técnica 3D-TEM.

3.2.2.7. Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (RMN-1D)

La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica no destructiva (la muestra se recupera intacta tras los experimentos) que permite estudiar casi cualquier elemento (isótopo) de la tabla periódica (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{23}Na , ^{27}Al , ^{29}Si , ...). La información molecular se obtiene por medio de espectros de RMN. Existe una enorme variedad de tipos de espectros de RMN y cada uno de ellos es sensible a un tipo de información molecular (estructura covalente o de enlaces químicos, proximidad espacial entre átomos, difusión traslacional molecular, difusión rotacional, etc.). Los espectros de RMN modernos pueden tener una o más dimensiones (1D, 2D, 3D, 4D, ...) lo que permite obtener información molecular de una forma rápida y precisa y que a su vez evita problemas en los análisis debidos a una posible congestión de señales.

RMN en disolución

La RMN en disolución permite determinar la estructura tridimensional y dinámica de moléculas disueltas tanto en H_2O como en cualquier otro disolvente. El rango de tamaño molecular que puede estudiarse va desde las pequeñas moléculas orgánicas y péptidos hasta proteínas o DNA con un límite de tamaño de hasta 80 kDa aproximadamente. Mediante RMN en disolución también se pueden estudiar las interacciones entre moléculas (Por ejemplo, interacción fármaco-receptor), difusión molecular, análisis de impurezas y productos de degradación etc.

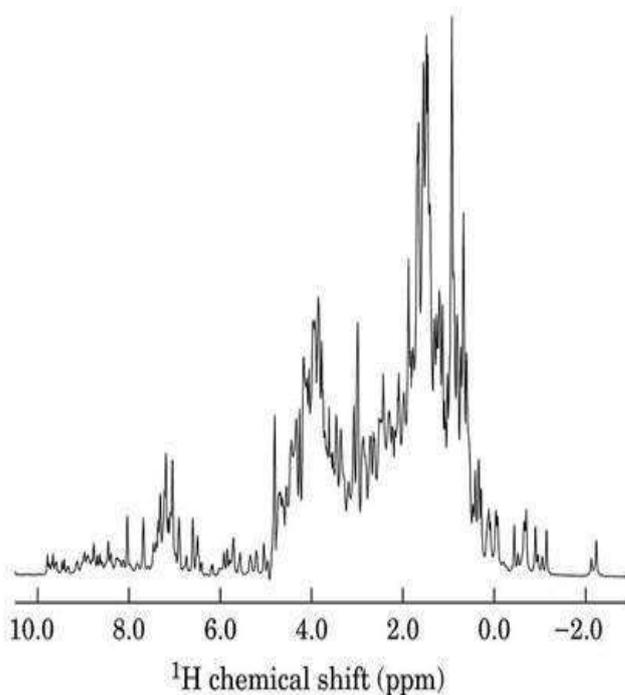


Figura 3.17: Ejemplo de espectros de RMN de proteínas de 1D.

3.2.3. Identificación de proteínas de unión con KAP: Pull-down

Se realizaron experimentos de Pull-down haciendo pasar extractos proteicos de riñón murino por columnas con GST y GST-KAP inmovilizados covalentemente y con un análisis proteómico diferencial entre las eluciones de las dos columnas. En la figura 3.18 se explica de forma esquemática el protocolo completo de la técnica Pull-down.

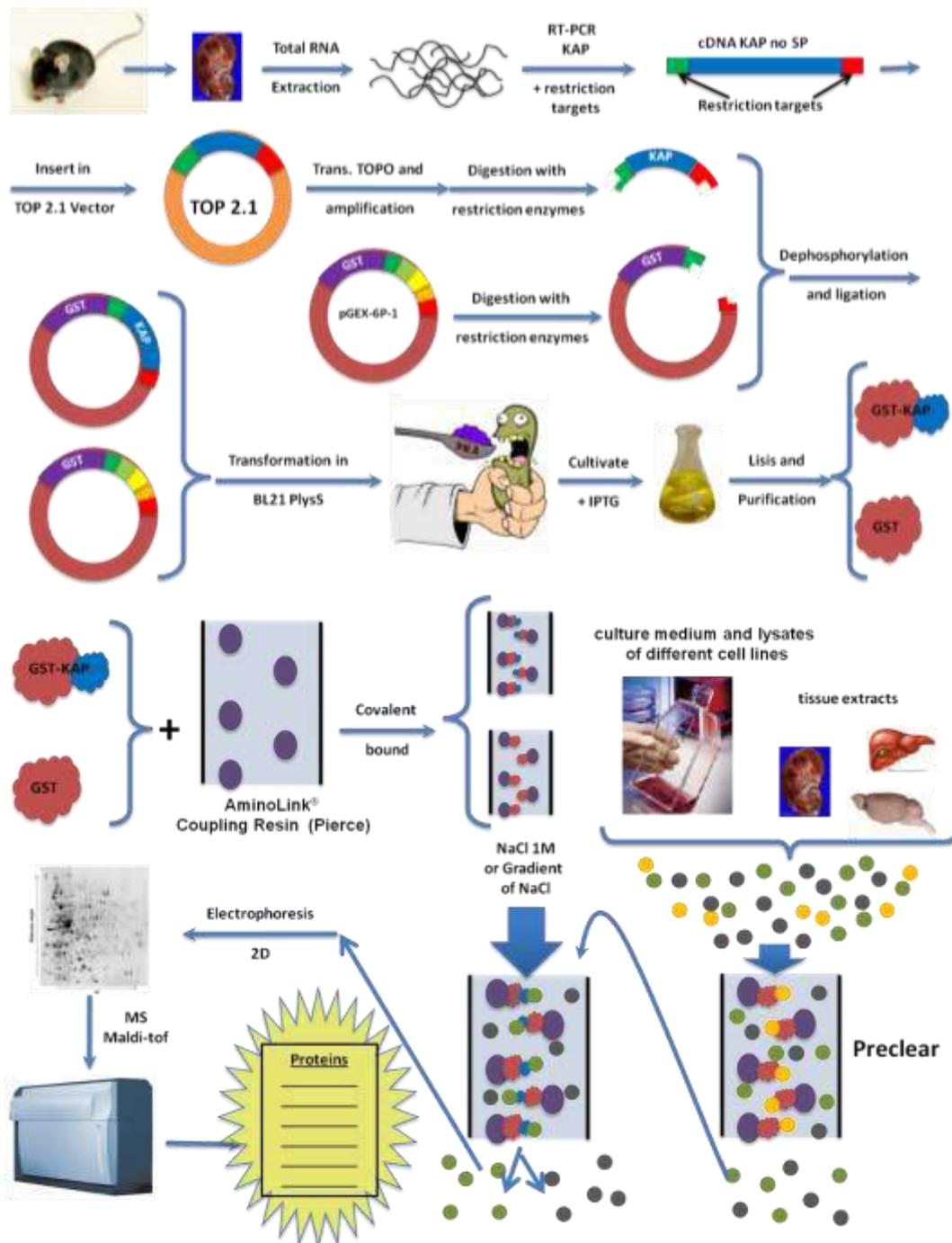


Figura 3.18: Esquema general de la técnica Pull-down.

3.2.3.1. Clonación del gen KAP, CypB murina (mCypB) y CypB humana (hCypB) en el plásmido pGEX-6P-1 y su expresión en BL21 (DE3) pLysS

Se ha procedido a la clonación de los genes KAP, CypB murina (mCypB) y CypB humana (hCypB) (secuencias en "Materiales: Material genético") en un vector pGEX-6P-1. Este vector se utiliza para expresar las proteínas dianas unidas a GST (Glutathione S-transferases), una proteína que se utiliza comúnmente como tag de purificación. Los métodos utilizados para realizar estas clonaciones y la expresión de sus proteínas en BL21 (DE3) pLysS son los mismos que los utilizados para la clonación de KAP en pET-14b (Ver "Métodos: Producción y purificación de la proteína KAP recombinante en bacteria"), salvo de la diferencia que, en lugar de utilizar un vector pET-14b se ha utilizado el vector pGEX-6P-1 (Ver detalles del vector en "Materiales: Los plásmidos"). Para la clonación se escogieron las dianas de restricción para BamHI y SmaI que se encuentran en el MCS de pGEX-6P-1. A continuación todos los primers utilizados para las clonaciones y para realizar las secuenciaciones de comprobación:

Primers para secuenciar pGEX-6P-1



UPPER:

5' GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGT 3'

LOWER:

5' CCGGGAGCTGCATGTGTCAAGG 3'

Primers para RT-PCR de KAP-SPS con dianas de BamHI y SmaI



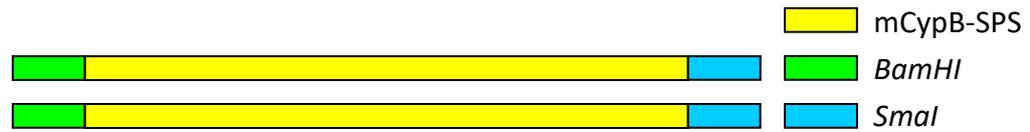
UPPER:

5' GGATCCCCCCTGTCAGAATTAGTTTC 3'

LOWER:

5' CCCGGGTCAGGAAGTAGGGGAGACTGG 3' ■ STOP

Primers para RT-PCR de mCypB-SPS con dianas de *Bam*HI y *Sma*I



UPPER:

5' GGATCCGGACCTAAAGTCACAGTCAA 3'

LOWER:

5' CCCGGGCCCACACAGACAGCTGCTTA 3'

Primers para RT-PCR de hCypB-SPS con dianas de *Bam*HI y *Sma*I



UPPER:

5' GGATCCGCCGATGAGAAGAAGAAGGG 3'

LOWER:

5' CCCGGGAAAGATGTCCCTGTGCCCTA 3' STOP

3.2.3.2. Purificación de las proteínas GST, GST-KAP, GST-mCypB y GST-hCypB en columnas de afinidad de glutathione.

Para purificar estas proteínas que contienen como tag un fragmento de GST se ha realizado cromatografías de afinidad con columnas que contienen glutathione unido (sustrato de la GST), en concreto *Glutathione-Agarose* (SIGMA, Cat. No. G4510). Este tipo de cromatografía es delicada, ya que si vas a utilizar la misma columna para purificar diferentes proteínas recombinantes (como es el caso), hay que regenerarla y limpiarla muy bien, ya que en una segunda purificación puede eluir proteína enganchada en la primera purificación (contaminación cruzada). El protocolo es el siguiente:

Notas:

-Columna por gravedad, a T^a ambiente, pero buffers y muestra en hielo.

-Añadir a la muestra TRITON-X100 hasta 1% concentración final y filtrar a 0,22 µm.

1. Equilibrar columna con 10 ml PBS pH = 7,4 aditivado con 1 mM PMSF y 15 mM β -Mercaptoetanol.
2. Aplicar muestra (opcionalmente 2 veces).
3. Lavar con 20 ml PBS-T (1% TRITON-X100) aditivado con 1 mM PMSF y 15 mM β -Mercaptoetanol.
4. Eluir con 20 ml de 10 mM glutathione reducido (SIGMA, Cat. No. G4251) en 50 mM TRIS-HCl pH = 9,0. Recoger sólo los 10 primeros ml, el resto dejar pasar como lavado.
5. Lavado (2 tipos):
 - a. Suave (si posteriormente se purificará la misma proteína):
 - i. Lavar con 10 ml de 0.1 M ácido bórico pH = 8.5, 0.5 M NaCl.
 - ii. Lavar con 10 ml H₂O.
 - iii. Lavar con 10 ml 0.1 M acetato sódico pH = 4.5, 0.5 M NaCl.
 - iv. Lavar con 10 ml H₂O.
 - b. Duro (si posteriormente no se purificará la misma proteína):
 - i. Lavar con 5 ml 6 M de guanidine hydrochloride.
 - ii. Lavar con 10 ml PBS pH = 7,4.
 - iii. Lavar con 10 ml 70% etanol.
 - iv. Lavar con 10 ml PBS pH = 7,4.
6. Lavar con 5 ml 2 M NaCl, 0.01% Azida sódica.
7. Tapar columna por arriba y abajo y poner parafilm → guardar en nevera.

3.2.3.3. *Digestión de la proteína GST-mCypB y GST-hCypB y segunda purificación con columna de glutathione.*

Esta parte del protocolo es para purificar las proteínas mCypB-SPS y hCypB-SPS sin el tag GST. Estas proteínas purificadas se utilizarán posteriormente. Una vez eluidas las proteínas GST-mCypB y GST-hCypB unidas a la columna de glutathione se hizo una digestión para eliminar el tag GST. Para ello se realiza una proteólisis sobre una diana proteolítica de una proteasa comercial que se encuentra entre el tag y la proteína diana: *PreScission Protease* (GE Healthcare, Cat. No. 27-0843-01). Posteriormente a la digestión, se hizo una segunda purificación con columna de glutathione para permitir la unión de la GST libre producida en la digestión y obtener la proteína de interés purificada en el flow-through (FT).

La PreScission Protease también quedará retenida en la columna de glutathione, ya que resulta ser en realidad una proteína de fusión de la proteasa específica de la diana y GST, facilitando así la purificación (en un solo paso nos deshacemos del tag digerido y la proteasa). El protocolo de la digestión es el siguiente:

1. Coger los 10 ml de elución de la columna de afinidad Glutathione-Agarose y aditarlo con 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 1 mM DTT.
2. Ajustar a pH = 7,0 (3-4 gotas HCl diluido 1:10).
3. Añadir 7,5 μ l (15 U) de PreScission Protease (2U/ μ l). Incubar O/N.

Finalmente, para obtener las proteínas mCypB-SPS y hCypB-SPS se hace pasar el producto de la digestión anterior otra vez por la columna de afinidad Glutathione-Agarose siguiendo el mismo protocolo detallado arriba, solo que en esta ocasión recolectaremos el FT (donde están nuestras proteínas de interés), ya que la GST digerida y la *PreScission Protease* se han quedado unidas a la columna. Purificar y regenerar la columna con el resto de protocolo.

3.2.3.4. Purificación de las proteínas GST, GST-KAP-SPS, mCypB-SPS y hCypB-SPS en columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF

El protocolo es el mismo que hay descrito en “Métodos: Producción y purificación de la proteína KAP recombinante en bacteria”, pero variando ligeramente las condiciones y buffers según la proteína a purificar y el tratamiento posterior.

En la purificación de mCpB-SPS y hCypB-SPS se ha utilizado el buffer “original” y como son proteínas muy básicas (PI en torno de 9) se han purificando recogiendo el FT (no se quedan unidas). Mientras en la purificación de GST y GST-KAP se ha utilizado un buffer alternativo, ya que para realizar una unión covalente (como veremos en el siguiente protocolo) no pueden existir ni rastro de TRIS, y se ha eluido con gradiente salino (sí quedan unidas a la columna).

Buffer para mCypB y hCypB	Buffer para GST y GST-KAP
50 mM TRIS-HCl pH= 8,0	10 mM PBS pH= 8,0

3.2.3.5. Construcción de las columnas de unión covalente con GST y GST-KAP

Es muy importante que las muestras de las proteínas a inmovilizar no tengan ningún resto de TRIS u otras aminas primarias en el medio, ya que es por estos grupos químicos donde se une con la resina formando un enlace covalente mediante una reacción química. La resina que se ha utilizado es *AminoLink® Coupling Resin* (Thermo Scientific, Cat. No. 20381) (Figura 3.19). Se trata de una resina con grupos aldehídos funcionales que espontáneamente reaccionan con aminas primarias. Luego, el enlace de base de schiff que se forma es estabilizado mediante reducción con un agente de reducción débil, Cianoborohidruro de sodio, produciendo un enlace covalente estable.

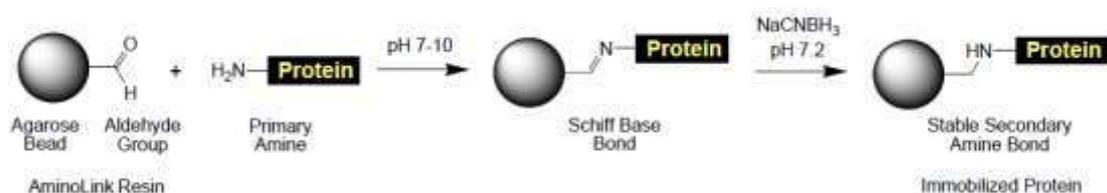


Figura 3.19: Diagrama donde se esquematiza la reacción de unión covalente.

Cuando obtenemos la resina con nuestra proteína unida covalentemente, la empaquetamos en una columna *Poly-Prep® Chromatography Columns* (BIO-RAD, Cat No. 731-1550). Todo el proceso se lleva a cabo en gravedad, sin bomba peristáltica. El protocolo es el siguiente:

1. Dializar la muestra de proteína GST-Tag (10-20 mg) en 200 volúmenes de coupling buffer utilizando una membrana de celulosa *Dialysis Tubing Cellulose Membrane* (SIGMA, Cat No. D9777-100FT, ancho membrana= 25 mm, corte= 12.000 Da), 4°C O/N en agitación → concentrar a 2-4 ml. Alternativa: Utilizar un tubo *Amicon® Ultra 15 Ultracel-3K* (Amicon, Cat No. UFC900396, corte= 3.000 Da, RCF de trabajo= 5.000g), que permite concentrar y cambiar el medio (Concentrar y resuspender con coupling buffer 3 veces).

Coupling Buffer*
10 mM PBS
150 mM NaCl

*Ajustar a pH 7,2

2. Poner en una columna Poly-Prep (BioRad) aprox. 2 ml de AminoLink Resin.
3. Quitar tapón inferior de la columna, y dejar salir el buffer de almacenamiento, hasta dejar un menisco.
4. Equilibrar la columna con 3 volúmenes de coupling buffer.
5. Poner en la columna los 2-4 ml de la solución con la proteína (Reservar 0,1 ml para poder calcular posteriormente el rendimiento).
6. En campana, añadir 40 µl de Cyanoborohydride Solution (concentración final= 50 mM NaCNBH₃).

Cyanoborohydride Solution*
5 M NaCNBH ₃
1 M NaOH

*Preparar en campana, puede producir gases tóxicos.

7. Tapar la columna y dejar en agitación 6 h (noria) a TA o O/N a 4°C.
8. En campana, sacar el tapón superior (posibles gases) y el tapón inferior → Drenar la columna --Z guardar el FT para análisis rendimiento.
9. Lavar con 4 ml de coupling buffer.
10. Lavar con 4 ml de quenching buffer (1 M Tris • HCl pH = 7,4).
11. En campana, poner 2 ml de quenching buffer y 40 µl de Cyanoborohydride Solution.

12. Tapar la columna y agitar en noria 30' a TA suavemente.
13. En campana quitar el tapón superior y el inferior → drenar.
14. Lavar con 10 ml, como mínimo, de Wash Solution (1 M NaCl) → Si hay mucha concentración de proteína pegada, habrá que lavar más intensamente (Va saliendo proteína).
15. Lavar con 6 ml de 10 mM PBS, 0,05% Azida sódica desgasificado → Tapar columna arriba y abajo y con parafilm y guardar a 4°C.

3.2.3.6. Extracción proteica de riñón murino

Una vez que tengamos las dos columnas puestas a punto, para realizar el pull-down necesitaremos extractos de proteínas de tejidos, celulares, proteínas recombinantes, etc. de interés, para poder pescar las proteínas que interaccionan con KAP. De momento, para empezar, se han realizado pull-down con extractos proteicos de riñón murino, ya que es donde se localiza la KAP. Para ello se decidió hacer tres extractos siguiendo el mismo protocolo, pero con tres tipos de buffer de lisis diferentes, de más a menos agresivo: Buffer Ripa, Buffer Hepes (Vera J, 2007) y un buffer de sacarosa. A continuación, los tres buffers y el protocolo:

Buffer Ripa*
50 mM TRIS·HCl
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1% Nonidet P-40
0,5% Sodium Desoxycholat
0,1% SDS
1 mM PMSF**
0,5 µg/ml Aprotinina**
10 µg/ml Leupeptina**

*Ajustar a pH= 7,5

**Añadir justo antes de usar

Buffer Hepes *
50 mM HEPES·KOH
50 mM KCl
1 mM EGTA***
1 mM MgCl ₂
10% Glicerol
0,1% TritonX-100
1 mM PMSF**
0,5 µg/ml Aprotinina**
10 µg/ml Leupeptina**

*Ajustar a pH= 7,6

**Añadir justo antes de usar

***Basificar con unas gotas de 5 M

Buffer Sacarosa
320 mM Sacarosa
0,01% Acida Sódica
0,1% TritonX-100
1 mM PMSF*
0,5 µg/ml Aprotinina*
10 µg/ml Leupeptina*

*Añadir justo antes de usar

1. Suplementar el buffer de lisis con los inhibidores de proteasas en el momento de utilizarlo.
2. Homogeneizar 8 gr de riñón murino con 50 ml de Buffer con el Politron (brazo mediano) en hielo → 30 "+ 15" descanso (10 series).
3. Pasar el homogenado por una jeringa de 21Gx20 (en su defecto con una aguja 21G y una jeringa de 50 ml) en hielo 10 veces.

4. Incubar 30 'en hielo.
5. Ultracentrifugar con el rotor AH-629 30 min, 4°C, 24.000 rpm (103.586 rcf).
6. Recuperar el sobrenadante evitando la parte turbia por encima del pellet (si hay) y filtrar a 0,22 µm.
7. Dializar el sobrenadante con Dialysis Tubing Cellulose Membrane en 5 l. de 10 mM PBS, 0.4 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂ O/N y con agitación.
8. Medir concentración de proteínas.
9. Guardar a -80 °C.

3.2.3.7. *Pull-down con las columnas GST/GST-KAP*

Todo se realizó en cámara fría (4°C) y con bomba peristáltica (20 ml/h para los equilibrados, lavados y elución y 10 ml/h para el pase de los extractos). El siguiente protocolo vale tanto para la columna GST como GST-KAP. El mismo extracto se pasó primero por columna GST, y luego, el FT del paso de la columna de GST, se hizo pasar por la columna GST-KAP:

1. Equilibrar la columna con 10 mM PBS, 0.4 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂ durante 1-2 horas.
2. Pasar muestra previamente dializada en 10 mM PBS, 0.4 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂ y filtrada con 0,22 µm 2 veces por la columna.
3. Lavar con 100 ml 10 mM PBS, 0.4 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂.
4. Eluir con 10 ml de 50 mM Glicina pH= 2,5 y añadir al eluido 1,7 ml de Tris 100mM pH= 10.5 (Neutralización). Alternativa: También se puede eluir con 1M NaCl o 50 mM Trietanolamina pH= 11,5.
5. Dializar el eluido con *Dialysis Tubing Cellulose Membrane* en 5 l. de 10 mM PBS pH= 7,4. Alternativa: Se puede hacer con Amicon si es necesario concentrar igualmente (concentrar + cambio buffer).
6. Lavar la columna con 10 ml de PBS.
7. Lavar la columna con 6 ml de 10 mM PBS, 0,05% Azida Sódica desgasificado.
8. Tapar la columna arriba y abajo y con parafilm y guardar a 4°C.

3.2.3.8. *Electroforesis bidimensional (2D) (tiras de 7 y 24 cm)*

La electroforesis 2D (Figura 3.20) es una técnica que permite analizar mezclas complejas de proteínas procedentes de muestras biológicas, como en este caso las eluciones de las columnas de pull-down, en las cuales esperamos una buena cantidad de proteínas diferentes que se tienen que separar y analizar. Inicialmente, las proteínas se separan según el punto isoeléctrico (PI) mediante isoelectroenfoque (IEF) en geles de gradiente de pH inmovilizados en condiciones desnaturizantes (Primera dimensión). El

gradiente de pH de la primera dimensión se selecciona en cada caso para obtener la máxima resolución del grupo de proteínas de interés. En este caso he utilizado gradientes lineales de 3-10 pH. En la segunda dimensión, las proteínas se separan en función de la masa molecular en un gel estándar SDS-PAGE. A continuación, se tiñen los gels con uno de los diferentes métodos disponibles, en este caso tinción por plata (mayor sensibilidad). Se adquieren las imágenes de los gels con un escáner de alta resolución y se analizan con un software especializado. Así se pueden comparar gels y observar cambios en el patrón de manchas: variación de intensidades, aparición y/o desaparición de manchas (Análisis diferencial). Luego, aquellas manchas de interés (en nuestro caso manchas que se encuentren en el pull-down de la columna GST-KAP y que no se encuentren en el pull-down de la columna GST, o muy disminuida) pueden ser recortadas y llevadas a análisis de masas MS-MALDI-TOF para identificar las proteínas (que en teoría interaccionan con KAP). Todos los buffers necesarios están descritos en “Materiales: Los Buffers”.

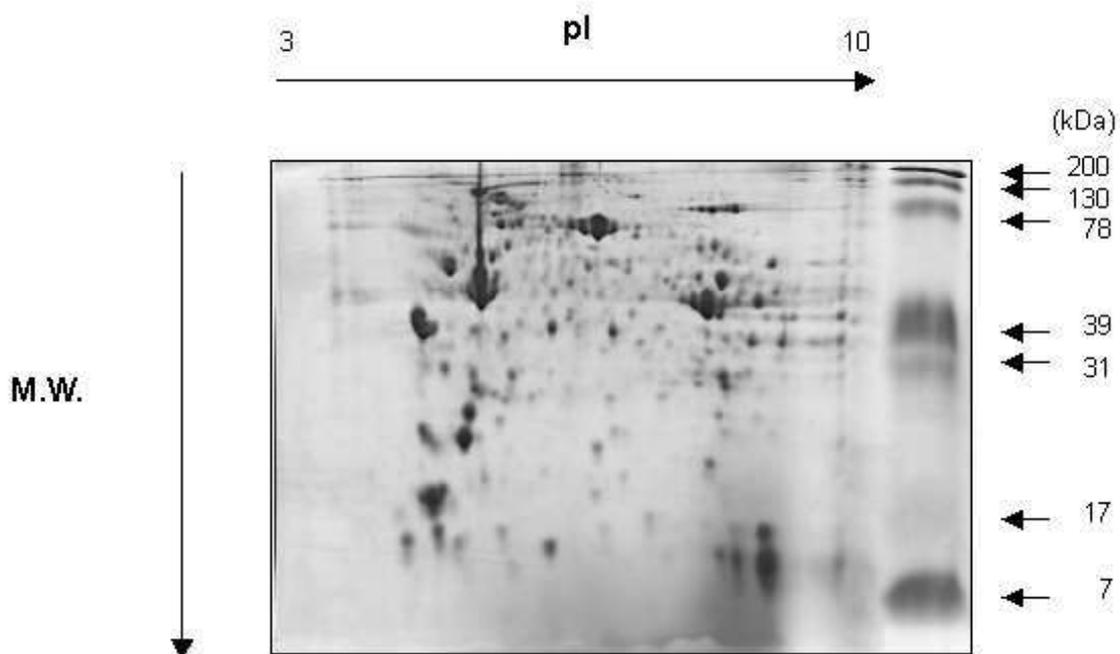


Figura 3.20: Ejemplo de electroforesis 2D de músculo esquelético de rata. Primera dimensión: Isoelectroenfoque, rango de pI 3-10 no lineal. Segunda dimensión: SDS-PAGE 12%.

Primera dimensión:

Para hacer el isoelectroenfoque de la primera dimensión se utilizó el mismo protocolo para las dos medidas de tiras. Utilizamos el sistema *IPGphor/Isoelectric Focusing System* de Amersham Pharmacia Biotech (Figura 3.21). Las tiras utilizadas fueron: *ImmobilineTM DryStrip* pH 3-10, 7 cm (GE Healthcare Cat. No. 17-6001-11) y *ImmobilineTM DryStrip* pH 3-10, 24 cm (GE Healthcare Cat. No. 17-6002-44) (Figura 3.21). Antes de empezar, lavar muy bien los *Strip Holder* (sarcófagos donde van metidas

las tiras) con una solución de detergente *IPGphor Strip Holder Cleaning solution* (Amersham Pharmacia Biotech, Cat. No. 80-6452-78) (Cuidado que son muy frágiles).

Utilizar en todo el proceso guantes sin talco.

1. Sacar a descongelar alícuotas de 500 μ l (24 cm) o 150 μ l (7 cm) de solución de rehidratación, una por muestra.
2. Añadir 6 μ l de DeStreakTM Reagent (GE Healthcare, Cat. No. 17-6003-18) a las alícuotas de solución de rehidratación \rightarrow vórtex + spin.
3. Añadir a los 500 μ l (24 cm) o 150 μ l (7 cm) de la solución de rehidratación la cantidad de muestra en solución de lisis necesaria para obtener la concentración de proteína deseada y agitar con vórtex:
 - a. 24 cm: 50 μ g de proteína para plata normal, 150 μ g para plata masas y 500-1000 μ g para coomassie.
 - b. 7 cm: 6 μ g de proteína para plata normal, 15 μ g para plata masas y 100 μ g para coomassie o western-blot.
4. Tomar 450 μ l (24 cm) o 125 μ l (7 cm) y aplicarlos en el Strip Holder con una pipeta \rightarrow Eliminar las posibles burbujas.
5. Sacar las tiras de 24 cm o 7 cm que vayamos a utilizar del congelador.
6. Coger la tira por el extremo anódico (+, código de barras) y con los dedos extraer la cubierta protectora.
7. Con la cara del gel hacia abajo situar el extremo de la tira con el código de barras en el extremo puntiagudo del Strip Holder, moviéndolo hacia delante y hacia atrás de manera que se impregne el gel y situado la tira dentro del receptáculo.
8. Aplicar unas gotas de *DryStrip Cover Fluid* (Amersham Pharmacia Biotech, Cat. No. 17-6003-18) sobre la tira hasta que esta quede totalmente cubierta (evita la evaporación).
9. Tapar los Strips Holders con las tapas de presión correspondientes.
10. Situar los sarcófagos en el *IPGphor* tal como se indica en el esquema dibujado en el aparato.
11. Seleccionar el programa adecuado y modificar el tiempo de rehidratación según convenga.

24cm

Paso	Voltaje	Duración	Ramp
	Rehidratación	10 + x h	
1	500	1 h	step
2	1000	1 h	gradient
3	8000	3 h	gradient
4	8000	45 min	step

7cm

Paso	Voltaje	Duración	Ramp
	Rehidratación	10 + x h	
1	300	30 min	step
2	1000	30 min	gradient
3	5000	1 h 20 min	gradient
4	5000	25 min	step

12. Finalizado el IEF se puede pasar a realizar la SDS-PAGE (segunda dimensión) o congelarse las tiras a -80°C en tubos cerrados con el plástico contra la pared del tubo.

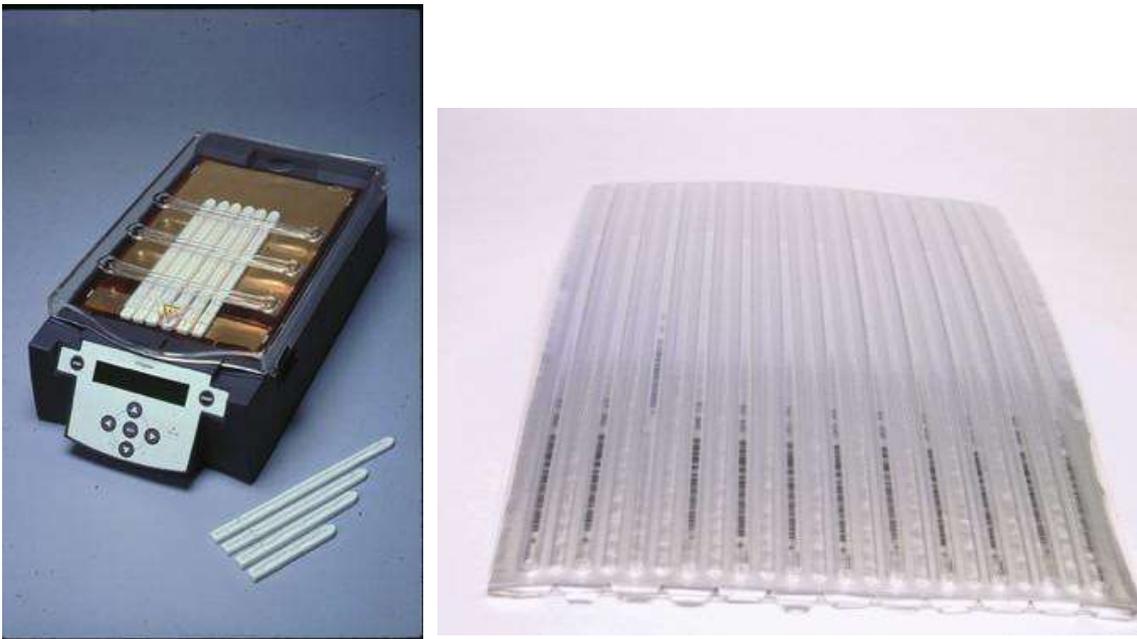


Figura 3.21: *Izquierda)* Sistema IPGphor/Isoelectric Focusing System de Amersham Pharmacia Biotech. *Derecha)* Tiras Immobiline™ DryStrip (GE Healthcare).

Segunda dimensión:

1. Gelificación: (para tiras de 24 cm, para tiras de 7 cm es el mismo protocolo que el explicado en Producción y purificación de la proteína KAP de forma recombinante, pero sin el gel stacking) → Sistema *Ettan™ DALTsix Large Vertical System*, de GE Healthcare (Figura 3.22):
 - a. Lavar los cristales con H₂O destilada + metanol.
 - b. Tumar el gel caster sobre la espalda y abrirlo quitando las pinzas laterales y aflojando los tornillos frontales. Montar tres stackers, espaciador/cristales alternativamente. En caso de no usar los seis cristales, sustituirlos por los insertos de plástico.
 - c. Poner en un kitasato de 1l con imán agitador los componentes necesarios (Ver “Materiales: Los Buffers”).
 - d. Dejar con agitación lenta y desgasificando al vacío durante 15 min. (Poner TEMED y APS en último lugar).
 - e. Llenar el Gel Caster hasta 0,5 cm por debajo del borde superior del cristal corto.
 - f. Añadir 1ml de isobutanol por cristal.
 - g. Una vez polimerizado, eliminar el isobutanol i lavar la parte superior del gel tres veces con 375 mM TRIS pH= 8,8.



Figura 3.22: Sistema *Ettan™ DALTsix Large Vertical System*, de GE Healthcare.

2. Electroforesis:

- a. Unos 30 min. antes de acabar la primera dimensión, descongelar las alícuotas de solución de equilibrado necesaria: 10 ml por muestra para tiras de 24 cm y 5 ml por muestra para tiras de 7 cm.
- b. Para cada muestra, separar su alícuota de solución de equilibrado en dos partes (2x5 ml en tubos de equilibrado Amershan para tiras de 24 cm y 2x2,5 ml en falcons de 15 ml para tiras de 7 cm).
- c. En uno de los tubos añadir DTT (10 mg/ml solución) → Solución reductora y en el otro tubo añadir yodoacetamida (40mg/ml solución) → Solución alquiladora.
- d. Introducir cada tira, cogiéndolo por un extremo sin gel, con el plástico tocando a la pared del tubo, es su correspondiente tubo con solución reductora. Agitar en orbital durante 15 min.
- e. Cambiar la tira a su correspondiente tubo de solución alquiladora. Agitar en orbital durante 15 min.
- f. Coger la tira por el extremo con unas pinzas, lavar en tampón de electroforesis y colocarla sobre el gel SDS-PAGE. Poner el ánodo de la tira (código de barras) a la izquierda del operador.
- g. Con una espátula presionar la tira hacia debajo de manera que queden en contacto el gel de la tira con el gel del SDS-PAGE.
- h. Aplicar solución de sellado de agarosa previamente calentado (60-80°C) con una pasteur de plástico hasta el borde del cristal. Eliminar las burbujas con una espátula plana.
- i. Llenar la cubeta de tampón de electroforesis, colocar los geles, cerrar la tapa y conectarla a la fuente. Condiciones eléctricas:

Para EttanDalt 6 (24 cm)(2)		Para Multiprotean III (7 cm)	
Potencia constante (W)	Tiempo	Voltaje constante (V)	Tiempo
2,5/gel	30 min	30	15 min
100 totales	(1)	200	(1)

(1) Hasta poco antes de que salga el azul de bromofenol

(2) Multitemp a 10°C

- j. Sacar los cassettes de la cubeta y separar los cristales.
- k. Guardar los geles en solución fijadora (hasta 2 semanas) o seguir (tinción, wester blot, etc).

3.2.3.9. Tinción de geles de acrilamida con plata

Para los geles de acrilamida de 1D de los pull-downs y para todos los geles de 2D se han realizado tinciones en plata, mucho más sensibles que una tinción de Coomassie Blue.

- Usar agua MQ para todo y guantes de nitrilo.
- Volúmenes de reactivos para un gel de 24 cm o para 4 geles de 7 cm.

Proceso	Reactivo	Volumen	Tiempo
Fijado	40% Etanol/10% A. Acético glacial	125 ml	2x30 min
Sensibilización	30% Etanol/6,9% Acetato de Sodio 5% Tiosulfato de Sodio 36,5% Glutaraldehido(1)(2)	125 ml 5 ml 630 µl	1x30 min
Lavado	Agua MQ	-	4x5 min
Tinción plata	0,25% Nitrato de Plata 25% Formaldehido(1)(2)	125 ml 50 µl	1x20 min
Lavado	Agua MQ	-	2x1 min
Revelado	2,5% Carbonato de Sodio 25% Formaldehido(1)	125 ml 50 µl	2-7 min
Parada	1,46% Na ₂ EDTA·2H ₂ O	125 ml	15 min
Lavado	Agua MQ	-	3x5 min

(1) Incorporar a la solución inmediatamente antes de utilizarla.

(2) No poner en caso de realizar una tinción de plata compatible con espectrometría de masas.

3.2.4. Identificación de proteínas de unión con KAP: Tandem Affinity Purification (TAP)

Se ha utilizado otro método de interactómica para encontrar proteínas que interactúen con KAP. Tradicionalmente, las técnicas más utilizadas para identificar interacciones proteína-proteína han estado basadas en métodos genéticos, como el doble híbrido por levadura (Y2H). Aunque estas técnicas han sido exitosas a lo largo del tiempo, son de utilidad limitada a medida que se quiere estudiar agregados de complejos de mayor tamaño (ribosomas, spliceosomas, complejos de transcripción, etc.). Para superar esta limitación se desarrolló una nueva técnica: Tandem affinity purification (TAP). TAP combina una doble purificación de los complejos de proteínas formados utilizando un doble tag de purificación de afinidad en nuestra proteína de interés con la posterior identificación de las proteínas del complejo por espectroscopia de masas (MS). La realización de dos etapas de purificación por afinidad permite lavados suaves y condiciones de elución excepcionalmente limpias y respetuosas con el complejo proteico.

Nosotros hemos elegido para realizar esta técnica el kit *InterPlay Adenoviral TAP System* (Stratagene, Cat No. 240213). Este kit mejora el sistema TAP original, utilizando como tags para la doble purificación dos péptidos muy pequeños (menores impedimentos estéricos) con una gran afinidad por sus respectivas resinas (Figura 3.23):

- Streptavidin Binding Peptide (SBP) tag:
 - Resina: Streptavidin resin.
 - Constante de afinidad: $2 \cdot 10^{-9}$ M.
 - Elución: Biotina.
- Calmodulin Binding Peptide (CBP) tag:
 - Resina: Calmodulin resin.
 - Constante de afinidad (en presencia de Ca): $1 \cdot 10^{-9}$ M.
 - Elución: Agente quelante.

Otra de las ventajas de este sistema de Stratagene es que se trata de un sistema adenoviral, el cual mejora la transfección de nuestro gen de interés con los dos tags de purificación respecto a los métodos de transfección estándar. Además, una vez recolectadas las partículas virales en el sobrenadante, se pueden transfectar un amplio tipo de células fácilmente (Figura 3.24). Información detallada de los vectores utilizados en “Materiales: Los Plásmidos”.

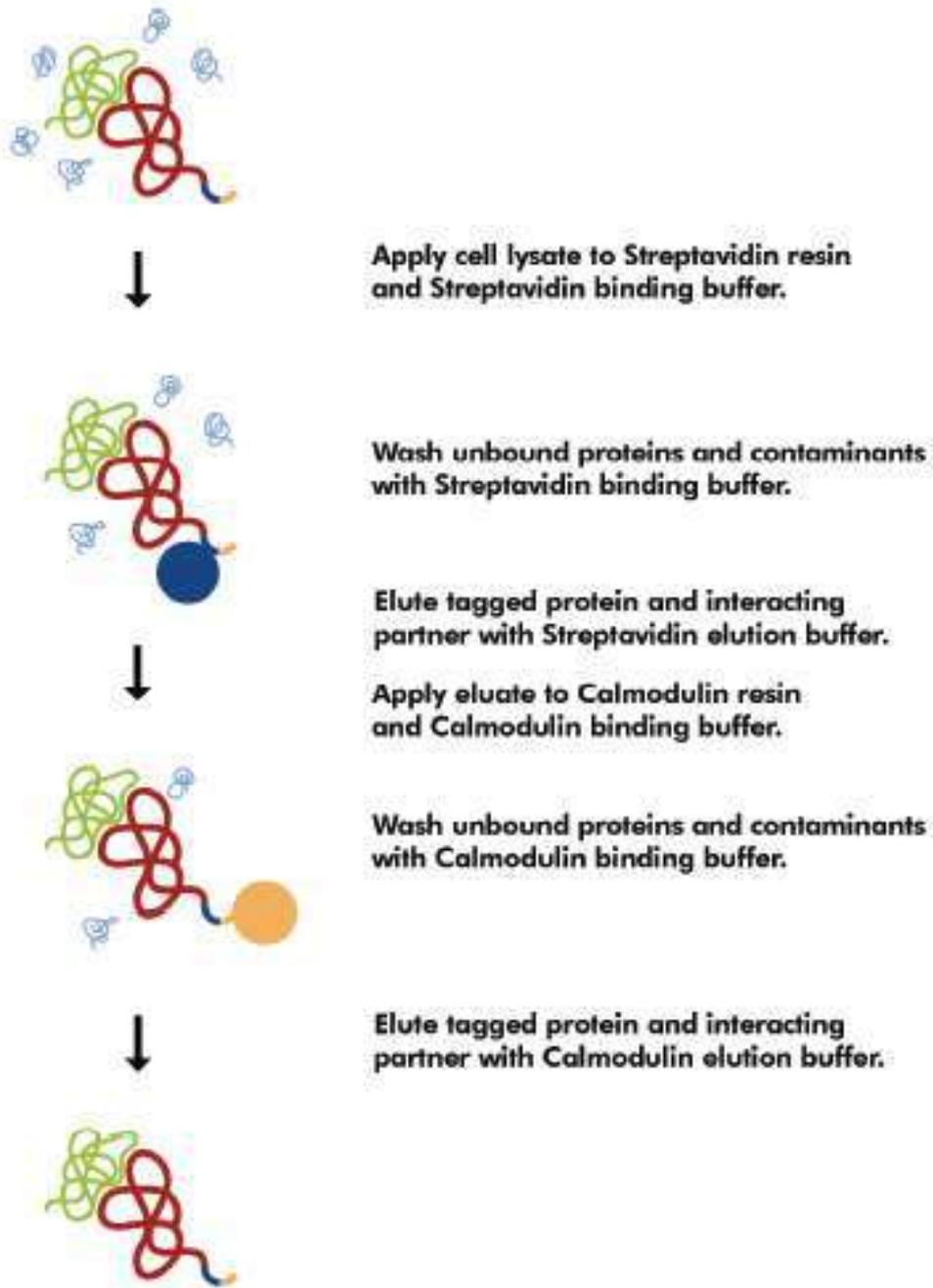


Figura 3.23: Esquema de la doble purificación secuencial mediante un doble tag.

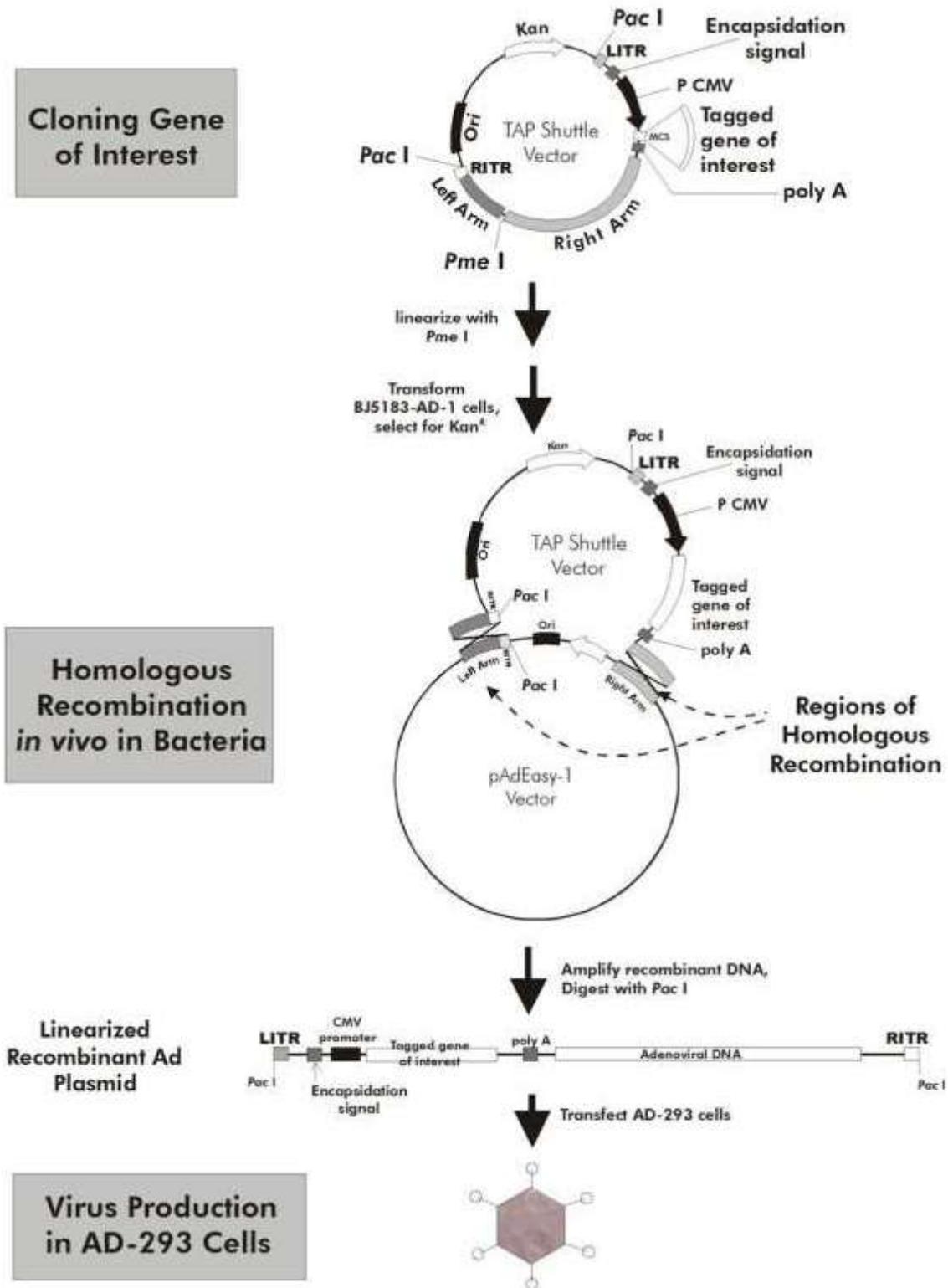


Figura 3.24: Esquema de la producción de adenovirus con los que transfectar nuestro gen de interés más doble tag a cualquier línea celular.

Una vez realizada la producción de adenovirus recombinante y la posterior transducción adenoviral en las células dianas, se recolectan las células, se obtiene un extracto proteico y se purifican con las resinas de estreptavidina y calmodulina de forma secuencial. Tras la elución, el complejo intacto purificado es analizado por SDS-PAGE (se puede identificar nuestra proteína de interés por Wester-blot con anticuerpo μ -CBP), pudiendo hacer geles de una o dos dimensiones. Paralelamente se habrá realizado TAP con una proteína control que no tenga ninguna relación con la nuestra. De esta forma haremos un análisis diferencial de los dos geles y analizaremos por MS-MALDI-TOF aquellas bandas o spots que encontremos de forma diferencial únicamente en el gel de nuestra proteína (De forma equivalente al análisis diferencial hecho en el pull-down), así evitaremos todas aquellas proteínas de interacción inespecífica, como pueden ser chaperonas y otras. Ventajas del sistema adenoviral:

- El adenovirus puede infectar una amplia gama de células de mamíferos y se han utilizado con éxito para expresar proteínas humanas y no humanas.
- Puede producir títulos altos (10^7 - 10^8 ufp/ml después de transfección transitoria).
- La infección no requiere una división activa de la célula huésped (puede infectar células tanto si están en división como no).
- Las proteínas recombinantes expresadas están plegadas adecuadamente, debido a que el sistema de vectores AdEasy utilizado emplea adenovirus humanos, y por tanto se utilizan células huésped de mamíferos, realizando las modificaciones postraduccionales y el plegamiento de forma correcta.
- Gran tamaño de inserción: Hasta 6,6 kb si se utilizan vectores lanzaderas pTAP de Stratagene.
- Remota posibilidad de activación o desactivación indeseada de genes de la célula huésped.

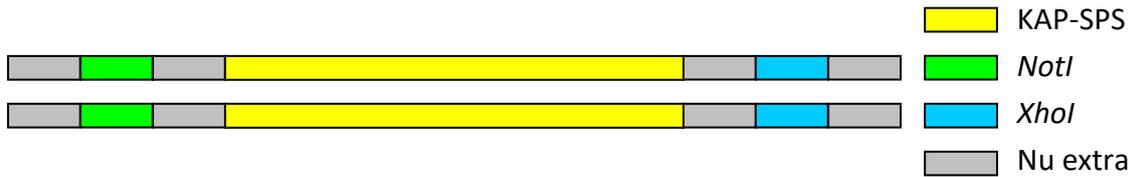
3.2.4.1. *Clonar KAP en pCTAP/pNTPA Shuttle*

Se ha realizado la técnica TAP con dos proteínas:

1. KAP sin péptido señal (KAP-SPS) con el doble tag en N-terminal (pNTPA Shuttle).
2. KAP con péptido señal (KAP-CPS) con el doble tag en C-terminal (pCTAP Shuttle).

Se ha seguido el protocolo de clonación ya descrito anteriormente (Ver “Métodos: Producción y purificación de la proteína KAP recombinante en bacteria”), excepto que en esta ocasión no se ha subclonado en el sistema TOPO, sino que se ha clonado directamente el producto de la RT-PCR en los vectores. Para ello y para que los enzimas de restricción puedan actuar, se han diseñado unos primers con nucleótidos extras que hacen de base para las enzimas de restricción escogidas: NotI y XhoI.

Clonación gen KAP sin ps en vector pNTAP-A Shuttle + *NotI*/*XhoI*



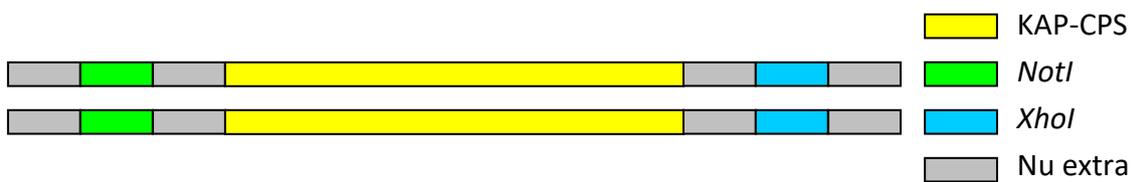
UPPER:

5' AAGGAAAAAA **GCGGCCGC** AAAAAGGAAAA **CCCCTGTCAGAATTAGTTCA** 3'

LOWER:

5' **CCGCTCGAGCGG** **TCA** **GGAAGTAGGGGAGACTGG** 3' ■ STOP

Clonación gen KAP con ps en vector pCTAP-C Shuttle + *NotI*/*XhoI*



UPPER:

5' AAGGAAAAAA **GCGGCCGC** AAAAAGGAAAA **ATGATG** **CTTTTCAAGGTCCTG** 3'

LOWER:

5' **CCGCTCGAGCGG** **GGAAGTAGGGGAGACTGGATT** 3' ■ Met

Después de secuenciar para comprobar que la clonación ha sido correcta, se siguen estos pasos extra antes de la siguiente etapa:

1. Linealizar 5 µg de los vectores TAP Shuttle Con el enzima de restricción PmeI y confirmar la completa digestión con un gel de agarosa 1%. Linealizar también los vectores pShuttle-CMV-*lacZ* i pTAP Shuttle-CAT:
 - a. X µl miniprep (5 µg).
 - b. 5 µl tampón 10X.
 - c. 0,5 µl BSA 100X.
 - d. 5 U de PmeI.
 - e. H₂O hasta 50 µl.

2. Realizar una electroforesis con gel de agarosa del 1% del producto de la digestión anterior, recortar banda del vector linealizado y purificar con *Gel Band Purification Kit* (GE, #28-9034-71) → volumen de elución: 30 µl, [Ideal] : 0,05-0,1 µg/µl
3. (Opcional): Desfosforilar el vector linealizado (En el protocolo de Estratagen dicen que no notan diferencia entre desfosforilar o no) con *Phosphatase Alkaline* (AP) (Roche, #1 097 075, 4º C) → repetir purificación con gel de agarosa.

3.2.4.2. Transformación de Células BJ5183-AD-1 para producir el plásmido recombinante pAdEasy-1

Notas: Las células competentes BJ5183-AD-1 son muy sensibles a las variaciones de temperaturas: del hielo seco al recepcionar el kit directo a -80º C, y sacar solo las alícuotas a utilizar (una vez fuera del congelador siempre con hielo).

1. Enfriar los tubos eppendorf DNA-free i cubetas de electroporación (0,2 cm gap) necesarios en hielo.
2. Coger las alícuotas de células competentes BJ5183-AD-1 (100 µl) necesarios y ponerlas en hielo.
3. Con cuidado coger 40 µl de células competentes BJ5183-AD-1 y ponerlo en un eppendorf enfriado en hielo (repetir con todas las alícuotas necesarias) y añadir 1 µl de vector Shuttle linealizado (0,05-0,1 µg). Hacerlo también con los vectores linealizados pShuttle-CMV-*lacZ* i pTAP Shuttle-CAT con los *Transformation Control Plasmid*.
4. Ajustar el electroporador: 200 Ω, 1,7 kV, 25 µF.
5. Transferir el contenido de un eppendorf a una cubeta de electroporación pre-enfriado y agitarla con cuidado hasta que la mezcla esté situado en el fondo de la cubeta.
6. Introducir la cubeta en la cámara de electroporación asegurando de que los electrodos toquen la cubeta.
7. Pulsar la mezcla una vez. Inmediatamente, coger la cubeta y añadir 1 ml de medio S.O.C. (o LB estéril) en un tubo falcon de base redonda de polipropileno de 14 ml.
8. Incubar 1h a 30º C en Shaker (225-250 rpm).
9. Sembrar 50 µl, 100 µl i 850 µl en placas LB + kanamicina (para el Transformation Control Plasmid 10 µl i 100 µl) → Para las siembras menores de 100 µl, primero colocar una gota de 100 µl de medio S.O.C. en la placa, pipetear la mezcla transformada extender).
10. Incubar las placas a 30ºC 24-48 h. → para comprobar que la transformación ha funcionado, tienen que crecer colonias con las transformadas con el Transformation Control Plasmid.

Identificación de colonias:

1. En las placas aparecen 3 poblaciones de colonias: Grandes, medianas y pequeñas. Las medianas i pequeñas representen las colonias potenciales en los que se ha producido la recombinación (el plásmido recombinado es muy grande (40 kb)). Las grandes representan las colonias donde no se ha producido la recombinación. La ratio entre las primeras y las segundas suele ser de 10:1 (una ratio de 5:1 o inferior puede ser normal si el vector linealizado no es va depurar en gel).
2. Picar 10 o mes de las colonias más pequeñas y bien aisladas de la placa y sembrar en 5 ml de medio LB + kanamicina → incubar O/N a 30° C (Shaker).
3. Hacer minipreps, digerir 10 µl con 1 U de enzima Pacl y correr en gel agarosa 0,8 %, junto con 10 µl sin digerir. Como control digerir 0,2 mg de TAP Shuttle vector no recombinado (pero con el inserto) → aparecen dos bandas: una grande de 30 kB i una pequeña de 3,0 kb (si han recombinado por el brazo de la izquierda) o 4,5 kb (si han recombinado por el origen de replicación) → Amplificar los plásmidos de las colonias con bandas esperadas predominantes.

3.2.4.3. Amplificación plásmidos pAdEasy-1 recombinantes con células ultracompetentes XL10-Gold

Notas: Las células ultracompetentes XL10-Gold son muy sensibles a las variaciones de temperaturas: del hielo seco del transporte directo a -80° C y sacar solo las alícuotas a utilizar (una vez fuera, siempre en hielo). Utilizar siempre falcons de 14 ml con fondo redondo de polipropileno. **Es recomendado amplificar más de un plásmido pAdEasy-1 bien transformados** (trozos de digestión correctos).

1. Preparar el baño a 42° C i preenfriar tubos falcon de 14 ml.
2. Poner las alícuotas de células ultracompetentes XL10-Gold en hielo directamente.
3. Agitar suavemente las células con la mano y poner 100 µl en los tubos falcons preenfriados.
4. Añadir 4 µl de β-ME mix (kit) → mezclar con cuidado.
5. Incubar en hielo 10' agitando con cuidado cada 2'.
6. Poner plásmidos transformados (y controles) → 0,1-50 ng (generalmente 1 µl de las minipreps, con un volumen máximo de 4 µl), y también plásmidos control pUC18 (diluido 1:10 con agua). Agitar con cuidado.
7. Incubar 30' en hielo.
8. Precalentar en baño 42°C medio NZY+ para el paso 11.
9. Incubar los tubos 30" a 42°C en baño.
10. Incubar tubos 2' en hielo.
11. Añadir 0,9 ml de medio NZY+ precalentado.
12. Incubar 1h a 30°C 225-250 rpm en shaker.

13. Aplicar 5 μ l, 25 μ l i 100 μ l de cada tubo en placas con medio LB-Kanamicina (LB-ampicilina para el pUC18) \rightarrow Para las siembras menores de 100 μ l, primero poner una gota de 100 μ l de medio NZY+ a la placa, pipetear la mezcla transformada y extender).
14. Incubar las placas 48 h. a 30°C.
15. Picar una colonia de cada placa en 10 ml de medio LB+Kanamicina \rightarrow O/N 30°C 225-250 rpm shaker.
16. Añadir los 10 ml de cultivo a 500 ml de LB+Kanamicina \rightarrow O/N 30°C 225-250 rpm shaker.
17. Hacer maxipreps.
18. Digerir 10 μ g de cada plásmido con Pacl (O/N 37°C en baño):
 - a. X μ l maxiprep (10 μ g).
 - b. Añadir 5 μ l de tampón 10X.
 - c. Añadir 0,5 μ l BSA 100X.
 - d. Añadir 5 U de Pacl.
 - e. Añadir H₂O hasta 50 μ l.
19. Correr 0,2 mg de cada digestión en un gel de agarosa 0,8 % \rightarrow se tiene que observar de unos 30 kb y otra de 4,5 o 3,0 kb.
20. Purificar con *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE, #28-9034-71) o precipitando el DNA con etanol \rightarrow resuspender con 50 μ l de agua, guardar a -20°C.

3.2.4.4. Descongelación de células

Notas: Las células AD-293 pueden ser pasadas más de 30 veces. Es importante conservar en nitrógeno líquido alícuotas de pases primerizos. No pipetear nunca líquidos encima de la monocapa de células, sino en las paredes de los recipientes.

1. Poner 10 ml de *growth medium* (DMEM con 4,5 g/L de glucosa, 110 mg/L sodium pyruvate y 4 mM L-glutamina, y aditivado con 10 % (v/v) de serum fetal bovino (inactivado por calor) en un falcon de 15 ml cónico.
2. Descongelar el criovial con las células agitando suavemente en un baño a 37°C durante 40"-60" \rightarrow descontaminar sumergiendo el criovial en alcohol 70 % v/v a T.A.
3. Transferir las células descongeladas al falcon con los 10 ml de *growth medium*.
4. Centrifugar 5' a 200 g a T.A. \rightarrow Aspirar sobrenadante.
5. Resuspender el pellet de células con 5 ml de *growth médium*.
6. Poner 10 ml de *growth medium* en un frasco de 75 cm² \rightarrow transferir los 5 ml de la suspensión celular \rightarrow poner en incubador 37°C 5 % CO₂.
7. Monitorizar las células diariamente. Tripsinizar cuando la confluencia sea menor del 50 %. Proceder a hacer estocs para nitrógeno líquido o hacer pases.

3.2.4.5. Congelación de células

1. Recolectar células “sanas” y en fase logarítmica (pero sin pasar del 50 % de confluencia → Aspirar medio → Tripsinizar 1'-3' con 1,5 ml de solución Tripsina-EDTA (0,53 mM EDTA, 0,05 % tripsina) (Tripsinizar con el tiempo mínimo posible).
2. Diluir las células con 8,5 ml de *growth medium* (el serum del medio inactiva la tripsina) → transferir en un falcon cónico de 15 ml → centrifugar 5' 600 g a T.A.
3. Aspirar sobrenadante → Resuspender el pellet con el mínimo de volumen de *growth medium* → contar [células].
4. Diluir la suspensión celular hasta 1×10^6 células/ml en *freezing medium* (50 ml DMEM con 4,5 g/L de glucosa, 110 mg/L sodium pyruvate i 4 mM L-glutamina + 40 ml serum fetal bovino inactivado + 10 ml DMSO → filtrado i esterilizado) → Alicuotar 1 ml en crioviales de 2 ml.
5. Protocolo congelación: -20°C hasta que se congele → -80°C O/N-2 días → nitrógeno líquido.

3.2.4.6. Pases de células AD-293

Notas: ¡Recordar! confluencia < 50 % (sino puede perder fenotipo adherente). A 50 %, se tiene de diluir en una ratio 1:10

1. Aspirar medio → Lavar una vez con PBS estéril.
2. Tripsinizar 1'-3' en 1,5 ml de Solución Tripsina-EDTA.
3. Diluir las células con 8,5 ml de *growth medium*.
4. Transferir 1 ml de la suspensión celular en un frasco de 75 cm² con 9 ml de *growth medium* → incubar a 37°C 5 % CO₂ → Monitorizar diariamente.

3.2.4.7. Preparación del estoc primario de adenovirus con plásmido pAdEasy-1 recombinado

Notas: Utilizar puntas de pipeta con filtro para evitar contaminaciones del adenovirus por aerosoles.

Preparar células AD-293 para la transfección: Aplicar $7-8 \times 10^5$ células AD-293 en una placa de 60 mm con 4-5 ml de *growth medium* 24 horas antes de la transfección.

Transfectan células AD-293:

1. Poner 250 µl de DMEM (serum-free, antibiotic-free) en un tubo de 5 ml de poliestireno.
2. Añadir 15 µl de *Gene Jammer transfection reagent* (Agilent Technologies # 204130) (3 µl/µg DNA) y mezclar pipeteando (no vortex) (el serum es un inhibidor

- en esta fase) → evitar que el reactivo concentrado toque la pared de plástico del tubo, puede inactivarlo.
3. Incubar a T.A. durante 5'-10'.
 4. Añadir para cada transfección 5 µg de plásmido pAdEasy-1 digerido con PacI y mezclar suavemente.
 5. Incubar a T.A. durante 5'-10'.
 6. Aspirar el medio de la placa de cultivo y añadir 2,25 ml de *growth medium* (con serum).
 7. Añadir la mezcla de transfección gota a gota y mover la placa para que se mezcle uniformemente → incubar a 37°C 5 % CO₂.
 8. Después de 3 horas, añadir otros 2,25 ml de *growth medium*.

A partir de este momento, en teoría, tiene que haber adenovirus en el medio: utilizar bata, guantes, etc.... y procedimiento adecuado.

9. Incubar las placas a 37°C durante 7-10 días → sustituir el medio cuando sea necesario (basado en el color): Si las células parecen bien adheridas a la placa, reemplazar el medio por 4 ml de *growth medium* fresco. Si en cambio se observan células libres por el medio, añadir un volumen igual de medio fresco.

Preparar estocs primarios virales:

1. Preparar un pequeño baño de hielo seco-metanol i un pequeño baño de agua a 37°C dentro de la campana.
2. Con cuidado, sacar el *growth medium* de las placas y lavar una vez con PBS. Ir con cuidado de no perder agrupaciones celulares presentes → Si se observan una mayoría de células en suspensión, pipetear el medio hasta resuspender la totalidad de células y transferirlo a un falcon de 15 ml. Centrifugar a baja velocidad, aspirar el medio y lavar con 0,5 ml de PBS estéril. Resuspender con 0,5 ml de PBS estéril y pasar al paso 5.
3. Añadir 0,5 ml de PBS en cada placa y hacer *scraping* con la placa inclinada.
4. Transferir la suspensión celular a un tubo de 1,7 ml con tapa de rosca. Si se realizaron duplicados de transformación con el mismo ADN, se pueden ir añadiendo las células en este paso.
5. Hacer 4 ciclos de congelación/descongelación pasando los tubos por el baño de hielo seco-metanol y el baño a 37°C alternativamente. Después de cada descongelación vortexar brevemente.
6. Centrifugar 10' a 12.000 g.
7. Transferir el supernadante, el cual contiene el estoc de virus primario, en un nuevo tubo. Alicuotar y guardar a -80°C (se pueden guardar durante más de un año).

3.2.4.8. Condiciones de infección y amplificación del estoc viral primario

Amplificación: La amplificación se realiza infectando cultivos de AD-293 con un estoc de virus de bajo pase → se debe minimizar la producción de *Replication-Competent Adenovirus*, que se produce de forma minoritaria en cada amplificación. Para evitarlo, realizar la amplificación con estocs de virus con el menor pase posible.

1. Para amplificar estocs virales, las células AD-293 tiene que estar al 50-70 % confluentes (mirar abajo: “Condiciones para la optimización de la infección”).
2. Diluir el estoc viral en el volumen mínimo de *growth medium* para cubrir las células y añadirlo a las placas.
3. Incubar durante 2 horas (mejor si puede ser con agitación orbital).
4. Añadir *growth medium*.
5. Después de unos días adecuado (mirar abajo “Monitorizar la infección”), recoger las células con el mínimo de volumen de PBS posible → lisar y centrifugar (mirar pasos 4,5,6 i 7 de “Preparando los estocs primarios virales”).

Infección: Puede ser realizada simplemente añadiendo solución de partículas virales en placas con cultivos celulares.

Condiciones para la optimización de la infección:

- Una multiplicidad de infección (MOI → N° de virus por célula en la infección) alta (10-20) sirve para cultivos que están cerca de la confluencia → Células que dejan de dividirse.
- Una MOI baja es óptima para cultivos con una confluencia del 50 %: solo una fracción se infecta y el resto continúan multiplicándose hasta que se infecten.

Confluencia	Células necesarias para placa de 60 mm	Células necesarias para placa de 100 mm
50%	$1,5 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$
75%	$2,5 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$
100%	$3,5 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^6$

Monitorizar la infección:

Para controlar el progreso de una infección viral, es necesario observar cambios fenotípicos en las células infectadas. Las células muestran evidencias de un efecto citopático (CPE): tienen una forma redonda y desprendida de la placa, y el núcleo sufre una expansión importante debido al alto nivel de producción de virus (figura 3.25). Niveles altos de MOI mostraran CPE completo y las células se pueden recoger en solo 3 días, mientras que niveles más bajos de MOI tendrán que incubar más tiempo hasta que se observe CPE (hasta 10 días).

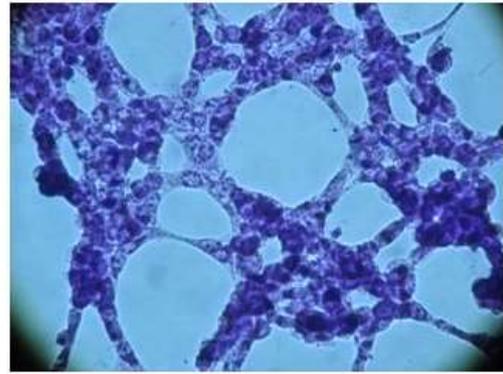
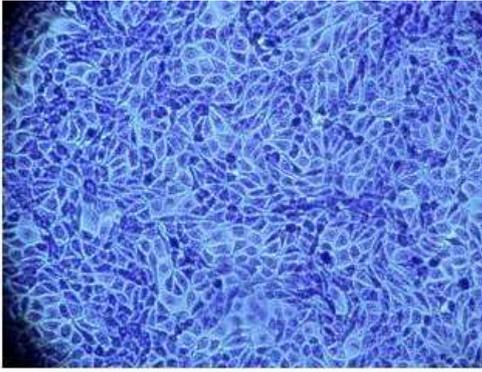


Figura 3.25: Efecto citopático en una monocapa de células MDBK (Riñón bovino) por el virus de la diarrea viral bovina. **Izquierda:** monocapa en estado basal, **derecha:** células infectadas con efecto citopático.

3.2.4.9. Expresión de la proteína de interés en el tipo celular escogido

La eficacia de la expresión de la proteína dependerá mucho del tipo celular y del gen a expresar. Puede ser necesario variar el MOI para conseguir una expresión del gen óptimo. En muchos casos, la expresión del gen puede ser detectable entre 34-72 horas después de la transducción (Ab α CBP). Es recomendado hacer un ensayo de evolución en el tiempo para determinar el momento óptimo de expresión del gen.

3.2.4.10. Control LacZ: Detección y aplicaciones

El vector control pShuttle-CMV-LacZ puede ser utilizado para monitorizar varias etapas durante el procedimiento de AsEasy. Par detectar la presencia de *LacZ* las células son teñidas con X-gal:

1. Fijación de las células:
 - a. Preparar la solución de fijación: 0,05% glutaraldehído en PBS (24 μ l de 25% glutaraldehído en 12 ml de PBS).
 - b. Aspirar el medio y añadir la solución de fijación.
 - c. Incubar 10' a T.A.
2. Tinción de las células:
 - a. Aspirar la solución de fijación y lavar con PBS 3 veces:
 - i. Lavado rápido.
 - ii. Lavar 10'.
 - iii. Lavado rápido.
 - b. Preparar solución de tinción:

Reactivo	Peso molecular	[estoc]	50 ml (en PBS)	100 ml (en PBS)
MgSO ₄	246,48	100 mM	1,23 gr	
K ₃ Fe(CN) ₆	329,26	500 mM		16,46
K ₄ Fe(CN) ₆	422,41	500 mM		21,12

Solución estoc	Para 1 ml	Para 10 ml	Para 12 ml	[final]
PBS	820 µl	8,2 ml	9,84 ml	
MgSO ₄ 100 mM	20 µl	200 µl	240 µl	2 mM
K ₃ Fe(CN) ₆ 500 mM	70 µl	700 µl	840 µl	35 mM
K ₄ Fe(CN) ₆ 500 mM	70 µl	700 µl	840 µl	35 mM
X-gal 50 mg/ml*	20 µl	200 µl	240 µl	1 mg/ml

*Añadir justo antes de utilizar

- c. Añadir solución de tinción (el mínimo posible para cubrir las células) e incubar al menos 1 h a 37°C.

Control de la transfección:

Para controlar el éxito de la transfección con el plásmido pAdEasy-1 recombinante + LacZ digerido con Pacl en células AD-293 se ha de teñir cuando la transfección tiene un mínimo de 2 días.

Control del virus:

Se puede utilizar la tinción con X-gal en células infectadas con adenovirus para:

1. Confirmar que la transfección se ha producido y que hay producción de partículas virales.
2. Estimar la titulación de estoc para transfecciones o amplificaciones.
3. Testar la habilidad del adenovirus para infectar un tipo celular concreto. 3 días de incubación postinfección es adecuado para detectar la presencia de *LacZ*.

3.2.4.11. Reactivos protocolo TAP

Buffer de lisis: Suplementar la cantidad de buffer de lisis necesaria para un día de trabajo con (per 1 ml de buffer):

- 10 µl de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma #P8340).
- 10 µl de 100 mM PMSF (inmediatamente antes de usar).

Mezclar suavemente por inversión.

Guardar a 4°C.

Streptavidin binding buffer (SBB): Los mejores resultados se obtienen cuando se prepara 24 horas antes, pero se puede almacenar durante 2 semanas a 4°C. Suplementar con (para 10 ml de SBB):

- 7 µl de 14,4 M β-mercaptoethanol.
- 100 µl de 100 mM PMSF (inmediatamente antes de usar).

Mezclar suavemente por inversión.

Streptavidin elution buffer (SEB): Suplementar la cantidad de SEB necesaria para un día de trabajo. Los mejores resultados se obtienen cuando se prepara 24 horas antes. Suplementar con (per 10 ml):

- 7 µl de 14,4 M β-mercaptoethanol.
- 100 µl de 100 mM PMSF (inmediatamente antes de usar).

Mezclar suavemente por inversión.

Calmodulin binding buffer (CBB): Los mejores resultados se obtienen cuando se prepara 24 horas antes, pero se puede almacenar durante 2 semanas a 4°C. Suplementar con (para 10 ml de CBB):

- 7 µl de 14,4 M β-mercaptoethanol.
- 100 µl de 100 mM PMSF (inmediatamente antes de usar).

Mezclar suavemente por inversión.

Calmodulin elution buffer (CEB): Los mejores resultados se obtienen cuando se prepara 24 horas antes, pero se puede almacenar durante 2 semanas a 4°C. Suplementar con (para 10 ml de CEB):

- 7 µl de 14,4 M β-mercaptoethanol.

No poner inhibidores de proteasas (puede interferir en el análisis de las proteínas).

Mezclar suavemente por inversión.

3.2.4.12. Protocolo TAP

Notas:

- Realizar toda la purificación a 4°C para prevenir la disociación de las interacciones.
- Se recomienda utilizar tubos antiadherentes, especialmente en la fase de purificación con resina de calmodulina, para evitar la pérdida (por adhesión) de proteínas muy poco concentradas.
- Se recomienda utilizar 10 frascos T175 (cada uno aproximadamente con 10⁷ células) para hacer un análisis posterior de MS (procesar todos a la vez). Para WB, hay suficiente con un T175.

Extractos de proteínas:

#	Etapa protocolo	10 ⁷ cel.	10 ⁸ cel.
1	Resuspender células con buffer de lisis en tubos de PP. Realizar 3 rondas de congelación/descongelación (10' en hielo seco o 20' a -80°C + 10' en agua fría)	1 ml buffer lisis	10 ml buffer lisis
2	Centrifugar 10' a 16,000 g → recoger sobrenadante		
3	Coger una pequeña alícuota del sobrenadante (5 µl) para posterior análisis en WB i guardar a -20°C		
4	Para cada ml de lisado celular, añadir 0,5 M EDTA i 14,4 M β-mercaptoethanol	4 µl EDTA 0,7 µl β-M	40µl EDTA 7 µl β-M

Preparar la resina de estreptavidina:

#	Etapa protocolo	10 ⁷ cel.	10 ⁸ cel.
5	Centrifugar la resina de estreptavidina (50% slurry) 5' a 1500 g. Descartar sobrenadante para eliminar el etanol del buffer de almacenamiento. Resuspender la resina en 1 ml de SBB. Si procesas múltiples lisados, se puede preparar y lavar la resina total junta y con 1 ml de SBB. Repetir el lavado 2 veces en total.	50 µl slurry (25 µl resina) 1 ml SBB	500 µl slurry (250 µl resina) 1 ml SBB
6	Centrifugar 5' a 1500 g i resuspender la resina con SBB	25 µl SBB	250 µl SBB

Purificar los complejos proteicos con resina de estreptavidina:

#	Etapa protocolo	10 ⁷ cel.	10 ⁸ cel.
7	Añadir el lisado de la etapa #4 a la resina de estreptavidina (50% slurry)	50 µl slu.	500 µl slu
8	Rotar el tubo a 4°C per 2 h.		
9	Centrifugar 5' a 1500 g. Sacar el sobrenadante y congelar para posterior análisis (5 µl). Resuspender la resina con 1 ml de SBB por rotación 5' a 4°C. Repetir el lavado (2 veces en total)	1 ml SBB	1 ml SBB

10	Centrifugar 5' a 1500 g. Descartar sobrenadante. Añadir SEB.	100 µl SEB	1 ml SEB
11	Rotar 30' a 4°C para eluir los complejos proteicos.		
12	Centrifugar 5' a 1500 g. Transferir el sobrenadante con cuidado a un nuevo tubo.		
13	Coger una pequeña alícuota del sobrenadante (0,5 µl + 4,5 µl H ₂ O) para posterior análisis en WB y guardar a -20°C		
14	Añadir el suplemento del sobrenadante de estreptavidina (SSS) al sobrenadante. Después, añadir CBB al sobrenadante.	2 µl SSS 400 µl CBB	20 µl SSS 4 ml CBB

Preparar la resina de calmodulina:

#	Etapa protocolo	10 ⁷ cel.	10 ⁸ cel.
15	Centrifugar la resina de calmodulina (50% slurry) 5' a 1500 g. Descartar sobrenadante para eliminar el etanol del buffer de almacenamiento. Resuspender la resina en 1 ml de CBB. Si se procesan múltiples lisados, se puede preparar y lavar la resina total junta con 1 ml de CBB. Repetir el lavado 2 veces en total.	25 µl slurry (12,5 µl resina) 1 ml CBB	250 µl slurry (125 µl resina) 1 ml CBB
16	Centrifugar 5' a 1500 g i resuspender la resina con CBB.	12,5 µl SBB	125 µl SBB

Purificar los complejos proteicos con resina de calmodulina:

#	Etapa protocolo	10 ⁷ cel.	10 ⁸ cel.
17	Añadir el eluido de la etapa #14 a la resina de calmodulina (50% slurry)	25 µl slu.	250 µl slu
18	Rotar el tubo a 4°C por 2 h.		
19	Centrifugar 5' a 1500 g. Sacar el sobrenadante y congelar para posterior análisis (2,5µl + 2,5 µl H ₂ O). Resuspender la resina con 1 ml de CBB por rotación 5' a 4°C. Repetir el lavado (2 veces en total)	1 ml CBB	1 ml CBB
20	Centrifugar 5' a 1500 g. Descartar sobrenadante. proceder a las etapas 21a o 21b para eluir los complejos proteicos de la resina de calmodulina según el método de análisis escogido. Si la purificación se ha de hacer en condiciones nativas para posteriores aplicaciones, como puede ser determinar actividades enzimáticas, eluir según 21a. Si la purificación se ha de analizar por otros métodos, como puede ser MS o inmunobloting, proceder al método por ebullición según 21b.		

21a	Método de elución: Añadir CEB y rotar durante 30' a 4°C para eluir los complejos proteicos. Centrifugar 5' a 1500 g y transferir con cuidado el sobrenadante a un nuevo tubo (contiene los complejos proteicos). Aditivar con 10% glicerol para prevenir la pérdida de actividad enzimática en las fases de congelación/descongelación. Se puede guardar a -20°C.	50 µl CEB	500 µl CEB
21b	Método de ebullición: Resuspender con un volumen igual a la resina de 1X loading buffer adecuado. Hervir 5' y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Se puede guardar a -20°C.		

Una vez obtenidos las eluciones con los complejos proteicos se procede a realizar electroforesis bidimensionales (2D) (tiras de 7 y 24 cm) y tinciones de geles de acrilamida en plata siguiendo los mismos protocolos descritos en “Métodos: Interactómica de la proteína KAP: Pull-down”.

3.2.5. Western Blot (WB)

Los primeros 6 pasos del protocolo explica de forma resumida una electroforesis SDS-Page en gel de acrilamida de muestras proteicas a analizar. Para ver esta fase con más detalle consultar “Métodos: Producción y purificación de la proteína KAP recombinante en bacteria”. El protocolo es para realizar WB con dos geles de acrilamida.

1. Preparar gel acrilamida a un % de acrilamida según el tamaño de la proteína, y el espesor de los geles según el volumen de muestra (1 mm hasta 20 µl, >20 µl 1,5 mm).
2. Preparar 500 ml de tampón de electroforesis SDS a partir de 5x.
3. Montar la cubeta de electroforesis con el/los geles y añadir unos 450 ml del tampón de electroforesis, teniendo en cuenta que la parte interior (entre los geles) tiene que quedar lleno hasta arriba. El resto del tampón se reserva por si en el transcurso de la electroforesis hace falta añadir (se evapora).
4. Aplicar las muestras de proteína en los pocillos con una jeringa Hamilton (al primer pocillo aplicar de 7 a 10 µl de marcador de pesos moleculares). La muestra tiene que tener los µg de proteína necesaria (empírico), hacer las diluciones convenientes y añadir buffer de carga 3x. El volumen final puede oscilar entre 15 y 50 µl.
5. Conectar la cubeta a la fuente eléctrica y aplicar entre 20-30 mA (amperios constantes) por gel.
6. Correr la electroforesis hasta que haya llegado a su fin (hasta donde quieras que corra, mirar el marcador de pesos moleculares).

7. Preparar 1L de buffer de electrotransferencia a partir de 3x i 20% metanol (poner en frío, prepara el buffer con tiempo, para que esté frío).
8. Montar el caset de electrotransferencia en el siguiente orden:
 - a. Parte negra del caset.
 - b. Esponja blanca mojada con buffer.
 - c. 2 papeles Watman mojados con buffer.
 - d. Gel de acrilamida.
 - e. Membrana de PDVF (Polivinilideno fluoruro) previamente activada → sumergirla con metanol 10" y lavarla 3 veces con agua destilada.
 - f. 2 papeles Watman mojados con buffer.
 - g. Esponja blanca mojada con buffer.
 - h. Cerrar el caset con la parte blanca.
9. Poner el/los casets a la cubeta de electroforesis, poner hielo y mosca (solo si se hace a T° ambiente) y llenar con buffer de electroforesis.
10. Conectar la cubeta a la fuente eléctrica y aplicar 400 mA (amperios constantes). Poner la cubeta encima de un agitador si se hace a T° ambiente. Realizar electrotransferencia durante 1h 30". **Opción O/N:** 70 mA (amperios constantes) en la cámara fría (no hace falta hielo ni agitación).
11. Lavar la membrana con PBS-tween.
12. Bloquear la membrana con 30-50 ml de solución bloqueante (% variable de BSA o leche desnatada en polvo con PBS-tween) mínimo 1h en agitación.
13. Incubar 1h con 5 ml (por gel) de solución de anticuerpo primario (la disolución es empírica, según el anticuerpo). El anticuerpo debe ir contra la proteína diana. La solución se prepara con la solución bloqueante, y la incubación se realiza a T° ambiente y con agitación. **Opcional:** También se puede efectuar una incubación O/N en la cámara fría para anticuerpos primarios "conflictivos" (con poca señal).
14. Lavar 15 minutos con PBS-tween a T° ambiente en agitador (x3).
15. Incubar 1h con 5 ml (por gel) de solución de anticuerpo secundario correspondiente (la disolución es empírica). El anticuerpo secundario debe ir contra el anticuerpo primario y está unido a HRP (HorseRadish Peroxidase). La solución se prepara con la solución bloqueante, y la incubación se realiza a T° ambiente y con agitación.
16. Lavar 15 minutos con PBS-tween a T° ambiente en agitador (x3).
17. Preparar 3ml (por membrana) de reactivo de detección *Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare #12316992) en un tubo tapado con papel de aluminio → las proporciones de los dos reactivos a mezclar están descritas en el kit. Hay dos tipos: ECL i ECL Plus (más sensible).
18. Colocar las membranas en una cajita de forma plana y aplicar el reactivo de detección por encima de toda la membrana sin tocarla. Tapar con papel de aluminio e incubar 5'.
19. Poner la membrana entre 2 plásticos transparentes (especiales para revelar) ponerlo dentro de un caset de revelado. Cerrar el caset.
20. Revelar con tiempos de exposición del film de revelar variados en una habitación de revelado (sin luz blanca).

3.2.6. Test de lactato deshidrogenasa (LDH)

Las células dañadas o muertas liberan Lactato Deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo de la que podemos detectar la actividad mediante espectrofotometría.

1. Sembrar las células en placas de 24 pocillos en la densidad deseada (PCT3 y HK-2: $0,2 \cdot 10^6$ cel/mL, 400 μ l/pocillo), y tratar en 500 μ l de medio/pocillo con tratamiento y tiempo necesarios para el experimento.
 2. Recoger el Sobrenadante (SN) y centrifugar 5 min. a 7000 rpm (4° C) y poner 75 μ l en una placa de 96 pocillos (por cada pocillo de la placa de 24 hacer 2 pocillos en la placa de 96).
 3. Lisar las células en tritón 0,4% en PBS 1X y dejar de 30 min. a 2 h. a 37° C o RT.
 4. Recoger el lisado y centrifugar 5 min. a 14.000 rpm y poner 75 μ l en una placa de 96 pocillos (por cada pocillo de la placa de 24 hacer 2 pocillos en la placa de 96).
- Kit de LDH de Roche Cytotoxicity detection Kit plus (LDH) de Roche (Cat. No. 04744926001)
5. 75 μ l de SN o lisado + 75 μ l Reaction Mixture (Rojo + azul).
 6. Incubar de 5 a 30 min. a RT en oscuridad.
 7. Añadir 37,5 μ l del reactivo STOP (tapón verde).
 8. Leer a 490nm.

- Cálculos:

$$\text{LDH release} = (\text{SN} / \text{SN} + \text{Lisado}) * 100$$

3.2.7. Producción de lentivirus e infección en células huésped

El siguiente protocolo sirve para obtener nuevas líneas celulares que expresen una proteína de interés, o silenciar su expresión, a través de un sistema de transfección lentiviral permanente.

Día 1

1. Sembrar células 293T al 80-90% de confluencia (aproximadamente 250.000-300.000 células/cm²) en DMEM-10% FBS-P/S. (Estos valores ya tienen en cuenta que algunas células se pierden durante la tripsinización y la transferencia a los frascos de virus finales).

Como las células 293T confluentes pueden desprenderse fácilmente de la placa, la superficie de la placa se puede recubrir opcionalmente con una matriz de polilisina.

Ejemplo: Sembrar 7.500.000 células 293T en un matraz T-30 cm² en 5 ml de medio.

2. Dejar que las células se adhieran a la placa durante 8-10 h (también es posible durante la noche, pero es menos preferido, ya que cuanto más recientemente se siembran las células, más eficiente es la transfección).
3. Prepare la solución de mezcla de transfección que contenga:

	Para un matraz T30-cm ²	Para un matraz T75-cm ²	Valor general
NaCl 150 mM (filtrado en 2 µm)	600 µl	1500 µl	20 µl/cm ²
DNA mix formado por:			
Vector de encapsulación (VSVG)	0,6 µg	1,5 µg	20 ng/cm ²
Vector de expresión reversa (RTR2)	0,6 µg	1,5 µg	20 ng/cm ²
Vector de empaquetado (PKGPIR)	1,8 µg	4,5 µg	60 ng/cm ²
Vector de transferencia (Vector de interés)	3 µg	7,5 µg	100 ng/cm ²
PEI (<i>Polysciences Inc. Ref. 23966</i>) 1 mg/ml a pH 7,45 y filtrado en 2 µm	30 µl	75 µl	1 µl/cm ² (=1 µg/cm ²)

Consideraciones:

- Cantidades más altas de DNA no aumentarán la eficiencia de la transfección y la producción de virus disminuirá.
- Los volúmenes de PEI se pueden reducir hasta en un 10%, pero los volúmenes más bajos disminuirán la eficiencia y los más altos de lo recomendado aumentarán la toxicidad celular.
- El último reactivo que se añade a la mezcla de transfección son los liposomas PEI. Debe ser añadido dentro de la mezcla y evitando el contacto directo con las paredes del tubo.
- Golpee suavemente la mezcla (no la agite si ya se ha agregado PEI).

Incubar la mezcla durante 15-20 min a TA.

4. Muy suavemente, cambiar el medio 293T para eliminar los restos celulares y agregar DMEM-10% FBS-P/S fresco atemperado con mucho cuidado. No es necesario lavar la placa con PBS.

Agregar aproximadamente 0,14-0,18 ml/cm². No poner volúmenes más bajos porque el PEI podría tener más toxicidad.

Volúmenes recomendados:

5 ml para un matraz T30, 12 ml para un matraz T75, 25 ml para un matraz T175.

5. Agregar la mezcla de transfección DNA-PEI, distribuyendo la solución de manera homogénea sobre la superficie de las células. Trate de no agitar o agitar demasiado el matraz, ya que las células pueden desprenderse con bastante facilidad.
6. Incubar de 12 a 16 h (normalmente de noche) a 37°C.

Día 2

7. Retirar el medio como antes y agregar DMEM-10% FBS-P/S atemperado (alternativamente, se puede usar medio Ultra Culture sin FBS, suplementado con L-glutamina).

Volúmenes recomendados:

5 ml para un matraz T30, 10 ml para un matraz T75, 25 ml para un matraz T175

Volúmenes mínimos:

3 ml para un matraz T30, 6 ml para un matraz T75, 16 ml para un matraz T175

-En este paso, se puede agregar butirato de sodio (Sigma) al medio a una concentración final de 10 mM (preparar una solución madre 1 M) para aumentar la producción de virus en 2-3 veces.

-Incubar durante 6-8 ha 37°C (exposiciones más largas pueden aumentar la muerte celular) y cambie el medio nuevamente asegurándose de que se elimine todo el butirato de sodio antes del volumen final del que se recolectará el virus.

Muy importante: Solo se puede añadir butirato de sodio si los virus producidos deben purificarse por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa antes de la infección celular. Si el sobrenadante 293T que contiene el virus se va a agregar directamente a las células sin ningún paso de purificación, ¡evitar la adición de butirato!

8. Incubar los matraces a 33 °C hasta 48 h después de la transfección. (33 °C es la temperatura ideal para la estabilidad de los lentivirus en el medio, aunque también se pueden producir a 37 °C).

La producción de virus comienza a las 24 h posteriores a la transfección y tiene un pico máximo a las 48 h que se mantiene hasta las 72 posteriores a la transfección.

Día 3

9. Sembrar la línea celular que desea infectar en una confluencia baja (aproximadamente un 10-20% de confluencia) (para células epiteliales: 10.000 células/cm²). Tener en cuenta que la placa tiene que estar creciendo durante 3 días y no se desea que alcance el 100% de confluencia y tampoco se recomienda la tripsinización en medio del proceso de infección del virus.

-Se aconseja sembrar la línea celular a infectar en matraces del mismo tamaño que el matraz de células 293T sembrado para producción viral.

-Sembrar un frasco adicional de células como control negativo para la infección.

10. Dejar que las células se adhieran durante aproximadamente 6 h a 37 °C. Este momento depende de la línea celular. Para las células de fijación difícil, se pueden sembrar el día anterior (DÍA 2); para las células de fijación rápida, este paso se puede acortar. Se recomienda verificar antes del tiempo necesario para cada línea celular.

Añadir Polybrene (bromuro de hexadimetrina, Sigma. Ref. 52495) al medio de las células a infectar a 8 µg/ml (stock a 1000X en H₂O). (Polybrene permeabiliza las células y las hace propensas a la infección viral y aumenta la eficacia de la infección de 2 a 3 veces.

11. Incubar estas células durante 1-2 h a 37 °C.

12. PRIMERA INFECCIÓN VIRAL (48 horas después de la transfección):

-Con mucha suavidad, recoger el medio de las células productoras de virus 293T y fíltrelo a través de un filtro de 0,45 µm.

-Agregar DMEM-10% FBS-P/S nuevo al matraz de células 293T (el mismo volumen utilizado para la primera ronda de recolección). Incubar el matraz a 33 °C durante 24 h más.

-Suplementar los medios filtrados con virus con FBS al 10%, Polybrene hasta 8 µg/ml y, opcionalmente, aminoácidos no esenciales (NEAA) hasta 1X (stock a 100X). El enriquecimiento del medio se realiza para compensar el hecho de que el medio ya ha sido utilizado por las células 293T y que el proceso de infección, que tiene lugar a 33 °C, es estresante para las células.

-Retirar el medio de la línea celular a infectar y agregue el medio filtrado y suplementado que contiene el virus.

-Incubar estas células a 33 °C durante 24h (si las células son muy delicadas, incubar a 33 °C O/N o durante 2-3 horas y 37 °C O/D o solo a 37 °C durante 24h).

Día 4

13. SEGUNDA INFECCIÓN VIRAL (72 h después de la transfección):

-Proceder como en la primera infección viral recolectando el medio 293T, filtrándolo y completándolo con FBS, Polybrene y NEAA.

-Añadir el medio preparado 72 h después de la transfección a los matraces de células infectadas sin retirar el medio de 48h postransfección añadido el día anterior.

-Incubar las células como antes a 33 °C durante 24h (si las células son muy delicadas, incubar a 33 °C O/N o durante 2-3 horas y 37 °C O/D o solo a 37 °C durante 24h).

-Los matraces de células 293T ahora se pueden desechar en los contenedores de virus apropiados (agregue lejía antes de desecharlos).

Día 5

14. Retirar el medio de infección de las células infectadas (y tírelo en un contenedor de virus apropiado con lejía), lavar el matraz con PBS y agregar su medio de cultivo normal e incubar a 37 °C.

Día 6 y/o posteriores

15. Seleccionar las células infectadas:

-En el caso de vectores de transferencia que contengan resistencia a los antibióticos, añada el antibiótico al medio en la concentración adecuada, cambiando el medio todos los días. Cuando todas las células del matraz de control negativo estén muertas, las células vivas restantes en los matraces infectados corresponden a la población infectada.

Para los vectores de transferencia shRNA de Mission Sigma, agregar Puromicina a 1 µg/ml (las células tardan de 2 a 4 días en seleccionarse, dependiendo de la línea celular).

-Para el vector de transferencia que contiene un marcaje fluorescente (como GFP, RFP, etc.), la fluorescencia comienza a aparecer después de 24 h de la infección. Para una producción celular estable, esperar al menos 3 días más para permitir que la expresión transitoria desaparezca antes de la clasificación celular de la población positiva.

La selección de la población infectada también se puede iniciar el día 5 de este protocolo si después de dos días de infección las células se ven bien. También se puede posponer algunos días para permitir que las células se recuperen de la infección y aumenten su expresión.

16. Para el shRNA de Mission Sigma, después de la selección con Puromicina, validar la regulación a la baja de la expresión por Western Blot o Real Time, etc. de los diferentes shRNA utilizados.

4. RESULTADOS

4.1. Interacción de KAP y CypB humana por técnica de Pull-down

Resultados de nuestro grupo han mostrado la capacidad protectora de KAP frente al daño renal por CsA y sugerido que es a través de la interacción de KAP con su receptor CypB, que tal efecto ocurre. Hasta el momento no hemos encontrado KAP en humanos ni una proteína homóloga a ella que pudiera hacer su función. Por ello, nos preguntamos si KAP, y eventualmente, algún péptido derivado de la misma, podría ejercer ésta y otras funciones en células de túbulo proximal humano. Nuestro primer objetivo fue determinar si KAP es capaz de interactuar con la CypB humana (hCypB), tal como lo hace con la CypB murina (mCypB), utilizando técnicas de pull-down, como se describe a continuación.

4.1.1. Producción y purificación de proteínas recombinantes GST, GST-KAP, mCypB y hCypB.

Por un lado, se han producido y purificado la proteína GST (Glutathione-S-Transferase) y la proteína de fusión GST-KAP, a fin de construir las dos columnas necesarias para realizar el Pull-down. Por otro lado, se ha producido y purificado la mCypB (Ciclofilina B murina) para comprobar que las columnas de Pull-down funcionan correctamente (la mCypB debería quedarse unida en la columna con GST-KAP). Y finalmente, se ha producido y purificado la hCypB (Ciclofilina B humana) para testar si también interacciona con KAP como su homólogo murino.

Producción y purificación preliminar de GST

Se realizó una pequeña producción preliminar de poca cantidad de GST para comprobar que el sistema de producción y purificación funcionaba perfectamente. En primer lugar, se realizó un pequeño cultivo de 100 ml con el vector GST vacío. Con el extracto obtenido, se realizó una cromatografía en una columna de Glutathione para retener el GST producido, eluyendo con un buffer 10 mM PBS pH 7,4 10 mM Glutathione reducido. Se recogieron alícuotas de 1 ml de la elución y se hizo un gel de acrilamida con tinción de Coomassie blue de las diferentes etapas de la cromatografía (Figura 4.1). En cada pocillo se cargaron 20 µl de cada muestra. El tamaño esperado del fragmento de GST producido es de 26 kDa. Se puede observar en el gel como existe una banda predominante de este tamaño. Las alícuotas del 1 al 7 fueron seleccionadas para realizar una segunda cromatografía (es recomendable que en toda purificación de proteínas recombinantes, exista por lo menos dos etapas de purificación).

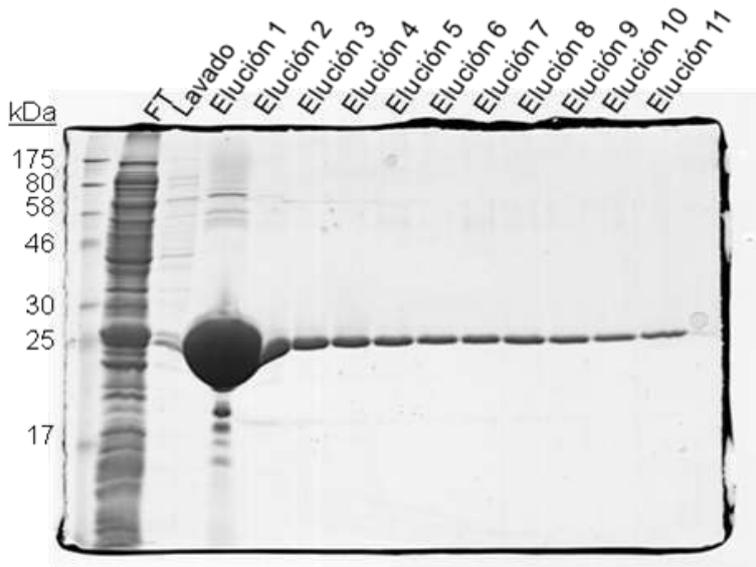


Figura 4.1: Purificación de GST en columna de Glutation.

Esta segunda cromatografía se realizó en una columna HiTrap Q (intercambio iónico). Se cargó en la columna las alícuotas seleccionadas de la cromatografía anterior y se eluyó con una concentración creciente de NaCl (buffer 10 mM PBS pH 7,4). Se recogieron alícuotas de 5 ml en cada etapa de la cromatografía y se realizó un gel de acrilamida con tinción de Coomassie Blue (20 μ l de cada alícuota, Figura 4.2). Se puede observar una banda predominante alrededor de 26 kDa, donde encontramos la GST con una mayor pureza que en la cromatografía anterior.

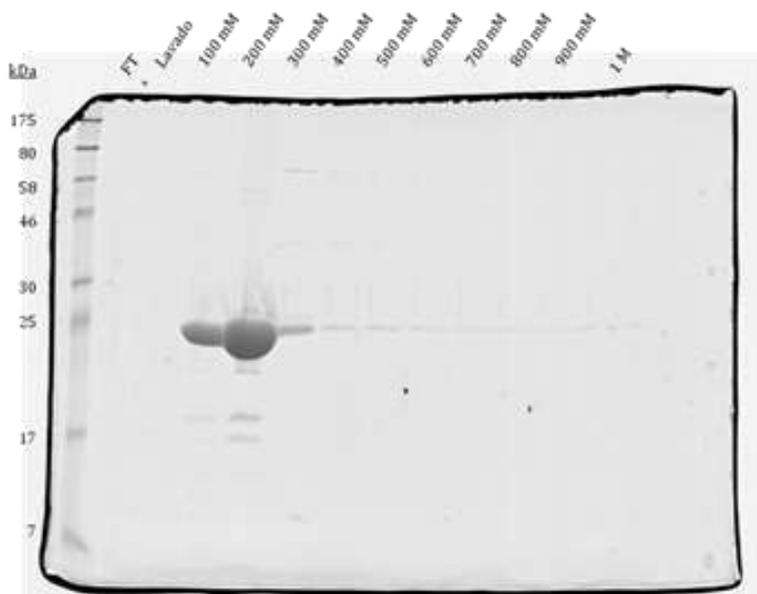


Figura 4.2: Segunda cromatografía con columna de intercambio iónico HiTrap Q FF.

Con esta pequeña purificación queda validado el método de producción y purificación de proteínas unidas al fragmento GST con esta doble cromatografía, ya que se consigue un alto grado de purificación.

Triple producción de GST y GST-KAP (para unión covalente en columna)

Una vez validado el método se realizaron varias producciones y purificaciones de distintos tipos de proteínas, escalando la producción a 1 L de cultivo. En primer lugar, se purifico el fragmento de GST solo (vector vacío) y la proteína de fusión GST-KAP. En la figura 4.3 podemos ver las eluciones finales de purificación en una de las producciones de GST y GST-KAP en un gel de acrilamida y tinción con Coomassie Blue. Debido al aumento de extracto a purificar, se realizó las cromatografías en tres columnas de forma paralela. El tamaño esperado de las bandas de las proteínas purificadas es de 26 kDa en el caso de la GST y de 39 kDa en el caso de la GST-KAP

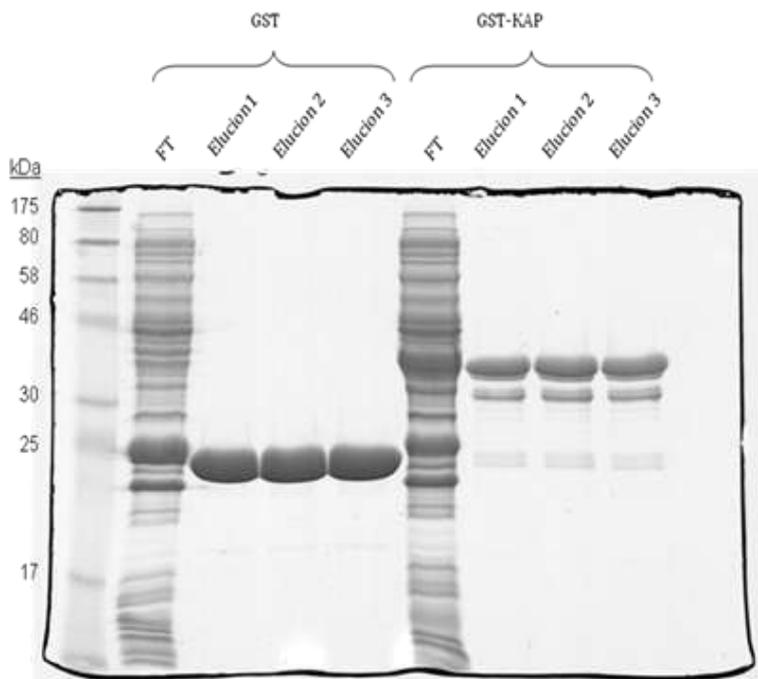


Figura 4.3: Triple purificación de GST y GST-KAP

Las alícuotas finales de cada purificación fueron unificadas y se concentró la solución final de proteína recombinante en un tubo Amicon de 3.000 Da de corte en una centrifuga (1 hora a 6.000g). Con el mismo tubo se realizan dos etapas de cambio de buffer (buffer 10 mM PBS pH 7,4, etapas de concentración-dilución) con el fin de eliminar el exceso de NaCl. El resultado final de la concentración es recogido en un tubo eppendorf y llevado hasta 1 ml con buffer 10 mM PBS pH 7,4. El resultado final de la producción y purificación de GST y GST-KAP es 1 ml de solución de cada proteína con las siguientes concentraciones:

- GST: 67,88 mg/ml
- GST-KAP: 17,21 mg/ml

Producción de GST-mCypB y GST-hCypB, digestión y purificación de mCypB y hCypB

Con el mismo procedimiento descrito anteriormente para la purificación de GST y GST-KAP, se purificaron las proteínas recombinantes de fusión GST-mCypB (CypB murina) y GST-hCypB (CypB humana). En la figura 4.4 se puede observar geles de acrilamida con tinción de Coomassie Blue de una de las etapas de la purificación de ambas proteínas, en este caso la cromatografía con la columna de Glutation. El tamaño esperado de las bandas para ambas proteínas (GST-mCypB y GST-hCypB) es de 46 kDa.

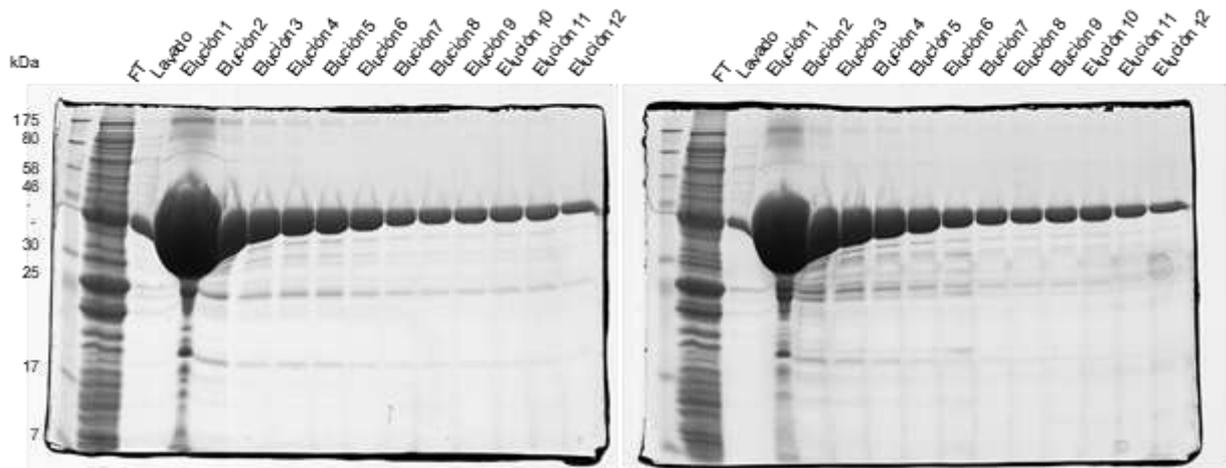


Figura 4.4: Purificación de GST-mCypB (Izquierda) y GST-hCypB (Derecha) en columna de Glutation.

En este caso, la proteína recombinante final que nos interesa no son las proteínas de fusión GST-mCypB y GST-hCypB, sino las ciclofilinas aisladas sin su tag de purificación GST. Para poder deshacernos de la GST existe una diana de digestión proteolítica con PreScission entre las dos proteínas. Por tanto, cada alícuota de 1 ml de proteínas purificadas GST-mCypB y GST-hCypB se trató con 10 U (5 µl) de proteasa PreScission. Como se puede observar en la figura 4.5, la digestión de la proteasa no es completa, así que queda una mezcla de GST-xCypB, GST y xCypB. Con tal de deshacernos de la GST libre y la GST-xCypB y quedarnos únicamente con las xCypB, se realiza una segunda cromatografía con la columna de Glutation. Esta vez nos quedamos con el FT, ya que el GST-xCypB y GST se quedarán unidas a la columna, y las xCypB saldrán de la columna sin unirse. Además, en la columna de Glutation también quedará unida la proteasa PreScission, ya que en realidad esta proteasa es una proteína de fusión unida a GST. De esta forma, en el producto final también nos deshacemos de la proteasa, y solo obtenemos nuestra proteína de interés altamente purificada. Para siguientes purificaciones de ciclofilinas, se realizaron las digestiones con 15 U de PreScission, digiriéndose prácticamente el 100%. En la figura 4.5 se puede observar las dos ciclofilinas finalmente purificadas. El tamaño esperado de las bandas de cada ciclofilina es de 21 kDa. El último paso es la concentración y cambio de medio con buffer 10 mM PBS pH 7,4, llegando a 1 ml de cada purificación con las siguientes concentraciones:

- mCypB: 5,55 mg/ml
- hCypB: 4,10 mg/ml

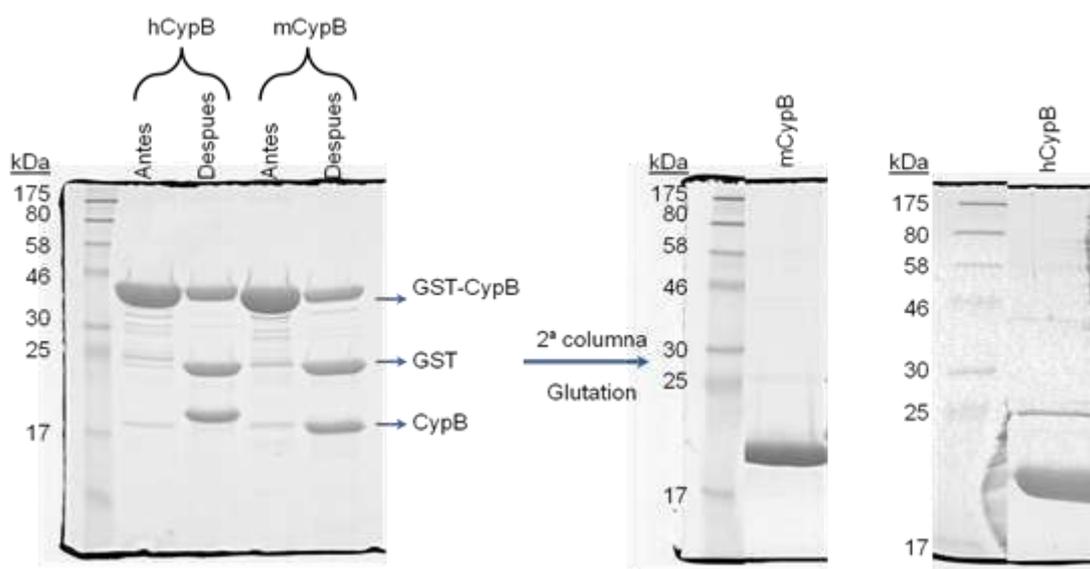


Figura 4.5: Digestión (Izquierda) y 2ª purificación en columna de Glutation (Derecha): mCypB y hCypB purificado.

4.1.2. Pull-down con mCypB y hCypB recombinantes

Se ha construido las dos columnas con GST y GST-KAP unidas covalentemente con 17,21 mg de GST-KAP y 20 mg de GST. El rendimiento de la unión de la proteína en las respectivas columnas ha sido cerca del 100% (Datos no mostrados). Para validar a la columna GST-KAP como una buena herramienta de Pull-down, se realizó Pull-down con la proteína recombinante mCypB, cuya interacción con KAP ha sido previamente descrita en nuestro laboratorio (Cebrian C, 2001). Para ello, 2 mg de mCypB recombinante en 5 ml 10 mM PBS, 0,4 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂ se hicieron pasar por la columna GST-KAP. Como podemos observar en la figura 4.6, el gel de acrilamida muestra una banda de mCypB (21 kDa) en el FT después de haber pasado por la columna (exceso de mCypB) que desaparece después de realizar diversos lavados (3 x 10 ml 10 mM PBS). Luego, esta banda vuelve a aparecer después de realizar una elución con 10 ml 50 mM Glicina pH 2,5 + 1,7 ml 100 mM TRIS pH 10,5, lo que significa que, efectivamente, la mCypB había sido retenida en la columna por, previsiblemente, interaccionar con KAP, lo que validaría la columna GST-KAP con buen método para retener proteínas que interaccionen con KAP. En el momento de realizar esta prueba consideramos, de forma errónea, que no era necesario realizar un Pull-down con la columna GST, ya que este paso demostraría que la retención de la mCypB en la columna GST-KAP era debida a la interacción con la KAP, y no por una interacción inespecífica con la GST u otros componentes de la columna.

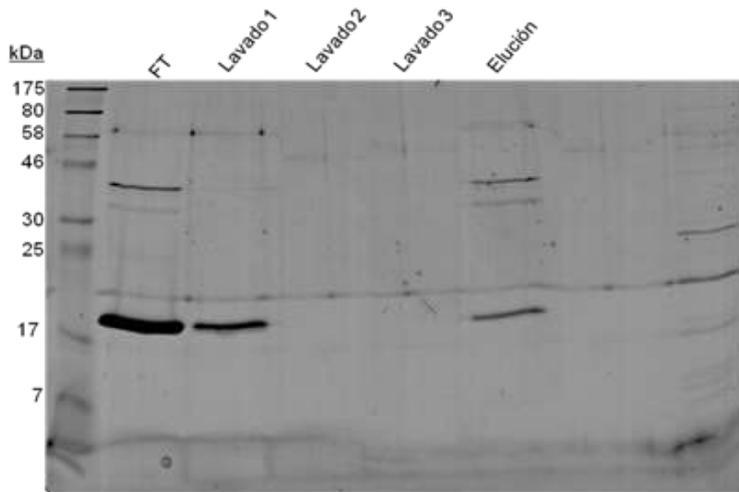


Figura 4.6: Pull-down en columna GST-KAP de mCypB

En ese momento, el siguiente paso era demostrar con esta técnica de Pull-down si la versión humana de la ciclofilina B (hCypB) es capaz, también de interactuar con KAP. En esta ocasión sí que se realizó el Pull-down tanto en la columna GST como en la columna GST-KAP, para demostrar que, en caso de que la hCypB se quede retenida en la columna GST-KAP es debido a la interacción de KAP, y no por cualquier otra interacción inespecífica, ya sea con la GST o con cualquier otro componente de la columna. En la figura 4.7 se pueden ver sendos geles de acrilamida con los diferentes pasos del Pull-down de hCypB en columna GST y GST-KAP. Se puede observar cómo, después de los lavados suficientes (en los que desaparece la banda de la hCypB, 21 kDa), y tras eluir sendas columnas, esta banda vuelve a aparecer en el caso de la columna GST-KAP y no en el caso de la columna GST (recuadros rojos).

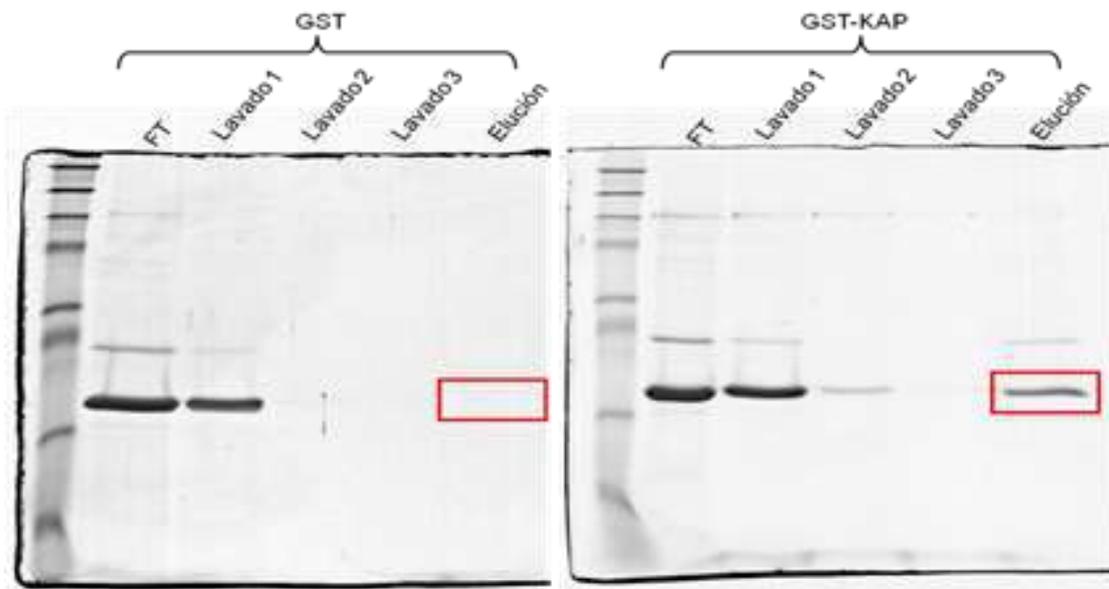


Figura 4.7: Pull-down de hCypB en las columnas GST y GST-KAP

Estos resultados muestran que, efectivamente, KAP puede interactuar con la CypB humana, además de la CypB murina, reforzando nuestra idea de que KAP podría tener un efecto en humanos a través de su interacción con CypB u otras proteínas y tener por tanto un valor a nivel traslacional y comenzar a estudiar los efectos de la KAP en células derivadas de túbulo proximal humano.

En base a los resultados obtenidos con CypB, nuestro siguiente objetivo fue identificar otras proteínas humanas capaces de interactuar con la proteína KAP murina en células HK-2 utilizando el sistema *Tandem Affinity Purification* (TAP) en células humanas HK2. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación.

4.2. Identificación de proteínas de unión con KAP y hCypB: Tandem Affinity Purification (TAP)

Como ya se ha comentado en la introducción, no se conoce ningún equivalente de gen humano de la KAP. Ya se ha demostrado en el apartado anterior que KAP puede interactuar con la versión humana de CypB, por tanto, si encontramos más interactores que nos indique qué efecto podría tener la proteína KAP para prevenir la toxicidad por CsA y el desarrollo del SM, por ejemplo, se podría sugerir nuevos procesos en los que la KAP pudiera estar involucrada, proponiéndose el uso de la misma como fármaco o analizando la posibilidad de utilizar sus proteínas interactoras como potenciales dianas.

Se ha realizado un ensayo de interactómica basado en el sistema TAP (*Tandem Affinity Purification*), que consiste en expresar en células dianas la proteína a estudiar unida a un doble tag de purificación. En nuestro caso utilizamos un sistema de transfección transitoria adenoviral mediante el kit comercial de Agilent® *InterPlay Adenoviral TAP System* (Cat No. 240213) que consiste en:

- Producción de Adenovirus con el gen a estudiar.
- Infección adenoviral de las células diana: doble purificación.
- Análisis diferencial de los perfiles proteicos.

Se ha clonado el gen de la KAP sin el péptido señal (KAP-SPS) y el gen de la hCypB unidos a un doble tag de purificación: Calmodulin Binding Peptide (CBP) y Streptavidin Binding Peptide (SBP), unidos tanto en C-terminal como en N-terminal en un sistema de producción adenoviral, que expresan estas proteínas recombinantes en las células dianas escogidas. Además, el propio kit contiene otro gen a expresar, *Chloramphenicol AcetylTransferase* (CAT), que se utilizará para poder hacer el análisis diferencial y descartar esas proteínas de interacción inespecífica. En total se han producido 5 tipos diferentes de Adenovirus que expresan 5 proteínas recombinantes (Figura 4.8).

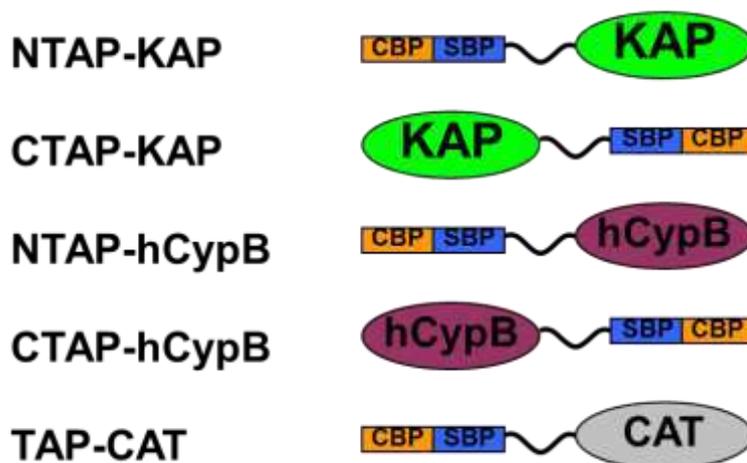


Figura 4.8: Construcciones de los 5 tipos de proteínas que producirá la transfección adenoviral. Se produce la KAP-SPS y hCypB con el doble tag de purificación (CBP+SBP) unido tanto en C- como N-terminal. TAP-CAT es la proteína utilizada para el análisis diferencial.

En cada etapa de clonación se seleccionaron varias colonias que fueron analizadas por PCR. De esta forma solo se seleccionaban las colonias con el gen transfectado mediante un gel de agarosa (Figura 4.9). Las bandas de interés se cortaron y los productos eluidos se secuenciaron para comprobar que no contenían ninguna mutación.

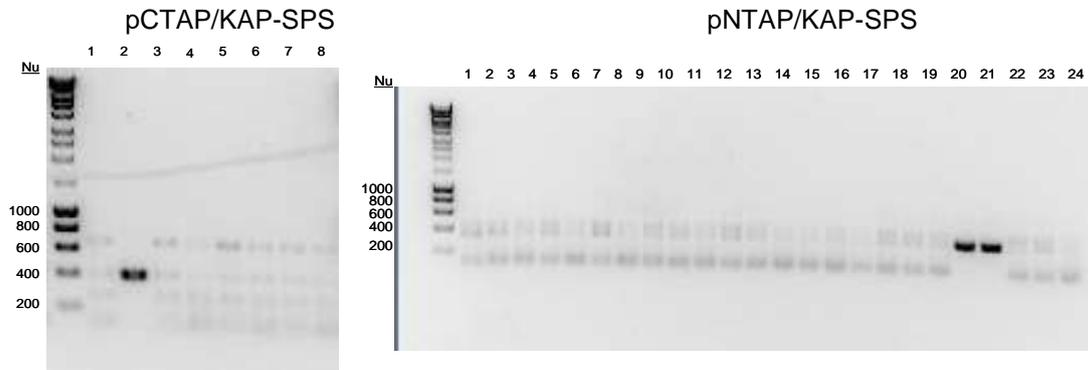


Figura 4.9: Ejemplos de geles de agarosa con el producto de una PCR de diversas colonias de clonación con el vector Shuttle. En este caso se trata de la clonación del gen KAP-SPS con doble tag de purificación en el C-terminal (pCTAP/KAP-SPS) y en el N-terminal (pNTAP/KAP-SPS). Se observan en total 3 colonias positivas con una banda que se sitúa en la medida esperada (Número de nucleótidos).

A continuación, se infectaron células HK2 (células de túbulo contorneado proximal humanas) tal como explica el protocolo y se comprobó la expresión de las proteínas de interés por técnica de western blot (Figura 4.10). Para detectar las proteínas CTPA-KAP-SPS y NTAP-KAP-SPS se utilizó como anticuerpo primario α -KAP1 (Cebrián C, 2001), y para el resto α -CBP. Se comprobó que las bandas aparecían en la posición de peso molecular esperado: 25 kDa para CTPA-KAP-SPS y para NTAP-KAP-SPS, 28 kDa para CTPA-hCypB y NTAP-hCypB y 31 kDa para TAP-CAT.

Un factor importante a tener en cuenta en este tipo de expresión heteróloga por transfección temporal adenoviral es la cantidad de adenovirus por célula infectada necesaria para obtener una expresión satisfactoria. Esta cantidad de adenovirus se expresa como MOI (multiplicidad de infección), que es el número de partículas virales que pueden infectar cada célula en el recipiente de cultivo. Se debe calcular el MOI óptimo para cada tipo celular (en nuestro caso células HK2) y para adenovirus (con su gen integrado), buscando la máxima expresión heteróloga, pero sin llegar a producir toxicidad celular (Figura 4.10).

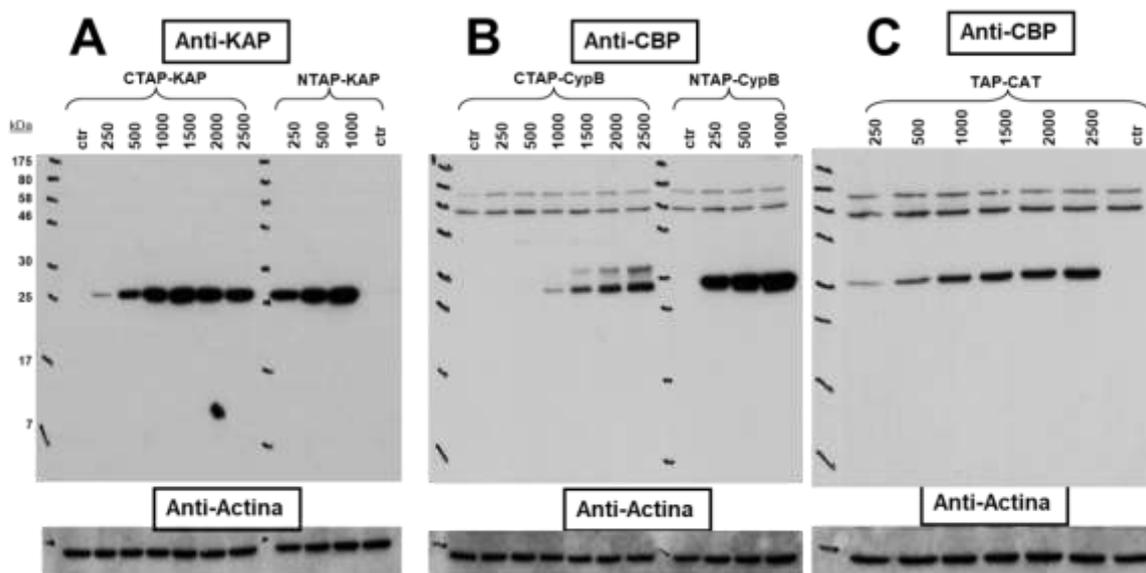


Figura 4.10: Western blot de extractos celulares de HK2 infectados con los distintos tipos de adenovirus: **A)** CTAP-KAP-SPS y NTAP-KAP-SPS con α -KAP1 **B)** CTAP-hCypB y NTAP-hCypB con α -CBP **C)** TAP-CAT con α -CBP. Se han hecho diferentes infecciones con diferentes MOI's para obtener la expresión óptima, sin llegar a la toxicidad celular.

Se obtuvieron la siguiente relación de MOI's como las más óptimas:

Adenovirus	MOI
NTAP-KAP-SPS	900
CTAP-KAP-SPS	1.500
NTAP-hCypB	900
CTAP-hCypB	5.000
TAP-CAT	1.500

Una vez calculado el MOI óptimo se realizó la infección en células HK2. Se sembraron 5 placas de 150mm de diámetro para cada tipo de adenovirus, y se realizó la infección cuando estaban al 50% de confluencia. Se dejó crecer el cultivo hasta llegar a un 90-100% de confluencia, sin dejar que se llegue a más para evitar posibles cambios moleculares debido a la postconfluencia. Se realizaron los extractos celulares de las 25 placas. Para poder optimizar el proceso de la doble purificación se hicieron varias pruebas con pequeñas alícuotas de estos extractos (Figura 4.11). Sin embargo, a pesar que la primera purificación con resina SBP siempre fue bien, en todos los casos siempre falló la segunda purificación (resina de unión al CBP).

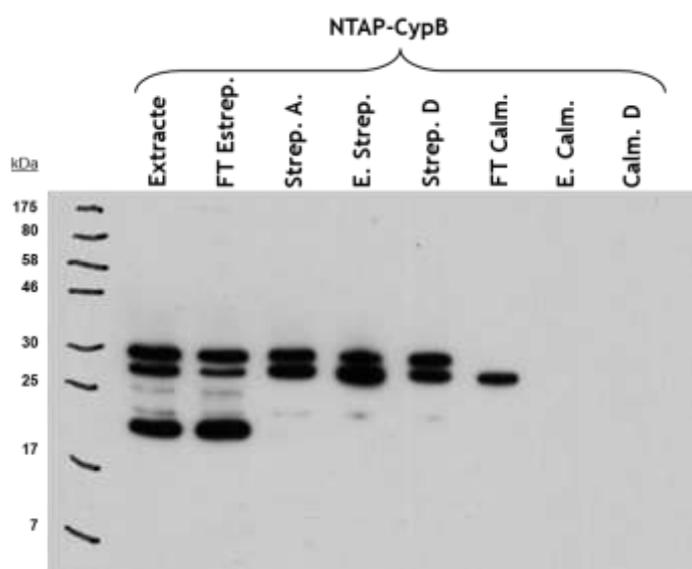


Figura 4.11: Ejemplo de western blot de la doble purificación con un extracto celular infectado con NTAP-hCypB. Se puede observar como la segunda purificación con CBP falla, perdiendo la proteína: no se encuentra ni en la elución de la proteína (“E. calm.”) ni unida a la resina (“calm. D”).

A pesar de que la doble purificación falló se planteó la posibilidad de que, con una sola purificación (con la resina de unión a la SBP) fuera suficiente para hacer un análisis diferencial. Se realizó la purificación de los 5 tipos de extractos celulares con la resina de unión a la SBP y se hicieron geles 1D de estos extractos con tinción de plata (Figura 4.12).

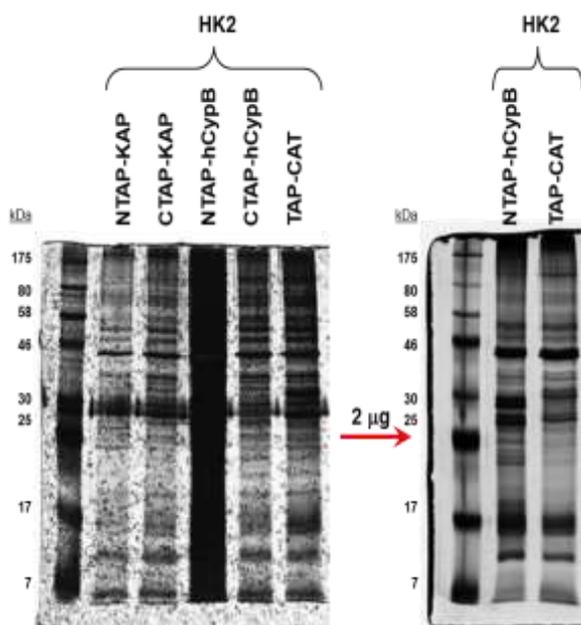


Figura 4.12: Geles de acrilamida teñidos en plata de los diferentes extractos celulares infectados con los 5 tipos de adenovirus. Primero se realizó un gel cargando 10 µl de extracto (izquierda). Como en dos de ellos (NTAP-hCypB y TAP-CAT) había demasiado señal, se repitió el gel, esta vez cargando solo 2 µg de proteína del extracto (derecha).

Se pudo observar que había patrones de bandas diferenciales significativos entre los extractos de NTAP-KAP-SPS, CTAP-KAP-SPS, NTAP-hCypB, CTAP-hCypB y el extracto de TAP-CAT, por lo que se consideró que una sola purificación con resina de unión a SBP era suficiente para seguir con el análisis diferencial y deducir proteínas de unión a KAP-SPS y hCypB.

4.2.1. Análisis diferencial de los perfiles proteicos

Una vez obtenidos los extractos celulares purificados con resina de unión a la SBP de los 5 tipos de infección adenoviral se procedió a analizar los perfiles proteicos de cada extracto, y así identificar aquellas proteínas que estaban en los extractos celulares de NTAP-KAP-SPS, CTAP-KAP-SPS, NTAP-hCypB, CTAP-hCypB y que a su vez no estuvieran en el extracto celular de TAP-CAT, para descartar uniones inespecíficas. Para realizar el análisis de los perfiles proteicos se contrataron los servicios de la empresa Bioproximity (Chantilly, United States), empresa especializada en análisis proteicos por Espectrometría de Masas (MS). Concretamente se trata de un análisis con una cromatografía de gel filtración en HPLC (separación de las proteínas) seguida en tándem por una espectrometría de masas por electroesprai (ESI-TOF, identificación de las proteínas) (Figura 4.13).

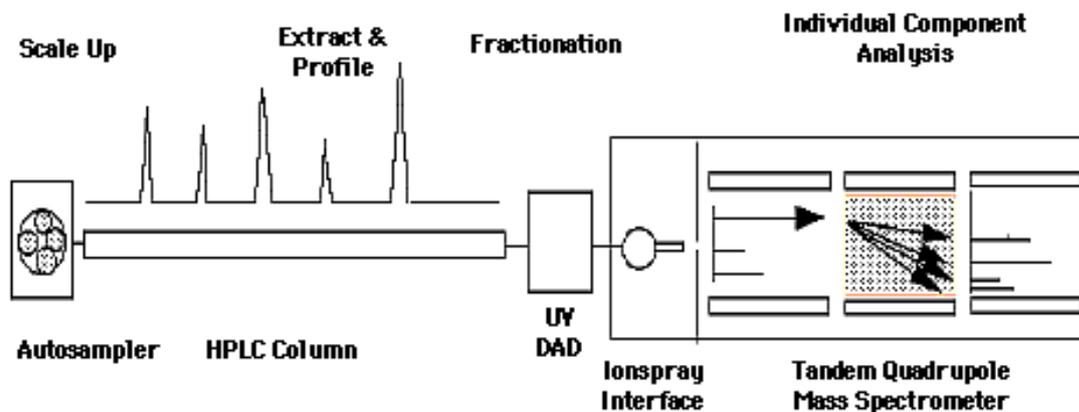


Figura 4.13: Esquema de un HPLC en tándem con un ESI-TOF (MS) para identificar las proteínas en los extractos celulares.

Una vez obtenidas las listas de las proteínas de cada extracto, se seleccionaron aquellas que estaban en las listas de NTAP-KAP-SPS, CTAP-KAP-SPS, NTAP-hCypB, CTAP-hCypB y que a su vez no estuvieran en la de TAP-CAT. Posteriormente se unificaron las listas de las proteínas diferenciales de NTAP-KAP-SPS y CTAP-KAP-SPS, y las de NTAP-hCypB y CTAP-hCypB (recordar que la única diferencia entre NTAP y CTAP era dónde estaban unidos el doble tag de purificación, en N-terminal o C-terminal respectivamente). De esta forma se obtuvieron dos listas de posibles interactores con KAP-SPS y hCypB en extractos celulares de HK2 (Figura 4.14 y 4.15). Se observan tres proteínas comunes en las dos listas: Vimentina, Prohibitina y Cofilina 1. Además, se observan varias proteínas de citoesqueleto (KAP-SPS y hCypB) y de reordenación de la cromatina (clústeres de histonas, en KAP-SPS).

•Protein name	•Accesion
•vimentin	•VIME_HUMAN
•enolase 1, (alpha)	•ENOA_HUMAN
•coronin, actin binding protein, 1C	•COR1C_HUMAN
•prohibitin	•PHB_HUMAN
•cofilin 1 (non-muscle)	•COF1_HUMAN
•brain-specific angiogenesis inhibitor 1	•BAI1_HUMAN
•myosin, heavy chain 9, non-muscle	•MYH9_HUMAN
•myosin, heavy chain 13, skeletal muscle	•MYH13_HUMAN
•myosin, heavy chain 14, non-muscle	•MYH14_HUMAN
•myosin, heavy chain 10, non-muscle	•MYH10_HUMAN
•myosin, heavy chain 9, non-muscle	•MYH9_HUMAN
•histone cluster 1, H2ab	•H2A1B_HUMAN
•histone cluster 1, H1e	•H14_HUMAN
•histone cluster 1, H2aj	•H2A1J_HUMAN
•histone cluster 1, H1c	•H12_HUMAN
•histone cluster 2, H2ab	•H2A2B_HUMAN
•voltage-dependent anion channel 1	•VDAC1_HUMAN
•voltage-dependent anion channel 2	•VDAC2_HUMAN
•heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	•GRP78_HUMAN
•heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	•CH60_HUMAN

Figura 4.14: Lista de posibles interactores con KAP-SPS en células HK2.

•Protein name	•Accesion
•vimentin	•VIME_HUMAN
•fused in sarcoma	•FUS_HUMAN
•prohibitin	•PHB_HUMAN
•cofilin 1 (non-muscle)	•COF1_HUMAN
•nucleolin	•NUCL_HUMAN
•Aly/REF export factor	•THOC4_HUMAN
•serine/arginine-rich splicing factor 3	•B4E241_HUMAN
•spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	•A6NG51_HUMAN
•interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa	•ILF2_HUMAN
•DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	•DHX9_HUMAN
•heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	•HNRPR_HUMAN
•heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	•HNRPU_HUMAN
•ribosomal protein L18	•J3QQ67_HUMAN
•ribosomal protein L6	•RL6_HUMAN
•ribosomal protein S18	•RS18_HUMAN
•ribosomal protein L18a	•RL18A_HUMAN
•ribosomal protein S16	•RS16_HUMAN
•ribosomal protein L8	•RL8_HUMAN
•ribosomal protein L31	•RL31_HUMAN
•ribosomal protein L30	•RL30_HUMAN
•ribosomal protein S9	•RS9_HUMAN
•ribosomal protein L4	•RL4_HUMAN
•ribosomal protein, large, P2	•RLA2_HUMAN
•ribosomal protein, large, P0	•RLA0_HUMAN
•actinin, alpha 1	•ACTN1_HUMAN
•myosin, heavy chain 9, non-muscle	•MYH9_HUMAN
•myosin, heavy chain 14, non-muscle	•MYH14_HUMAN
•myosin, heavy chain 10, non-muscle	•MYH10_HUMAN

Figura 4.15: Lista de posibles interactores con hCypB en células HK2.

La Vimentina es un marcador de desdiferenciación celular. Concretamente forma filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en particular de células embrionarias, ciertas células endoteliales, así como en las células sanguíneas. La Vimentina es también usado como un marcador de ciertos tumores y melanomas. Debido al conocimiento previo que demuestra la implicación tanto de la KAP como de la CypB en nefrotoxicidad inducida por CsA, **es relevante realizar experimentos para monitorizar éste y otros marcadores de diferenciación celular**. En concreto se han realizado WB para monitorizar los niveles de Vimentina, E-Cadherina y α -SMA en las 4 líneas celulares de HK-2 (HK2 control, HK2 KAP, HK2 no B y HK2 KAP-B) con y sin tratamiento de CsA 20 μ M 24h (Resultados a continuación).

Las Prohibitinas (PHB) se ensamblan en una estructura en forma de anillo con 16-20 subunidades en la membrana mitocondrial interna (Tatsuta T, 2005). La función molecular precisa del complejo PHB no está clara, pero se sospecha un papel como acompañante de las proteínas de la cadena respiratoria o como un andamio de estructuración general requerido para una función y morfología mitocondrial óptima. Las prohibitinas son reguladores de la proliferación celular tanto en plantas como en ratones, aunque existe una fuerte controversia del papel que juegan. Inicialmente se le atribuyó un papel de regulador negativo de la proliferación (Mishra S, 2005), pero posteriormente también se le atribuyó un papel de regulador positivo en la proliferación y adhesión celular en células cancerígenas (Sievers C, 2010). Más recientemente, se le atribuye más funciones a parte de la regulación de la proliferación, como funciones en el metabolismo energético, apoptosis o senescencia (Peng YT, 2015). Por eso **se consideró relevante realizar experimentos de proliferación celular, ciclo celular y apoptosis** en las 4 líneas celulares de HK-2 (HK2 control, HK2 KAP, HK2 no B y HK2 KAP-B) con y sin tratamiento de CsA 20 μ M 24h (Resultados a continuación).

La Cofilina 1 es una proteína moduladora de la actina intracelular ampliamente distribuida que se une y despolimeriza la actina F filamentosa e inhibe la polimerización de la actina G monomérica (Yeoh S, 2002). Juega un papel importante en la regulación morfológica celular y en la organización del citoesqueleto en células epiteliales (Bai SW, 2011). Por tanto, refuerza la relevancia vista previamente con la Vimentina de **monitorizar marcadores de diferenciación celular**.

4.3. Experimentos funcionales con KAP y hCypB en HK2

En la introducción se han mencionado varios trabajos (*in vitro* e *in vivo* con animales transgénicos) donde se informa de la regulación en la expresión y localización de KAP, así como en la localización de CypB, en varios escenarios de daño renal como, por ejemplo, el de la nefrotoxicidad inducida por CsA (Mihatsch MJ, 1986; Cebrián C, 2001), la nefrolitiasis (Wang L, 2000), la nefrectomía parcial (Zhang H, 1999) o la sobreexpresión de la propia KAP (Tornavaca O, 2009; Grande MT, 2011; Bardaji B, 2017). Además, como se ha visto en los resultados mostrados anteriormente, se han encontrado proteínas que interaccionan tanto con KAP como con hCypB que tienen papeles relevantes en diferenciación y proliferación celular.

Por ello, y con el fin de profundizar en el papel de la KAP en procesos que son relevantes en daño y reparación renal se diseñaron experimentos para monitorizar marcadores de diferenciación, proliferación-ciclo celular y apoptosis combinando tres variables clave: ausencia o presencia de KAP, hCypB y CsA (inmunosupresor que causa daño renal). También consideramos clave realizar estos experimentos en células de túbulo proximal de origen humano (en este caso HK2) ya que se busca **el valor traslacional de KAP en el ámbito humano**.

Para ello se produjeron 4 líneas de HK2 transformadas de forma estable con un sistema lentiviral (Figura 4.16). Cada línea está transformada con dos plásmidos: el primero, pRTR2, expresa de forma constitutiva KAP (o sin expresión de KAP si el vector está vacío), y el segundo, silencia de forma constitutiva la hCypB (sh74) o no lo silencia (shcv, vector vacío). De esta forma, alternando los diferentes tipos de plásmidos, obtenemos 4 líneas: HK2 wt (sin expresión de KAP y con expresión normal de hCypB), HK2 KAP (con expresión de KAP y con expresión constitutiva de hCypB), HK2 no B (sin expresión de KAP y sin expresión de hCypB (silenciado)) y HK2 KAP-B (con expresión de KAP y sin expresión de hCypB (silenciado)).

Nombre de la línea	Expresión de KAP	Expresión de hCypB
HK2 wt (Control)	-	+
HK2 KAP	+	+
HK2 no B	-	-
HK2 KAP-B	+	-

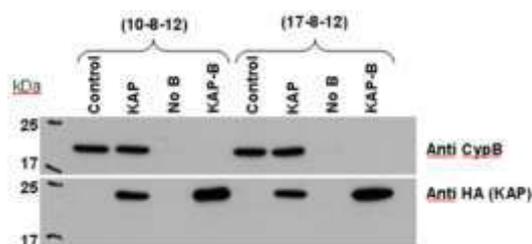


Figura 4.16: *Izquierda:* Cuadro con las combinaciones de los dos plásmidos para obtener las 4 líneas. *Derecha:* Ejemplo de Western blot control de extractos celulares de las 4 líneas en fechas distintas para observar el buen funcionamiento de la expresión o no de KAP y del silenciamiento o no de hCypB.

4.3.1. Papel de la KAP y hCypB en la diferenciación celular

Debido a que en experimentos de interactómica anteriores se observó que la Vimentina, un marcador de desdiferenciación celular, es una proteína de interacción tanto de KAP como de hCypB en células HK2 (Ver "4.2. Identificación de proteínas de unión con KAP: Tandem Affinity Purification (TAP)") se realizó WB para determinar los niveles de vimentina y de e cadherina, marcador de diferenciación epitelial, en las líneas celulares descritos anteriormente con y sin CsA (tratamiento 20 μ M).

Para el caso de la Vimentina se realizaron dos experimentos: uno con un tratamiento de 6 horas con CsA y otro con un tratamiento de 24 horas (Figura 4.17).

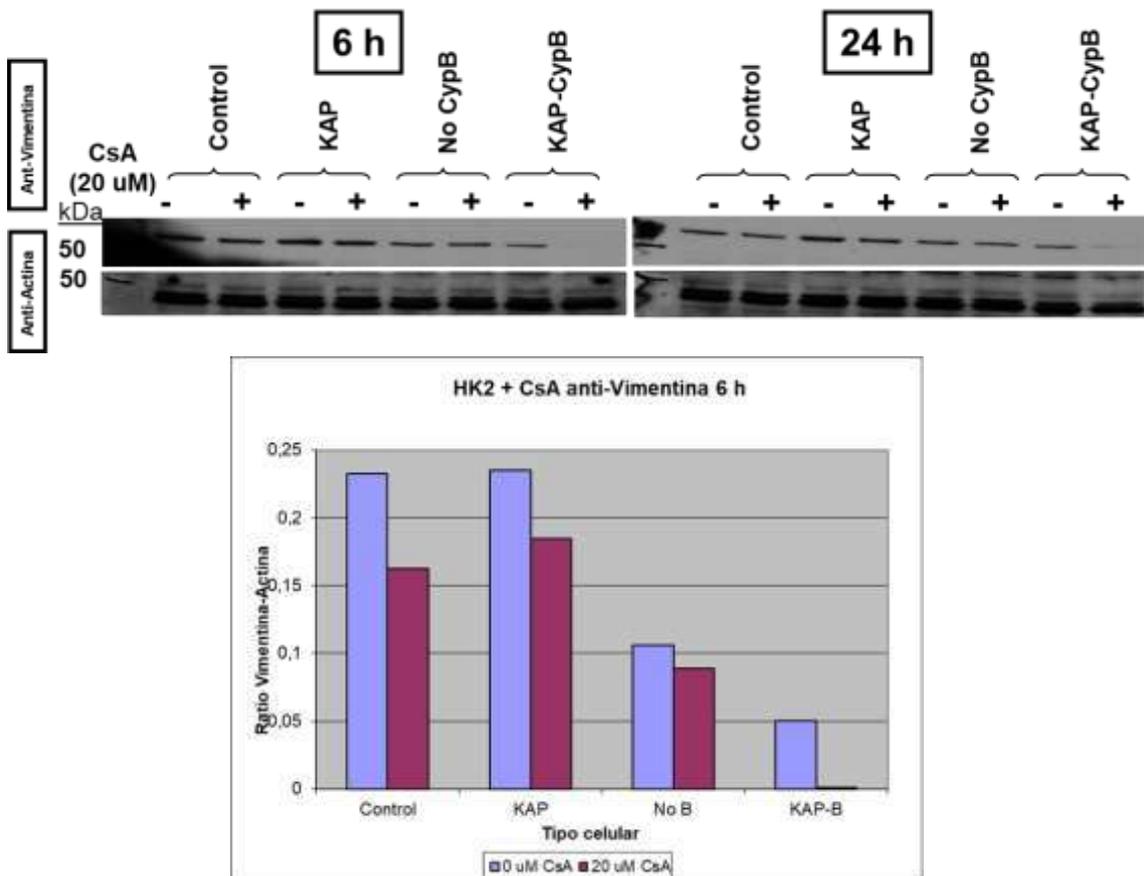


Figura 4.17: WB α -Vimentina con extracto celular de HK2 control, HK2 KAP, HK2 no B y HK2 KAP-B, con y sin tratamiento de CsA 20 μ M y 6 horas de tratamiento.

En primer lugar, se aprecia que, en cualquier tipo celular, la presencia de CsA baja el nivel de Vimentina, un efecto contrario a lo que se esperaba. Si miramos por tipo celular, el nivel de Vimentina entre el control y KAP no se ve alterado, pero la ausencia de CypB hace bajar su nivel. En caso de añadir KAP cuando no hay CypB, provoca una mayor bajada (efecto sinérgico). Por tanto, la sobreexpresión de KAP no altera los niveles de vimentina, pero en cambio, la ausencia de hCypB provoca que estos niveles bajen considerablemente.

La E-Cadherina es un marcador de fenotipo epitelial. Primero se realizó WB con los mismos extractos celulares que los utilizados para la Vimentina (Figura 4.18). No se cuantificaron las bandas, ya que no aparecieron en los extractos de HK2 control y HK2 KAP.

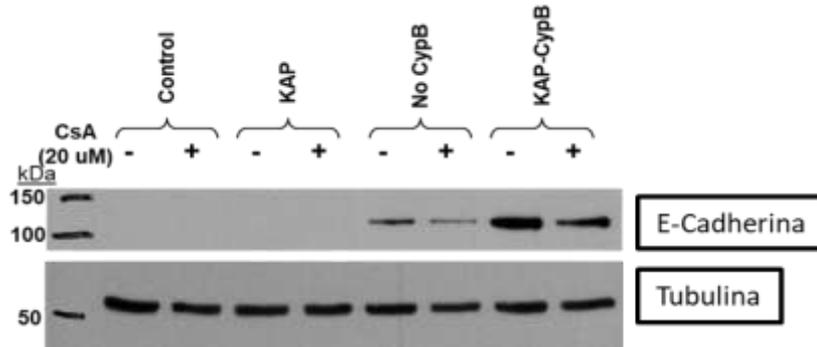


Figura 4.18: WB α -E-Cadherina con extracto celular de HK2 control, HK2 KAP, HK2 no B y HK2 KAP-B, con y sin tratamiento de CsA 20 μ M 24h.

Debido a que la E-Cadherina, al ser un marcador de fenotipo epitelial, requiere que el cultivo celular esté en confluencia, para formar la monocapa y que surjan las uniones intercelulares donde participa la E-Cadherina, se realizó un posterior experimento con 4 réplicas emulando el anterior, pero dejando en postconfluencia y con tratamiento de CsA durante 5 días (Figuras 4.19).

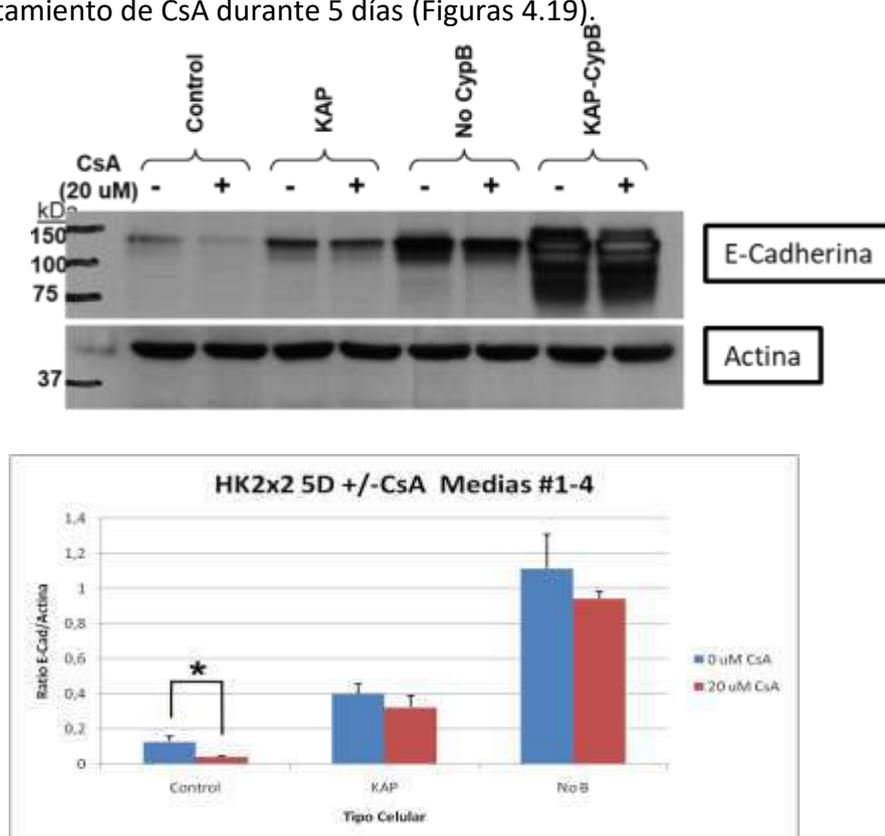


Figura 4.19: Arriba: WB de una de las 4 réplicas representativo, con las mismas líneas celulares, pero con 5 días de postconfluencia. Abajo: Cuantificación de las 4 réplicas. Las bandas del tipo celular HK2 KAP-B no se pudieron cuantificar por exceso de señal. (*) = p -value < 0,05

Si lo comparamos con la Vimentina, solo en el caso de las células HK2 control baja el nivel de E-Cadherina en presencia de CsA de forma significativa. Al observar su nivel según el tipo celular, vemos un patrón totalmente opuesto a la Vimentina, con un nivel mínimo en el control, y subiendo según haya presencia de KAP, ausencia de CypB y presencia de KAP en ausencia de CypB (otra vez comportamiento sinérgico). Es decir, la sobreexpresión de KAP sube de forma clara el nivel de E-Cadherina (ya sea por el aumento de su expresión o modulando la degradación de la misma), y la ausencia de hCypB provoca un aumento de su nivel aún mayor, de forma muy significativa.

De forma general, parece que la expresión KAP, comparado con la ausencia de CypB, tenga un papel menor en cuanto a la diferenciación celular. Es decir, KAP produce algún efecto a favor de la diferenciación (sobre todo si miramos la E-cadherina), pero este efecto es mucho mayor si hay ausencia de CypB. Sin embargo, cuando se dan las dos condiciones (expresión de KAP y ausencia de CypB) el efecto es aún mayor, lo que indica una sinergia entre las dos condiciones, y que KAP aumenta su función en ausencia de CypB, lo que sugiere que esta última modula su actividad.

4.3.2. Papel de la KAP y hCypB en la proliferación

Debido a que se ha encontrado como posible interactor de KAP y hCypB a la Prohibitina, una proteína reguladora de la proliferación celular, y que la CypB, por si sola, ya tiene este papel, se hicieron varios experimentos para cuantificarla en las 4 líneas celulares, así como el nivel de varias proteínas clave en el ciclo celular por WB.

4.3.2.1. *Cálculo de la proliferación*

Se cuantificó la proliferación de los tipos celulares descritos en “4.3. Experimentos funcionales con KAP y hCypB en HK2”. Para ello se sembraron las 4 líneas celulares en placas de 150 mm de diámetro lo suficientemente diluidas para que no llegaran a la confluencia en 7 días (tiempo estipulado para el experimento). Las células fueron tratadas con 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE, λ_{ex} 492 nm; λ_{em} 517 nm), un tipo de marcador fluorescente utilizado para test de proliferación, que es permeable a la membrana citoplasmática y se une covalentemente a moléculas intracelulares. Idealmente, la cantidad de CFSE (y, por tanto, de fluorescencia emitida) por célula se divide por dos en cada división celular. Por consiguiente, utilizando un citómetro de flujo, podemos cuantificar la fluorescencia emitida por célula. Comparando esta fluorescencia unitaria por célula entre el día cero y después de 3 y 7 días de crecimiento (3 réplicas de cada), podemos extrapolar cuanto han proliferado. Se utilizó el software *FCS Express 4.0*[®], que a partir de los datos de la

citometría permite separar la población en diferentes generaciones y extrapolar un valor de Índice de Proliferación (IP, cuanto más IP, más prolifera) (Figura 4.22 y 4.23).

3 días de proliferación

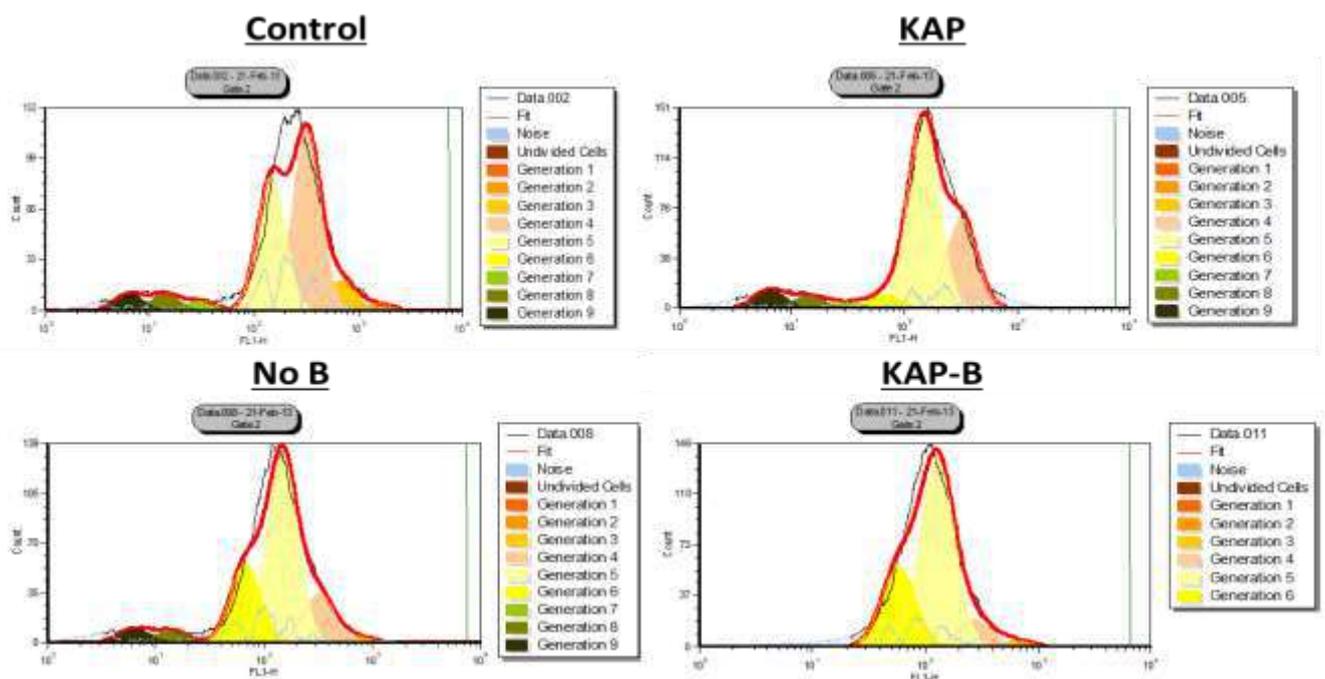


Figura 4.22: Cuantificación generacional realizado por el programa FCS Express 4.0 de cada uno de las 4 líneas celulares después de 3 días de proliferación.

7 días de proliferación

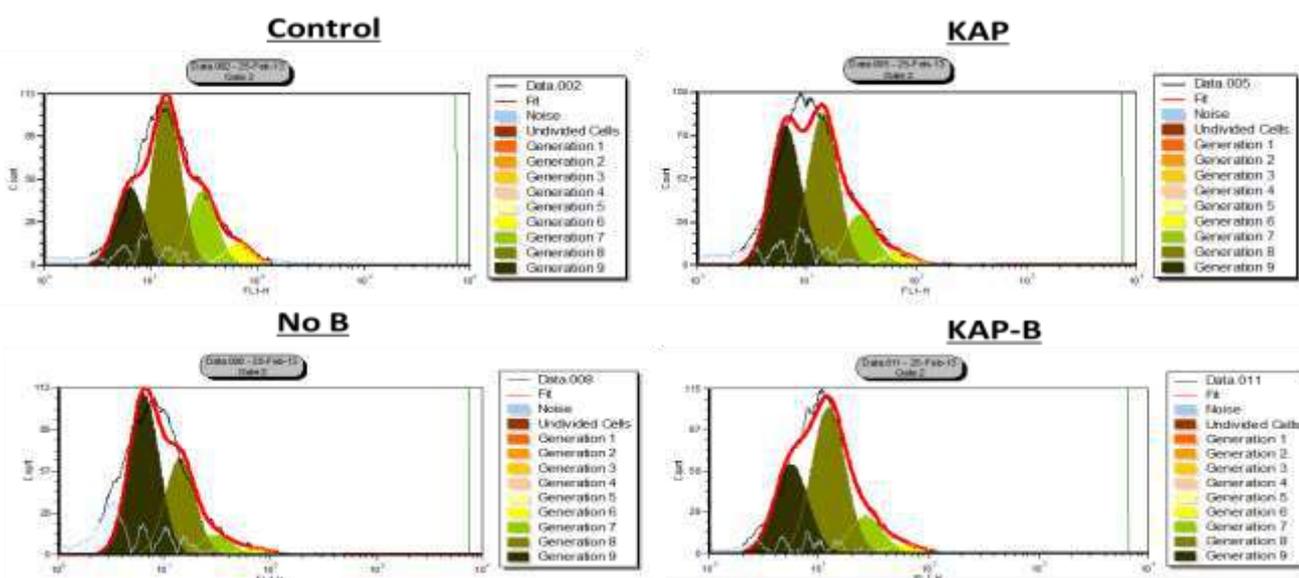
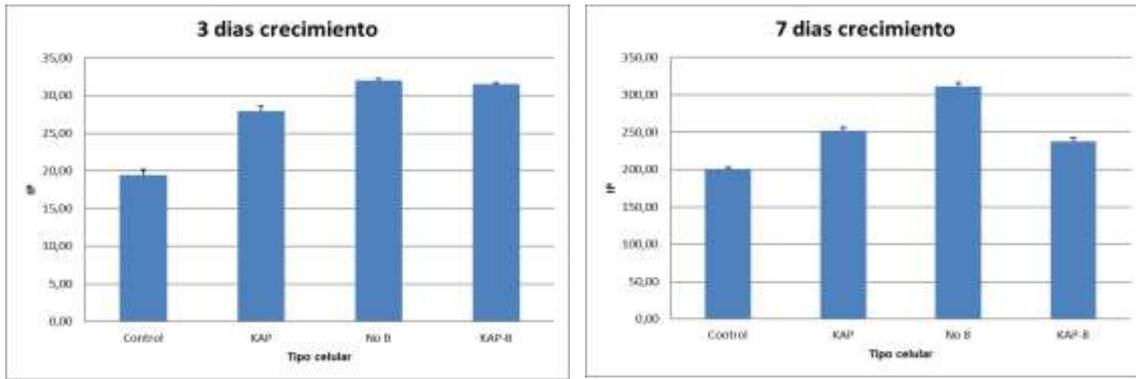


Figura 4.22 (Continuación): Cuantificación generacional realizado por el programa FCS Express 4.0 de cada uno de las 4 líneas celulares después de 7 días de proliferación.



3 días		
Tipo celular		p-value
Control Vs	KAP	0,00012
	No B	0,00041
	KAP-B	0,00051
KAP Vs	No B	0,00382
	KAP-B	0,00574
No B Vs	KAP-B	0,05801

7 días		
Tipo celular		p-value
Control Vs	KAP	0,00048
	No B	0,00003
	KAP-B	0,00089
KAP Vs	No B	0,00012
	KAP-B	0,02135
No B Vs	KAP-B	0,00004

Figura 4.23: Gráficos de los IP de las 4 líneas celulares con 3 y 7 días de crecimiento. Abajo los valores de p-value comparando diferentes líneas celulares. Todos los marcados con negrita tienen un valor de p-value < 0,05, que significa que la diferencia en la proliferación es estadísticamente significativa.

Se observa una tendencia clara en cuanto a proliferación. El tipo celular que tiene una menor proliferación es el control, luego las células que expresan KAP proliferan más que el control, pero las que proliferan más son las que tienen ausencia de hCypB, independientemente de si hay KAP o no. Hay una excepción en este patrón, que es la proliferación a 7 días del HK2 KAP-no B, podría ser que, en esta condición de postconfluencia después de 7 días en este tipo celular la sobreexpresión de KAP provocara más muerte celular al llegar a la confluencia. Se puede resumir la proliferación de HK2:

Control < presencia de KAP < ausencia de hCypB

Existe otra forma de procesar los datos de fluorescencia anteriores: En lugar de que un algoritmo procese las curvas de fluorescencia para interpolar número de generaciones y generar un número de IP, se puede, simplemente, medir la media de fluorescencia por célula, y entonces dividir la fluorescencia del día 0 por la del día 3 o 7 (Figura 4.24 y 4.25). Cuanto mayor dé este cociente, mayor proliferación. Además, para que el sistema sea más robusto, el dato del día 0 puede ser la fluorescencia media por célula o el valor del pico de fluorescencia por célula. Obtener valores parecidos utilizando los dos tipos de datos del día 0 da una mayor robustez al sistema de medición de proliferación. **El patrón de proliferación es el mismo que el obtenido por cálculo de IP.**

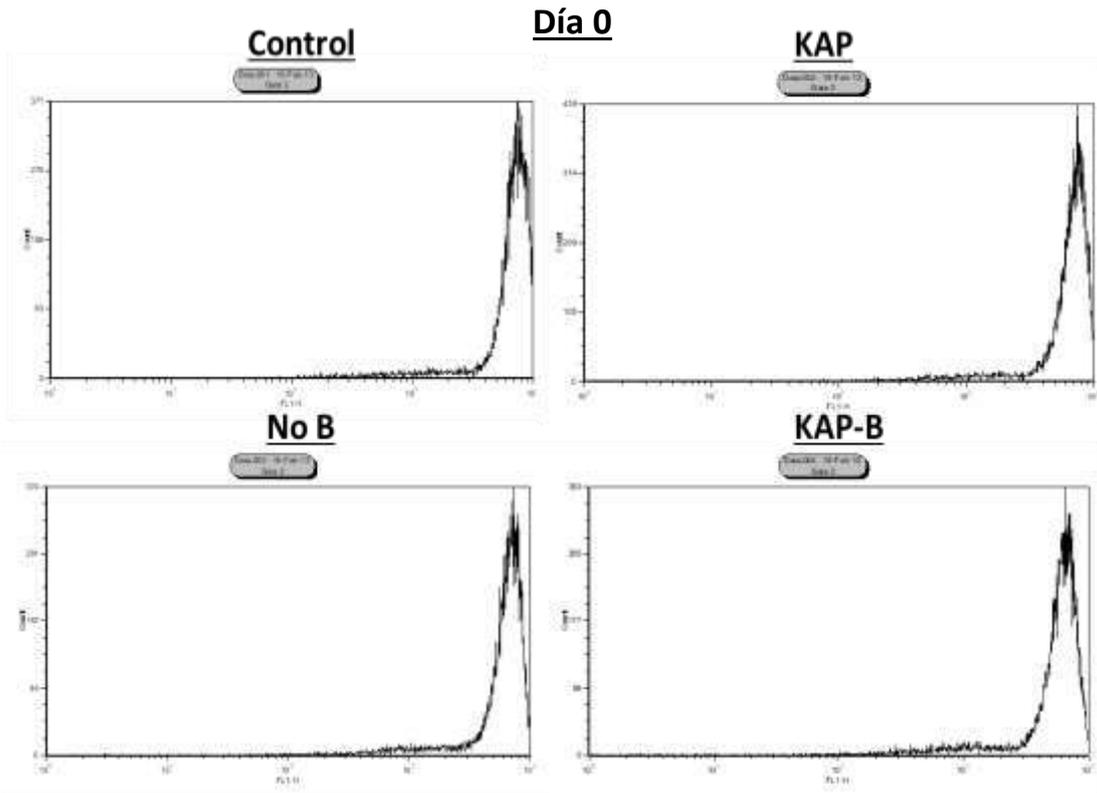
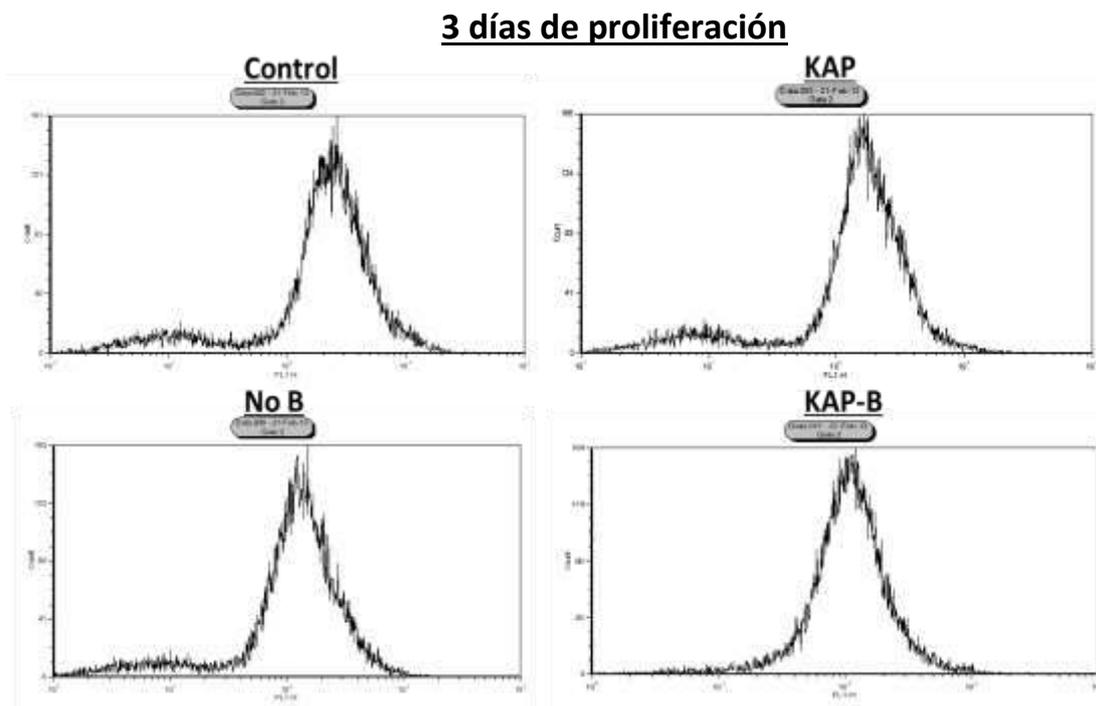


Figura 4.24: Gráfico de distribución de fluorescencia celular el día 0 del test de proliferación



7 días de proliferación

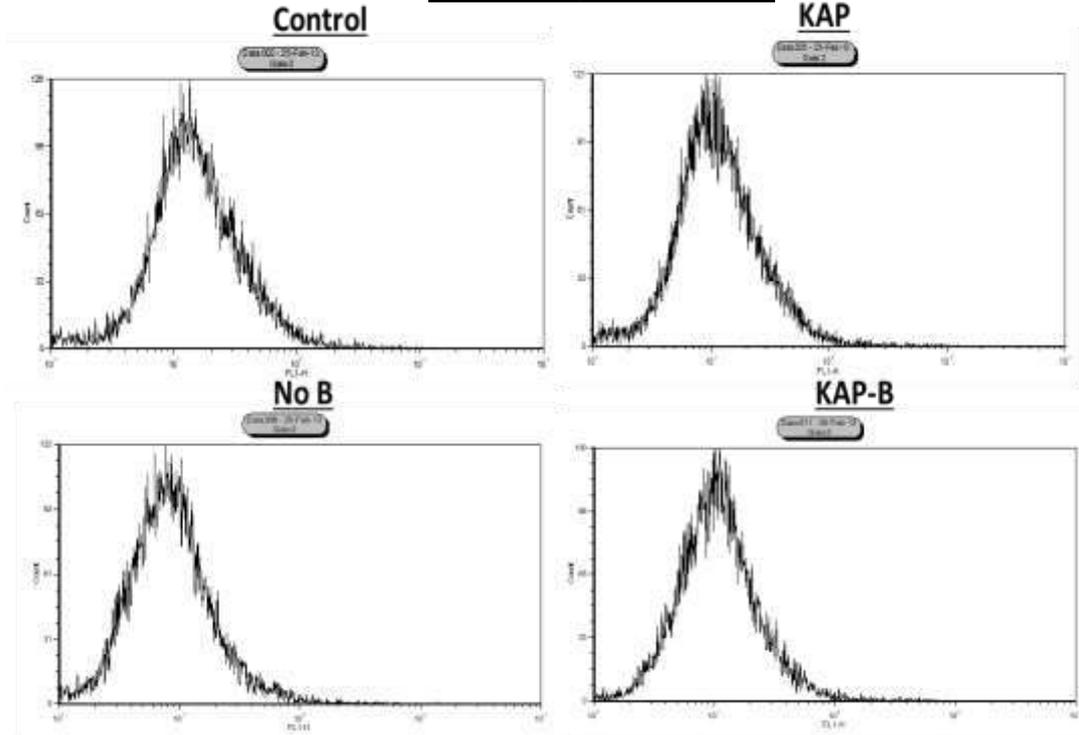
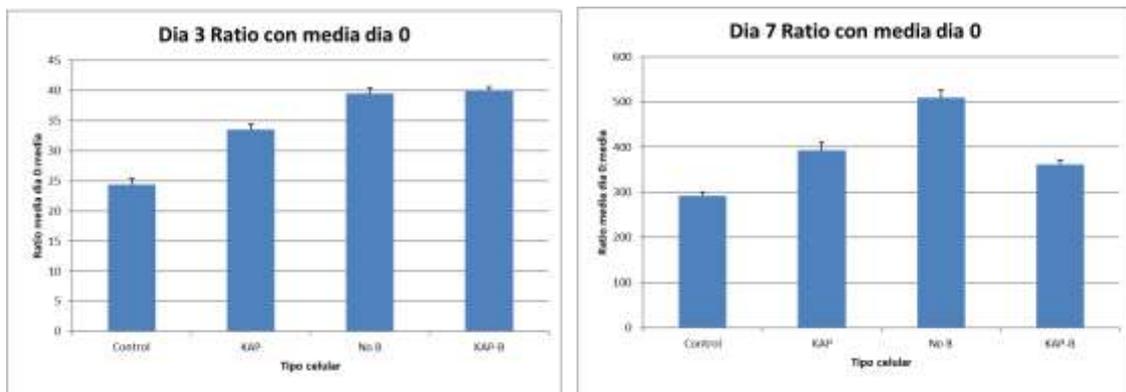


Figura 4.24 (Continuación): Gráfico de distribución de fluorescencia celular en el tercer día (Arriba) y séptimo día (Abajo) del test de proliferación

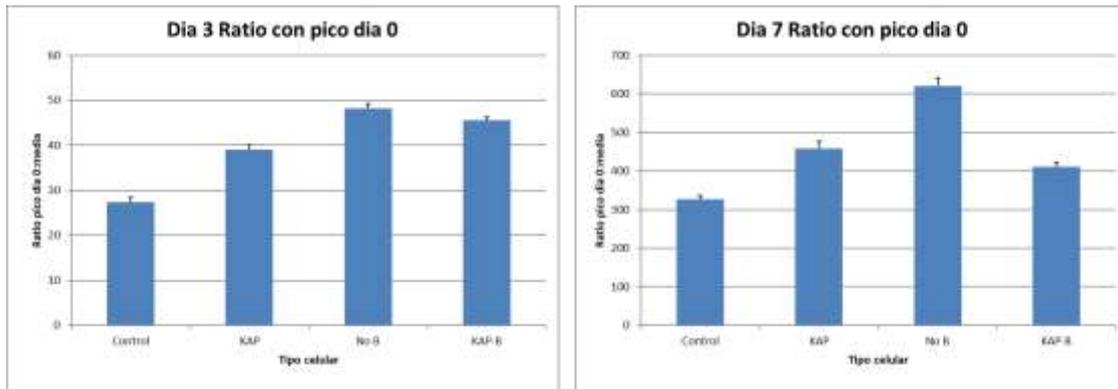
Ratio con media día 0



3 días media día 0		
Tipo celular		p-value
Control Vs	KAP	0,00029
	No B	0,00004
	KAP-B	0,00012
KAP Vs	No B	0,00089
	KAP-B	0,00074
No B Vs	KAP-B	0,39465

7 días media día 0		
Tipo celular		p-value
Control Vs	KAP	0,00275
	No B	0,00042
	KAP-B	0,00067
KAP Vs	No B	0,00102
	KAP-B	0,05474
No B Vs	KAP-B	0,00076

Ratio con pico día 0



3 días pico día 0		
Tipo celular		p-value
Control Vs	KAP	0,00017
	No B	0,00002
	KAP-B	0,00010
KAP Vs	No B	0,00035
	KAP-B	0,00129
No B Vs	KAP-B	0,02715

7 días pico día 0		
Tipo celular		p-value
Control Vs	KAP	0,00221
	No B	0,00039
	KAP-B	0,00054
KAP Vs	No B	0,00056
	KAP-B	0,02980
No B Vs	KAP-B	0,00057

Figura 4.25: Proliferación calculada con fluorescencia media por célula. Valores de p-value > 0,05 tienen significancia estadística.

4.3.2.2. Marcadores del ciclo celular

Puesto que se han visto diferencias significativas en la proliferación entre las diferentes líneas celulares de HK2, se hicieron WB de diferentes marcadores bioquímicos implicados en el paso de la fase G1 a Fase S del ciclo celular. Este paso es determinante para el inicio irreversible inicia la división celular:

- Proteínas activadoras del ciclo celular:
 - CDK2 (Figura 4.26)
 - CDK4 (Figura 4.27)
 - CDK6 (Figura 4.28)
 - Ciclina D (Figura 4.29)
 - Ciclina E (Figura 4.30)
- Proteínas inhibidoras del ciclo celular:
 - p21 (Figura 4.31)

CDK2

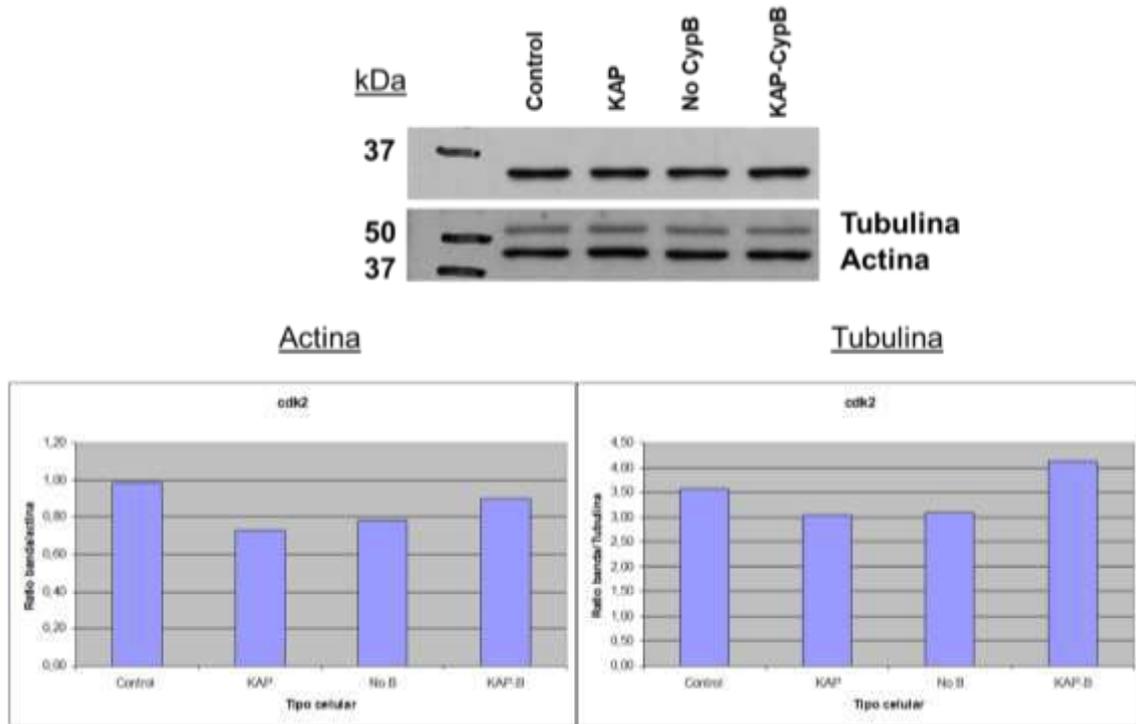


Figura 4.26: WB α -CDK2 de las 4 líneas celulares de HK2. **Abajo-izquierda:** Cuantificación normalizada con Actina. **Abajo-derecha:** Cuantificación normalizada con tubulina.

CDK4

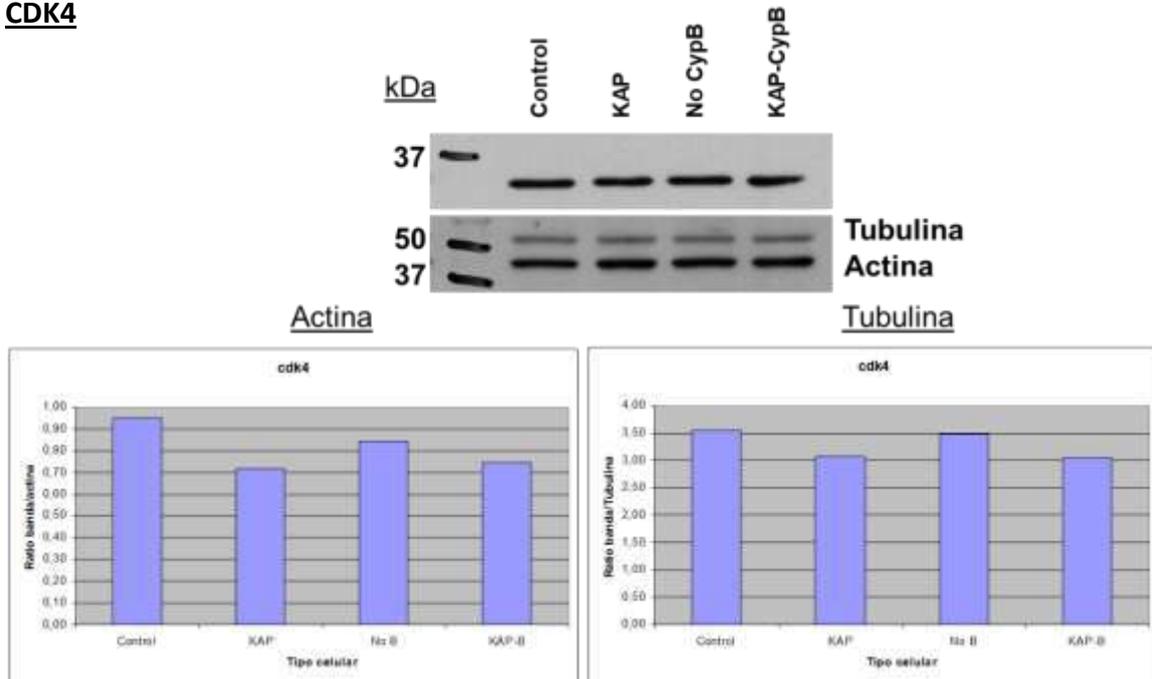


Figura 4.27: WB α -CDK4 de las 4 líneas celulares de HK2. **Abajo-izquierda:** Cuantificación normalizada con Actina. **Abajo-derecha:** Cuantificación normalizada con tubulina.

CDK6

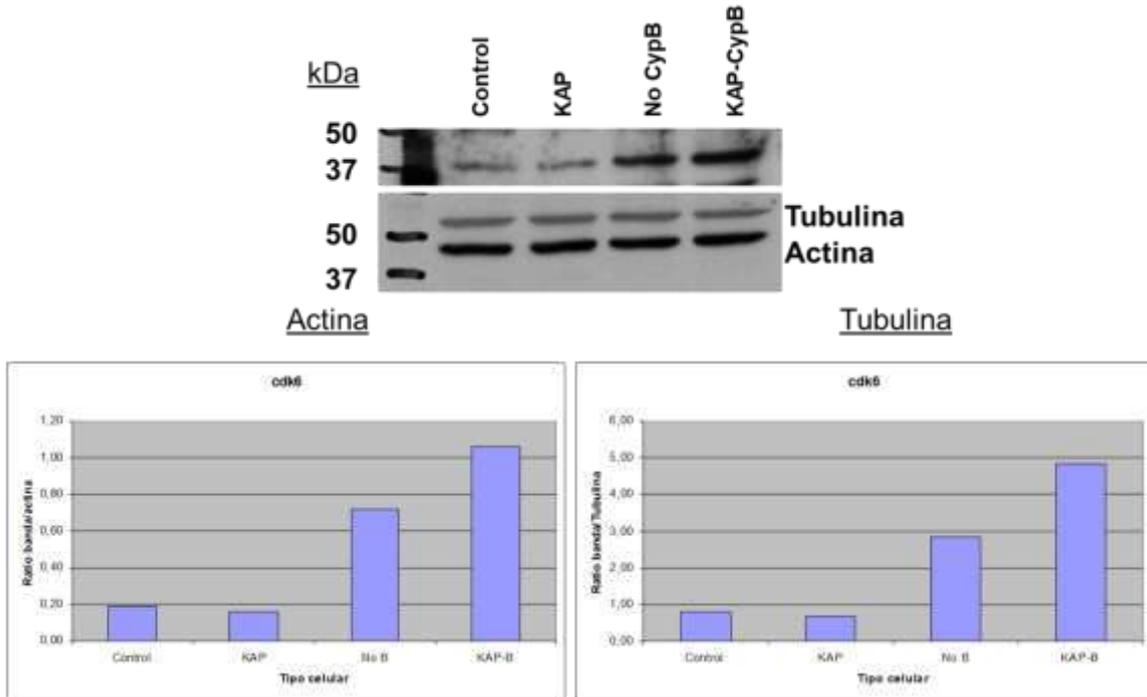


Figura 4.28: WB α -CDK6 de las 4 líneas celulares de HK2. **Abajo-izquierda:** Cuantificación normalizada con Actina. **Abajo-derecha:** Cuantificación normalizada con tubulina.

Ciclina D

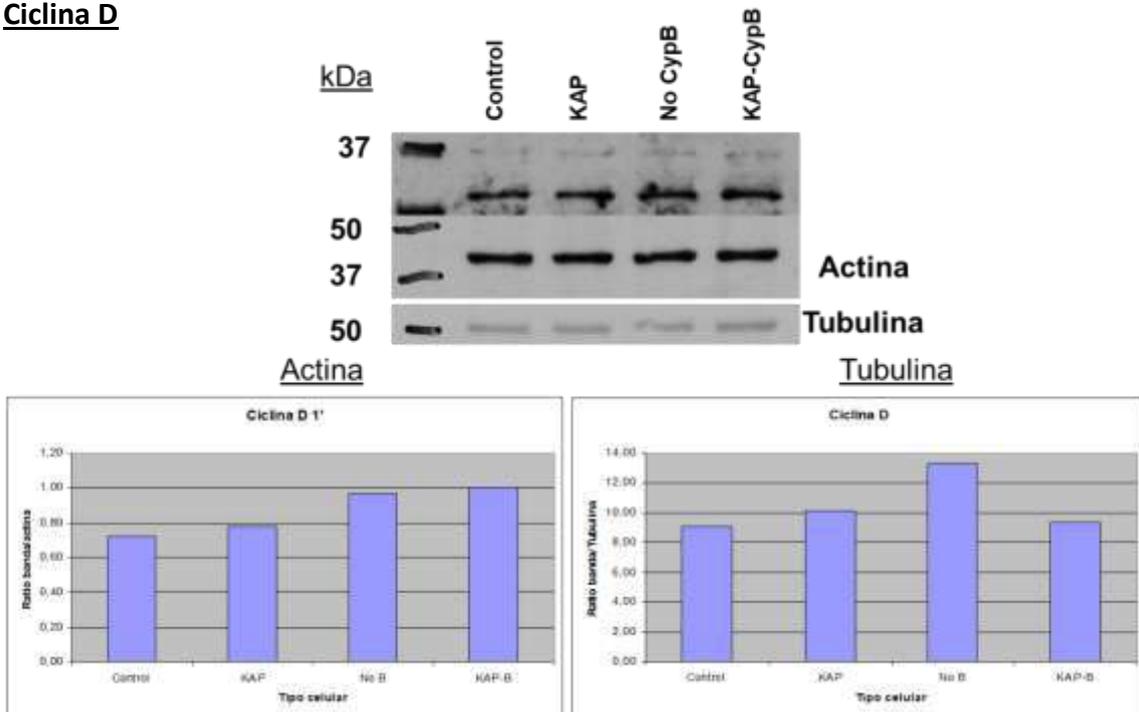


Figura 4.29: WB α -Ciclina D de las 4 líneas celulares de HK2. **Abajo-izquierda:** Cuantificación normalizada con Actina. **Abajo-derecha:** Cuantificación normalizada con tubulina.

Ciclina E

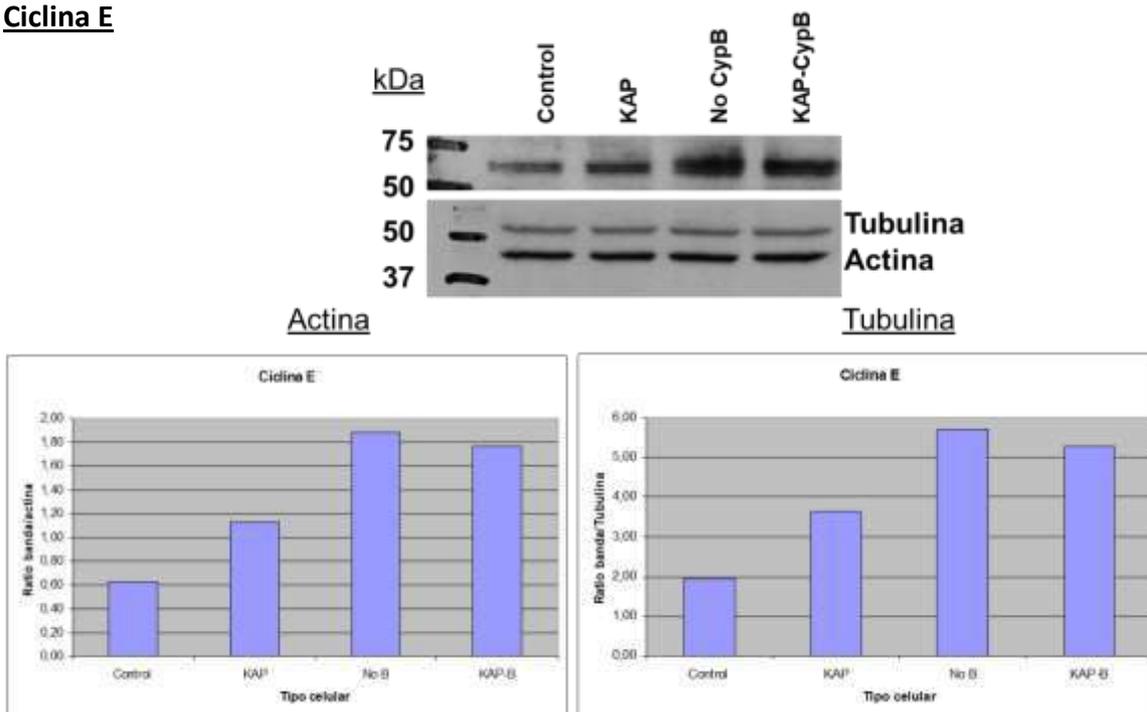


Figura 4.30: WB α -Ciclina E de las 4 líneas celulares de HK2. **Abajo-izquierda:** Cuantificación normalizada con Actina. **Abajo-derecha:** Cuantificación normalizada con tubulina.

P21

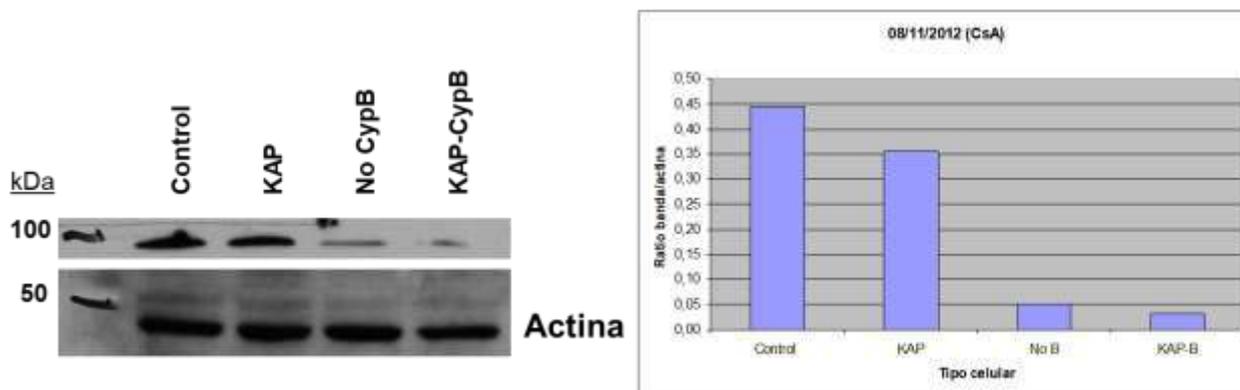


Figura 4.31: WB α -p21 de las 4 líneas celulares de HK2. **Derecha:** Cuantificación normalizada con Actina.

De todos los marcadores monitorizados la **CDK6**, la **Ciclina E**, la **p21** y, en menor medida, la **Ciclina D** presentan un patrón exacto a la proliferación visto anteriormente según el tipo celular (inverso en el caso del p21, como es lógico al tratarse de un inhibidor del ciclo celular). La CDK2 y CDK4 no presentan ningún patrón específico. Así pues, la presencia de KAP o la ausencia de hCypB regulan, de forma directa o indirecta, los niveles de CDK6, Ciclina E, p21 y puede que de Ciclina D, provocando el patrón de proliferación visto anteriormente.

4.3.3. Papel de la KAP y hCypB en la citotoxicidad por CsA

4.3.3.1. Test de LDH

La cuantificación de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) liberada al medio es un marcador de citotoxicidad y citólisis ampliamente utilizado (kit comercial: *Cytotoxicity detection Kit^{plus}* Roche #art: 04744926001) Cuanto mayor sea este cociente LDH medio / (LDH medio + LDH lisado celular) * 100 (%), mayor será la citotoxicidad o citólisis presente en ese tipo celular y en esas condiciones. Todos los ensayos de citotoxicidad por CsA se han hecho en placas de 96 pocillos, sembrando 6 pocillos por cada tipo celular y tratamiento de CsA. Se han testado las 4 líneas celulares de HK2 (Control, KAP, No hCypB, KAP-B), y con 4 tipos de tratamientos (todos de 24h): 0 μ M CsA, 5 μ M CsA, 10 μ M CsA y 20 μ M CsA (Figura 4.32). En la figura se puede observar como la **ausencia de hCypB causa una menor toxicidad debida a CsA independientemente de la dosis**, es decir, que la actividad de la hCypB es importante para que la CsA cause su toxicidad. Por otro lado, también se observa una **protección frente a la toxicidad provocada por CsA cuando hay presencia de KAP**, aunque en menor medida que la ausencia de hCypB, y solo cuando hay dosis alta de CsA (20 μ M).

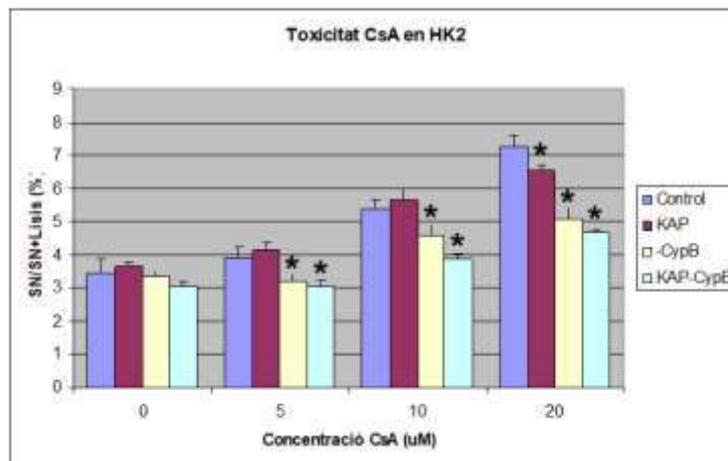


Figura 4.32: Test de LDH para citotoxicidad. (*) valores de p-value menores a 0,05 respecto al control con el mismo tratamiento.

4.3.3.2. Marcador de apoptosis: PARP Cleavage

Visto los resultados del test LDH, se propuso ver por WB el nivel de un marcador de toxicidad. Se escogió la PARP cleavage, un marcador clave en la vía apoptótica por toxicidad mediada por CsA (Sarró E, 2012).

Se realizaron WB contra la *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP-1), una proteína de 113 kDa que es fragmentada en dos péptidos de 89 y 24 kDa en condiciones de

apoptosis. Por tanto, el fragmento de 89 kDa (PARP Cleavage) es utilizado como marcador de apoptosis. Los WB se realizaron con las 4 líneas celulares descritos anteriormente y con tratamientos de 6 y 24 horas de 20 μ M de CsA (Figura 4.33).

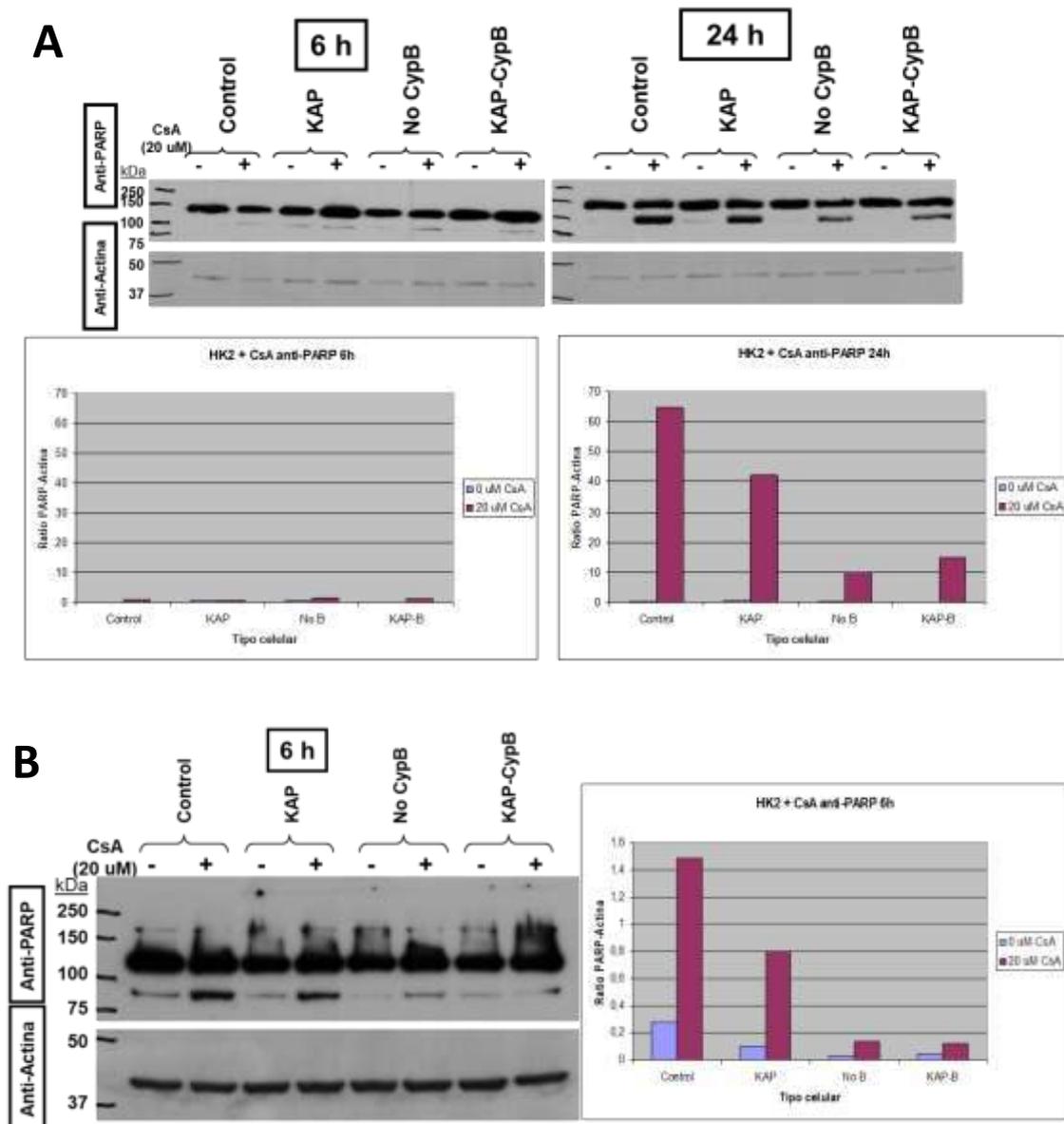


Figura 4.33: A) WB α -PARP con las 4 líneas celulares de HK2 y 6 y 24 horas de tratamiento de 20 μ M de CsA. Las gráficas de barras están representadas con el mismo rango de valores en el eje "y", para poder apreciar el aumento exponencial de la PARP Cleavage. **B)** WB de 6 horas de tratamiento visto en A) pero con mayor exposición.

En primer lugar, se puede observar, como es lógico, un gran aumento de PARP cleavage cuando se añade CsA al medio independientemente del tipo celular y del tiempo de tratamiento. Ahora bien, se observa diferentes patrones de disminución de PARP cleavage según el tipo celular: Menor cuando hay presencia de KAP (en comparación con el control), y aún menor en ausencia de hCypB, independientemente de la presencia o no de KAP. Este patrón coincide con lo observado en el test de LDH.

4.3.4. Papel de la KAP y hCypB en la activación de STAT3

Se ha demostrado que ratones transgénicos que sobreexpresan la KAP con una dieta HFD tienen niveles de IL-6 (una importante citoquina proinflamatoria) mucho menores que en sus homólogos WT, también con dieta HFD. Asimismo, y para demostrar que este efecto era causado directamente por la KAP, se utilizaron células HK2 (línea control y línea con expresión constitutiva de KAP) tratadas con TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa, otra citoquina que provoca la expresión de IL-6), y se vio claramente que la expresión de KAP en células HK-2 tiene un efecto directo sobre la producción de IL-6 inducida por TNF- α , reduciendo sus niveles casi por completo (Bardaji B, 2017). Se ha demostrado que la vía IL-6/gp130/JAK/STAT es una vía muy importante en la obesidad, ya que el aumento de los niveles de leptina circulante conduce al desarrollo de resistencia a la leptina por la activación crónica de JAK/STAT3 en el SNC, mientras que en los órganos periféricos, la activación crónica de JAK/STAT3 inducida por IL-6 altera la acción de la insulina (Wunderlich CM, 2013). Por tanto, se consideró interesante observar el papel de la KAP y la hCypB en la activación de la vía JAK/STAT. La vía de activación más conocida para STAT3 es mediante la fosforilación en la tirosina 705. Para este fin, se trataron las 4 líneas celulares con dosis creciente de TNF- α en el medio (0, 1, 10 y 100 ng/ml) y se hicieron WB de la STAT3 total (STAT3_T) y la STAT3 fosforilada en la tirosina 705 (pSTAT3-Tyr705) (Figura 4.34).

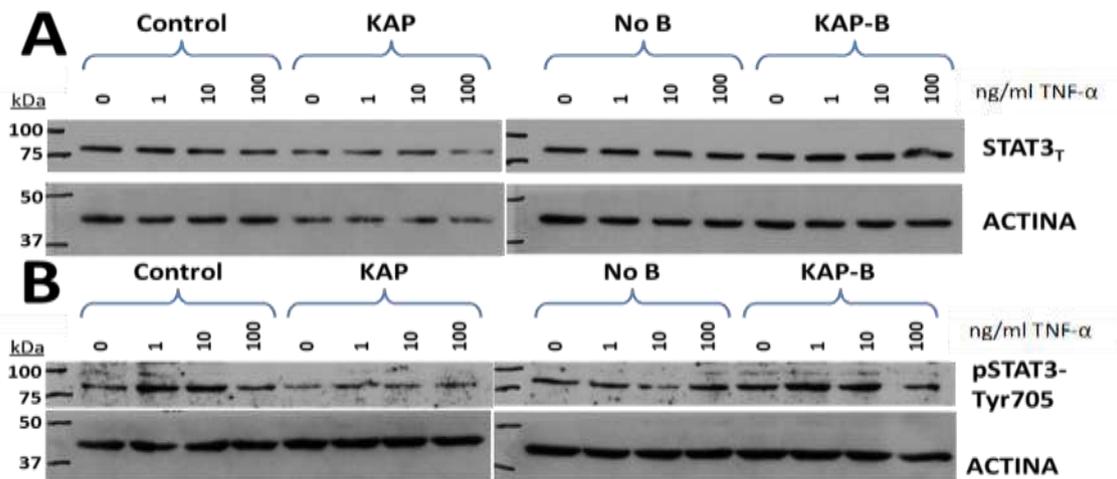


Figura 4.34: WB de extractos de las 4 líneas celulares de HK2. **A)** WB con anti-STAT3_T. **B)** WB con anti-pSTAT3-Tyr705.

Se puede apreciar que, mientras la expresión de STAT3_T no se ve afectada por el tipo celular o la dosis de TNF- α , sí se aprecia un menor nivel de fosforilación en la Tyr-705 con sobreexpresión de KAP y también en ausencia de hCypB, independientemente de la dosis de TNF- α . En este caso, cuando hay sobreexpresión de KAP y a la vez ausencia de hCypB, no hay un efecto sinérgico, si no que parece que sus efectos se anulan y se vuelve a la situación control. Por tanto, se demuestra que la sobreexpresión de KAP y la ausencia de hCypB en las células HK-2 tiene un impacto en la vía IL-6/gp130/JAK/STAT3 previniendo la activación de STAT3 mediante fosforilación en Tyr-705.

4.4. Producción y purificación de la proteína KAP sin péptido señal recombinante en bacteria

Se han producido varios lotes de proteína KAP sin péptido señal (KAP-SPS) para diversos usos, tanto para utilizar de forma interna en nuestro grupo en tratamientos celulares, etc. como para utilizarla en cristalografía 3D. Las diferencias en el protocolo de la producción según fuera su uso final tenían leves variaciones, ya que, por ejemplo, para la utilización interna de nuestro grupo, con poca cantidad producida era suficiente, mientras que para la cristalografía requería de una mayor cantidad. En cualquier caso, siempre tenemos en común una gran pureza de producto final.

4.4.1. Producción y purificación de His-KAP-SPS en columna HisTrap™ FF 1 ml

Se ha producido y purificado varias veces la His-KAP-SPS cambiando ligeramente las condiciones de lavado, elución y cantidad de extracto bacteriano cargado en la columna HisTrap™ FF de 1 ml (Figura 4.35). A continuación, las condiciones de purificación optimizadas:

- Muestra aplicada: Extracto proteico de 500 ml de cultivo.
- Lavado 1: 10 ml buffer de lisis → guardar 1 ml para gel.
- Lavado 2: 10 ml buffer elución → guardar 1 ml para gel.
- Pre-elución: 3 ml buffer elución con 20 mM imidazol → alícuotas de 1 ml.
- Elución: 10 ml buffer elución con 100 mM imidazol → alícuotas de 1 ml.

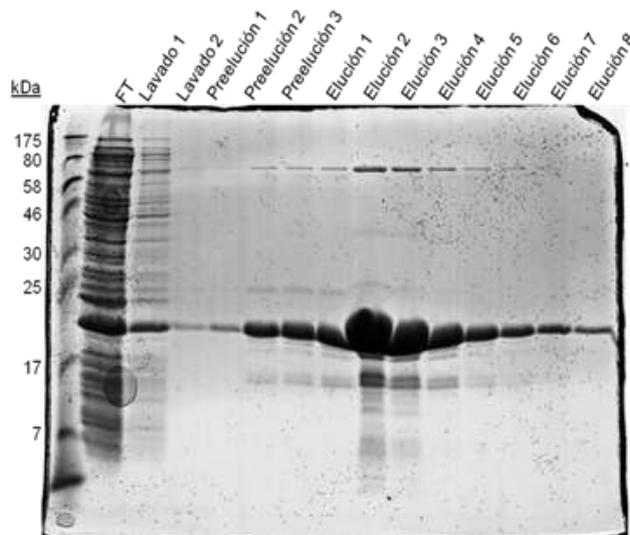


Figura 4.35: Ejemplo de purificación de His-KAP-SPS para uso interno del laboratorio. Volumen de carga por cada pocillo: 20 µl de cada alícuota

Se puede apreciar que, a pesar de ser una primera purificación, ya obtenemos una buena calidad. Eso es debido a que se ha realizado una pre-elución con bastante imidazol (20 mM) y la elución ha sido de fuerza menor (solo 100 mM de imidazol). Con estas condiciones se pierde un poco de rendimiento, pero a cambio obtenemos una buena pureza. En el ejemplo del gel anterior, se recogerían las alícuotas del 1 al 7 (7 ml en total) de las fracciones eluidas para seguir con la purificación de la proteína.

4.4.2. Digestión de His-KAP-SPS con trombina

Se han realizado varias digestiones con trombina para eliminar el tag de histidinas de nuestra proteína His-KAP-SPS en condiciones diferentes para encontrar la condición ideal (Figura 4.36). En cada purificación de His-KAP-SPS se recuperaban las alícuotas de elución donde había la mayor concentración de esta, luego se colocaban todas juntas en un tubo falcon y se realizaba la digestión. A continuación, se muestran solo las digestiones iniciales en las que se buscaba las condiciones óptimas de digestión (20 µl de la digestión total por pocillo):

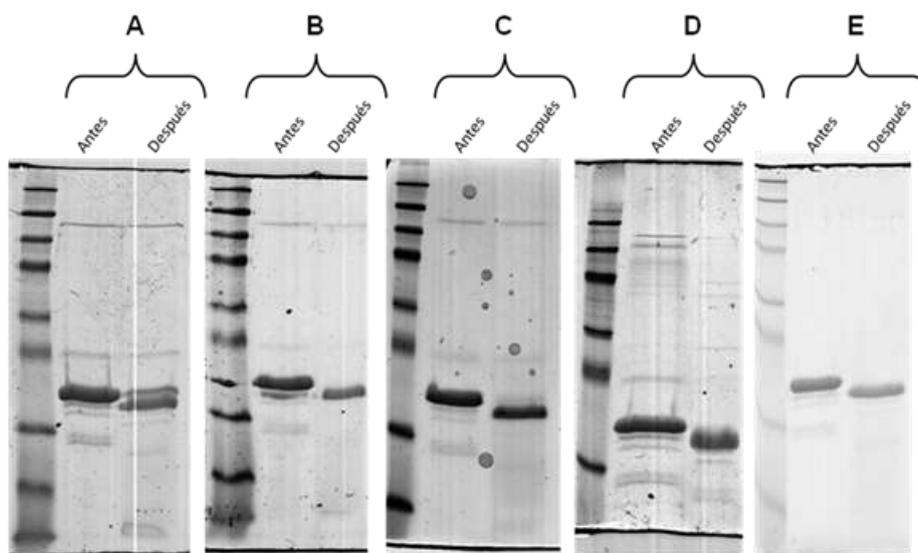


Figura 4.36: Pruebas de diferentes digestiones con trombina buscando las condiciones ideales. La eliminación del tag His comporta que la banda de KAP-SPS baje de peso.

Digestión	Volumen digerido	Concentración proteína (mg/ml)	Concentración trombina (U/µg prot)	Horas digestión	Temperatura digestión
A	100 µl	0,32	1 U/100 µg	1	TA
B	100 µl	0,32	1 U/100 µg	2	TA
C	100 µl	0,32	1 U/100 µg	2	4°C
D	15 ml	1,37	1 U/684 µg	5	4°C
E	8 ml	1,65	1 U/1000 µg (resina reutilizada)	O/N	4°C

Se puede ver como únicamente en la digestión "A", la digestión no es completa, mientras que en todas las demás sí lo es. Se observa que a 4°C la digestión funciona mejor que a TA y que las U/μg de enzima pueden disminuir notablemente. La resina del *kit Thrombin CleanCleave™* se puede reutilizar. Finalmente se eligió las condiciones de la digestión "E", que permite una total digestión con ahorro de trombina y resina.

4.4.3. Purificación KAP-SPS digerido con HiTrap™ Q FF

El último paso para purificar la KAP-SPS es una segunda cromatografía, en este caso de intercambio iónico (Figura 4.37). Se ha utilizado un gradiente de concentración mayor de NaCl para aumentar la fuerza iónica de forma progresiva.

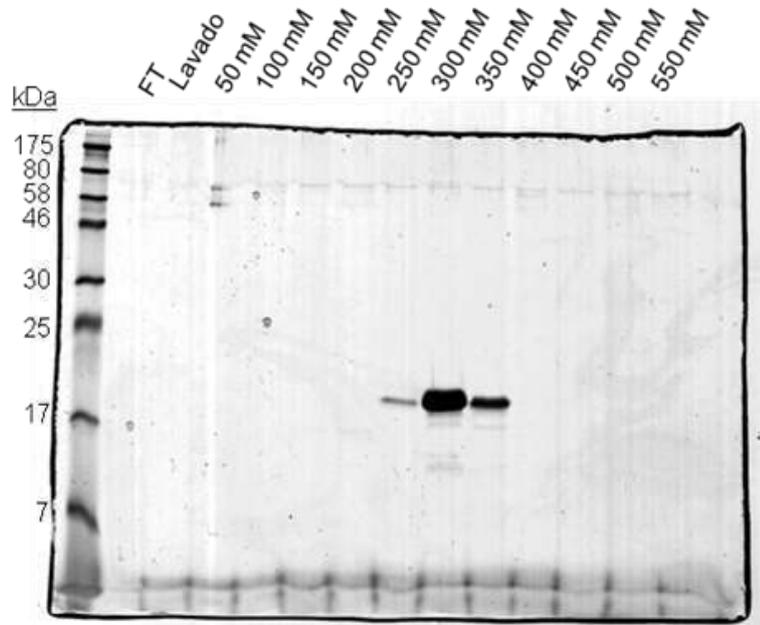


Figura 4.37: Ejemplo de segunda y última cromatografía (intercambio iónico) para purificar la proteína KAP-SPS. Valores de elución en mM de NaCl (1 ml de cada concentración).

Normalmente se obtiene la proteína concentrada y muy purificada en 2 o 3 alícuotas entre 250 y 350 mM de NaCl. El último paso es reunir estas alícuotas en un solo tubo falcon y acondicionarlas o cambiarles el buffer según el uso posterior que se le va a dar.

4.4.4. Producción y purificación de His-KAP-SPS en columna HisTrap™ FF 5 ml

La producción de proteína KAP-SPS para cristalografía requiere de una mayor producción de proteína. Para ello se utilizó una columna HisTrap™ FF de 5 ml en lugar de 1 ml. (Figura 4.38). A continuación, las condiciones de purificación optimizadas:

- Muestra aplicada: Extracto proteico de 1000 ml de cultivo + 1 mM imidazol.
- Lavado: 100 ml 50 mM Tris·HCl pH 8,0 10 mM CaCl₂ 1 mM imidazol → guardar 1 ml para gel.
- Elución 300: 10 ml 50 mM Tris·HCl pH 8,0 10 mM CaCl₂ 300 mM imidazol → alícuotas de 3 ml.
- Elución 500: 5 ml 50 mM Tris·HCl pH 8,0 10 mM CaCl₂ 500 mM imidazol → alícuotas de 3 ml.

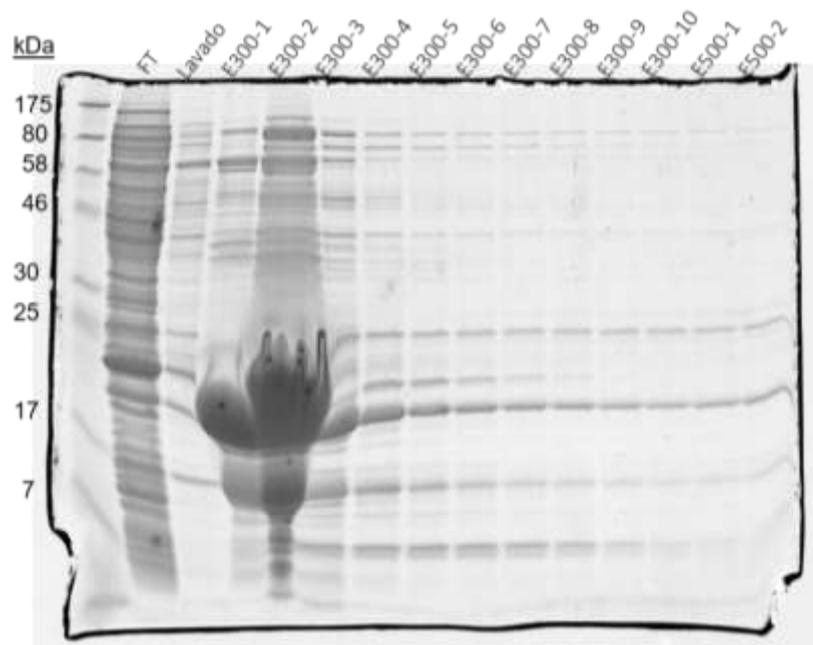


Figura 4.38: Ejemplo de purificación de His-KAP-SPS para cristalografía. Volumen de carga por cada pocillo: 10 µl de cada alícuota.

Se observa el aumento drástico de la producción de His-KAP-SPS (a pesar de que en este gel se ha cargado la mitad de muestra), a costa de perder pureza (se observan muchas más bandas de la esperada a 20 kDa → tamaño aparente de la His-KAP-SPS). Esto es debido a que en la producción de la proteína para cristalografía debe primar el rendimiento, ya que la cantidad necesaria es importante. Para corregir esta disminución de la pureza se trata la proteína con dos cromatografías extras en HPLC (en total 3 cromatografías), pero primero se tuvo que decidir si la proteína elegida para la cristalización también debería ser digerida con trombina para eliminar el tag de histidinas.

4.4.5. Prueba de estabilidad de His-KAP-SPS Vs KAP-SPS

Se hizo la prueba de estabilidad tanto con KAP-SPS (Figura 4.39) ultrapurificado (después de la digestión con trombina una purificación con HiTrap Q FF) como con His-KAP (Figura 4.40). En esta prueba se monitorizó la posible degradación de los dos tipos de proteínas en disolución a lo largo del tiempo, tanto a 4°C como a TA. También se hizo paralelamente otra prueba de estabilidad comprobando la posible degradación de las proteínas en numerosas fases de congelación/descongelación.

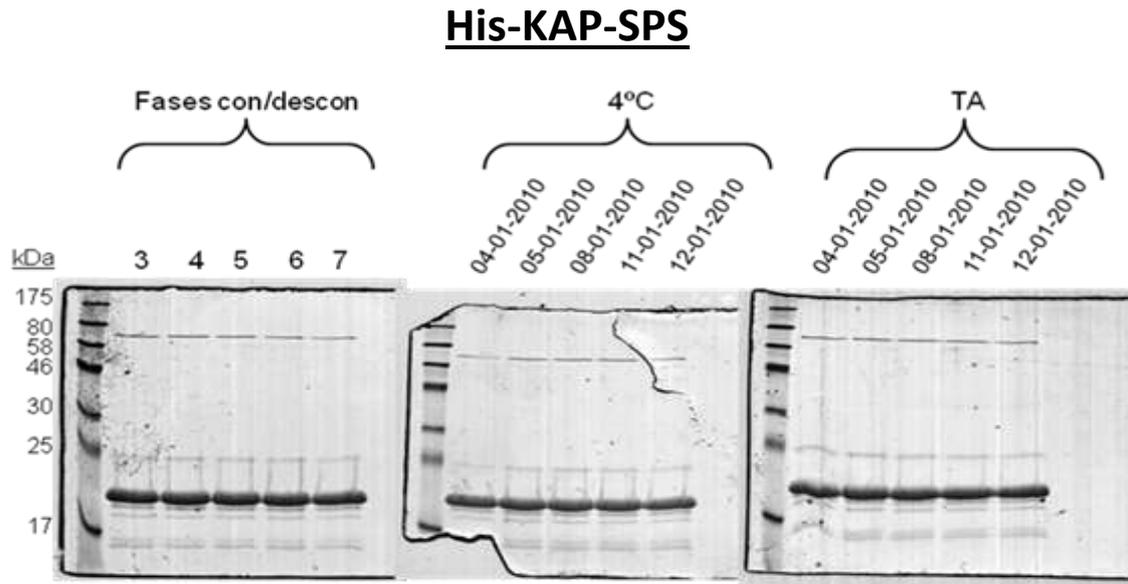


Figura 4.40: Ensayos de estabilidad de la His-KAP-SPS. Se observa que la proteína es estable y no presenta ningún tipo de degradación en todas las pruebas.

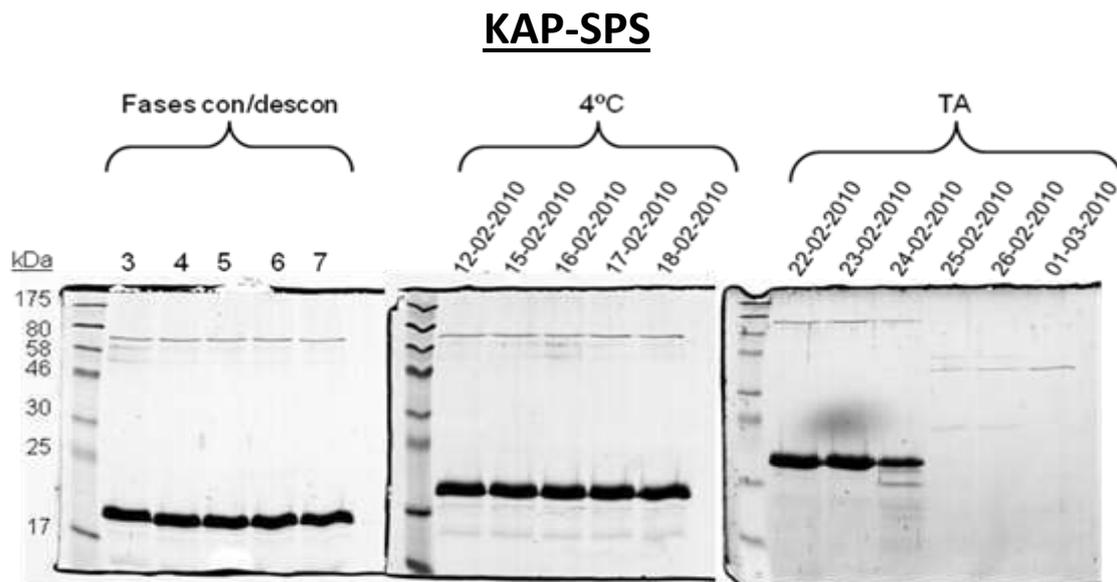


Figura 4.39: Ensayos de estabilidad de la KAP-SPS. Se observa degradación de la proteína a TA; parcial en el tercer día y total a partir del cuarto día.

En esta prueba se concluye que es mucho más estable la His-KAP-SPS que la KAP-SPS, ya que esta última se degrada a partir del segundo día cuando está a temperatura ambiente. Debido a que la fase de cristalografía es larga y se realiza a una temperatura ambiente, o cercana a ella, se decide que la proteína que se llevará a cristalizar sea la His-KAP-SPS. Además, se ha demostrado que el tag de 6 histidinas no va a interferir en la fase de cristalografía.

4.4.6. Purificación de KAP-SPS digerido con columna intercambio aniónico Mono Q HPLC

Las dos siguientes cromatografías en HPLC se llevaron a cabo en el centro cic-BIOGUNE de Bizkaia, centro con el que colaboramos para la cristalografía de la proteína. Se enviaron las muestras congeladas de proteína His-KAP-SPS ya digeridas con trombina. No se observó ningún precipitado al descongelar las muestras, se reunieron las alícuotas de elución de 250mM a 350mM NaCl en la pre-purificación con HiTrap Q FF (15ml). La concentración de NaCl de la muestra quedó en 300mM, por lo que se diluyó hasta 100mM NaCl adicionando 30 ml del buffer Tris 50mM pH 8.0. La KAP-SPS no quedó retenida a la columna (debería haberse diluido hasta 50mM NaCl) por lo que sale antes de que se aplique el gradiente de sal, pero concentrada en pocas alícuotas, con lo que se consigue el objetivo de purificar la proteína (Figura 4.41). Se colectaron cuatro fracciones de 2ml y se concentraron hasta 5 ml antes de aplicarlo en la columna de gel filtración. Se realizó un gel posterior con las muestras recolectadas durante el proceso de purificación (Figura 4.42).

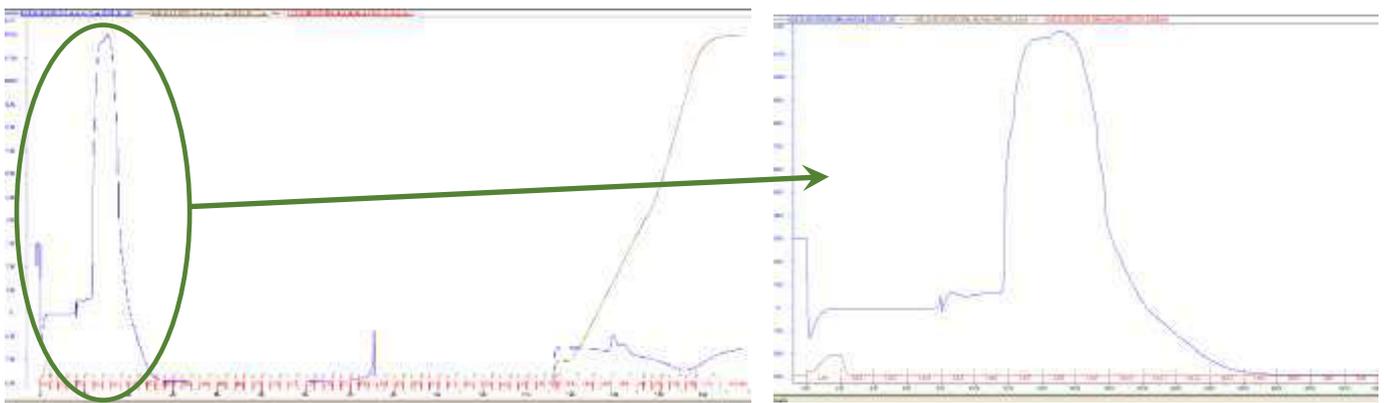


Figura 4.41: *Izquierda:* Cromatograma de la purificación de His-KAP-SPS por Mono Q HPLC. Se observa que la proteína no queda retenida a la columna y eluye antes de aplicar el gradiente salino. De todas formas, se cumple el objetivo de purificación. **Derecha:** Ampliación de la zona del cromatograma donde la His-KAP-SPS eluye de la columna.

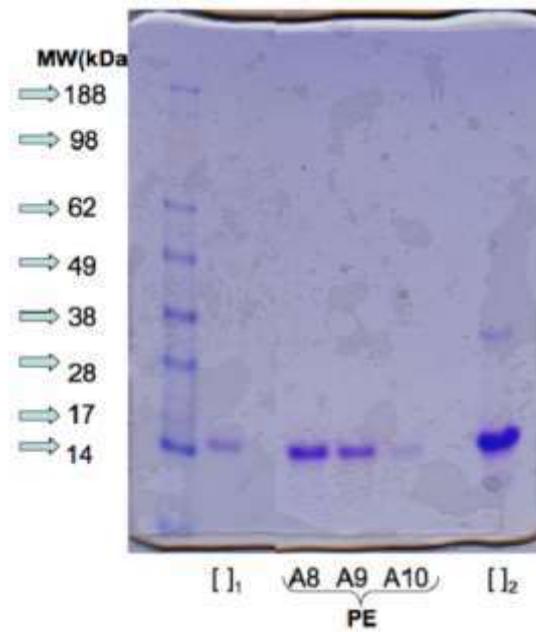


Figura 4.42: Gel de acrilamida con tinción de coomassie blue de las diferentes fases de la purificación. [1]₁: Muestra inicial; A8-A10: fracciones de la elución de His-KAP-SPS en la columna Mono Q; [1]₂: Unión de las fracciones A8-A10 concentrada a 5 ml.

4.4.7. Purificación de His-KAP-SPS con columna gel filtración Superdex G-200 HPLC

Partiendo de los 5 ml de la purificación anterior concentrada, se hace una segunda cromatografía, en este caso de gel filtración HPLC en una columna *Superdex G-200* (Figura 4.43). La proteína eluye en 66.3ml y, aunque el pico no es perfectamente simétrico, solo se observa KAP en el gel. Se colectaron alícuotas de 1ml y se aplicaron 10 μ l en el gel. En la calibración que está en el manual de la columna se observa que la aldolase de 158kDa eluye alrededor de 65ml, así que la KAP tiene un peso aparente parecido. Buffer: 100mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0.

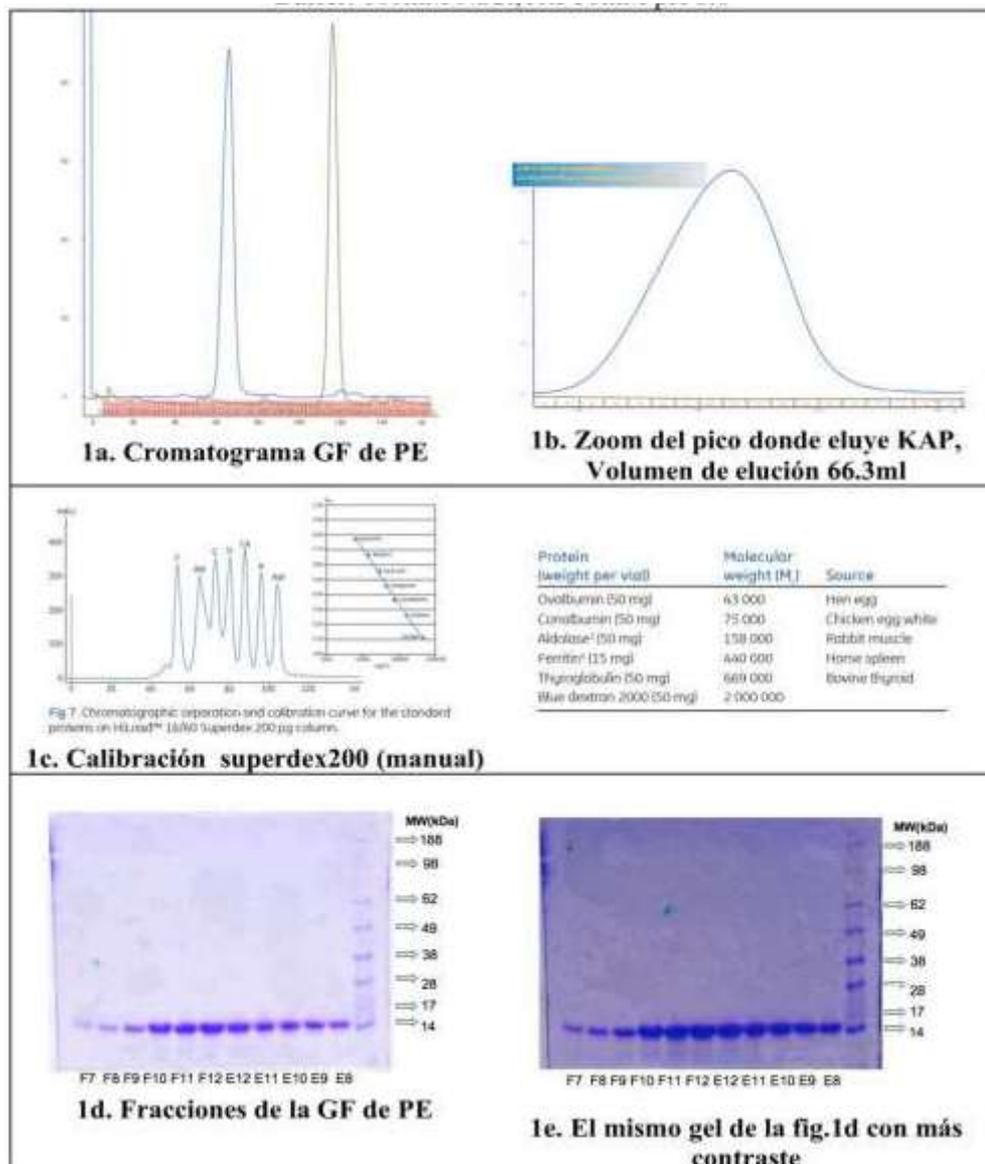


Figura 4.43: Proceso de purificación de la His-KAP-SPS por cromatografía de gel filtración HPLC en columna *Superdex G-200*. Se puede apreciar en la figura 1e la gran pureza final de la purificación.

4.5. Estructura 3D de la proteína KAP

4.5.1. Producción de cristales de His-KAP-SPS en el Crystalfarm

Para la producción de cristales de His-KAP-SPS se ha utilizado la plataforma Crystalfarm de cic-BIOGUNE que utiliza un método de difusión de vapor por gota colgante. En esta plataforma se han utilizado un total de 25 kits comerciales (Tabla 4.1) compuestos por placas con 96 condiciones diferentes de cristalización, poniendo en cada pocillo dos gotas de 1ml de mix muestra/solución precipitante, cada gota con una concentración de proteína diferente.

Tabla 4.1: Kits comerciales de soluciones precipitantes utilizados (96 condiciones por kit).

HAMPTON

[services/userfiles/Index_formulations.pdf](#)
[services/userfiles/PEGRx1_formulations.pdf](#)
[services/userfiles/file/PEGRx2_formulations.pdf](#)
[services/userfiles/file/SaltRx1_formulation.pdf](#)
[services/userfiles/file/SaltRx2_formulation.pdf](#)
[services/userfiles/file/grid_screen_ammonium_sulfate_documents.pdf](#)
[services/userfiles/file/grid_screen_mpd_documents.pdf](#)
[services/userfiles/file/Natrix_formulation_sheet.pdf](#)
[services/userfiles/file/PEG_Ion_formulation.pdf](#)
[services/userfiles/file/peg-ion_2_formulations.pdf](#)
[services/userfiles/CrystalScreenCryo.pdf](#)
[services/userfiles/file/crystal_screen_2_formulations.pdf](#)
[services/userfiles/file/Crystalscreen.pdf](#)

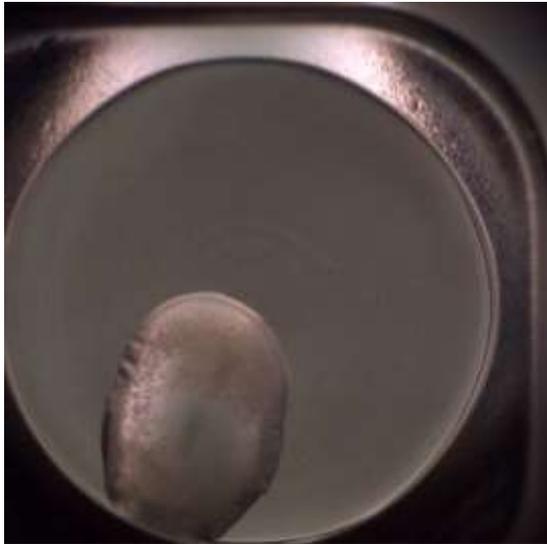
MOLECULAR DIMENSIONS

[services/userfiles/JCSG+.pdf](#)
[services/userfiles/PACT_premier.pdf](#)
[services/userfiles/Structure_Screen_1.pdf](#)
[services/userfiles/Structure_Screen_2.pdf](#)
[services/userfiles/Morpheus.pdf](#)
[services/userfiles/MD1-24_NR-LBD.pdf](#)
[services/userfiles/MD1-26_NR-LBD_Extension.pdf](#)
[services/userfiles/MD1-38_ProPlex.pdf](#)

QIAGEN-NEXTAL

[services/userfiles/JCSG-Core-I-Suite.pdf](#)
[services/userfiles/JCSG-Core-II-Suite.pdf](#)
[services/userfiles/JCSG-Core-III-Suite.pdf](#)
[services/userfiles/JCSG-Core-IV-Suite_0309.pdf](#)

Se realizó una primera ronda de cristalización con estos kits. Se obtuvieron fotos de cada pocillo: cada ocho horas el primer día, cada día los seis días siguientes y cada dos días el resto de días hasta tres-cuatro semanas. En total se obtuvieron 51.744 fotos que fueron analizadas visualmente. Algunas fotos representativas y sus condiciones se muestran en la figura 4.45.



A

Sal: 0,2 M Acetato de Calcio
Buffer: 0,1 M Imidazol pH 8,0
Precipitante: 20% PEG 1000
Concentración proteína: 10,02 mg/ml
Dia: 28



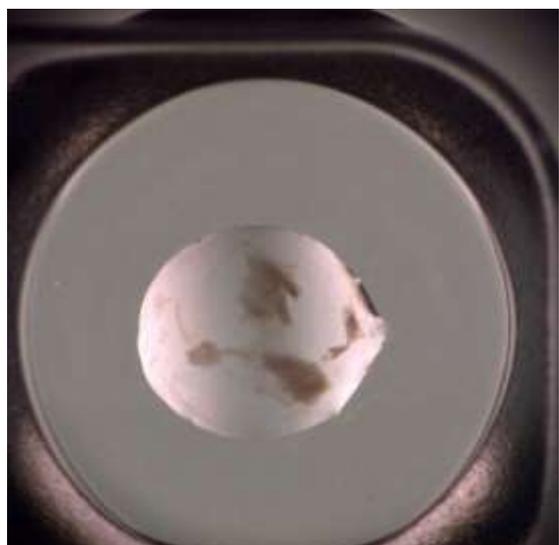
B

Buffer: 0,1 M HEPES pH 7,0
Precipitante: 20% PEG 8000
Concentración proteína: 10,02 mg/ml
Dia: 28



C

Buffer: 0,1 M TRIS pH 8,5
Precipitante: 1,0 M Fosfato Amónico dibásico
Concentración proteína: 10,02 mg/ml
Dia: 28



D

Sal: 1,0 M Cloruro de Litio
Buffer: 0,1 M Ácido Cítrico pH 4,0
Precipitante: 20% PEG 6000
Concentración proteína: 10,02 mg/ml
Dia: 28

Figura 4.45: Algunos ejemplos de fotos en el Crystalfarm y sus condiciones.

En esta primera ronda no se obtuvo un buen cristal de KAP, pero sí que aparecieron precipitados que, sin ser un cristal, indican las condiciones semejantes a esa que podrían ser buenas (Figura 4.46).

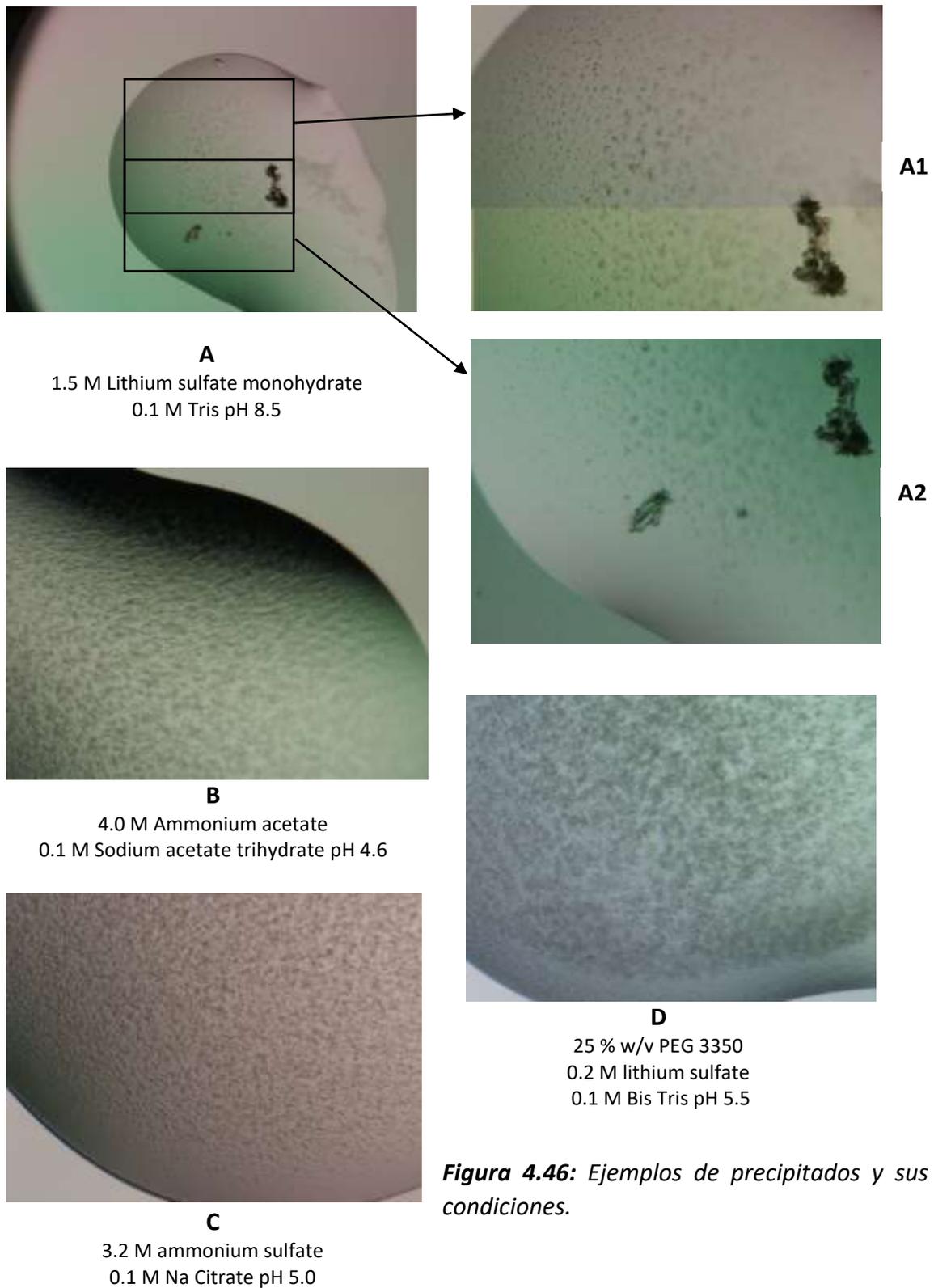


Figura 4.46: Ejemplos de precipitados y sus condiciones.

En la gota “A” podemos observar un precipitado que llamamos “polvo de cristal”, microcristales que en las condiciones adecuadas podrían evolucionar para formar un cristal que se pueda utilizar para recolectar datos de difracción. En las gotas “B” y “C” tenemos un precipitado que puede ser un crecimiento cristalino. Finalmente, en la gota “D” tenemos un ejemplo de un precipitado color marrón, que es característico de proteína desnaturizada (este precipitado lo hemos obtenido en muchas gotas).

Si sacamos las gotas del Crystalfarm y las observamos bajo el microscopio podremos ver en algunas condiciones microcristales que no se observan en las fotos hechas automáticamente, ya que la gota tiene volumen, y si cambiamos el plano manualmente sí lo podemos ver.

En A2 (Figura 4.46) se observa un cristal prometedor. Hay que asegurar que ese cristal es de proteína y no de sal (estamos en concentraciones de sales muy altas), Para ello se capturó este cristal y se irradió con rayos X en el generador de rayos X X8-PROTEUM que hay en las instalaciones del cic-BIOGUNE: el patrón de difracción de un cristal de sal y el de una proteína son muy diferentes. Se pudo observar que el cristal no era un cristal de sal, y suficientemente prometedor para llevarlo al sincrotrón de Grenoble.

4.5.2. Difracción de rayos X de los cristales de proteínas

Se llevó al sincrotrón de Grenoble el cristal más prometedor por un equipo comandado por la Dra. Adriana Rojas (cic-BIOGUNE). En el sincrotrón se obtuvo un patrón de difracción de rayos X (Figura 4.47).

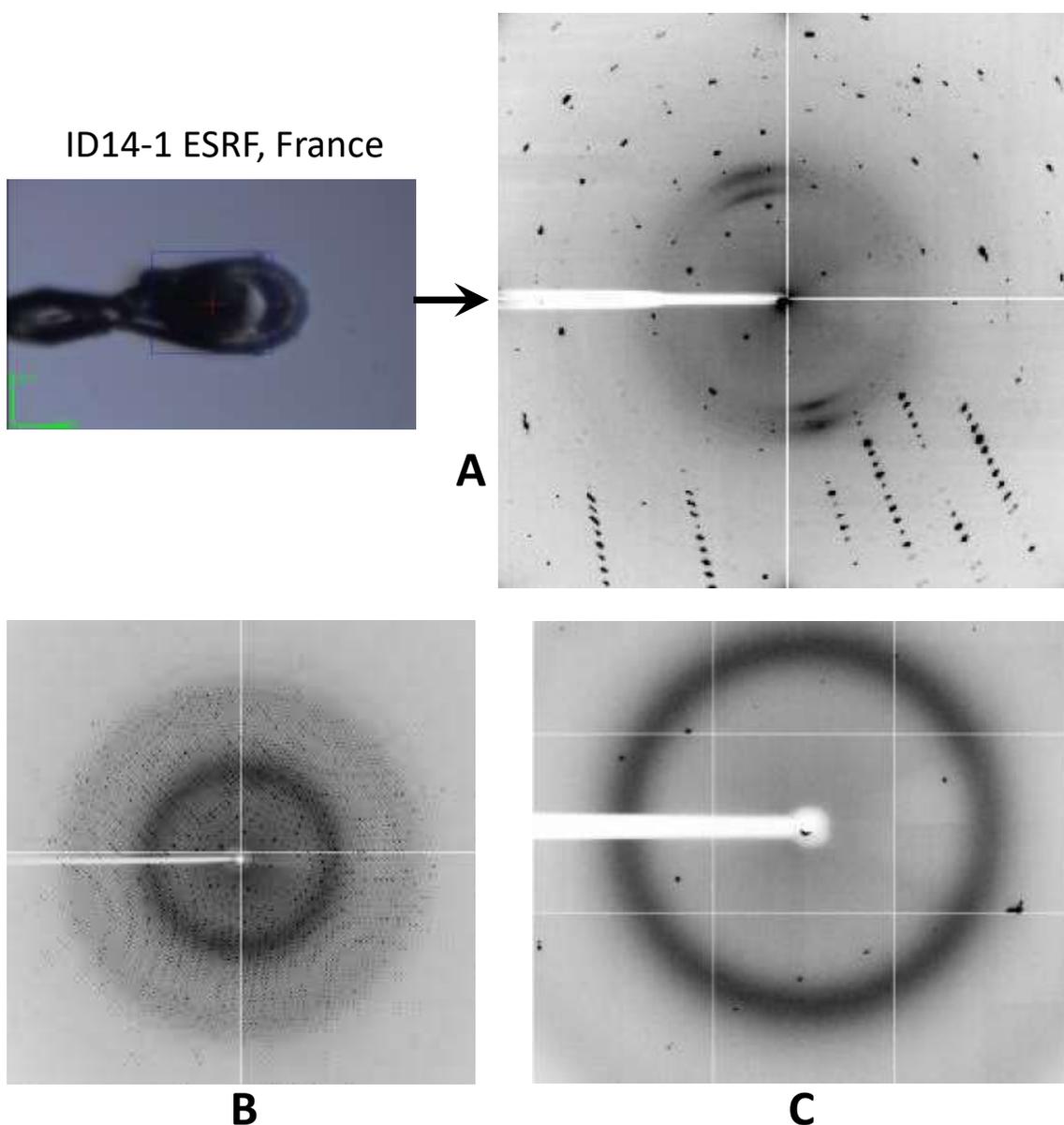


Figura 4.47: **A)** Patrón de difracción obtenido de un cristal de His-KAP-SPS. **B)** Patrón de difracción típico de un cristal de proteína. **C)** Patrón de difracción típico de un cristal de sal.

El patrón de difracción de rayos “X” obtenido fue definido en Grenoble como un patrón “anormal”, ya que, si bien estaba claro que no era un patrón típico de una sal, tampoco se ajustaba del todo a un patrón típico esperable de un cristal de proteína (Ver “Métodos: Difracción de rayos X de los cristales de proteínas”). De todas formas, se realizó un estudio computacional.

4.5.2.1. Análisis computacional de los patrones de difracción

Se ha realizado un estudio computacional de los datos de difracción con el programa HKL2000 (Tabla 4.2). El análisis de la celda unitaria utilizando este programa sugiere un cristal hexagonal con parámetros de red: $a=b=11.44\text{Å}$; $c=46.33\text{Å}$ $\alpha=\beta=90^\circ$; $\gamma=120^\circ$.

Tabla 4.2: Análisis de los datos de difracción con el programa HKL2000

Autoindexing preformed for unit cell between 11.7 to 312 Angstroms

◇ primitive cubic	51.67%	11.44 23.07	11.44 23.07	46.33 23.07	90.00 90.00	90.00 90.00	120.00 90.00
◇ I centred cubic	63.00%	47.72 35.63	47.72 35.63	11.44 35.63	83.11 90.00	83.11 90.00	23.97 90.00
◇ F centred cubic	65.82%	47.72 48.61	47.72 48.61	50.39 48.61	26.80 90.00	153.20 90.00	152.25 90.00
◇ primitive rhombohedral	3.36%	47.72 47.25 11.44	46.33 47.25 11.44	47.72 47.25 140.38	13.87 13.84 90.00	13.77 13.84 90.00	13.87 13.84 120.00
◆ primitive hexagonal	0.00%	11.44 11.44	11.44 11.44	46.33 46.33	90.00 90.00	90.00 90.00	120.00 120.00
◇ primitive tetragonal	13.61%	11.44 11.44	11.44 11.44	46.33 46.33	90.00 90.00	90.00 90.00	60.00 90.00
◇ I centred tetragonal	14.07%	11.44 11.44	11.44 11.44	93.35 93.35	86.49 90.00	86.49 90.00	120.00 90.00
◇ primitive orthorhombic	13.61%	11.44 11.44	11.44 11.44	46.33 46.33	90.00 90.00	90.00 90.00	60.00 90.00
◇ C centred orthorhombic	0.00%	11.44 11.44	19.82 19.82	46.33 46.33	90.00 90.00	90.00 90.00	90.00 90.00
◇ I centred orthorhombic	14.07%	11.44 11.44	11.44 11.44	93.35 93.35	86.49 90.00	93.51 90.00	60.00 90.00
◇ F centred orthorhombic	2.91%	11.44 11.44	19.82 19.82	93.35 93.35	90.00 90.00	97.04 90.00	90.00 90.00
◇ primitive monoclinic	0.00%	11.44 11.44	46.33 46.33	11.44 11.44	90.00 90.00	120.00 120.00	90.00 90.00
◇ C centred monoclinic	0.00%	19.82 19.82	11.44 11.44	46.33 46.33	90.00 90.00	90.00 90.00	90.00 90.00
◇ primitive triclinic	0.00%	11.44	11.44	46.33	90.00	90.00	120.00

Sin embargo, un posterior análisis calculando el coeficiente de Matthews sugiere que no es probable que una molécula de 12kDa forme un cristal con una celda unitaria de estas dimensiones (Figura 4.49).

```

Unit cell dimensions in A, deg(o) and cubic A :
  a      b      c      alpha  beta  gamma  volume
 11.4400 11.4400 46.3300 90.000 90.000 120.000 5251.0
Space group P 6      , space group number 168, Laue class 6/m , z= 6
System as decoded from unit cell dimensions : hexagonal
is consistent with space group P 6      : hexagonal
Found 0 possible solutions :
  N(mol)      Prob(N)      Prob(N)      Vm      Vs      Mw
      for resolution overall      A**3/Da      % solvent      Da
  
```

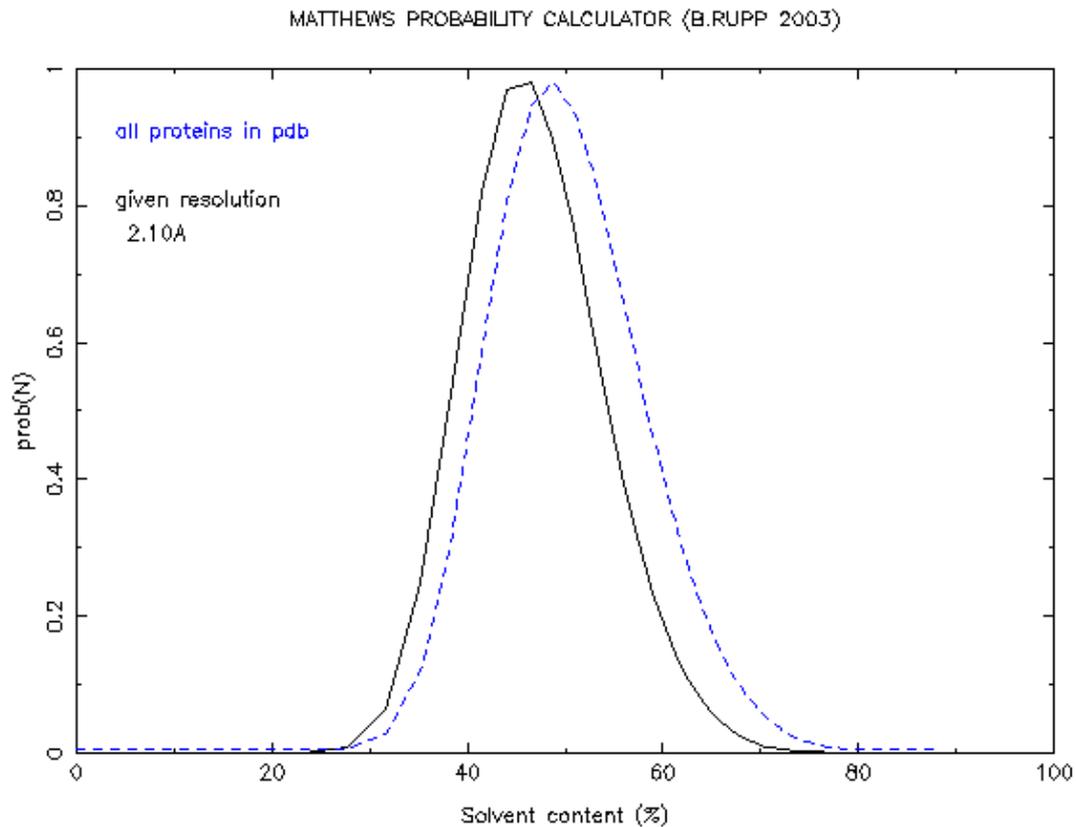


Figura 4.49: Cálculo del coeficiente de Matthews.

4.5.3. Dicroísmo Circular (DC)

Se han realizado estudios de DC con la proteína His-KAP-SPS en disolución y se ha obtenido un espectro de Elipticidad Molar por Residuo (EMR) Vs longitud de onda en el ultravioletado (Figura 4.50).

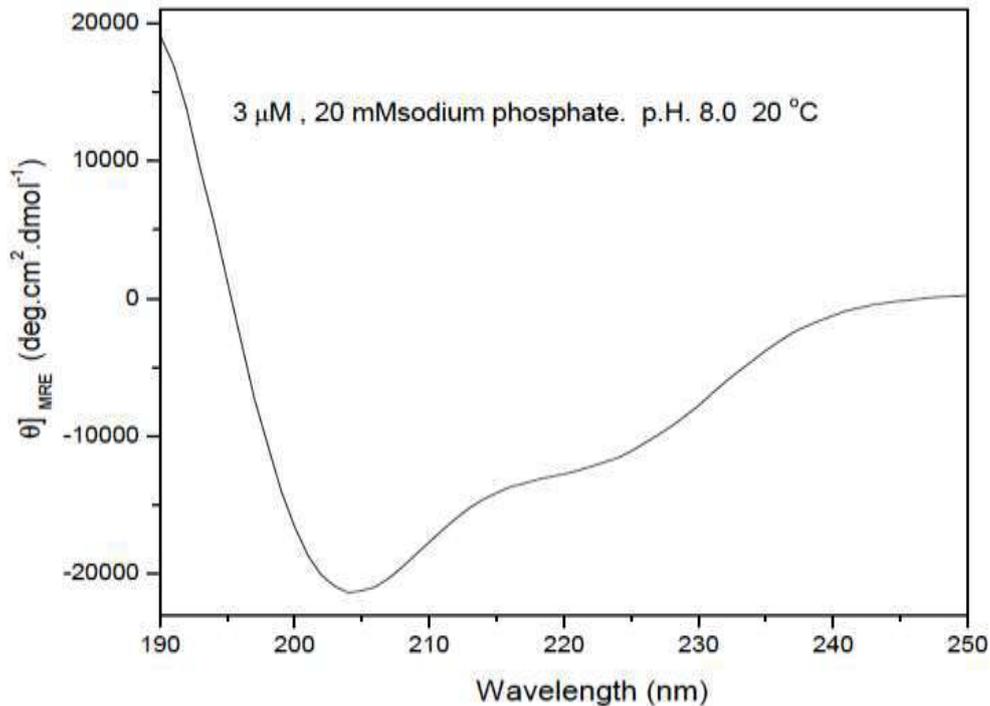


Figura 4.50: Espectro de DC de la proteína His-KAP-SPS en disolución.

A partir de este espectro se ha hecho un análisis computacional con diferentes algoritmos que comparan este espectro con los espectros de DC de otras proteínas ya determinadas (Tabla 4.3). De los tres algoritmos hay uno, CONTINLL, que obtiene un valor de la raíz del error cuadrático medio (RECM, NRMSD en la figura) particularmente bueno: 0,029. Indica que la predicción hecha por este algoritmo se ajusta de forma estadísticamente significativa con sus bases de datos. Según este algoritmo, la proteína His-KAP-SPS es un 52.1% desestructurado (giros + desordenado).

Tabla 4.3: Predicción de la estructura 3D de la proteína His-KAP-SPS a partir de su espectro de dicroísmo circular realizado por tres algoritmos diferentes

Program	Helix	Strand	Turn	Unordered	NRMSD
CONTINLL	38.2%	9.7%	19.5%	32.6%	0.029
SELCON3	32.1%	18.9%	20.2%	29.5%	0.785
CDSSTR	42.0%	13.9%	12.1%	32.5%	0.129

4.5.3.1. Estudio de Desnaturalización Térmica

Se ha realizado un estudio de desnaturalización térmica que da como resultado un espectro de la elipticidad normalizada a una longitud de onda de 222nm Vs temperatura (Figura 4.52). Este estudio permite calcular un valor de Tm. Tm es la temperatura en la que una proteína en disolución está al 50% desnaturalizada, es decir, nos da un valor de temperatura a partir de la cual la proteína empieza a perder su estructura 3D. En el caso de nuestra proteína His-KAP-SPS, este valor de Tm es de sólo 32,2°C. Este valor de Tm es particularmente bajo, propia de una proteína intrínsecamente desestructurada.

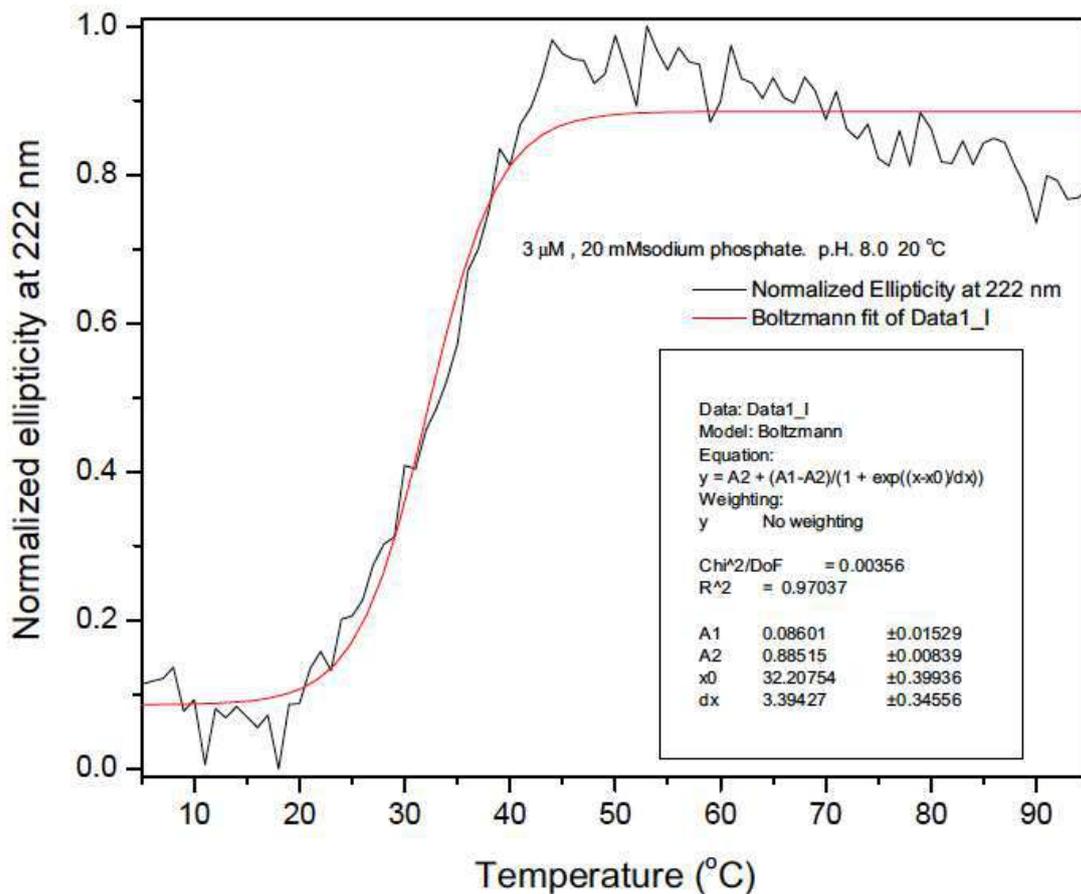


Figura 4.52: Estudio de desnaturalización térmica de la His-KAP-SPS. Este estudio nos da un valor de Tm (Punto de inflexión de la curva) de 32,2°C.

También se hizo un estudio de reversibilidad térmica, en la que la proteína se desnaturalizaba subiendo la temperatura, y al bajarla se volvía a capturar el espectro de DC (Figura 4.53). Este estudio releva que la proteína His-KAP-SPS tiene una desnaturalización térmica reversible, lo que quiere decir que después de una fase de desnaturalización-renaturalización vuelve a tener su misma estructura 3D.

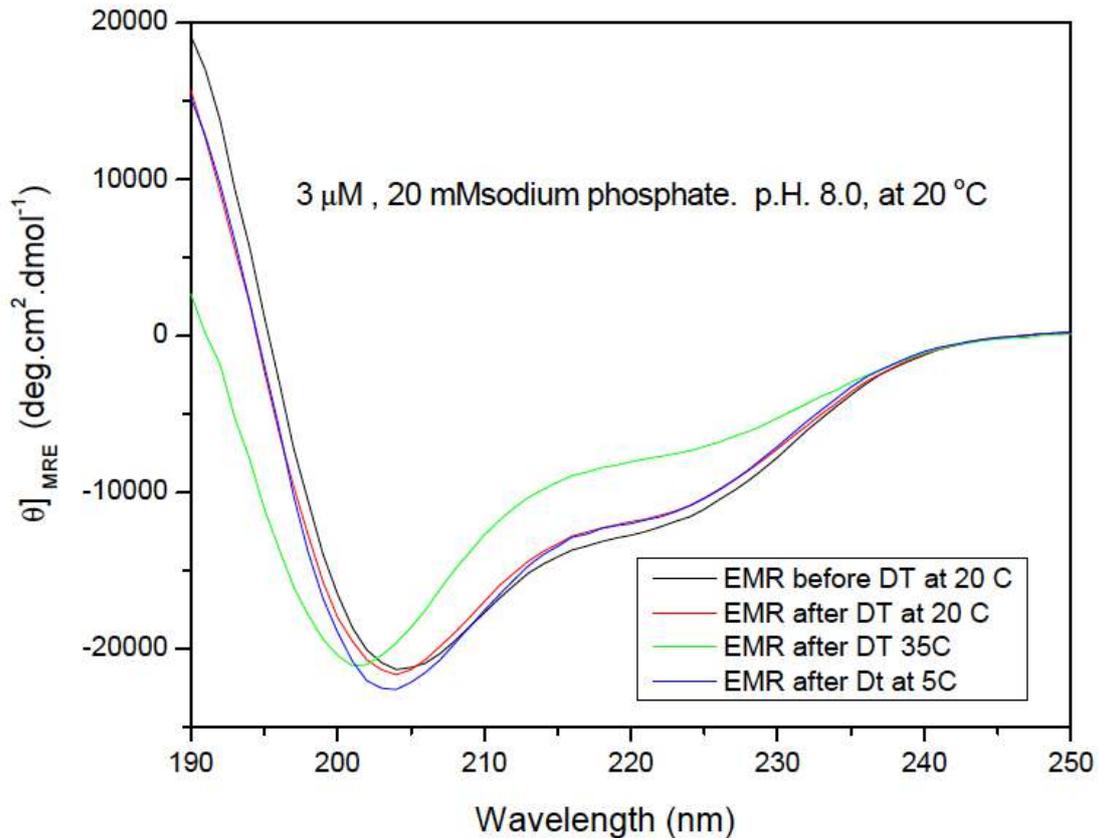


Figura 4.53: Estudio de reversibilidad térmica de la His-KAP-SPS. Se compara el espectro de DC de la proteína después de desnaturalizarla y bajar la temperatura a 20°C (rojo), 35°C (verde) y 5°C (azul); con el espectro de la proteína antes de desnaturalizarla (negro). Se observa como los espectros coinciden (lo que indica una buena reversibilidad térmica) menos en el caso de 35°C, que tiene otro espectro. Pero esta anomalía es lógica teniendo en cuenta que esta proteína tiene un T_m de 32,2°C, por lo que a 35°C ya tiene otra estructura 3D.

4.5.4. Microscopia Electrónica de Transmisión Tridimensional (3D-TEM)

Se ha realizado diferentes ensayos de 3D-TEM con la proteína His-KAP-SPS. Para eso, se ha utilizado la mejor muestra de His-KAP-SPS que teníamos (en términos de pureza, 11,12 mg/ml), diluida 1/5, 1/10, 1/20 i 1/50 con tinción negativa de acetato de uranilo i vanadio. De todos los ensayos, el que mejor resultados ha dado ha sido con la tinción negativa de acetato de uranilo y en una dilución 1/20 (Figura 4.54). La mayor parte de la proteína se ha agregado, y solo se observan unas pocas unidades discretas de His-KAP-SPS aisladas. El número de unidades aisladas de la proteína es totalmente insuficiente para poder realizar el trabajo *in-silico* y obtener una estructura 3D de baja resolución.

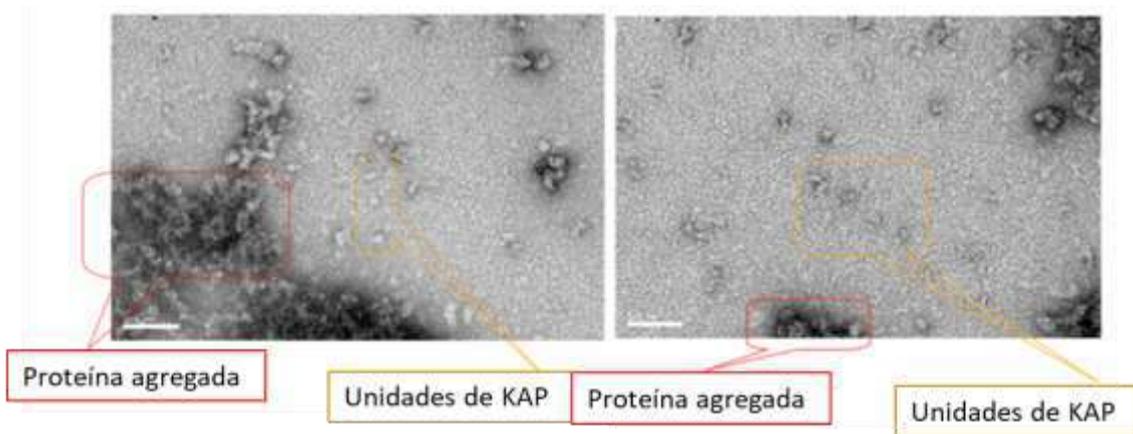


Figura 4.54: Microscopia electrónica de transmisión de His-KAP-SPS en una dilución 1/20 y con tinción negativa de acetato de uranilo. Se pueden observar dos capturas diferentes, en las que se ve una mayor proporción de agregado proteico y solo unas pocas unidades discretas de la proteína.

4.5.5. Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (RMN-1D)

Se ha realizado un ensayo de Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (RMN-1D) de la señal N-H con la proteína His-KAP-SPS. Para eso, se ha utilizado la mejor muestra de His-KAP-SPS que teníamos (en términos de pureza, 11,12 mg/ml) (Figura 4.55).

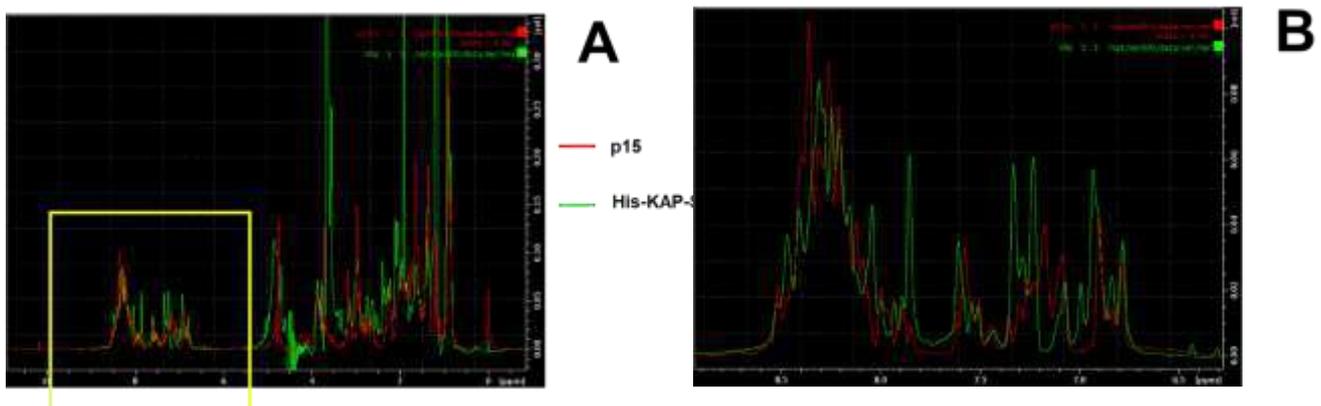


Figura 4.55: Espectro de RMN-1D de la Hid-KAP-SPS (Verde) y superpuesto el espectro de p51 (Rojo). **A)** Espectro de 0-10 ppm. **B)** Espectro de 6,5-8,5 ppm (ampliación del recuadro amarillo de A).

Si se observa el espectro, y el gran solapamiento que tiene con el espectro de la proteína p15 (proteína intrínsecamente desestructurada), podemos deducir que His-KAP-SPS podría ser intrínsecamente desestructurada.

5. Discussión

El riñón murino representa un modelo único en donde estudiar la acción androgénica a nivel transcripcional ya que, contrariamente a lo que ocurre en los órganos sexuales accesorios del sistema reproductor, los andrógenos inducen hipertrofia, sin síntesis de DNA (Niu EM, 1991). Nuestro grupo, interesado en el estudio de los mecanismos que controlan la regulación de la expresión génica mediada por andrógenos en riñón y en el significado fisiopatológico de la misma, decidió identificar nuevos genes diana de la acción androgénica en este tejido. Utilizando técnicas de expresión diferencial se identificaron genes coordinadamente expresados por andrógenos en el riñón (Melia MJ, 1998). Entre estos genes se encontraba la Kidney androgen-regulated Protein (KAP) el gen más abundante y específico de las células del túbulo proximal renal murino (Meseguer A, 1987; Meseguer A, 1990; Meseguer A, 1992), donde se expresa de forma exclusiva por acción de hormonas esteroideas y tiroideas, en los distintos segmentos del túbulo. El estudio de genes regulados por andrógenos en el riñón, y especialmente los de expresión restringida al mismo, como es el caso de la KAP, podría ser relevante en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad renal de mayor gravedad y más frecuente en hombres que en mujeres. Por ese motivo en nuestro grupo, se han realizado muchos estudios sobre la regulación de la KAP, tanto a nivel de mRNA como proteína, así como sobre su posible papel en la fisiopatología renal utilizando modelos celulares derivados de túbulo proximal murino y humano y ratones transgénicos con expresión restringida de KAP en el riñón (Tornavaca O, 2009).

Los primeros 600 pares de bases del promotor de KAP contienen varios elementos de respuestas para c/EBPs, Sp1/Sp3, una caja TATA, ARE (Elemento de Respuesta a Andrógenos), ERE (Elemento de Respuesta a Estrógenos), TRE (elemento de Respuesta a hormonas Tiroideas), etc. (Teixido N, 2006). Todos estos elementos cooperan de forma aditiva y/o sinérgica formando un enhanceosoma en el promotor proximal que facilita la transcripción del gen. Además de estos elementos esenciales, se conoce que la GH, a través de IGF-1 (Soler M, 2002), y los glucocorticoides (Teixidor N, 2007) sinergizan con el receptor de andrógenos y Sp1 en la activación transcripcional de KAP. Estos experimentos indican que existe un estricto y coordinado control multifactorial de la expresión del gen KAP en las células del túbulo proximal, lo que probablemente sugiere la conveniencia de mantener sus niveles de expresión en un estricto rango fisiológico. Por ello, y porque no había información sobre la función ni la estructura de la proteína KAP se propuso la identificación y caracterización de la misma.

Los resultados obtenidos en esos estudios, ampliamente descritos en la introducción de esta tesis, indicaron que la KAP se regula de forma compleja y sofisticada en los distintos segmentos del túbulo proximal por varios factores y hormonas a nivel transcripcional, tal como sugería el análisis de su promotor (Soler M, 2002; Teixidor N, 2006; Teixidor N, 2007). También se observó que existe una regulación post-traducciona de la proteína, vinculada a su estado de fosforilación por CK2 en distintos residuos de secuencias PEST, que promueven la degradación de la misma por calpaína (Tornavaca O, 2007). Este elevado grado de regulación sugiere, como ya ha sido comentado, la necesidad de mantener la proteína en rangos fisiológicos.

En este sentido observamos que el daño tubular causado por CsA en las células del túbulo proximal se asocia a la pérdida de KAP, que se degrada por acción del inmunosupresor (Cebrian C, 2001). La interacción de KAP y CypB, uno de los receptores intracelulares de CsA, sugiere una relación funcional entre ambas proteínas. También se puso en evidencia que cuando KAP se administra de forma exógena a las células disminuye el daño por CsA, lo que sugiere que la pérdida de KAP, al menos en parte, promueve el daño tubular. Esos mismos resultados se observaron en riñones de animales Tg para KAP, donde el transgén está exclusivamente expresado en las células del túbulo proximal renal, por acción de los andrógenos (Tornavaca O, 2011). Se constató que KAP se pierde en presencia de CsA, especialmente en el segmento S3, correlacionándose con el aumento de marcadores de daño tubular, y que en animales Tg para KAP, en donde los niveles de la proteína se mantienen más elevados, los marcadores de daño disminuyen aun en presencia de las mismas dosis de CsA. Estos resultados demuestran que la pérdida de KAP por debajo de sus niveles fisiológicos puede inducir daño renal y que el mantenimiento de sus valores en el animal Tg protege de la toxicidad.

Del mismo modo, también hemos observado que los animales Tg para KAP en situación basal, por el mero hecho de sobreexpresar KAP en el túbulo renal, muestran alteraciones importantes que incluyen: glomérulo esclerosis segmental y focal, hipertensión, glucosuria y proteinuria, relacionadas con el aumento del estrés oxidativo, la actividad simpática y la activación del sistema renina-angiotensina (RAS) (Tornavaca O, 2009). Tal como ha sido comentado en la introducción, algunos de estos rasgos son propios del síndrome metabólico y, por ello, se postuló que exponer los animales Tg a una dieta rica en grasa exacerbaría el desarrollo del síndrome en estos animales. De forma sorprendente, observamos que lejos de promover la gravedad del síndrome, la sobre expresión de KAP en el riñón tuvo un efecto protector sobre su desarrollo (Bardaji B, 2017). El estudio bioquímico y molecular de animales Tg y hermanos WT de camada, alimentados con dieta control o rica en grasa, demuestra que KAP ejerce un control sobre el aumento de los niveles de leptina y de marcadores de inflamación a nivel sistémico y local, producidos por la dieta. En modelos celulares de túbulo proximal renal humano se ha demostrado que KAP impide la producción de Il-6 inducida por TNF- α y la posterior activación de STAT-3 mediada por la fosforilación del residuo Tyr705. La inflamación es un elemento patogénico clave en el desarrollo de la obesidad producida por una dieta rica en grasa, así como de la fibrosis promovida por la CsA, por lo que el papel protector de KAP podría estar relacionado con su efecto anti-inflamatorio en este tipo de situaciones patológicas.

El impacto de la sobreexpresión de KAP en animales alimentados con dieta control es mucho menor que el producido por la dieta rica en grasa en animales control. Los animales Tg alimentados con dieta rica en grasa no sufren el impacto de la dieta y muestran las mismas características que los Tg alimentados con dieta control en cuanto a niveles de presión arterial, peso, desarrollo de esteatosis hepática, marcadores de inflamación, etc.

Nuestro grupo se consideró que el conocimiento que habíamos generado en torno a KAP, tanto a nivel de la regulación del mRNA y de la proteína, como a nivel funcional en modelos celulares y animales de ratón, sugería que la proteína KAP podía ser relevante en la prevención/tratamiento del síndrome metabólico y de la fibrosis, también en humanos. El síndrome metabólico es la epidemia del siglo XXI; la fibrosis es el resultado final de un proceso patológico renal, independientemente del origen de la patología de base, que conlleva al tratamiento renal sustitutivo (diálisis o trasplante). El hecho de que no encontráramos el gen de la KAP en humanos, inhabilitaba a la proteína KAP como putativa diana terapéutica pero todavía permitía pensar en ella como una molécula con potencial terapéutico como fármaco.

Los objetivos de esta tesis han ido dirigidos a entender en mayor profundidad qué relación existe entre KAP y CypB, en procesos relevantes para la célula como son: la proliferación, la diferenciación, la muerte celular o la inflamación, en particular, en la vía NF- κ B y la activación de STAT-3. Además, dado que KAP y CypB interactúan en el riñón murino hemos querido identificar, tras demostrar que KAP y la CypB humana también interactúan, nuevas proteínas capaces de interactuar con KAP, pero también con la CypB humana, a efecto de encontrar un posible homólogo funcional de KAP en humanos que pudiera constituir, en este caso sí, una nueva diana terapéutica. Finalmente, y dado que se desconoce la estructura tridimensional de KAP, propusimos como último objetivo de esta tesis la cristalización de KAP. Nuestra hipótesis fue que ese conocimiento podría arrojar luz sobre posibles homólogos estructurales en humanos, que sin compartir similitud de secuencia pudieran compartir funcionalidad en las células del túbulo proximal.

A continuación, se discutirán en más detalle todos estos aspectos en los que se ha enfocado la tesis.

5.1. Interacción de KAP con CypB humana

Un estudio de alineamiento aminoacídico entre la mCypB y la hCypB (Figura 5.1) muestra que las dos proteínas tienen el mismo tamaño (208 aminoácidos), que solo cambian de aminoácido en 13 posiciones (6 de ellos son cambios conservadores, entre aminoácidos con carga electrostática y tamaño parecidos) y arroja un valor de *E value* (Valor esperado) de únicamente $2e-146$ (Cuanto menor sea el *E value*, o cuanto más cerca esté de cero, más "significativa" es la coincidencia). Es decir, hay una gran homología entre las dos CypB, estamos ante una secuencia conservada o secuencia ortóloga.

mCypB	1	MKVLFAAALIVGSVVFLLLPGPSVANDKKKGPKVTVKVYFDLQIGDESVGRVVFGLFGKT	60	
		MKVLAAALI GSV FLLLPGPS A KKKGPKVTVKVYFDL IGDE VGRV FGLFGKT		
hCypB	1	MKVLAAALIAGSVFLLLPGPSAADEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDEVGRVIFGLFGKT	60	
mCypB	61	VPKTVDNFVALATGEKGFYKNSKFHRVIKDFMIQGGDFTRGDGTGGKSIYGERFPDENF	120	
		VPKTVDNFVALATGEKGFYKNSKFHRVIKDFMIQGGDFTRGDGTGGKSIYGERFPDENF		
hCypB	61	VPKTVDNFVALATGEKGFYKNSKFHRVIKDFMIQGGDFTRGDGTGGKSIYGERFPDENF	120	
mCypB	121	KLKHYGPGWVSMANAGKDTNGSQFFITTVKTSWLDGKHVVFQKVLGMDVVRKVESTKTD	180	
		KLKHYGPGWVSMANAGKDTNGSQFFITTVKTSWLDGKHVVFQKVLGMDVVRKVESTKTD		
hCypB	121	KLKHYGPGWVSMANAGKDTNGSQFFITTVKTAWLDGKHVVFQKVLGMEVVRKVESTKTD	180	
mCypB	181	SRDKPLKDVIIVDSGKIEVEKPFIAIAKE	208	■ Cambio aminoácido
		SRDKPLKDVIIDGKIEVEKPFIAIAKE		
hCypB	181	SRDKPLKDVIADCGKIEVEKPFIAIAKE	208	■ Cambio aminoácido conservador

Figura 5.1: Comparación aminoacídica de las CypB murinas (mCypB) y humana (hCypB) realizado por el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Dada la gran homología entre la mCypB y la hCypB, era de esperar que KAP, además de interactuar con la CypB de ratón, también lo hiciera con la humana, pero se debía comprobar experimentalmente.

En un trabajo reciente realizado por nuestro grupo, se ha demostrado que el silenciamiento de CypB en células del túbulo proximal humano (HK-2) promueve la diferenciación epitelial y previene cambios fenotípicos similares a EMT inducidos por TGF- β (regulación a la baja de los marcadores epiteliales, morfología celular alterada y aumento de la adhesión e invasión de la célula al sustrato), por lo que se postuló que CypB actúa como un represor epitelial (Sarró E, 2020). Sin embargo, existen algunas similitudes entre el silenciamiento de CypB y la acción de TGF β en la promoción de la migración celular colectiva y la adhesión de célula a sustrato que podrían involucrar diferentes mecanismos de acción. Una migración colectiva más rápida de las células silenciadas con CypB resultaría de la regulación al alza de las proteínas adherentes y de las uniones estrechas.

5.2. Interactómica de KAP y hCypB con otras proteínas

Tras demostrar la interacción de KAP con la CypB humana, investigamos qué proteínas expresadas en las células del túbulo proximal humano, podrían interactuar con KAP, con hCypB o con ambas.

Entre las proteínas que se unen tanto a hCypB como a KAP se incluyen: **Vimentina, Prohibitina y Cofilina-1.**

Es sugerente pensar que KAP y CypB podrían estar funcionalmente relacionadas en procesos distintos a la ya conocida prevención de la toxicidad por CsA, y que las tres proteínas que interactúan simultáneamente con KAP y CypB también estuvieran implicadas en esos procesos, a través de la formación de complejos funcionales.

La Vimentina, uno de los miembros de la familia de proteínas de Filamentos Intermedios (IF), es la principal representante de la familia en las células mesenquimales, y se utiliza con frecuencia como marcador del desarrollo de células y tejidos. El análisis del fenotipo de los ratones KO para vimentina (Colucci-Guyon E, 1994) reveló que la pérdida de vimentina conduce a cambios morfológicos en las células de la glía (Colucci-Guyon E, 1999), deterioro en la cicatrización de heridas (Eckes B, 2000) debido a defectos en la capacidad de los fibroblastos para migrar (Eckes B, 1998), disminución en la dilatación inducida por el flujo en las arterias que refleja un papel en la mecanotransducción del esfuerzo cortante (Henrion D, 1997), alteración del desplazamiento de los leucocitos a los ganglios linfáticos (Nieminen M, 2006) y falta de integridad en el endotelio vascular (Nieminen M, 2006). Estudios recientes han demostrado que la vimentina participa en una serie de funciones críticas, a menudo relacionadas con la organización de proteínas que participan en la adhesión, migración y señalización celular.

La Cofilina-1 es miembro de la familia ADF (Factor Despolimerizante de Actina) / Cofilina, y tiene un papel importante en la modulación de la dinámica de la actina, como regulador del ensamblaje y desensamblaje del filamento de actina (Troys MV, 2008), y está implicada en el movimiento de avance de las células, proceso crucial para el desarrollo embrionario (Chan C, 2009).

Nuevos estudios sobre la Cofilina-1 han señalado funciones no relacionadas con la regulación del ensamblaje de la actina. La primera es la de acompañar a la actina hasta el núcleo, donde participa en la formación de complejos nucleares de ribonucleoproteínas relacionados con la regulación de la expresión génica (Pederson T, 2008; Zheng B, 2009). La actina en sí misma no tiene una secuencia de localización nuclear pero la Cofilina-1 sí la tiene y la acompaña hasta el núcleo. La segunda hace referencia a la translocación de la Cofilina-1 a las mitocondrias tras la inducción de la apoptosis con estaurosporina en células de neuroblastoma (Chua BT, 2003). En los neutrófilos, la oxidación de la Cofilina-1 y su translocación mitocondrial también inducen apoptosis (Klamt K, 2009). La translocación de Cofilina-1 parece ser necesaria para la

apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la posterior liberación de citocromo c, un paso temprano en la apoptosis; fenómeno que también se da por acción de la CsA a través de la inhibición de la ciclofilina D (CypD) mitocondrial (Leytin V, 2009). Ni la translocación a las mitocondrias ni la liberación de citocromo c requieren la unión a actina, aunque la apoptosis se bloquea mutando el dominio de unión a actina (Chua BT, 2003). Esta propiedad de la Cofilina-1 vinculan citoesqueleto y apoptosis, y se cree que una reducción de la dinámica de la actina provoca una disminución del potencial de la membrana mitocondrial y el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gourlay CW, 2005).

En cuanto a la regulación de la actividad de la Cofilina-1, se sabe que la fosforilación en la Serina 3 inhibe su unión con la G-actina (actina monomérica) y la F-actina (Bamburg JR, 2008) (Bamburg JR, 1999). La activación de la Cofilina-1 viene dada por la defosforilación en Ser3 mediante una fosfatasa: Slingshot 1L (SSH1L) (Huang TY, 2006). Una de las causas que inactiva la SSH1L y, por tanto, frena la activación de la cofilina-1, es el estrés oxidativo derivado de ROS (Eiseler T, 2009; Peterburs P, 2009), que provoca la fosforilación de SSH1L y su unión con la proteína 14-3-3. Recordemos que la modulación de proteína 14-3-3 era una de las funciones de la Vimentina descrita anteriormente, y que el estrés oxidativo es una de las particularidades que muestran los ratones KAP Tg (Tornavaca O, 2009; Grande MT, 2011). El estrés oxidativo es un factor que provoca cambios funcionales en el riñón que afectan la fisiopatología del SM (Raimundo M, 2011). **Aunque no hemos realizado los experimentos necesarios para demostrarlo, se apunta una posible relación funcional entre estos dos interactores de KAP y hCypB con el SM inducido por dieta HFD y con los procesos de estrés oxidativo promovidos por la sobre expresión de KAP en el túbulo proximal renal.**

La Prohibitina (PHB), otra proteína capaz de interactuar con KAP y CypB, se expresa de forma ubicua en muchos tipos de células y se localiza principalmente en las mitocondrias, el núcleo y la membrana plasmática. Diversos estudios han encontrado que la PHB está involucrada en varias vías metabólicas importantes, siendo regulado por varios genes, y a su vez, regulando la expresión de otros (Figura 5.2)

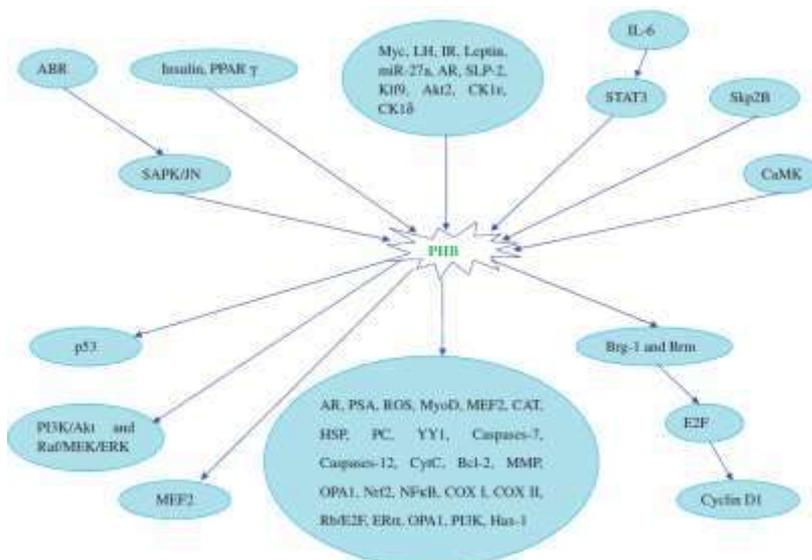


Figura 5.2: Vías de señalización donde está involucrada la PHB.

Prohibitina-1 (PHB1) y prohibitina-2 (PHB2) son las dos subunidades altamente homólogas del complejo PHB mitocondrial eucariota. PHB1 y PHB2 son interdependientes a nivel de proteína, y la pérdida de una conduce simultáneamente a la pérdida de la otra (Merkwirth C, 2008; Kasashima K, 2006). Tanto PHB1 como PHB2 se componen de un dominio transmembrana N-terminal, un dominio PHB conservado evolutivamente que es similar al de las proteínas asociadas a balsas lipídicas, y un dominio en espiral C-terminal que participa en interacciones proteína-proteína, incluida la interacción entre PHB1 y PHB2, así como la regulación transcripcional. En la membrana plasmática celular, el PHB es un adaptador transmembrana que activa la transducción de señales corriente abajo (Zhou TB, 2013). En el núcleo, PHB regula la activación transcripcional y el ciclo celular. En la membrana interna mitocondrial, heterodímeros de PHB1 y PHB2 de 12-16 subunidades forman una estructura macromolecular en forma de anillo de aproximadamente 1 MDa, sin homodímeros detectados hasta la fecha. Este complejo está implicado en la estabilización del genoma mitocondrial, la morfología mitocondrial, el estrés oxidativo y la apoptosis (Zhou TB, 2013; Osman C, 2009). PHB1 juega un papel en la lucha contra el **estrés oxidativo** en múltiples tipos de células. Los niveles de PHB1 disminuyen durante el estrés oxidativo en las células epiteliales intestinales (Theiss AL, 2007) y en el tejido pulmonar ex vivo durante la hiperoxia (Henschke P, 2006). La caída de PHB1 en las células endoteliales aumentó la producción de ROS en las mitocondrias a través de la disminución de la actividad del complejo I y el bloqueo parcial de la cadena de transporte de electrones (Schleicher M, 2008). Los estudios en células epiteliales intestinales utilizando modelos de colitis in vitro e in vivo sugieren que PHB1 protege a estas células del estrés oxidativo asociado con el proceso inflamatorio (Theiss AL, 2007; Theiss AL, 2010; Theiss AL, 1999).

Posteriormente, se vio que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) reduce los niveles de PHB1 in vivo y en células epiteliales intestinales cultivadas (Theiss AL, 2009). Estos resultados sugieren que el TNF- α puede contribuir a la reducción de los niveles de Prohibitina en la mucosa de los pacientes con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII). La expresión exógena de PHB1 en las células epiteliales intestinales redujo la activación de la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B), que desempeña un papel central en las respuestas inflamatorias y también regula la transcripción de múltiples citoquinas (Theiss AL, 2009). En conjunto, estos resultados sugieren que PHB1 y KAP comparten funciones relacionadas con la modulación del estrés oxidativo y con procesos inflamatorios relacionados con la vía NF- κ B.

En este punto hay que destacar que recientemente se ha demostrado que el silenciamiento de CypB en células HK-2 baja los marcadores proinflamatorios e inhibe la vía NF- κ B (Sarró E, 2020), es decir, que CypB jugaría un papel opuesto al de la Prohibitina en procesos inflamatorios. Esto sugiere la posibilidad de que la interacción entre Prohibitina y CypB (con o sin la intermediación de KAP) regula la vía NF- κ B modulando diferentes marcadores inflamatorios. La idea de que estas dos proteínas participen con papeles opuestos en procesos inflamatorios refuerzan la hipótesis de que puedan interactuar entre ellas.

Síndrome metabólico.

La actividad deficiente de PHB1 en el hígado contribuye a la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica y la **obesidad**, aunque el mecanismo sigue siendo desconocido (Sanchez-Quiles V, 2010). Kolonin y colaboradores (Kolonin MG, 2004) identificaron PHB1 como marcador de la vasculatura adiposa. Descubrieron que el PHB1 unido a la membrana plasmática actúa como un receptor vascular en la grasa blanca subcutánea y peritoneal para un péptido proapoptótico que da como resultado la pérdida de peso y la prevención de la obesidad en ratones. La internalización del péptido por PHB1 provocó reabsorción de grasas, apoptosis de la vasculatura del tejido graso blanco y mejoría de la tolerancia a la glucosa y los niveles de insulina sérica (Hossen MN, 2010). Los fármacos dirigidos a PHB1, que también se expresa en la vasculatura de la grasa blanca humana, pueden ser una opción terapéutica para el tratamiento de la obesidad.

Estos y otros estudios relacionan PHB con manifestaciones propias de la obesidad y el SM que también hemos identificado en los ratones KAP Tg y WT alimentadas con dieta rica en grasa.

PHB y apoptosis

La apoptosis es un regulador clave de la homeostasis tisular. La inducción aberrante de la apoptosis celular puede resultar en enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias crónicas y autoinmunes, entre otras. La sobreexpresión de PHB protege, mientras que su eliminación aumenta la susceptibilidad a apoptosis. Los estudios con células madre también mostraron que la ablación de PHB2 provocó una apoptosis masiva y una letalidad embrionaria temprana en ratones (Zhou TB, 2013; Baris OR, 2011; Park SE, 2005). Sin embargo, el efecto de PHB1 sobre la apoptosis celular y la supervivencia es complicado en casos de resistencia a la apoptosis persistente, como fibrosis hepática y tumorigénesis. En particular, se requiere PHB1 para inducir apoptosis mediada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Savulescu D, 2013) y por Tan IIA (Pan TL, 2012) en células hepáticas estrelladas. En cáncer existen estudios donde muestran que la eliminación de PHB aumenta la apoptosis (Kasashima K, 2006; Gregory-Bass RD, 2008; Wu Q, 2012; Kim SY, 2007; Zhang Y, 2014; Sanchez-Quiles V, 2010; Ko KS, 2010), mientras que otros describen lo contrario (Liu YH, 2012; Zhong N, 2015; Zhang L, 2012; Liu Y, 2012). En general, parece que la expresión de PHB, los estímulos y el tipo de célula pueden influir en la supervivencia celular y la apoptosis. Una serie de estudios describen que la localización subcelular puede explicar el efecto antiapoptótico y proapoptótico paradójico de PHB en diferentes tipos celulares (Thuaud F, 2013), y sugieren que, en la mayoría de los casos, el PHB mitocondrial y asociado a la membrana están relacionados con una función anti-apoptótica o tumorigénica. La localización subcelular y la regulación de la transcripción, traducción y modificación postraduccional de PHB pueden determinar el efecto final de la misma sobre la supervivencia celular y la apoptosis.

PHB y enfermedad renal

La PHB se expresa en las células intersticiales y las células epiteliales tubulares renales. Se encuentra down-regulada en muestras de biopsia renal correlacionando negativamente con la expresión de la Alfa-Actina del Músculo Liso (α -SMA) y con el grado de lesión tubulointersticial. La sobreexpresión de PHB en células en cultivo redujo significativamente la expresión de novo de α -SMA después de la estimulación con TGF- β 1 (Guo W, 2007). También se observó una reducción en la expresión de PHB en un modelo de nefropatía inducida por ácido aristolóquico en ratas (Wu HZ, 2001). Otros estudios encontraron que una menor expresión de PHB se asoció con una mayor expresión de TGF- β 1, colágeno-IV (Col-IV), fibronectina (FN), caspasa-3 escindida, y un mayor índice de Fibrosis Intersticial Renal (RIF) y de apoptosis celular (Zhou TB, 2012a; Zhou TB, 2012b).

Una vez más, encontramos otro punto de unión entre las funciones de PHB y CypB, ya que un artículo publicado recientemente por nuestro grupo describe por primera vez que el silenciamiento de CypB promueve la diferenciación epitelial y previene cambios fenotípicos similares a EMT inducidos por TGF β (Sarró E, 2020), lo que refuerza un poco más la hipótesis de que la PHB y CypB puedan interactuar.

Por lo tanto, y para concluir, los tres posibles interactores de KAP y hCypB: Vimentina, Cofilina-1 y Prohibitina, resultan ser tres proteínas involucradas en muchas e importantes funciones celulares, relacionadas con estrés oxidativo, resistencia a la insulina, inflamación, obesidad (SM), proliferación, ciclo celular y apoptosis. En muchas de estas funciones también se ha observado el papel que juegan KAP y CypB, por lo que es sugestivo hipotetizar que podrían existir relaciones funcionales de KAP y CypB con Vimentina, Cofilina-1 y Prohibitina.

Aunque sería muy interesante estudiar si KAP y CypB podrían tener algún efecto en la localización y función de cada una de las putativas proteínas interactoras, no lo hemos contemplado como objetivos de esta tesis. Por poner un ejemplo, se ha descrito que alterar la localización subcelular de la expresión de PHB o interactuar con el PHB de la superficie celular puede proporcionar estrategias prometedoras para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, lesión del miocardio, diabetes, cáncer y obesidad (Zhou TB, 2013; Theiss AL, 2011). Así pues, sería interesante diseñar un experimento donde estudiar el posible impacto de KAP y/o CypB en la localización y actividad de la PHB.

Uno de los objetivos de la tesis se ha centrado en determinar los efectos de la expresión de KAP y del silenciamiento de CypB, de manera individual o combinada, sobre la expresión de marcadores de diferenciación/des-diferenciación, ciclo celular y apoptosis, utilizando un sistema celular de túbulo proximal renal de origen humano. Las células han sido modificadas para silenciar CypB y/o expresar KAP. Estos experimentos se han realizado en situación basal y en presencia de CsA

5.3. KAP y hCypB en diferenciación/desdiferenciación celular

Como se ha comentado anteriormente, la Vimentina y la Cofilina-1, dos posibles interactores de KAP y hCypB, tienen un papel muy importante en la diferenciación y migración celular.

La Vimentina se usa comúnmente para identificar las células cancerosas que sufren el proceso conocido como transición epitelio mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) basándose en una correlación positiva de su expresión con una mayor capacidad invasiva y metastásica (Zeisberg M, 2009; Ruscetti M, 2015; Wei SC, 2015). La EMT produce cambios en la adhesión célula-célula, remodelación de los sitios de adhesión célula-matriz y cambios en la matriz extracelular, un fenómeno común en procesos como, por ejemplo, las metástasis, donde las células tumorales deben migrar (Yilmaz M, 2009; Kalluri R, 2009; Thiery JP, 2002). Además de su papel en la progresión del cáncer, el aumento de vimentina asociado a EMT se produce en procesos fisiológicos y patológicos, incluida la embriogénesis (Gros J, 2014; Yoshino T, 2014), inflamación (Correa-Costa M, 2014), fibrosis (Grande MT, 2015; Lovisa S, 2015; Schneider DJ, 2012), cicatrización de heridas (Banerjee P, 2015).

Otra característica distintiva de la EMT es la pérdida de expresión de E-Cadherina, que conduce a una reducción de la adhesión celular.

La E-Cadherina está presente en la membrana plasmática de la mayoría de las células epiteliales y se ha implicado como supresor de tumores en varios tipos de tumores epiteliales humanos, inhibiendo la migración y la metástasis (Thiery JP, 2002; Larue L, 2005). La propia E-Cadherina no presenta actividad enzimática. Sin embargo, se ha demostrado que la adhesión célula-célula mediada por E-Cadherina puede desencadenar una activación independiente del ligando del Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial (EGFR), regulando vías de señalización celular importantes como PI3-K/AKT y Quinasa Regulada por señal Extracelular (ERK) (Reddy P, 2005; Shen X, 2004; Bussink J, 2007). Por otro lado, la E-Cadherina inhibe la activación de EGFR dependiente de ligando (Qian X, 2004) (revisado en Cavallaro U, 2011). Además, existe una creciente evidencia que indica que las vías de señalización de EGFR son capaces de regular la expresión de las proteínas implicadas en EMT (Lee MY, 2008;

La pérdida de fenotipo epitelial por falta de E-cadherina es un rasgo característico de la toxicidad producida por la CsA en el riñón, específicamente en el túbulo proximal.

Que el silenciamiento de CypB induce la expresión de E-cadherina, es algo que ya había sido reportado por nuestro grupo (Sarró E, 2020). Sin embargo, desconocíamos si KAP o la interacción de ésta con CypB podía tener un impacto en la expresión de la misma, tanto en situación basal como en presencia de CsA.

Es interesante observar que, en situación basal, la presencia de KAP y la ausencia de CypB son capaces de inducir la expresión de E-cadherina, siendo la falta de CypB más

potente que la presencia de KAP, pues incluso la induce cuando las células aún no están en un estado de diferenciación en post-confluencia. Es evidente que la ausencia de CypB es un potente inductor del fenotipo epitelial y que la KAP, potente ya por sí misma, es capaz de potenciar de forma extraordinaria la expresión de E-cadherina en ausencia de CypB. De estos resultados se deduce que KAP y CypB podrían tener un target común que KAP induciría y por el que CypB competiría bloqueando el efecto de KAP. De este modo, la situación óptima para la expresión de E-cadherina sería eliminar CypB y expresar KAP, como demuestran nuestros resultados. Parecería que KAP y CypB compiten y tienen acciones antagónicas en la diferenciación del túbulo proximal.

Dado que CypB es una molécula pro-inflamatoria podríamos hipotetizar que los efectos beneficiosos de KAP en inflamación y en la preservación del fenotipo epitelial podrían estar relacionados con su interferencia en algunas de las acciones propias de CypB.

En presencia de CsA, disminuyen los niveles de E-cadherina. La disminución también ocurre en las células que sobreexpresan KAP, en las silenciadas por CypB y en las que combinan ambos rasgos; sin embargo, los niveles basales son tan altos que la acción de la CsA no consigue disminuir el marcador de diferenciación a límites críticos para la célula, por lo que KAP y el silenciamiento de CypB ejercen un efecto protector del fenotipo epitelial.

Los niveles de vimentina también han sido estudiados en estas 4 líneas celulares y lo primero que nos ha sorprendido es que en situación control no se observan cambios relevantes en los niveles de esta proteína, en presencia de CsA. No parece que KAP por sí misma tenga un efecto sobre los niveles de vimentina, aunque la ausencia de CypB sí que disminuye los niveles de la misma y la combinación de KAP sin CypB aun lo hace más evidente. Ello estaría de acuerdo con los resultados obtenidos para la E-cadherina, reforzando el concepto de que la presencia de KAP sin CypB promueve el fenotipo epitelial. Lo más llamativo de este experimento, y que no sabemos cómo explicar, es que en la situación en la que se da presencia de KAP sin CypB, la expresión de vimentina desaparece prácticamente por completo cuando se tratan las células con CsA. Está claro que este resultado merece un estudio en profundidad para poder dar una explicación al mismo.

5.4. KAP y hCypB en proliferación, ciclo celular y apoptosis

Durante el desarrollo normal de los organismos multicelulares, el número apropiado de células y el tamaño de los órganos se determinan mediante el crecimiento celular coordinado, la proliferación celular y la apoptosis (Danial NN, 2004; Murray AW, 2004; Sherr CJ, 2004). La interrupción o el mal funcionamiento de estos procesos puede provocar enfermedades como el cáncer (Danial NN, 2004), y alteraciones en procesos fisiológicos normales en distintos órganos (Schrijvers BF, 2004; Bonventre JV, 2011; Duman RS, 2002; Cines DB, 1998).

Proliferación celular

Hemos visto en la introducción que CypB interviene en la proliferación renal. Además, sabemos que la KAP está involucrada en diferentes procesos de daño renal y, por lo tanto, puede tener también un papel en la proliferación celular. De hecho, en nuestro grupo anteriormente se hicieron experimentos del papel de la KAP en la proliferación que no se han publicado. En esa ocasión, pero, se realizaron en células PCT3, es decir, células del túbulo proximal renal murino. En esos experimentos se demostró que la sobreexpresión de KAP reduce el crecimiento de células de cultivo, y este efecto se da por una disminución de la proliferación y no por un aumento de la mortalidad. Además, se vio que KAP también se encuentra en el núcleo y que una mayor presencia nuclear de la KAP induce un efecto más acusado sobre la inhibición de la proliferación. Analizando la distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular se observa que la KAP induce un bloqueo en G0/G1, impidiendo la progresión del ciclo. Se observó una disminución de ciclina D, imprescindible para la correcta progresión de la fase G1 y para la transición de G1 a S, en presencia de KAP. Por tanto, se le atribuyó a KAP un papel en la regulación del ciclo celular (Figura 5.3).

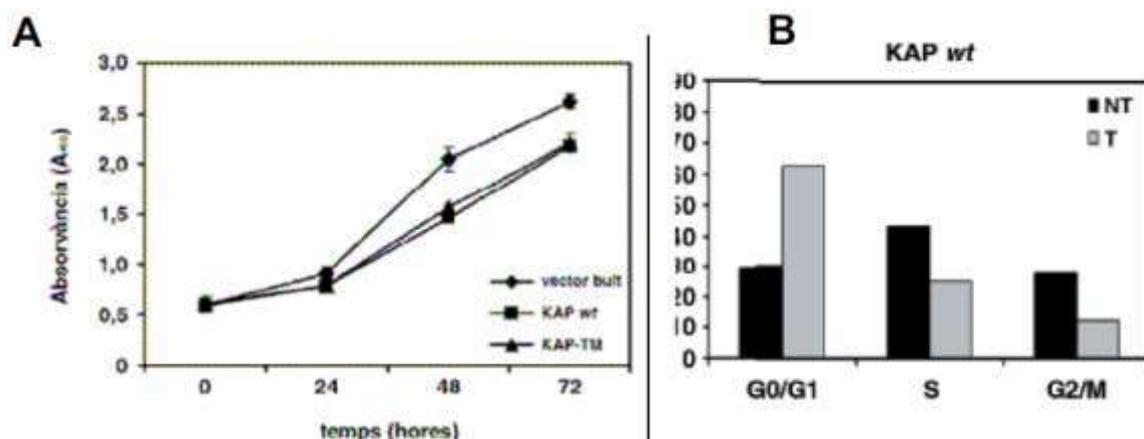


Figura 5.3: Efectos de la sobreexpresión de KAP en la proliferación y progreso del ciclo celular. **A)** Crecimiento de las células PCT3 transferida con el vector de expresión vacío o con KAP. **B)** Distribución en las diferentes fases del ciclo celular de células PCT3 transfectadas (T) y no transfectadas (NT) con KAP.

Para la actual tesis se realizaron nuevos experimentos de proliferación con sobreexpresión de KAP i/o silenciamiento de hCypB, en esta ocasión con células HK2 humanas. Para ello se trataron las 4 líneas celulares con un marcador fluorescente citoplasmático (CFSE) y una técnica de citometría. Se hicieron tres réplicas y se procesaron los datos en dos formas diferentes, pero ambas formas dieron los mismos resultados: La sobreexpresión de KAP aumenta la proliferación celular de HK2, y el silenciamiento de hCypB también aumenta la proliferación en mayor medida que KAP e independientemente de la sobreexpresión de esta.

Es decir, el impacto en la proliferación celular causado por la sobreexpresión de KAP es inversa según si el tipo celular es murino o humano: disminuye la proliferación en células murinas (PCT3) y aumenta la proliferación en células humanas (HK2).

En cuanto a la hCypB, estos experimentos muestran claramente que el silenciamiento de hCypB en células HK2 wt provocan un aumento de la proliferación. Estos resultados están reforzados por los marcadores del ciclo celular alterados que veremos más adelante. Este dato choca con muchas publicaciones donde atribuyen un papel importante a la CypB en el aumento de proliferación y diferenciación de diferentes tipos de cáncer. Una explicación a esta contradicción puede ser el hecho de que en los casos donde la CypB juega un papel importante en la proliferación del cáncer, está involucrada con la vía JAK/STAT3. Esta vía está anómalamente activada en diferentes cánceres, y la CypB juega un papel de feedback positivo en este caso. Una hipótesis puede ser que, en situaciones donde no está alterada esta vía JAK/STAT3, la CypB juega un papel opuesto frenando la proliferación, y en caso de silenciarla aumente la proliferación, como en nuestro caso. De hecho, existen en la literatura precedentes que pueden avalar esta hipótesis. Marcant y colaboradores demostraron que la Ciclofilina B atenúa la expresión de TNF- α en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos mediante la inducción del linfoma de células B-3, de forma totalmente contraria a lo esperado (Marcant A, 2012). Por tanto, no todo está descubierto en torno a la CypB, una proteína crucial en la función reguladora de la célula y que participa en un sinnúmero de vías. No es nada descabellado pensar que, dependiendo de la localización celular, las vías activadas en un momento dado, etc. la CypB pueda ser capaz de realizar funciones opuestas. De hecho, anteriormente hemos visto un ejemplo con la PHB en cáncer, donde existen hallazgos contradictorios. Algunos estudios mostraron que la eliminación de PHB aumentó la apoptosis de las células cancerosas (Kasashima K, 2006; Gregory-Bass RD, 2008; Wu Q, 2012; Kim SY, 2007; Zhang Y, 2014; Sanchez-Quiles V, 2010; Ko KS, 2010). Sin embargo, otros estudios encontraron que la deficiencia de PHB1 aceleró el crecimiento de las células cancerosas y disminuyó la apoptosis celular (Liu YH, 2012; Zhong N, 2015; Zhang L, 2012; Liu Y, 2012). Curiosamente, la caída de PHB1 aumentó la apoptosis en las células cancerosas en las células SGC7901 (Zhang Y, 2014), pero la sobreexpresión de PHB1 aumentó la apoptosis en las células BGC823 (Zhang L, 2012), y ambas líneas son células de carcinoma gástrico. En este caso, una serie de estudios sugiere que la localización subcelular de la PHB puede explicar el efecto antiapoptótico y proapoptótico paradójico de PHB en diferentes tipos de células (Thuaud F, 2013), y sugieren que, en la mayoría de los casos, la PHB mitocondrial y asociada a la membrana

está relacionado con una función anti-apoptótica o tumorigénica, mientras que el PHB nuclear muestra propiedades proapoptóticas o antitumorigénicas. La localización subcelular y la regulación de la transcripción, traducción y modificación postraduccional de PHB pueden determinar el efecto final de PHB sobre la supervivencia celular y la apoptosis.

Por tanto, no se puede descartar que este mismo comportamiento aparentemente contradictorio de CypB también sea dado por su localización celular o posibles modificaciones transcripcionales.

Ciclo celular

Las Quinasas Dependientes de Ciclina (CDK) en asociación con subunidades reguladoras de Ciclina son los reguladores maestros del ciclo de división celular. Dependiendo de la actividad de los complejos CDK-ciclina en la fase G1, las células pueden detener la división celular o comprometerse a pasar por un ciclo de división (Figura 5.4) (Blagosklonny MV, 2002). Esta decisión depende de las señales extracelulares y la información intrínseca de la célula, que determina la reactivación de las CDK después del ciclo celular anterior (Spencer SL, 2013). La estimulación de células inactivas con mitógenos y factores de crecimiento induce la expresión de ciclinas de tipo D (D1, D2, D3 en mamíferos) y la activación de CDK4 o CDK6 (Choi YJ, 2014). CDK4/6-Ciclina D es responsable de la fosforilación limitada del Retinoblastoma (Rb), proteína supresora de tumores. Se cree que esta fosforilación debilita la interacción entre pRb y el factor de transcripción heterodimérico E2F/DP (denominado conjuntamente E2F). Como consecuencia, la represión de la activación de E2F por pRb se reduce, lo que permite la transcripción inicial de genes dependientes de E2F que incluyen Ciclina E y otros genes del ciclo celular. La activación posterior de CDK2-Ciclina E conduce a una mayor fosforilación e inactivación de pRb, comprometiendo totalmente la entrada en la fase S (van den Heuvel S, 2008). Además de la represión transcripcional mediada por pRb, existen otros niveles de control que contrarrestan la progresión de G1 a la fase S. Esto incluye miembros de 2 familias diferentes de Proteínas Inhibidoras de CDK (CKI) que se asocian con las CDK's (Sherr CJ, 1999). Los CKI de la familia de proteínas INK4, como p16^{INK4A}, se unen específicamente a las quinasas CDK4/6 y previenen su interacción con la Ciclinas D. Por el contrario, los CKI de la familia CIP/KIP se asocian con complejos CDK-Ciclina y bloquean su actividad. La familia CIP/KIP consta de p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} y es particularmente importante para el control temporal de CDK2-Ciclina E. Las proteínas de ambas familias de CKI contribuyen a la salida del ciclo celular y muestran una mayor expresión en las células en diferenciación. La importancia de los CKI se subraya aún más por la inactivación funcional de p16^{INK4A} en una amplia variedad de cánceres humanos (Kandoth C, 2013).

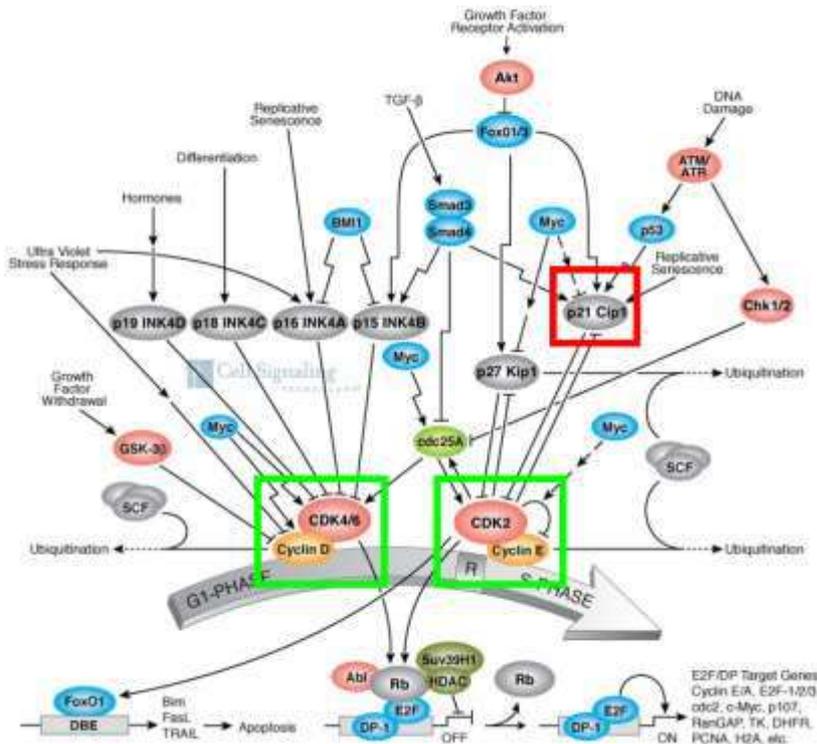


Figura 5.4: Vía reguladora del paso de fase G1 a fase S del ciclo celular. En recuadro verde, los marcadores activadores del ciclo, y en recuadro rojo, los inhibidores, que han sido estudiados en esta tesis.

En esta tesis se han analizado las proteínas activadoras del ciclo celular CDK2, CDK4, CdK6, Ciclina D y Ciclina E en las 4 líneas celulares. También se ha observado el nivel de la proteína inhibidora del ciclo celular p21.

Mientras no se observan cambios significativos en la CDK2 y CDK4, sí se observan claramente cambios en la CDK6, Ciclina E y, en menor medida, Ciclina D. Además, estos cambios casan perfectamente con los patrones de proliferación celular vistos anteriormente. Es decir, la CDK 6 Ciclina E y Ciclina D aumenta su nivel en células HK2 con sobreexpresión de KAP comparándolas con las células HK2 wt, y en ausencia de hCypB, estos niveles aumentan de una manera más considerable. De manera complementaria, los niveles de p21 (inhibidor del ciclo celular) disminuyen, también, de forma progresiva: menor nivel en las células HK2 que sobreexpresan la KAP, y aún menor en ausencia de hCypB. Todos los niveles de los marcadores anteriores en ausencia de hCypB son independientes de si hay o no sobreexpresión de KAP. Así pues, podemos considerar que la mayor proliferación que mostraban las células HK2 que sobreexpresan KAP o silencia hCypB es debido a un mayor nivel de expresión de las proteínas CDK6, Ciclina E y Ciclina D y por un menor nivel de p21.

Los niveles de los diferentes marcadores del ciclo celular refuerzan los resultados obtenidos en el estudio del ciclo celular, en donde se observa que la ausencia de hCypB es la situación que promueve el mayor nivel de proliferación.

Apoptosis

Las características de la célula apoptótica incluyen condensación de cromatina y fragmentación nuclear (picnosis), formación de ampollas en la membrana plasmática y contracción celular. Finalmente, las células se rompen en pequeños fragmentos

rodeados de membranas (cuerpos apoptóticos), que se eliminan mediante fagocitosis sin provocar una respuesta inflamatoria (Reed JC, 2000).

Un tipo de proteasas son las causantes de estos cambios morfológicos que reconocemos como apoptosis y de los cambios bioquímicos que a menudo se asocian con este fenómeno. Específicamente, la activación de una familia de cisteína proteasas intracelulares que escinden sus sustratos en los residuos de ácido aspártico, conocidas como caspasas (Alnemri ES, 1996). Estas proteasas están presentes como zimógenos inactivos en prácticamente todas las células animales, pero pueden asumir estados activos, que generalmente implican su procesamiento para generar las subunidades grandes (~20 Kd) y pequeñas (~10 Kd) de las enzimas activas.

Se realizó un experimento de citotoxicidad por CsA mediante un test de LDH. El objetivo era ver cuál de las 4 líneas celulares presentaba una mayor resistencia a la toxicidad (o supervivencia) tras un tratamiento con dosis creciente de CsA (0, 5, 10 y 20 μ M) en células HK2 humanas. Los resultados muestran que la ausencia de hCypB se traduce en una menor toxicidad a cualquier dosis. Por otro lado, la sobreexpresión de KAP también muestra protección, pero solo a dosis altas de CsA (20 μ M), y en menor medida que la protección observada por la ausencia de hCypB. Anteriormente ya se había descrito que la KAP protege frente a la citotoxicidad inducida por CsA en células del túbulo proximal renal murino (PCT3) (Cebrian C, 2001), pero esta es la primera vez que se comprueba esta función de KAP en células del túbulo proximal renal de origen humano.

Un trabajo realizado en nuestro grupo nos permitió identificar vías de señalización celular implicadas en la nefrotoxicidad inducida por CsA en células del túbulo proximal murino (PCT3) (Sarró E, 2012)(Figura 5.5).

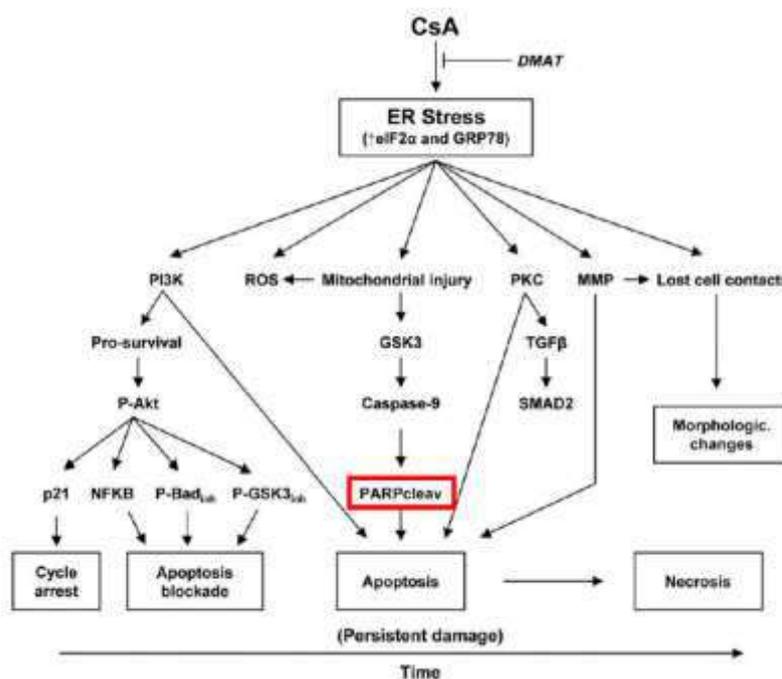


Figura 5.5: Mecanismo propuesto de toxicidad inducida por CsA en células PCT3. En recuadro rojo, el marcador PARP Cleavage escogido para monitorizar la apoptosis

En este trabajo se identificó a la PARP Cleavage como una proteína clave para que la célula entrara en apoptosis debido a la toxicidad por CsA.

La Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP o PARP-1) es una proteína nuclear con una amplia gama de funciones fisiológicas y patológicas. Inicialmente identificada como una enzima que desempeña funciones centrales en la reparación del ADN dañado, PARP-1 participa en el inicio de la Reparación por Escisión de Bases (BER) (Dantzer F, 2000; Dantzer F, 1999), reparación por escisión de nucleótidos, reparación de base de una sola hebra mediada por ADN ligasa III, polinucleótido quinasa, y contribuye a la reparación de Base de Doble Hebra (DSB) en una vía de unión de extremos no homóloga alternativa con ADN ligasa III (Audebert M, 2004; Benjamin RC, 1980; Fisher AE, 2007; Wang M, 2006). La PARP-1, una proteína de 113 kDa que es fragmentada en dos péptidos de 89 y 24 kDa en condiciones de apoptosis por las caspasas 3 y 7. Por tanto, el fragmento de 89 kDa (PARP Cleavage) es utilizado como marcador de apoptosis.

Se realizaron WB de cultivos de las 4 líneas celulares sin y con tratamiento de CsA (20 μ M, 6 y 24 h) para determinar los niveles de PARP Cleavage. Los resultados indican que sin CsA, los niveles de PARP Cleavage son prácticamente nulos en todas las líneas celulares. Sin embargo, a las 6h de tratamiento con CsA, aparecen ya niveles significativos de PARP Cleavage. Las células que sobreexpresan KAP tienen un nivel de PARP Cleavage mucho menor que las células control, prácticamente la mitad, y en las células con la hCypB silenciada baja el nivel de PARP Cleavage, prácticamente a niveles basales sin tratamiento con CsA. A las 24h de tratamiento con CsA, los niveles de PARP Cleavage aumentan de forma importante, pero siguen exactamente el mismo patrón observado a las 6h de tratamiento. Además, este patrón sigue la misma tendencia observada en el test de LDH de citotoxicidad. Es decir, que en la protección frente a la toxicidad mediada por CsA observada en ausencia de hCypB, y en menor medida por la sobreexpresión de KAP, la PARP Cleavage tiene un papel predominante en el proceso apoptótico. Por tanto, KAP y hCypB participan en la vía de señalización que provoca la fragmentación de PARP inducida por CsA, y por tanto, se puede considerar la utilización de KAP o el silenciamiento de hCypB como medios terapéuticos para protección frente a citotoxicidad mediada por la PARP Cleavage no solo por tratamientos con CsA, sino también en todos esos procesos citotóxicos donde la participación de PARP Cleavage sea capital, como por ejemplo en enfermedades inflamatorias o metabólicas, como diabetes, trastornos neurodegenerativos como Alzheimer y Parkinson, y enfermedades cardiovasculares, o cáncer (Maluchenko NV, 2021). De hecho, existen actualmente mucho interés en encontrar moduladores de la actividad o fragmentación de PARP. Ya existen bastantes inhibidores de la PARP, pero presentan efectos secundarios graves y la investigación se centra en la búsqueda de inhibidores naturales, como los polifenoles, un grupo de metabolitos vegetales (Maluchenko NV, 2021). Es en este contexto donde la KAP podría jugar un papel importante, una pequeña proteína exógena que, potencialmente, podría causar menos o ningún efecto secundario indeseado (más allá de su posible alergenicidad, aún por estudiar).

5.5. KAP y hCypB en procesos inflamatorios

La IL (interleucina) -6, que originalmente se identificó como un factor de diferenciación de células B, es una citoquina multifuncional que regula la respuesta inmune, la hematopoyesis, la respuesta de fase aguda y la inflamación (Mihara M, 2012). IL-6 ejerce sus actividades biológicas a través de dos moléculas: IL-6R (receptor de IL-6) y gp130. Cuando IL-6 se une a mIL-6R (forma unida a membrana de IL-6R), se induce la homodimerización de gp130 y se forma un complejo receptor funcional de alta afinidad de IL-6, IL-6R y gp130. Este complejo activa la ruta JAK/STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción) (Figura 5.6). STAT3 es activada cuando se fosforilan ciertos residuos, aunque el mas relevante es la tirosina 705. pSTAT3-Tyr705 homodimeriza, se transloca al núcleo y activa la expresión de ciertos genes. La fosforilación de STAT3-tyr705 puede realizarse por diferentes rutas además de la ruta por la IL-6. (Figura 5.6).

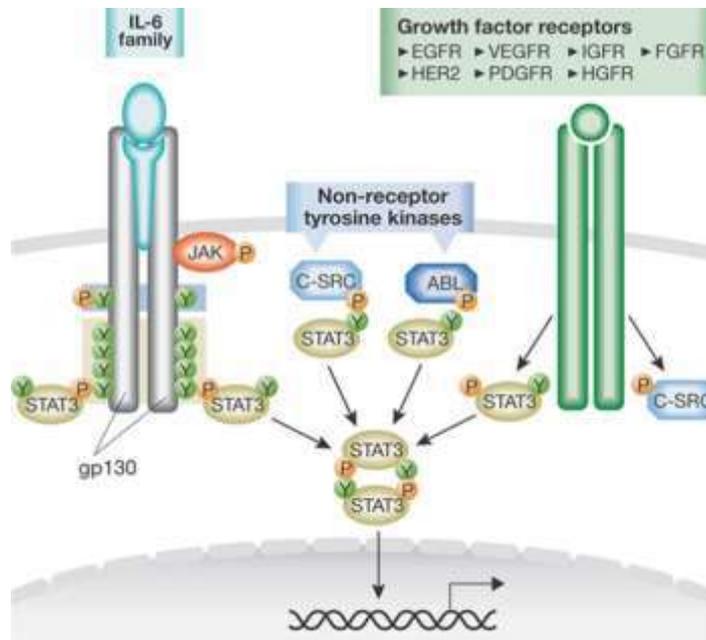


Figura 5.6: Señalización STAT3.

En los últimos años ha habido un gran número de publicaciones que otorgan un papel novedoso para la CypB, como la activación en la proliferación y supervivencia de diferentes tipos de cáncer. La mayoría de estas publicaciones unen esta actividad de la CypB a la activación de STAT3. Así, por ejemplo, Ting Li y colaboradores indican que CypB tiene un papel importante en la proliferación y supervivencia del cáncer gastrointestinal (Li T, 2017), mediante una retroalimentación positiva que causa la inhibición de miR-520d-5p, un miRNA (micro RNA de interferencia) que regula la actividad de CypB (Figura 5.7). De este modo, el aumento de actividad de CypB amplifica la vía IL6-STAT3 antes mencionada, que además de estar implicada en procesos de inflamación, su sobreactivación está implicada en el cáncer gastrointestinal.

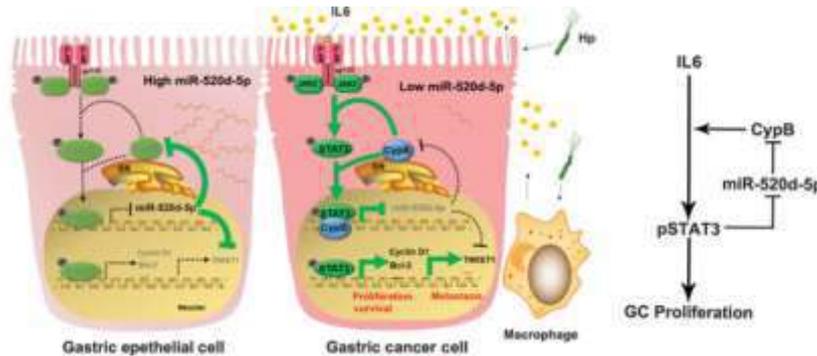


Figura 5.4: Modelo esquemático del desarrollo del cáncer gástrico.

De forma similar, Tae Gyu Choi y colaboradores indican que la CypB induce quimioresistencia en cáncer colorrectal, mediante la degradación de p53 (un importante supresor tumoral) (Choi TG, 2018; Yu H, 2014). Esta degradación de p53 es mediada por el aumento de la expresión de la proteína Mdm2 (murine double minute 2), un regulador negativo de p53, gracias a la activación de STAT3. Mao-rong Teng y colaboradores indican que la CypB promueve la proliferación, migración, invasión y angiogénesis celular mediante la regulación de la vía STAT3 en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Teng M, 2019). Fan Mei y colaboradores indican que la CypB mejora la proliferación y diferenciación de las células MC3T3-E1 (un tipo de osteoblastos) a través de la vía de señalización JAK2/STAT3 (Mei F, 2019). Los autores sugieren que este aumento de la proliferación y diferenciación de los osteoblastos puede estar relacionado con el osteosarcoma o metástasis ósea. Existen también otros trabajos donde se indican el papel crucial de la CypB en la proliferación de otros tipos de cáncer en los que, a pesar de no demostrar que la vía de activación es la STAT3, sí que lo sugieren, como por ejemplo Young-Seok Lee y colaboradores que indican que el Honokiol (un compuesto de bifenilo natural derivado de la planta de magnolia) inhibe la migración de células de hepatocarcinoma a través de la inhibición de la expresión de ciclofilina B (Lee YS, 2021).

Por último, mencionar otros trabajos recientes, con nuevas funciones de CypB, en los que no se ha demostrado aún que estas nuevas funciones sean adquiridas a través de la activación de STAT3, pero merece la pena tenerlos en cuenta para el futuro. Prem Prakash y colaboradores indican que la CypB forma parte de un complejo de múltiples proteínas durante la invasión de eritrocitos por *Plasmodium falciparum* (Malaria) (Prakash P, 2017), Hang Zhang y colaboradores indican que niveles elevados de CypB sérica están asociados con la prevalencia y la gravedad del síndrome metabólico (MS) (Zhang H, 2017), Kui Zhao y colaboradores indican que la CypB facilita la replicación de los virus Orf (Los virus Orf (ORFV) son un tipo de especie del género *Parapoxvirus*) (Zhao K, 2017), y Jean-Michel Pawlotsky indica el papel clave que tienen las ciclofilinas en la actividad infecciosa de los coronavirus (Pawlotsky JM, 2020). Aunque en la mayoría de casos, la ciclofilina clave para esta actividad de los coronavirus es la ciclofilina A (CypA), incluido el virus SARS-CoV-2, causante de la enfermedad pandémica Covid-19, existen algunos coronavirus, como el *feline infectious peritonitis coronavirus* (FPIV) en donde la CypB también juega un papel importante.

Así pues, puesto que KAP y hCypB interactúan, y viendo el papel relevante que tiene CypB en la activación de STAT3, junto al hecho de que KAP debe estar implicada en la regulación de los niveles de IL-6 (citoquina clave en la vía de expresión génica JAK/STAT3), se sugirió que era muy relevante monitorizar tanto los niveles de STAT3 total (STAT3_T) como de su forma fosforilada en la tirosina 705 (pSTAT3-Tyr705) en las 4 líneas celulares de HK2 (Wild type, expresión de KAP, silenciamiento de hCypB, expresión de KAP + silenciamiento de hCypB).

Como se puede ver en “Resultados: 4.3.4. Papel de la KAP y hCypB en la activación de STAT3”, mientras el nivel de STAT3_T no varía según el tipo celular, sí se observa una bajada significativa del nivel de su forma fosforilada, pSTAT3-Tyr705 en el caso de las células que expresan KAP y las que tienen el silenciamiento de hCypB, independientemente del nivel de TNF- α (otra citoquina que activa la STAT3) que haya en el medio. El hecho de que la falta de hCypB provoque una menor fosforilación de la tirosina 705 en STAT3 es congruente con los artículos recientes publicados, en los que indican que CypB es un actor importante en la activación de STAT3. La novedad es comprobar que la expresión de KAP también provoca el mismo efecto. Una hipótesis podría ser que esta función de KAP puede venir por el “secuestro” de la hCypB presente en el citoplasma, impidiendo así su función. Si esta hipótesis fuera cierta, podríamos sugerir a KAP como un inhibidor, o al menos, un modulador de la actividad de CypB, como ya se ha sugerido cuando se han comentado los efectos de ambas proteínas sobre los niveles de E-cadherina, en otra parte de la discusión. Cabe recordar que, una de las estrategias que más se está considerando actualmente para contrarrestar los efectos adversos de la actividad de CypB es la utilización de sus inhibidores. Así, por ejemplo, se está considerando inhibidores de las ciclofilinas, como Alisporivir, o incluso Ciclosporina A (Pawlotsky JM, 2020), para tratar las enfermedades causantes por coronavirus. Si la hipótesis es cierta se podría considerar a la KAP también como un inhibidor (o modulador) de CypB, exento de los efectos nefrotóxicos que presenta la CsA.

Otra consideración muy importante si la hipótesis de que KAP inhibe o modula la actividad de CypB fuera cierta, estaría relacionada con el trabajo realizado por nuestro grupo, donde se ve el papel protector que tiene la KAP en ratones transgénicos que la sobreexpresan en desarrollar síndrome metabólico con dieta rica en grasa (Ver “Introducción: 1.3.10.2. Protección contra el Síndrome Metabólico inducido por dieta rica en grasa”). Con estos resultados, junto al hecho de que se ha publicado que niveles elevados de CypB sérica están asociados con la prevalencia y la gravedad del síndrome metabólico (Zhang H, 2017), podríamos considerar que este papel protector de la KAP frente al síndrome metabólico en dietas ricas en grasas viene dado por la inhibición o modulación de la actividad de CypB, reforzando un poco más la hipótesis sugerida.

Si la hipótesis fuera finalmente validada, se podría sugerir el uso de la KAP para tratar o controlar diferentes enfermedades, como el síndrome metabólico, algunos tipos de cáncer (supliendo el papel que hace el miRNA miR-520d-5p en el cáncer gastrointestinal, por ejemplo) o control de diferentes virus o patógenos (Malaria, Orf virus, algunos coronavirus, etc.).

5.6. Estructura 3D de KAP

A lo largo de esta tesis se han referenciado muchos de los trabajos realizados por nuestro grupo en relación al gen que codifica para KAP y la posible función de su proteína en varios estados fisiopatológicos, así como su posible función en otras especies, como la humana. Pese a ello, todavía falta mucha información para conocer en mayor profundidad las funciones de la proteína, las vías de señalización en los que actúa, con que proteínas interactúa y cuál es el impacto funcional de esas interacciones. Esta tesis pretende dar respuesta a algunas de estas cuestiones.

Un enfoque potente para poder responder muchas de estas preguntas sería conocer la estructura tridimensional (3D) de la proteína KAP, que actualmente se desconoce. A partir de la estructura 3D se podría inferir, mediante un trabajo *in silico*, posibles nuevas funciones de la KAP, comprender mejor algunas de las funciones que se le atribuyen, descubrir nuevos interactores, así como homólogos funcionales en otras especies, como la humana, si es que existen (Thornton JM, 2000) (Figura 5.8).

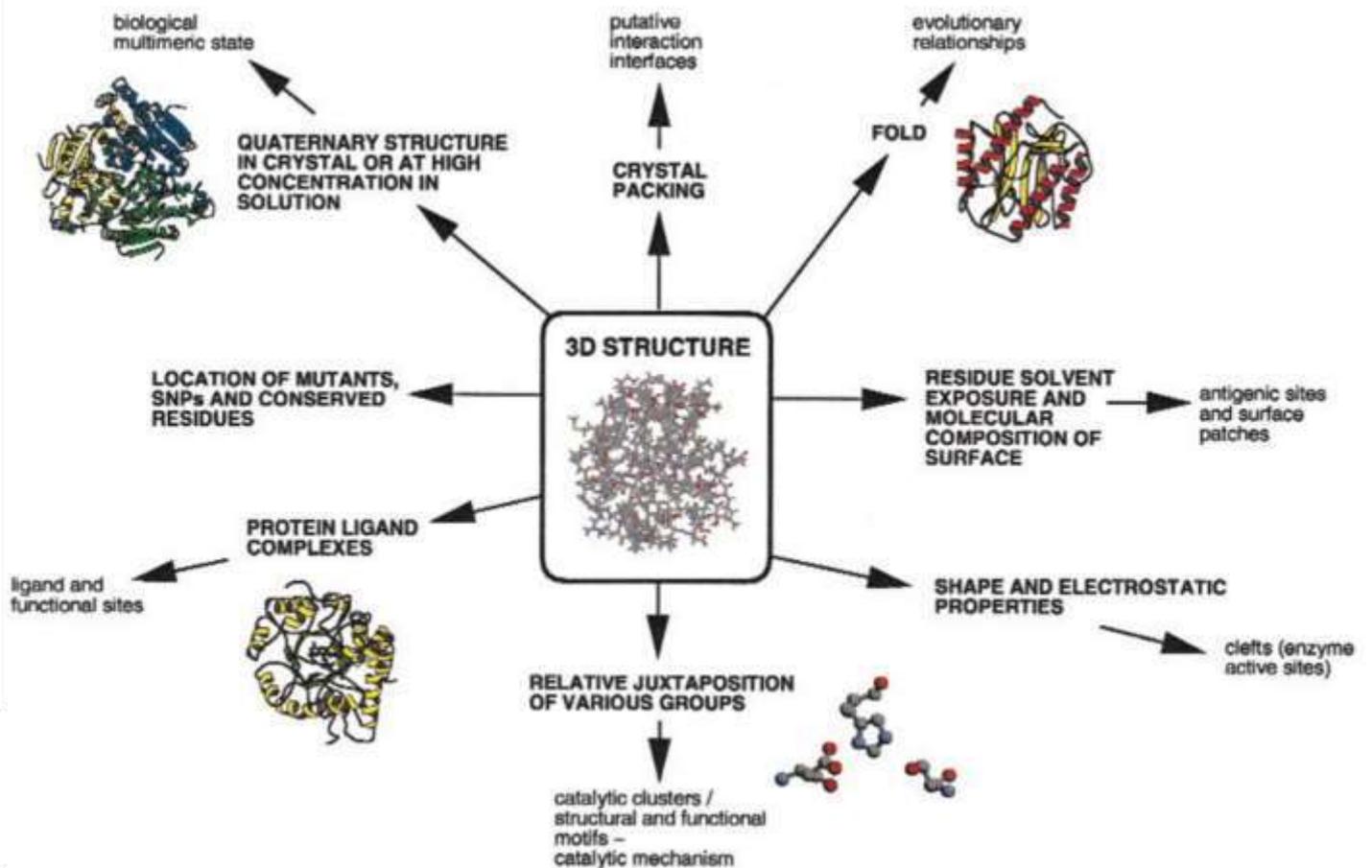


Figura 5.8: De la estructura a la función: un resumen de la información que se puede derivar de la estructura tridimensional, relacionada con la función biológica.

Por lo tanto, se decidió que uno de los objetivos relevantes de esta tesis era conocer la estructura 3D de la KAP. La técnica escogida fue la cristalografía de rayos X, una de las técnicas más utilizadas y potentes.

Como se puede ver en “Resultados: 4.5. Estructura 3D de la proteína KAP”, después de la obtención de un cristal de KAP prometedor, el patrón de difracción de rayos X obtenido resultó ser muy anómalo. Si bien estaba claro que no se trataba de un patrón de difracción de un cristal de sal, tampoco resultaba ser un patrón de difracción canónico propio de una proteína. En palabras de los técnicos del sincrotrón de Grenoble, el patrón obtenido era singular, ya que nunca habían visto uno parecido, y no contenía la suficiente información para poder inferir una estructura. A pesar de ello, se realizó el análisis computacional del patrón de difracción. El programa HKL2000 sugirió una celda unitaria de tipo hexagonal con parámetros de red: $a=b=11.44\text{\AA}$; $c=46.33\text{\AA}$ $\alpha=\beta=90^\circ$; $\gamma=120^\circ$ (Figura 5.9).

$a=11.440\text{\AA}$
 $b=11.440\text{\AA}$
 $c=46.330\text{\AA}$
 $\alpha=90.000^\circ$
 $\beta=90.000^\circ$
 $\gamma=120.000^\circ$

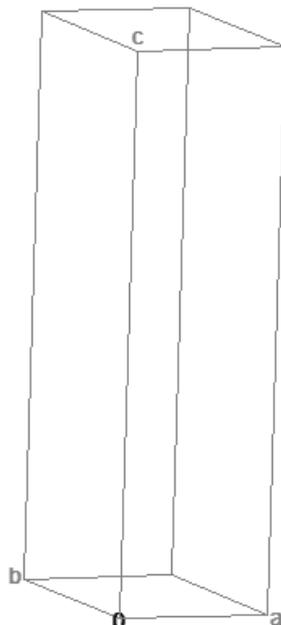


Figura 5.9: Representación de la celda unitaria calculada por el programa HKL2000 (Bilbao Crystallographic Server <http://www.cryst.ehu.es>)

Sin embargo, un posterior análisis calculando el coeficiente de Matthews sugiere que no es posible que una molécula de 12kDa, como en el caso de la KAP, forme un cristal con una celda unitaria de estas dimensiones.

En conclusión, podemos decir que se obtuvo un patrón de difracción para la proteína KAP, que no fue suficientemente bueno como para inferir una estructura, y que su análisis computacional sugirió una celda unitaria insuficiente para el tamaño de KAP. Una hipótesis podría ser que se cristalizó una parte de la proteína, aunque no lo suficientemente bien como para obtener, como mínimo, la estructura de este hipotético fragmento de KAP.

A pesar de que no se obtuvo la estructura 3D de la KAP a partir de la cristalografía se decidió explorar otras técnicas de estructura de proteínas, como el difracción de neutrones.

(DC), la microscopia electrónica de transmisión tridimensional (3D-TEM) y la resonancia magnética nuclear de una dimensión (RMN-1D).

Los ensayos de DC no permite dilucidar la estructura 3D de una proteína, pero sí que nos da información de esta estructura, como el porcentaje de cada estructura secundaria de la proteína en disolución (Greenfield NJ, 2006). Gracias al análisis del espectro de DC se pudo comprobar que más del 50% de la proteína (52,1%) tiene una estructura secundaria desordenada o en giros. **Es la primera evidencia que se tiene que la KAP puede ser una Proteína Intrínsecamente Desestructurada (IDP)**. Por otro lado, la parte estructurada de KAP, reveló que el 38,2% del total de la proteína corresponde a una hélice alfa. Siguiendo con el DC, se realizaron estudios de desnaturalización térmica, que arrojaron dos datos más de la KAP: una temperatura de fusión (T_m) de sólo 32,2°C y que la desnaturalización de KAP es reversible. Una T_m (temperatura en el que el 50% de la proteína está desnaturalizada) tan baja y con desnaturalización reversible es típico de las IDP's o IDR's (Región Intrínsecamente Desestructurada) (Uversky VN, 2009), reforzando la idea de que KAP sea una IDP.

La resonancia magnética nuclear de una dimensión (RMN-1D) es otra técnica que puede dar información sobre la estructura secundaria de las proteínas. De hecho, el objetivo real era realizar una resonancia magnética nuclear de dos dimensiones (RMN-2D), una técnica mucho más potente que puede dar la estructura 3D de la proteína, pero ésta se descartó por los resultados obtenidos con la RMN-1D, tal como se explica a continuación. En el apartado "4.5.5. Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión (RMN-1D)" en el capítulo de Resultados se observa una gran cantidad de señal en el espectro de la RMN entre 8.0 y 8.8 ppm. Esta señal es típica de una IDP. Para confirmarlo, se solapó el espectro de KAP con el espectro de p21, una IDP conocida, y se observa como en la región anteriormente mencionada del espectro, entre 8.0 y 8.8 ppm, existe casi un solapamiento perfecto. Este resultado hacia descartar la RMN-2D, ya que esta técnica no funciona con IDP's en solución.

Los resultados obtenidos, tras usar tres técnicas distintas que incluyen: dicróismo circular, cromatografía de gel filtración y resonancia magnética nuclear de una dimensión, **ponen en evidencia que KAP, al menos parcialmente, es una proteína intrínsecamente desestructurada.**

Las proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDP) han recibido muchos nombres. Usamos el término "desordenado" debido a que Jirgensons (Jirgensons B, 1966) lo usa para la clasificación de proteínas, que Arnone et al. (Arnone A, 1971) lo usan para describir regiones mal estructuradas y porque este nombre tiene una amplia cobertura (UverskyVN, 2005). La palabra "intrínsecamente" indica una característica dependiente de la secuencia. Los ligandos de molécula pequeña, interactores macromoleculares o modificaciones postraduccionales (PTM) pueden inducir a los IDP o regiones IDP a estructurarse o pueden hacer que los dominios estructurados se conviertan en IDP (Reichmann D, 2013).

Inicialmente, cuando se descubrieron las primeras IDP's están quedaron relegadas como una mera curiosidad biológica, proteínas con una función disminuida, fruto de procesos evolutivos ineficientes. Sin embargo, a partir de la década de 1950, se descubrieron muchos IDP's con funciones biológicas, como por ejemplo la caseína (McMeekin TL, 1952), fosvitina (Jirgensons B, 1958), fibrinógeno (Doolittle RF, 1973), tripsinógeno (Bode W, 1976) y calcineurina (CaN) (Manalan AS, 1983). Actualmente, las IDP's son consideradas como una de las formas de modulación funcional de las proteínas más sofisticadas y complejas de la biología, pasando de ser ignoradas por completo en el pasado a generar un gran interés en la actualidad (Figura 5.10).

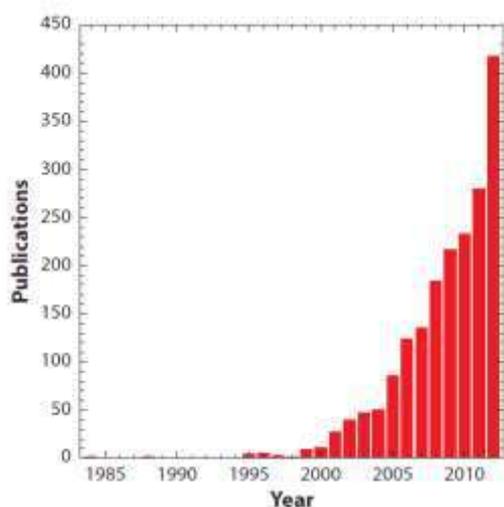


Figura 5.10: Número de publicaciones relacionadas con proteínas intrínsecamente desordenadas (PDI) por año, de 1984 a 2012.

Una IDP puede tener varias regiones desestructuradas, denominadas regiones intrínsecamente desestructuradas (IDR), y cada IDR tener capacidad de unirse a interactores diferentes, por lo que una sola IDP puede unirse a muchas moléculas si tiene varias IDR's (Uversky VN, 2010). En ejemplo claro de este modelo es la p53, una conocida proteína supresora de tumores (Figura 5.11). Alternativamente, una IDR puede cambiar su forma y, por lo tanto, unirse otros interactores (Hsu WL, 2013; Dyson HJ, 2005; Oldfield CJ, 2008).

Estas capacidades de interactuar con múltiples socios se ven reforzadas por las modificaciones postraduccionales (PTM) y por los *Splicing* alternativos (AS) (Hsu WL, 2013), los cuales ocurren con frecuencia en los IDP's e IDR's (Romero PR, 2006; Gao J, 2012). En el ejemplo anterior de la proteína p53, en la figura 5.11 solo están representadas una pequeña fracción de las interacciones proteicas conocidas que involucran las IDR's de p53. La IDR N-terminal probablemente se une a más de 40 socios diferentes, y la IDR C-terminal se une a un número aún mayor. A medida que determinemos más estructuras, la complejidad de la superposición de los diversos sitios de unión aumentará aún más.

Además, con tantos interactores para cada IDR, es importante considerar no solo que una única IDR puede unirse a múltiples moléculas, sino la competencia que se establece entre ellas por vincularse a la misma IDR. Esta competencia tiene importantes consecuencias, y añade un nivel más de complejidad y sofisticación en la modulación funcional de las IDP's.

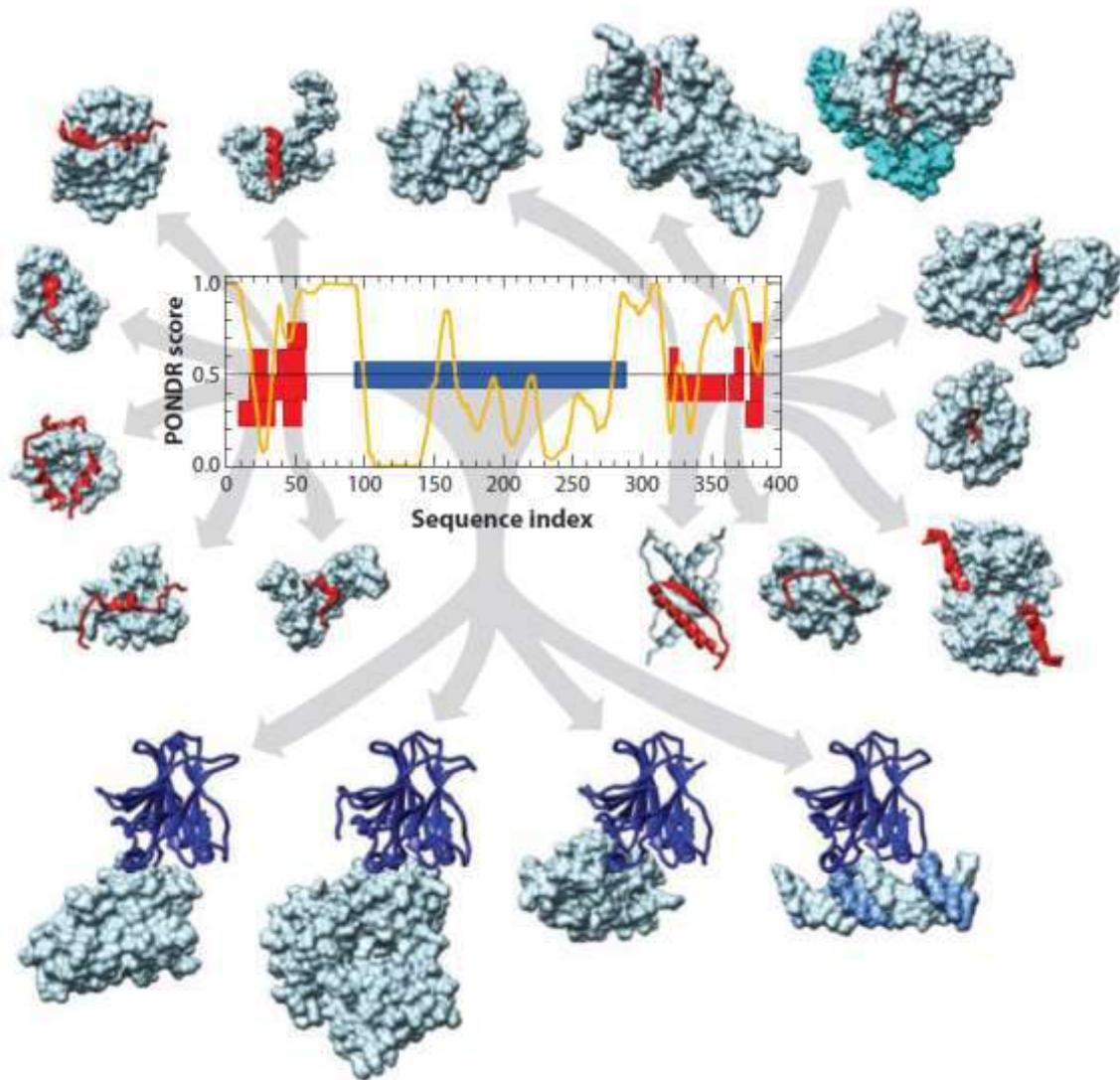


Figura 5.11: Ejemplos de interacción de p53 con múltiples socios distintos. Cada uno de los tres IDR's de p53 interacciona con socios diferentes.

El descubrimiento de las funciones de las IDP's significó refutar el concepto clásico de las proteínas de estructura-función. Como hemos visto, varias evidencias apuntan a que KAP sea una IDP, o por lo menos contenga una IDR. Esta conclusión nos permite dar una explicación de porqué fracasó la cristalización de KAP, ya que las IDP's son difícilmente cristalizables, y si lo hacen, solo se cristaliza parte de ella. Por otro lado, que la KAP sea una IDP **puede dar otra dimensión nueva de su importancia a nivel funcional** en diferentes vías de señalización, o su capacidad para interactuar con múltiples socios, pudiendo explicar cómo puede estar involucrada en todos los papeles funcionales o roles en procesos fisiopatológicos renales descritos anteriormente en esta tesis (Ver "Introducción: La KAP").

AlphaFold 2

Durante la escritura de esta tesis ha aparecido un avance muy importante a nivel de predicción de la estructura 3D de las proteínas a partir de su secuencia primaria con algoritmos informáticos: AlphaFold 2.

Cada dos años se celebra una competición para dirimir cuál es el software que predice mejor la estructura de proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos. El concurso se conoce por las siglas CASP (del inglés Critical Assessment of Protein Structure Prediction). En el 2020 se celebró la decimocuarta edición de la competición (CASP14), y el algoritmo vencedor resultó ser AlphaFold 2, desarrollado por la empresa DeepMind (Alphabet Inc., empresa matriz de Google), con una gran ventaja sobre sus competidores.

Los resultados obtenidos por AlphaFold 2 han sido calificados de espectaculares por los especialistas por el alto nivel de acierto de las predicciones. La mayoría de las predicciones de AlphaFold 2 arrojan resultados muy similares a los que se obtienen a partir de las observaciones mediante cristalografía de rayos X, sin descartar que las predicciones mejoren, incluso, los resultados de las observaciones experimentales de algunas proteínas. AlphaFold 2 deduce la estructura 3D de las proteínas mediante aprendizaje profundo haciendo uso de una red neuronal artificial, estructuras y secuencias de aminoácidos para las ciento setenta mil proteínas para las que se cuenta con el conocimiento necesario (de los doscientos millones que existen en la naturaleza). A partir de esa comparación, el algoritmo es capaz de predecir la forma de proteínas cuya estructura se desconoce, pero de las que se sabe su secuencia.

Durante la primera mitad de 2021, AlphaFold 2 ha creado una base de datos de más de 350.000 estructuras de proteínas de Homo sapiens y veinte organismos modelo (Entre los que están los ratones y ratas). En esta base de datos sale, por primera vez, una predicción de la estructura 3D de KAP, tanto de ratón (Figura 5.12) como de rata (Figura 5.13).

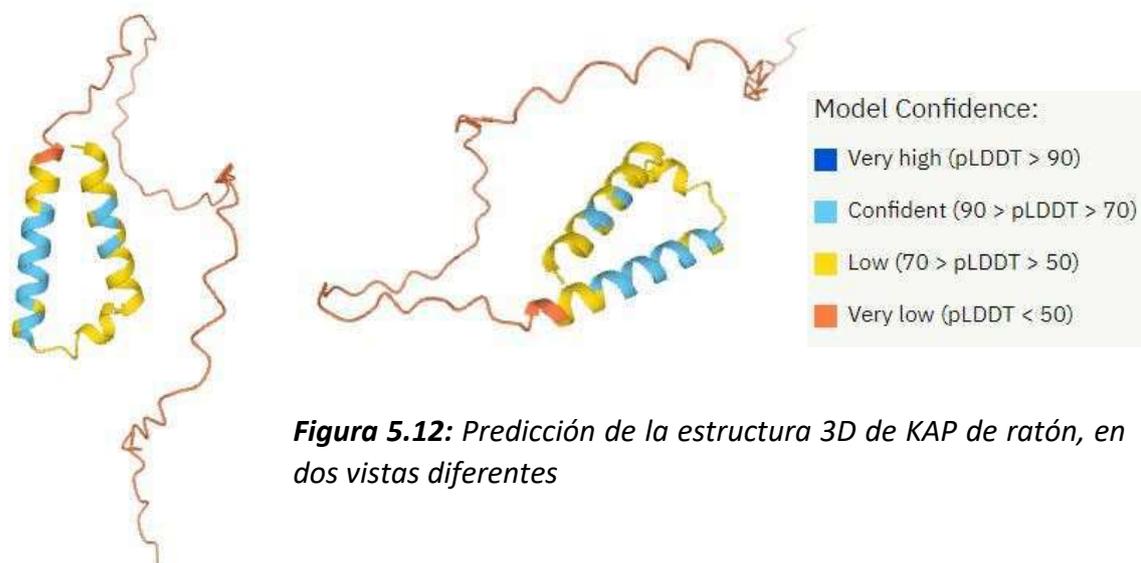


Figura 5.12: Predicción de la estructura 3D de KAP de ratón, en dos vistas diferentes

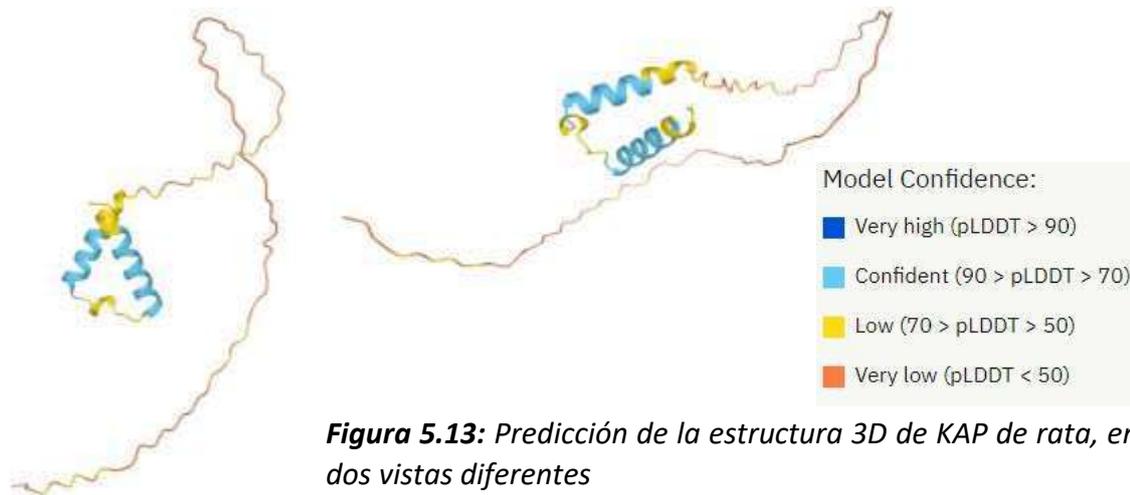


Figura 5.13: Predicción de la estructura 3D de KAP de rata, en dos vistas diferentes

Según la predicción de AlphaFold 2, KAP tendría dos hélices alfa en el extremo N-terminal, siendo el resto de la proteína una IDR. Esta región desestructurada sería más de la mitad de la proteína: del aminoácido 51 al 121 en la KAP de ratón, y del 45 al 120 en el caso de la rata. En todo caso, confirmaría todo lo dicho anteriormente sobre la estructura de KAP, aunque no sería una IDP en su totalidad, sí sería desestructurada en su mayor parte.

Un análisis de grado de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica de la KAP realizado por el software ProtScale en el portal web de Expasy (Swiss Bioinformatics Resource Portal, del Swiss Institute of Bioinformatics), tanto en ratón como en rata revela que esta región N-terminal con las hélices alfa predichas tiene un índice de hidrofobicidad positiva, al contrario que el resto de la proteína desestructurada (Figura 5.14).

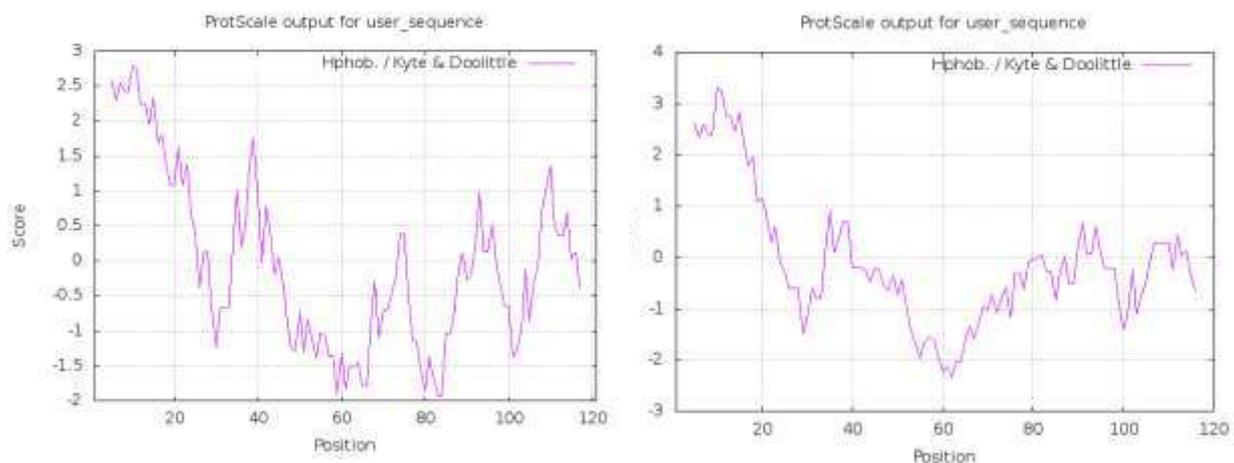


Figura 5.14: Índice de hidrofobicidad Kyte&Doolittle a lo largo de las secuencias aminoacídicas de KAP en ratón (Izquierda) y rata (Derecha).

Este dato podría indicar que esta región N-terminal con las dos hélices alfa puedan estar integradas dentro de una bicapa lipídica típica de las membranas celulares (Figura 5.16), por lo que KAP sería **una proteína integral de membrana**.

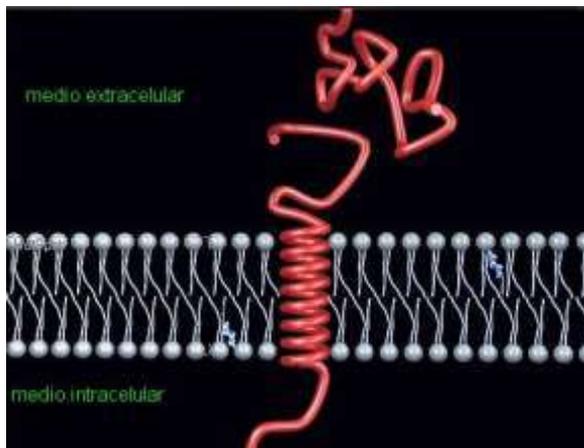


Figura 5.16: Ejemplo de una proteína con estructura hélice alfa integrada en una bicapa lipídica.

La microscopía electrónica de transmisión tridimensional (3D-TEM) es una técnica estructuralista de baja resolución pero que da una buena aproximación de la estructura 3D de proteínas problemáticas que no han podido ser cristalizadas o que necesiten estar en disolución. Como podemos ver en “Resultados: 4.5. Estructura 3D de la proteína KAP”, tampoco pudimos obtener resultados de la estructura de KAP por esta técnica. La razón se debe a que se necesitan miles de imágenes discretas de la proteína para que el algoritmo informático pueda inferir una estructura, y en nuestro caso, solo se pudieron obtener algunas de estas imágenes. Esto se debe a que la mayoría de la proteína se agregaba. Después de intentar muchas variaciones (diferentes diluciones, diferentes tinciones negativas, cambios de medios, fuerzas iónicas, etc.) no se pudo mejorar los resultados, por lo que se concluyó que la agregación se debía a un artefacto de la técnica. No obstante, sí se obtuvo un resultado. Esta técnica de microscopía electrónica de transmisión sólo permite ver moléculas de, al menos, 150 kDa. Recordemos que la KAP tiene un tamaño de 13 kDa, por lo que, en principio, puede resultar contradictorio. No obstante, existe otro dato que puede confirmar este tamaño de ≈ 150 kDa. Durante la purificación de diferentes lotes de KAP recombinante por HPLC en una columna de gel filtración Superdex G-200, la proteína siempre eluía en un único, perfecto y simétrico pico (Ver: “4.4.2.4. Purificación de His-KAP-SPS con columna gel filtración Superdex G-200 HPLC”). Cuando se calibraba la columna con un mix de proteínas estándar comercial, se comprobaba que la KAP eluía en el mismo punto que lo hacía la Aldolasa (158 kDa), una de las proteínas del mix comercial. Es decir, se ha encontrado en dos técnicas totalmente diferentes, un tamaño aparente de la KAP en solución de unos 150 kDa. Como sabemos que la KAP tiene un tamaño real de 13 kDa solo puede existir una explicación: **la KAP podría formar un homo-oligómero compuesto por unas 12 subunidades de KAP, un dodecámero** (Figura 5.17). Como curiosidad, la Prohibitina (PHB), uno de los posibles interactores de KAP, también forma un oligómero, en este caso compuesto por 16 subunidades del heterodímero PHB-1/PHB-2 (Figura 5.18)

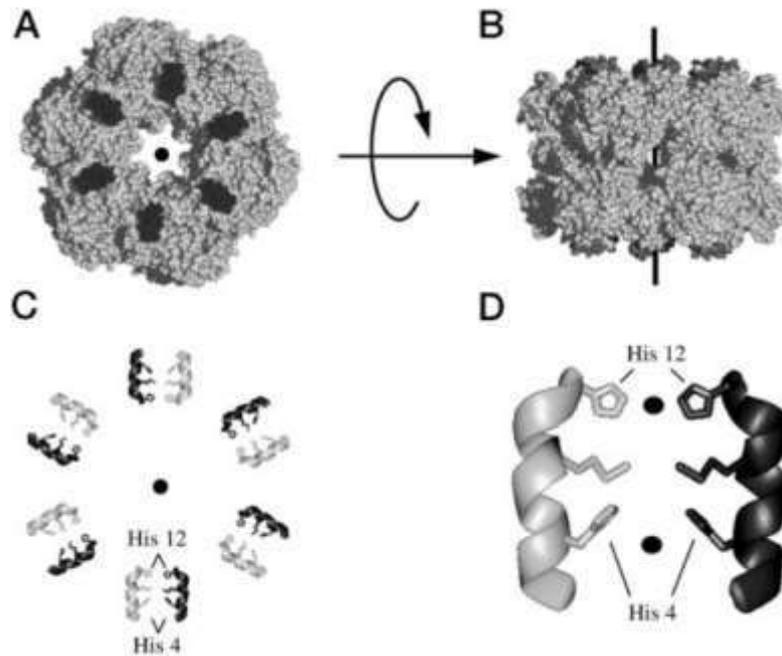


Figura 5.17: ejemplo de un dodecámero, en este caso se trata de la Glutamina Sintasa (GS) de *E. Coli*.

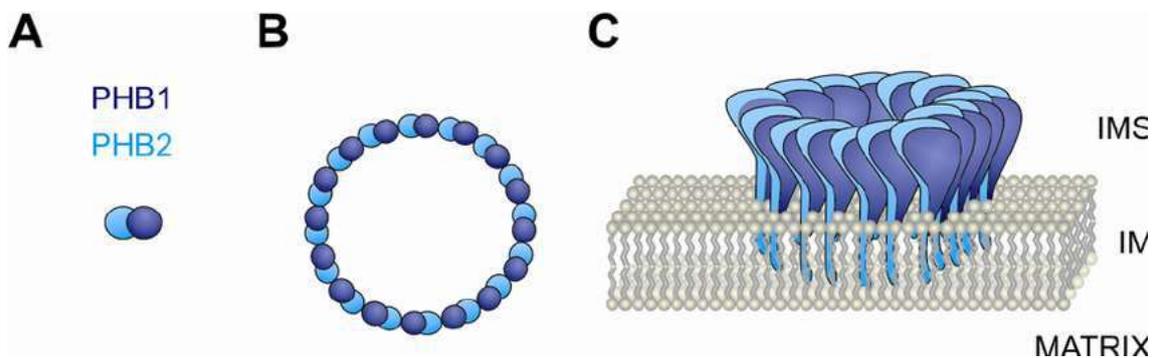


Figura 5.18: Oligómero de la Prohibitina, formado por la repetición de 16 heterodímeros de PHB-1 y PHB-2, en la membrana interna mitocondrial. Los N-terminales de cada monómero, compuesto por aminoácidos hidrofóbicos, se integran en la membrana.

Como hemos visto anteriormente, es probable que los extremos N-terminales de KAP puedan estar integradas en bicapas lipídicas en forma de hélices alfa. Así pues, es posible que el modelo de dodecámero de KAP se pueda asemejar bastante al que podemos ver en la Prohibitina (Figura 5.18), un oligómero integrado en una membrana celular. Con toda esta nueva información se podría emplear alguna técnica de estructura 3D especializada en proteínas integrales de membrana, como puede ser la Cristalografía Electrónica (que no de rayos X) en ambiente lipídico (Raunser S, 2009).

5.7. Opciones de futuro con la KAP

La Kidney Androgen-regulated Protein (KAP), una proteína de expresión exclusiva del túbulo proximal renal murino, ha sido objeto de múltiples estudios anteriores a esta tesis. En estos estudios, se ha demostrado que la KAP protege frente a la nefrotoxicidad inducida por CsA (Cebrian C, 2001), un potente inmunosupresor ampliamente utilizado. También ha mostrado protección contra el síndrome metabólico e inactivación del eje proinflamatorio IL6/gp130 inducido por dieta rica en grasa (Bardaji B, 2017). En la actual tesis, se han visto indicios de que KAP puede estar implicada también en otros procesos fisiopatológicos, ya que, por un lado, se ha validado su interacción con la Ciclofilina B humana (hCypB), y por otro, ha mostrado la existencia de tres posibles interactores importantes, como son la Vimentina, la Prohibitina y la Cofilina-1, que, además, también son posibles interactores de hCypB. KAP y CypB han mostrado tener un papel importante en la diferenciación, proliferación y protección frente a la apoptosis y procesos inflamatorios mediada por IL6/STAT3 en células del túbulo proximal renal humano. Por otro lado, en los últimos años, la literatura muestra que CypB está implicada en la activación de numerosos tipos de cáncer (Li T, 2017; Choi TG, 2018; Yu H, 2014; Teng M, 2019; Mei F, 2019) (algunos de ellos mediante STAT3), así como en otros procesos fisiopatológicos con mediación de STAT3 (Prakash P, 2017; Zhao K, 2017), por lo que KAP podría tener también un rol terapéutico mediante la modulación/inhibición de la función de CypB. Por último, los tres posibles interactores de KAP y CypB, Vimentina, Prohibitina y Cofilina-1, están implicados en proliferación, diferenciación, apoptosis, migración celular, expresión génica, cáncer, síndrome metabólico y enfermedad renal. En algunas de estas funciones ya hemos visto la implicación de la KAP, por lo que se podría hipotetizar que KAP podría llevar a cabo algunas de sus funciones a través de su interacción con Vimentina, Prohibitina, Cofilina-1 y, especialmente, CypB. Por todo ello, y dado que aún no se ha encontrado ningún homólogo funcional de KAP en humanos, una de las conclusiones más importantes de esta tesis es **proponer la utilización de KAP, o alguno de sus péptidos, para su uso terapéutico en humanos.**

Para ello, una de las mejores opciones sería realizar pruebas concepto con ratones que posean algunas de estas disfunciones, y administrar KAP de forma exógena para monitorizar una posible mejora fisiopatológica (recordar que uno de los últimos hallazgos encontrados por nuestro grupo es que KAP es secretada de las células del túbulo proximal y que tiene un impacto en otros órganos, por lo que se hipopetiza que KAP tenga funciones endocrinas). Por ejemplo, una prueba de concepto podría ser la utilización de ratones de la cepa Ob/Ob, deficientes en leptina y con un fenotipo obeso para demostrar la protección de KAP frente a la obesidad. También se podrían utilizar ratones WT y, por ejemplo, inducirles SM con una dieta HFD, o administrarles CsA para inducir daño renal, o utilizar cepas proclives a desarrollar diferentes tipos de cáncer o WT con inducción de cáncer. En todos estos casos se puede administrar KAP y comprobar su posible papel protector.

Otro desarrollo importante que se puede sugerir es identificar qué péptidos de la KAP tienen alguna de las capacidades funcionales descritas hasta ahora. Este enfoque tiene beneficios, tales como poder amplificar la potencia terapéutica o evitar posibles efectos secundarios (como alguna función de KAP no deseada, o introducir algún antígeno reactivo). Según lo que se ha hipotetizado anteriormente en “Discusión: 5.5. Estructura 3D de KAP”, el extremo C-Terminal de KAP (en realidad desde el aminoácido 51 al final), que es una IDR, podría ser la que concentre mayor parte de sus funciones.

Después de muchos años invertidos, decenas de publicaciones, varias tesis doctorales, mucho capital financiero y humano invertido, es el momento de trasladar el conocimiento adquirido sobre la KAP en productos de valor terapéutico para la sociedad.

Bibliografía

- Allain F Boutillon C, Mariller C, Spik G.** Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *Journal of Immunological Methods* - 1995. - págs. 113-120.
- Alnemri ES Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* - 1996.
- Arber S Krause KH, 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. - págs. 113-125.
- Aresté C Melià MJ, Isern J, Tovar JL, Meseguer A.** Sex steroid regulation and identification of different transcription units of the SA gene in mouse kidney. *J Endocrinol* - 2004. - págs. 101-114.
- Arnone A Bier CJ, Cotton FA, Day VW, Hazen EE, Richardson DC, Yonath A, Richardson JS.** A high resolution structure of an inhibitor complex of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. I. Experimental procedures and chain tracing. *J Biol Chem* - 1971. - págs. 2302-2316.
- Audebert M Salles B, Calsou P.** Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* - 2004. - págs. 55117-55126.
- Azrak Z Kfoury C, Ghantous C, Zeidan A.** Molecular Mechanisms of Angiotensin II-Induced Leptin Synthesis in Vascular Smooth Muscle. *The FASEB Journal*. - 2016.
- Bai SW Herrera-Abreu MT, Rohn JL, Racine V, Tajadura V, Suryavanshi N, Bechtel S, Wiemann S, Baum B, Ridley AJ.** Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biol* - 2011.
- Baker RG Hayden MS, Ghosh S.** NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metab* - 2011. - págs. 11-22.
- Bamburg JR Bernstein BW.** ADF/cofilin. *Curr. Biol* - 2008. - págs. R273–R275.
- Bamburg JR** Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* - 1999. - págs. 185–230.
- Banerjee P, Venkatachalam S, Mamidi MK, Bhone R, Shankar K, Pal R.** Vitiligo patient-derived keratinocytes exhibit characteristics of normal wound healing via epithelial to mesenchymal transition. *Experimental dermatology* - 2015. - págs. 391-393.
- Bardají B** Role of The Kidney Androgen-Regulated Protein in the development of the metabolic syndrome. (Tesis doctoral). - 2013.
- Bardaji B Villena JA, Aranda M, Brils G, Cuevas A, Hespel T, Lekuona H, Suárez C, Tornavaca O, Meseguer A.** Kidney Androgen-Regulated Protein (KAP) Transgenic Mice Are Protected Against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome. *Sci Re* - 2017.
- Bardin CW Catterall JF.** Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science* - 1981. - págs. 1285-1294.

Baris OR Klose A, Kloepper JE, Weiland D, Neuhaus JFG, Schauen M, Wille A, Müller A, Merkwirth C, Langer T, Larsson NG, Krieg T, Tobin DJ, Paus R, Wiesner RJ. The mitochondrial electron transport chain is dispensable for proliferation and differentiation of epidermal progenitor cells. *Stem Cells*.- 2011. - págs. 1459-1468.

Benjamin RC Gill DM. Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *J Biol Chem* - 1980. - págs. 10502-10508.

Bennett WM Pulliam JP. Cyclosporine Nephrotoxicity. *Annals of Internal Medicine* - 1983.

Berger FG Watson G. Androgen-Regulated Gene Expression. *Annual Review of Physiology* - 1989. - págs. 51-65.

Bergsma DJ Eder C, Gross M, Kersten H, Sylvester D, Appelbaum E, Cusimano D, Livi GP, McLaughlin MM, Kasyan K. The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms. *J Biol Chem* - 1991. - págs. 23204-23214.

Bernstein BW Bamburg JR. ADF/Cofilin: a functional node in cell biology. *Cell* - 2010. - págs. 187-195.

Bertram JF Douglas-Denton RN, Diouf B. Human nephron number: implications for health and disease *Pediatr Nephrol* 26(9). - 2011. - págs. 1529–1533.

Blagosklonny MV Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell cycle* - 2002. - págs. 103-110.

Bode W Fehlhhammer H, Huber R. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1–8 Å resolution. I. Data collection, application of patterson search techniques and preliminary structural interpretation. *J. Mol. Biol* - 1976. - págs. 325-335.

Bonventre JV Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *JCI* - 2011.

Boonstra JG van der Woude FJ, Wever PC, Laterveer JC, Daha MR, van Kooten C. Expression and function of Fas (CD95) on human renal tubular epithelial cells. *JASN*. - 1997. - págs. 1517-1524.

Borel JF Feurer C, Magnée C, Stähelin H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* - 1977. - págs. 1017-1025.

Bram RJ Hung DT, Martin PK, Schreiber SL, Crabtree GR. Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Molecular and Cellular Biology* - 1993.

Bussink J Kaanders JH, van der Kogel AJ. Microenvironmental transformations by VEGF- and EGF-receptor inhibition and potential implications for responsiveness to radiotherapy. *Radiother Onco* - 2007. - págs. 10-17.

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. - págs. 10739-10742.

Carr DB Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, Shofer JB, Fish BE, Knopp RH, Kahn SE. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*. - 2004. - págs. 2087-2094.

Cartier N Lacave R, Vallet V, Hagege J, Hellio R, Robine S, Pringault E, Cluzeaud F, Briand P, Kahn A. 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. - págs. 695-704.

Catterall JF Kontula KK, Watson CS, Seppänen PJ, Funkenstein B, Melanitou E, Hickok NJ, Bardin CW, Jänne OA. Regulation of gene expression by androgens in murine kidney. *Recent Prog Horm Res* - 1986. - págs. 71-109.

Catterall JF Meseguer A. The effects of sex steroids on renal gene expression. *Semin Uro.* - 1989. - págs. 252-259.

Cavallaro U Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Bio.* - 2011. - págs. 189-197.

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. - págs. 276-289.

Chan C Beltzner CC, Pollard TD. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Bio.* - 2009. - págs. 537-545.

Chen J Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Annals of Internal Medicine* . - 2004. - págs. 167-174.

Choi TG Nguyen MN, Kim J, Jo YH, Jang M, Nguyen NNY, Yun HR, Choe W, Kang I, Ha J, Tang DG, Kim SS. Cyclophilin B induces chemoresistance by degrading wild type p53 via interaction with MDM2 in colorectal cancer. *J Pathol* - 2018. - págs. 115-126.

Choi YJ Anders L. Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene* - 2014. - págs. 1890-1903.

Chou YH Bischoff JR, Beach D, Goldman RD. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell* - 1990. - págs. 1063-1071.

Chou YH Ngai KL, Goldman RD. The regulation of intermediate filament reorganization in mitosis. p34cdc2 phosphorylates vimentin at a unique N-terminal site. *J. Biol. Chem* - 1991. - págs. 7325-7328.

Christensen EI Wagner CA, Kaissling B. Uriniferous tubule: structural and functional organization *Compr Physiol* 2(2). - 2012. - págs. 805-861.

Chua BT Volbracht C, Tan KO, Li R, Yu VC, Li P. Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat Cell Biol.* - 2003. - págs. 1083-1089.

Cines DB Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* - 1998. - págs. 3527-3561.

Colucci-Guyon E Gimenez M, Ribotta Y, Maurice T, Babinet C, Privat A. Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia*. - 1999. - págs. 33-43.

Colucci-Guyon E Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*. - 1994. - págs. 679-694.

Correa-Costa M Andrade-Oliveira V, Braga TT, Castoldi A, Aguiar CF, Origassa CS, Rodas AC, Hiyane MI, Malheiros DM, Rios FJ, Jancar S, Camara NO. Activation of platelet-activating factor receptor exacerbates renal inflammation and promotes fibrosis. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology - 2014. - págs. 455-466.

Cristina Aresté M Jesús Melià, Joan Isern, José Luis Tovar, Anna Meseguer. Sex steroid regulation and identification of different transcription units of the SA gene in mouse kidney. J Endocrinol. - 2004. - págs. 101-114.

Daniel NN Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points Cell - 2004. - págs. 205-219.

Dantzer F de Murcia JM, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. Biochemistry - 2000. - págs. 7559-7569.

Dantzer F Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, de Murcia JM, de Murcia G. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. Biochimie - 1999. - págs. 69-75.

de la Monte SM Neely TR, Cannon J, Wands JR. Ethanol impairs insulin-stimulated mitochondrial function in cerebellar granule neurons. Cell. Mol. Life Sci - 2001. - págs. 1950-1960.

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

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

Ding Y Davisson RL, Hardy DO, Zhu LJ, Merrill DC, Catterall JF, Sigmund CD. The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice. J Biol Chem - 1997. - págs. 274-289.

Ding Y Sigmund CD. Androgen-dependent regulation of human angiotensinogen expression in KAP-hAGT transgenic mice. Am J Physiol Renal Physiol - 2001. - págs. 54-60.

Doolittle RF Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. Adv. Protein Chem - 1973. - págs. 1-109.

Dudkowska M Manteuffel-Cymborowska M, Chmurzyńska W, Grzelakowska-Sztabert B. Catecholamines participate in the induction of ornithine decarboxylase gene expression in normal and hyperplastic mouse kidney. Molecular Basis of Disease - 1999. - págs. 71-79.

Dudkowska M Stachurska A, Chmurzyska W, Grzelakowska-Sztabert B, Manteuffel-Cymborowska M. Cross-talk between steroid-receptor-mediated and cell-membrane-receptor-mediated signalling pathways results in the in vivo modulation of c-Met and ornithine decarboxylase gene expression in mouse kidney. Biochem J - 2001. - págs. 317-323.

Duman RS Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. European Psychiatry - 2002. - págs. 306-310.

Dyson HJ Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol - 2005. - págs. 197-208.

- E M Niu A Meseguer, J F Catterall** Genomic organization and DNA sequence of the mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene. *DNA Cell Biol* - 1991. - págs. 41-49.
- Eckes B Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P.** Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci* - 2000. - págs. 2455–2462.
- Eckes B Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvee A, Koteliensky V, Babinet C, Krieg T.** Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell Sci.* - 1998. - págs. 1897–1907.
- Eiseler T Döppler H, Yan IK, Kitatani K, Mizuno K, Storz P.** Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nature Cell Biology* - 2009. - págs. 545–556.
- El-Meanawy MA Schelling JR, Pozuelo F, Churpek MM, Ficker EK, Iyengar S, Sedor JR.** Use of serial analysis of gene expression to generate kidney expression libraries. *American Journal of Physiology*. - 2000. - págs. 383-392.
- Eriksson JE Brautigan DL, Vallee R, Olmsted J, Fujiki H, Goldman RD.** Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1992. - págs. 11093–11097.
- Eriksson JE He T, Trejo-Skalli AV, Harmala-Brasken AS, Hellman J, Chou YH, Goldman RD.** Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J. Cell Sci.* - 2004. - págs. 919–932.
- Faarup P Holstein-Rathlou NH, Norgaard T.** Functionally induced changes in water transport in the proximal tubule segment of rat kidneys. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 4. - 2011. - págs. 73-84.
- Fidaleo M Arnauld S, Clémencet MC, Chevillard G, Royer MC, De Bruycker M, Wanders RJA, Athias A, Gresti J, Clouet P, Degrace P, Kersten S, Espeel M, Latruffe N, Nicolas-Francès V, Mandard S.** A role for the peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase B enzyme in the control of PPAR α -mediated upregulation of SREBP-2 target genes in the liver. *Biochimie* - 2011. - págs. 876-891.
- Fieser LF Fieser M.** *Steroids*. - New York : Reinhold Publishing Corp, 1959. - pág. 945.
- Fisher AE Hohegger H, Takeda S, Caldecott KW.** Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly (ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol* - 2007. - págs. 5597-5605.
- Ford ES** Prevalence of the metabolic syndrome defined by the international diabetes federation among adults in the U.S. *Diabetes Care*. - 2005. - págs. 2745–2749.
- Frigolet ME Torres N, Tovar AR.** The renin–angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry*. - 2013. - págs. 2003-2015.
- Gale R** *Crystallography Made Crystal Clear*. - 1993.
- Gan Y Shi C, Inge L, Hibner M, Balducci J, Huang Y.** Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogen* - 2010. - págs. 4947-4958.

- Gao J Xu D.** Correlation between posttranslational modification and intrinsic disorder in protein. *Pac. Symp. Biocomput.* - 2012. - págs. 94-103.
- Gard DL Lazarides E.** Cyclic AMP-modulated phosphorylation of intermediate filament proteins in cultured avian myogenic cells. *Mol. Cell. Biol.* - 1982. - págs. 1104-1114.
- Gilling-Smith G Willis DS, Beard RW, Franks S.** Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* - 1994. - págs. 1158-1165.
- Gomi S Nakao M, Niiya F, Imamura Y, Kawano K, Nishizaka S, Hayashi A, Sobao Y, Oizumi K, Itoh K.** A Cyclophilin B Gene Encodes Antigenic Epitopes Recognized by HLA-A24-Restricted and Tumor-Specific CTLs. *Immunol* - 1999. - págs. 4994-5004.
- Goto H Kosako H, Tanabe K, Yanagida M, Sakurai M, Amano M, Kaibuchi K, Inagaki M.** Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *J. Biol. Chem* - 1998. - págs. 11728-11736.
- Goto H Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K, Inagaki M.** Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J. Biol. Chem* - 2003. - págs. 8526-8530.
- Gourlay CW Ayscough KR.** Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci* - 2005. - págs. 2119-2132.
- Graham FL Smiley J, Russell WC, Nairn R.** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* - 1977. - págs. 59-74.
- Grande MT Pascual G, Riobos AS, Clemente-Lorenzo M, Bardaji B, Barreiro L, Tornavaca O, Meseguer A, López-Novoa JM.** Increased oxidative stress, the renin-angiotensin system, and sympathetic overactivation induce hypertension in kidney androgen-regulated protein transgenic mice. *Free Radic Biol Med* - 2011. - págs. 1831-1841.
- Grande MT Sanchez-Laorden B, Lopez-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arevalo M, Rowe RG, Weiss SJ, Lopez-Novoa JM, Nieto MA.** Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature medicine* - 2015. - págs. 989-997.
- Greenfield NJ** Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols.* - 2006. - págs. 2876-2890.
- Gregory-Bass RD Olatinwo M, Xu W, Matthews R, Stiles JK, Thomas K, Liu D, Tsang B, Thompson WE.** Prohibitin silencing reverses stabilization of mitochondrial integrity and chemoresistance in ovarian cancer cells by increasing their sensitivity to apoptosis. *Int J Cancer* - 2008. - págs. 1923-1930.
- Gros J Tabin CJ.** Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science.* - 2014. - págs. 1253-1256.
- Guo W Xu H, Huang WY, Chen J, Yang Y, Fu R, Liu HM, Zha XL, Zhang ZG.** Prohibitin suppresses renal interstitial fibroblasts proliferation and phenotypic change induced by transforming growth factor-beta1. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* - 2007. - págs. 1660-1665.

Gurniak CB Perlas E, Witke W. The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev Biol* - 2005. - págs. 231-241.

Han L Stope MB, López de Jesús M, Weernink PAO, Urban M, Wieland T, Rosskopf D, Mizuno K, Jakobs KH, Schmidt M. Direct stimulation of receptor-controlled phospholipase D1 by phospho-cofilin. *EMBO J* - 2007. - págs. 4189-4202.

Hardwick JP Osei-Hyiaman D, Wiland H, Abdelmegeed MA, Song BJ. PPAR/RXR Regulation of Fatty Acid Metabolism and Fatty Acid omega-Hydroxylase (CYP4) Isozymes: Implications for Prevention of Lipotoxicity in Fatty Liver Disease. *PPAR Res* - 2009.

Held A Toole J, Nicholas D, William H. An abundant androgen-regulated mRNA in the mouse kidney. *Cell* - 1979. - págs. 441-448.

Henrion D Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Friedlander G, Poitevin P, Levy BI. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *Clin. Invest* - 1997. - págs. 2909-2914.

Henschke P Vorum H, Honore B, Rice GE. Protein profiling the effects of in vitro hyperoxic exposure on fetal rabbit lung. *Proteomics*. - 2006. - págs. 1957-1962.

Herrmann H Fouquet B, Franke WW. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin. *Development* - 1989. - págs. 279-298.

Hess AD Colombani PM. Ciclosporin - Mechanism of Action: In vitro Studies. - 1986. - págs. 198-221.

Hossen MN Kajimoto K, Akita H, Hyodo M, Ishitsuka T, Harashima H. Ligand-based targeted delivery of a peptide modified nanocarrier to endothelial cells in adipose tissue. *J. Control. Release.* - 2010. - págs. 261-268.

Hotamisligil GS Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. - 2006. - págs. 860-867.

Hotulainen P Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* - 2005. - págs. 649-664.

Hsu WL Oldfield CJ, Xue B, Meng J, Huang F, Romero P, Uversky VN, Dunker AK. Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding. *Protein Sci.* - 2013. - págs. 258-273.

Huang TY DerMardirossian C, Bokoch GM. Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* - 2006. - págs. 26-31.

Hughson M Farris AB, Douglas-Denton R. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight *Kidney Int* 63(6). - 2003. - págs. 2110-2122.

Ikeda S Cunningham LA, Boggess D, Hawes N, Hobson CD, Sundberg JP, Naggert JK, Smith RS, Nishina PM. Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor). *Hum Mol Genet* - 2003. - págs. 1029-1037.

Isern J Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Meseguer A. Functional analysis and androgen-regulated expression of mouse organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) in the kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - 2001. - págs. 73-78.

Isern J Meseguer A. Hormonal regulation and characterisation of the mouse Cyp4b1 gene 5'-flanking region. *Biochem and Biophys Res Com* - 2003. - págs. 139-147.

Ivaska J Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration and signaling. *Experimental Cell Research* - 2007. - págs. 2050-2062.

Jean-Faucher C Berger M, Gallon C, de Turckheim M, Veyssièrè G, Jean C. Sex-related differences in renal size in mice: ontogeny and influence of neonatal androgens. *J Endocrinol.* - 1987. - págs. 241-246.

Jin HJ Kim J, Yu J. Androgen receptor genomic regulation. *Transl Androl Urol* - 2013. - págs. 158-177.

Jirgensons B Classification of proteins according to conformation. *Die Makromolekulare Chemie* - 1966.

Jirgensons B Optical rotation and viscosity of native and denatured proteins. X. Further studies on optical rotatory dispersion. *Arch. Biochem. Biophys* - 1958. - págs. 57-69.

Kahan BD Tejpal N, Gibbons-Stubbers S, Tu Y, Wang M, Stepkowski S, Chou TC The synergistic interactions in vitro and in vivo of brequinar sodium with cyclosporine or rapamycin alone and in triple combination. *Transplantation* - 1993. - págs. 894-900.

Kaissling B Kriz W Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 56. - 1979. - págs. 1-123.

Kalluri R Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* - 2009. - págs. 1420-1428.

Kandoth C McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* - 2013. - págs. 333-339.

Karp R Brasel JA, Winick M. Compensatory Kidney Growth After Uninephrectomy in Adult and Infant Rats. *Am J Dis Child* - 1971. - págs. 186-188.

Kasashima K Ohta E, Kagawa Y, Endo H. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *Biol Chem* - 2006. - págs. 36401-36410.

Kasik JW Rice EJ. Kidney androgen-regulated protein gene is expressed in the uterus during late pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* - 1993. - págs. 239-259.

Kim SY Kim Y, Hwang HY, Kim TY. Altered expression of prohibitin in psoriatic lesions and its cellular implication. *Biochem Biophys Res Commun* - 2007. - págs. 653-658.

Klamt K Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, Yu LR, Veenstra TD, Shacter E. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol* - 2009. - págs. 1241-1246.

Ko KS Tomasi ML, Iglesias-Ara A, French BA, French SW, Ramani K, Lozano JJ, Oh P, He L, Stiles BL, Li TWH, Yang H, Martínez-Chantar ML, Mato JM, Lu SC. Liver-specific deletion of prohibitin 1 results in spontaneous liver injury, fibrosis, and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* - 2010. - págs. 2096-2108.

Kochin V Imanishi SY, Eriksson JE. Fast track to a phosphoprotein sketch — MALDI-TOF characterization of TLC-based tryptic phosphopeptide maps at femtomolar detection sensitivity. *Proteomics*. - 2006. - págs. 5676–5682.

Koenig H Goldstone A, Lu CY. Androgens regulate mitochondrial cytochrome c oxidase and lysosomal hydrolases in mouse skeletal muscle. *Biochemical Journal* - 1980. - págs. 349-353.

Kolonin MG Saha PK, Chan L, Pasqualini R, Arap W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med* - 2004. - págs. 625–632.

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. - págs. 705-712.

Larue L Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogen* - 2005. - págs. 7443-7454.

Lázaro. Olga Tornavaca Anàlisi funcional de la kidney androgen-regulated protein (kap) i caracterització de nous mecanismes de regulació posttranscripcional. (Tesis doctoral) - 2007.

Le 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. - págs. 727-733.

Lee MY Chou CY, Tang MJ, Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* - 2008. - págs. 4743-4750.

Lee YS Jeong S, Kim KY, Yoon JS, Kim S, Yoon KS, Ha J, Kang I, Choe W. Honokiol inhibits hepatoma carcinoma cell migration through downregulated Cyclophilin B expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* - 2021. - págs. 44-51.

Lehman N Di Fulvio M, McCray N, Campos I, Tabatabaian F, Gomez-Cambronero J. Phagocyte cell migration is mediated by phospholipases PLD1 and PLD2. *Blood* - 2006. - págs. 3564-3572.

Leytin V Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S Freedman J. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Laboratory Investigation* - 2009. - págs. 374-384.

Li T Guo H, Zhao X, Jin J, Zhang L, Li H, Lu Y, Nie Y, Wu K, Shi Y, Fan D. Gastric Cancer Cell Proliferation and Survival Is Enabled by a Cyclophilin B/STAT3/miR-520d-5p Signaling Feedback Loop. *Tumor and Stem Cell Biology* - 2017. - págs. 1227-1240.

Lindsay RS Howard BV. Cardiovascular risk associated with the metabolic syndrome. *Current Diabetes Reports*. - 2004 - págs. 63-68.

Ling S Dai A, Williams MRI, Myles K, Dilley RJ, Komesaroff PA, Sudhir K. Testosterone (T) Enhances Apoptosis-Related Damage in Human Vascular Endothelial Cells. *Endocrinology* - 2002. - págs. 1119-1125.

- Liu J Chen CM, Walsh CT.** Human and Escherichia coli cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry*. - 1991. - págs. 2306-2310.
- Liu T Sakane J, Tsunematsu T.** The Effects of FK-506 and Cyclosporin A on the Proliferation of PHA - Stimulated T Cells in Response to IL-2, IL-4 or IL-6. *International Archives of Allergy and Immunology* - 1992. - págs. 293-298.
- Liu Y He P, Zhang M, Wu D.** Lentiviral vector-mediated RNA interference targeted against prohibitin inhibits apoptosis of the retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line NB4-R1. *Mol Med Rep* - 2012. - págs. 1288-1292.
- Liu YH Peck K, Lin JY.** Involvement of prohibitin upregulation in abrin-triggered apoptosis. *Evid Based Complement Altern Med* - 2012.
- Lorz C Ortiz A, Justo P, González-Cuadrado S, Duque N, Gómez-Guerrero C, Egidio J.** Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli. *JASN*. - 2000. - págs. 1266-1277.
- Lovisa S LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R.** Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature medicine*. - 2015. - págs. 998-1009.
- Lumeng CN Saltiel AR.** Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Investig.* - 2011. - págs. 2111-2117.
- Lund SD Gallagher PM, Wang B, Porter SC, Ganschow RE.** Androgen responsiveness of the murine beta-glucuronidase gene is associated with nuclease hypersensitivity, protein binding, and haplotype-specific sequence diversity within intron 9. *Molecular and Cellular Biology*. - 1991. - págs. 5426-5434.
- Luu-The V** Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. - 2013. - págs. 137-176.
- M Hubank D G Schatz** Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* - 1994. - págs. 5640-5648.
- Madsen KM Park CH** Lysosome distribution and cathepsin B and L activity along the rabbit proximal tubule *Am J Physiol* 253(6 Pt 2). - 1987. - págs. F1290–F1301.
- Malstrom SE Tornavaca O, Meseguer A, Purchio AF, West DB.** The characterization and hormonal regulation of kidney androgen-regulated protein (Kap)-luciferase transgenic mice. *Toxicol Sci* - 2004. - págs. 266-277.
- Maluchenko NV Feofanov AV, Studitsky VM.** PARP-1-Associated Pathological Processes: Inhibition by Natural Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences* - 2021.
- Manalan AS Klee CB.** Activation of calcineurin by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci* - 1983. - págs. 4291-4295.
- Mangelsdorf DJ Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM.** The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* - 1995. - págs. 835-839.

Manteuffel-Cymborowska M Chmurzyńska W, Grzelakowska-Sztabert B. Polyamines in testosterone-induced hypertrophic and antifolate-induced hyperplastic mouse kidney. Differential effect of α -difluoromethylornithine. *Molecular Basis of Disease* - 1993. - págs. 133-141.

Manteuffel-Cymborowska M Pęska M, Chmurzyńska W, Grzelakowska-Sztabert B. Catecholamines are required for androgen-induced ODC expression but not for hypertrophy of mouse kidney. *Molecular Cell Research* - 1997. - págs. 292-298.

Marcant A Denys A, Melchior A, Martinez P, Deligny A, Carpentier M. Allain F. Cyclophilin B Attenuates the Expression of TNF- α in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages through the Induction of B Cell Lymphoma-3. *The Journal of Immunology* - 2012. - págs. 2023-2032.

Maunsbach AB Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy. *Ultrastruct Res* 16. - 1966. - págs. 239-258.

McMeekin TL Milk proteins. *J. Food Prot.* - 1952. - págs. 57-63.

McPhaul MJ Marcelli M, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD. Genetic basis of endocrine disease. 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* - 1993. - págs. 17-23.

Mei F Tu Y. Cyclophilin B enhances the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* - 2019. - págs. 1590-1598.

Melanitou E Cohn DA, Bardin CW, Jänne OA. Genetic variation in androgen regulation of ornithine decarboxylase gene expression in inbred strains of mice. *Mol Endocrinol.* - 1987. - págs. 266-273.

Melanitou E Simon-Chazottes D, Guénet JL, Rougeon F. The gene coding for the kidney androgen-regulated protein (Kap), maps between the Gapd and Kras-2 genes on mouse chromosome 6. *Mamm Genome* - 1991. - págs. 191-193.

Melanitou E Tronik D, Rougeon F. Two isoforms of the kidney androgen-regulated protein are encoded by two alleles of a single gene in OF1 mice. *Genet Res* - 1992. - págs. 117-134.

Melia M Bofill N, Hubank M, Meseguer A. Identification of Androgen-Regulated Genes in Mouse Kidney by Representational Difference Analysis and Random Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *Endocrinology* - 1998. - págs. 688-695.

Merkwirth C Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Löwer B, Wunderlich FT, von Kleist-Retzow JC, Waisman A, Westermann B, Langer T. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev* - 2008. - págs. 476-488.

Meseguer A Catterall JF. Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control. *Mol endocrinol* - 1990. - págs. 1240-1248.

Meseguer A Catterall JF. Effects of pituitary hormones on the cell-specific expression of the KAP gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* - 1992. - págs. 153-162.

- Meseguer A Catterall JF.** Mouse kidney androgen-regulated protein messenger ribonucleic acid is expressed in the proximal convoluted tubules. *Mol Endocrinol* - 1987. - págs. 535-549.
- Meseguer A Watson CS, Catterall JF.** Nucleotide Sequence of Kidney Androgen-Regulated Protein mRNA and Its Cell-Specific Expression in Tfm/Y Mice. *Molecular endocrinology* - 1989. - págs. 962-967.
- Mihara M Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M.** IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* - 2012. - págs. 143–159.
- Mihatsch MJ Ryffel B, Hermle M, Brunner FP, Thiel G.** Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clinical Nephrology* - 1986. - págs. 2-8.
- Mihatsch MJ Thiel G, Ryffel B.** Cyclosporin A: action and side-effects. *Toxicology Letters* - 1989. - págs. 125-139.
- Miller WL Auchus RJ** The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* - 2011. - págs. 32-81.
- Miller WL** Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* - 1988. - págs. 295-303.
- Mishra S Murphy LC, Nyomba BLG, Murphy LJ.** Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* - 2005. - págs. 192-197.
- Morishima A Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K.** Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* - 1995. - págs. 3689–3698.
- Müller-Steinhardt M Härtel C, Müller B, Kirchner H, Fricke L.** The interleukin-6 -174 promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney International* - 2002. - págs. 1824-1827.
- Mulrone SE Koenig JI, Csikos T, Pesce C, Striker L, LeRoith D, Haramati A.** Temporal changes in insulin-like growth factor I, c-fos, and c-jun gene expression during hyperplastic kidney growth in weanling rats. *Endocrinology* - 1996. - págs. 839-845.
- Mulrone SE Pesce C.** Early Hyperplastic Renal Growth after Uninephrectomy in Adult Female Rats. *Endocrinology* - 2000. - págs. 932-937.
- Mulrone SE Woda C, Johnson M, Pesce C.** Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney International* - 1999. - págs. 944-953.
- Murray AW** Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* - 2004. - págs. 221-234.
- Neugarten J Acharya A, Silbiger SR.** Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* - 2000. - págs. 319-329.
- Neugarten J** Gender and the Progression of Renal Disease. *JASN* - 2002. - págs. 2807-2809.
- Nieminen M Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S.** Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat. Cell Biol.* - 2006. - págs. 156-162.
- Niu EM Crozat A, Catterall JF.** Cell-specific and hormonal regulation of the rat kidney androgen-regulated protein (KAP) gene. *Endocrine* - 1996. - págs. 1-10.

Niu EM Meseguer A, Catterall JF. Genomic organization and DNA sequence of the mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene. *DNA Cell Biol* - 1991. - págs. 41-49.

Okada H Kikuta T, Kobayashi T, Inoue T, Kanno Y, Takigawa M, Sugaya T, Kopp JB, Suzuki H. Connective Tissue Growth Factor Expressed in Tubular Epithelium Plays a Pivotal Role in Renal Fibrogenesis. *JASN* - 2005. - págs. 133-143.

Oldfield CJ Meng J, Yang JY, Yang MQ, Uversky VN, Dunker AK. Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics* - 2008.

Osman C Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci* - 2009. - págs. 3823–3830.

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. - págs. 59-66.

Paek I Axel R. Glucocorticoids enhance stability of human growth hormone mRNA. *Molecular and cellular biology* - 1987. - págs. 1496-1507.

Pan TL Wang PW. Explore the Molecular Mechanism of Apoptosis Induced by Tanshinone IIA on Activated Rat Hepatic Stellate Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* - 2012.

Park K Lee JH, Huh KH, Kim SI, Kim YS. Exchange living-donor kidney transplantation: Diminution of donor organ shortage. *Transplantation Proceedings* - 2004. - págs. 2949-2951.

Park SE Xu J, Frolova A, Liao L, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Genetic deletion of the repressor of estrogen receptor activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo. *Mol Cell Biol* - 2005. - págs. 1989-1999.

Patel DG Singh SP. Effect of ethanol and its metabolites on glucose mediated insulin release from isolated islets of rats. *Metabolism* - 1979. - págs. 85-89.

Pawlotsky JM COVID-19 Pandemic: Time to Revive the Cyclophilin Inhibitor Alisporivir. *Clinical Infectious Diseases* - 2020.

Pederson T As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? *J Cell Biol* - 2008. - págs. 1061-1064.

Peng YT Chen P, Ouyang RY, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis*. - 2015. - págs. 1135–1149.

Peterburs P Heering J, Link G, Pfizenmaier K, Olayioye MA, Hausser A. Protein kinase D regulates cell migration by direct phosphorylation of the cofilin phosphatase slingshot 1 like. *Cancer Res* - 2009. - págs. 5634-5638.

Prakash P Zeeshan M, Saini E, Muneer A, Khurana S, Chourasia BK, Deshmukh A, Kaur I, Dabral S, Singh N, Anam Z, Chaurasiya A, Kaushik S, Dahiya P. Human Cyclophilin B forms part of a multi-protein complex during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* - 2017.

Prasad A Quyyumi AA. Renin-Angiotensin System and Angiotensin Receptor Blockers in the Metabolic Syndrome. *Circulation* - 2004. - págs. 1507–1512.

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. PNAS. - 1994. - págs. 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. - págs. 1903-1907.

Qian X Karpova T, Sheppard AM, Mc.Nally J, Lowy DR. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. EMBO J - 2004. - págs. 1739-1748.

Raimundo M Lopes JA. Metabolic Syndrome, Chronic Kidney Disease, and Cardiovascular Disease: A Dynamic and Life-Threatening Triad. Cardiol Res Pract. - 2011.

Ralph D McClelland M and Welsh J. RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR identifies differentially regulated RNAs in mink lung (MylLu) cells growth arrested by transforming growth factor α 1. Proc Natl Acad Sci USA.. - 1993. - págs. 10710-10714.

Raunser S Walz T. Electron Crystallography as a Technique to Study the Structure on Membrane Proteins in a Lipidic Environment. Annual Review of Biophysics - 2009.

Rechsteiner M PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. Seminars in Cell Biology - 1990. - págs. 433-440.

Rechsteiner M Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci - 1996. - págs. 267-271.

Reddy P Liu L, Ren C, Lindgren P, Boman K, Shen Y, Lundin E, Ottander U, Rytinki M, Liu K. Formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion activates AKT and mitogen activated protein kinase via phosphatidylinositol 3 kinase and ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. Mol Endocrinol - 2005. - págs. 2564-2578.

Reed JC Mechanisms of Apoptosis. The American Journal of Pathology -2000- págs. 1415-1430.

Reichmann D Jakob U. The roles of conditional disorder in redox proteins. Curr. Opin. Struct.. - 2013. - págs. 436-442.

Riegman PHJ Vlietstra RJ, van der Korput JAGM, Brinkmann AO, Trapman J. The Promoter of the Prostate-Specific Antigen Gene Contains a Functional Androgen Responsive Element. Molecular Endocrinology - 1991. - págs. 1921-1930.

Robinson RC Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, Pollard TD. Crystal structure of Arp2/3 complex. Science - 2001. - págs. 1679-1684.

Rogers S Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science - 1986. - págs. 364-368.

Romero PR Zaidi S, Fang YY, Uversky VN, Radivojac P, Oldfield CJ, Cortese MS, Sickmeier M, LeGall T, Obradovic Z, Dunker AK. Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder enables increased functional diversity in multicellular organisms. Proc Natl Acad Sci - 2006. - págs. 8390-8395.

Ruan H Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes:

nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* - 2002. - págs. 1319-1336.

Runic R Zhu LJ, Crozat A, Bagchi MK, Catterall JF, Bagchi IC. Estrogen regulates the stage-specific expression of kidney androgen-regulated protein in rat uterus during reproductive cycle and pregnancy. *Endocrinology* - 1996. - págs. 729-737.

Ruscetti M Quach B, Dadashian EL, Mulholland DJ, Wu H. Tracking and Functional Characterization of Epithelial-Mesenchymal Transition and Mesenchymal Tumor Cells during Prostate Cancer Metastasis. *Cancer research* - 2015. - págs. 2749-2759.

Ryan MJ Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* - 1994. - págs. 48-57.

Sanchez-Quiles V Santamaria E, Segura V, Sesma L, Prieto J, Corrales FJ. Prohibitin deficiency blocks proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells: molecular mechanisms and functional implications. *Proteomics* - 2010. - págs. 1609-1620.

Sarró E DuránM, Rico A, Bou-Teen D, Fernández-Majada V, Croatt AJ, Nath KA, Salcedo MT, Gundelach JH, Batlle D, Bram RJ, Meseguer A. Cyclophilins A and B oppositely regulate renal tubular epithelial cell phenotype. *Journal of Molecular Cell Biology* - 2020. - págs. 499-514.

Sarró E Jacobs C, Itarte E, Meseguer A. A pharmacologically-based array to identify targets of cyclosporine A-induced toxicity in cultured renal proximal tubule cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. - 2012. - págs. 275-287.

Savulescu D Feng J, Ping YS, Mai O, Boehm U, He B, O'Malley BW, Melamed P. Gonadotropin-releasing hormone-regulated prohibitin mediates apoptosis of the gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* - 2013. - págs. 1856-1870.

Schaffeld M Herrmann H, Schultess J, Markl J. Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: sequence, expression patterns and in vitro assembly. *Eur. J. Cell Biol* - 2001. - págs. 692-702.

Schleicher M Shepherd BR, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Pan Y, Acevedo LM, Shadel GS, Sessa WC. Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol* - 2008. - págs. 101-112.

Schneider DJ Wu M, Le TT, Cho SH, Brenner MB, Blackburn MR, Agarwal SK. Cadherin-11 contributes to pulmonary fibrosis: potential role in TGF-beta production and epithelial to mesenchymal transition. *FASEB Journal* - 2012. - págs. 503-512.

Schneider H Charara N, Schmitz R, Wehrli S, Mikol V, Zurini MGM, Quesniaux VFJ, Movva NR. Human Cyclophilin C: Primary Structure, Tissue Distribution, and Determination of Binding Specificity for Cyclosporins. *Biochemistry* - 1994. - págs. 8218-8224.

Schrijvers BF Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney International* - 2004. - págs. 2003-2017.

Selye H The Effect of Testosterone on the Kidney. *Journal of Urology* - 1939. - págs. 637-641.

- Shen X Kramer RH.** Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol.* - 2004. - págs. 1315-1329.
- Sherr CJ** Principles of tumor suppression. *Cell* - 2004. - págs. 235-246.
- Sherr CJ Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* - 1999. - págs. 1501-1512.
- Sievers C Billig G, Gottschalk K, Rudel T.** Prohibitins Are Required for Cancer Cell Proliferation and Adhesion. *PLOS ONE.* - 2010.
- Sigal NH Dumont FJ.** Cyclosporin A, FK-506, and Rapamycin: Pharmacologic Probes of Lymphocyte Signal Transduction. *Annual Review of Immunology.* - 1992. - págs. 519-560.
- Silbiger SR Neugarten J.** The Role of Gender in the Progression of Renal Disease. *Advances in Renal Replacement Therapy* - 2003. - págs. 3-14.
- Skurk T van Harmelen V, Blum WF, Hauner H.** Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes Res.* - 2005. - págs. 969-975.
- Solé E Calvo R, Obregón MJ, Meseguer A.** Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney. *Mol Cell Endocrinol.* - 1996. - págs. 147-159.
- Solé E Calvo R, Obregón MJ, Meseguer A.** Thyroid hormone controls the cell-specific expression of the kidney androgen-regulated protein gene in S3 mouse kidney cells. *Endocrinology* - 1994. - págs. 2120-2129.
- Soler M Tornavaca O, Solé E, Menoyo A, Hardy D, Catterall JF, Vandewalle A, Meseguer A** Hormone-specific regulation of the kidney androgen-regulated gene promoter in cultured mouse renal proximal-tubule cells. *The Biochemical Journal* - 2002. - págs. 757-766..
- Spencer SL Cappell SD, Tsai FC, Overton KW, Wang CL, Meyer T.** The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell* -2013- págs. 369-383.
- Spik G Haendler B, Delmas O, Mariller C, Chamoux M, Maes P, Tartar A, Montreuil J, Stedman K, Kocher HP.** A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP) *Journal of Biological Chemistry* - 1991. - págs. 10735-10738.
- Stefanovic S Windsor M, Nagata KI, Inagaki M, Wileman T.** Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. *J. Virol* -2005- págs 11766–11775.
- Sugiyama H Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota A.** Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int.* - 1996. - págs. 103-111.
- Suh SK Hood BL, Kim BJ, Conrads TP, Veenstra TD, Song BJ.** Identification of oxidized mitochondrial proteins in alcohol-exposed human hepatoma cells and mouse liver. *Proteomics* - 2004. - págs. 3401–3412.
- Suñé G Sarró E, Puigmulé M, López-Hellín J, Zufferey M, Pertel T, Luban J, Meseguer A.** Cyclophilin B Interacts with Sodium-Potassium ATPase and Is Required for Pump Activity in Proximal Tubule Cells of the Kidney. *PlosONE.* - 2010.

Swanson SK Born T, Zydowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT, Rusnak F. Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *PNAS* -1992 -págs 3741-3745.

Swirski FK Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* - 2009. - págs. 612-616.

Takai Y Ogawara M, Tomono Y, Moritoh C, Imajoh-Ohmi S, Tsutsumi O, Taketani Y, Inagaki M. Mitosis-specific phosphorylation of vimentin by protein kinase C coupled with reorganization of intracellular membranes. *J. Cell Biol.* - 1996. - págs. 141–149.

Takenaka T Suzuki H, Okada H, Hayashi K, Kanno Y, Saruta T. Mechanosensitive cation channels mediate afferent arteriolar myogenic constriction in the isolated rat kidney. *J Physiol* - 1998. - págs. 245-253.

Talal N Nakabayashi T, Letterio JJ, Kong L, Geiser AG, Dang H. Cytokines may Prove Useful in the Treatment of Sjögrens Syndrome (SS) Dry Eye. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 2* - 1998. - págs. 953-958.

Tatsuta T Kirstin M, Langer T. Formation of Membrane-bound Ring Complexes by Prohibitins in Mitochondria. *Mol Biol Cell* - 2005. - págs. 248–259.

Teixido N Huguet M, Pérez-Rivera M, Norma G, Bernués J, Meseguer A. CCAAT/enhancer binding protein-mediated role of thyroid hormone in the developmental expression of the kidney androgen-regulated protein gene in proximal convoluted tubules. *Mol Endocrinol* - 2006. - págs. 389-404.

Teixido N Soler M, Rivera N, Bernue J, Meseguer A. CCAAT/Enhancer Binding Protein-Mediated Role of Thyroid Hormone in the Developmental Expression of the Kidney Androgen-Regulated Protein Gene in Proximal Convoluted Tubules. *Molecular Endocrinology* - 2006. - págs. 389-404.

Teixidor N Nous aspectes en la regulació transcripcional del gen que codifica per la Kidney androgen-regulated protein en relació a la seva especificitat de teixit i control hormonal. 2007.

Teng M Huang J, Zhu Z, Li H, Shen J, Chen Q. Cyclophilin B promotes cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis via regulating the STAT3 pathway in non-small cell lung cancer. *Pathology - Research and Practice* - 2019.

Theiss AL Idell RD, Srinivasan S, Klapproth JM, Jones DP, Merlin D, Sitaraman SV. Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *FASEB J* - 2007. - págs. 197–206.

Theiss AL Jenkins AK, Okoro NI, Klapproth JM, Merlin D, Sitaraman SV. Prohibitin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappa B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin alpha3 expression. *Mol. Biol. Cell* - 2009. - págs. 4412-4423.

Theiss AL Laroui H, Obertone TS, Chowdhury I, Thompson WE, Merlin D, Sitaraman SV. Nanoparticle-based therapeutic delivery of prohibitin to the colonic epithelial cells ameliorates acute murine colitis. *Inflamm. Bowel. Dis* - 2010.

Theiss AL Obertone TS, Merlin D, Sitaraman SV. Interleukin-6 transcriptionally regulates prohibitin expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* - 2007. - págs. 12804-12812.

Theiss AL Sitaraman SV. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochim Biophys Acta* - 2011. - págs. 1137–1143.

Theiss AL Vijay-Kumar M, Obertone TS, Jones DP, Hansen, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. Prohibitin is a novel regulator of antioxidant response that attenuates colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* - 1999. - págs. 199-208.

Thiery JP Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* - 2002. - págs. 442-454.

Thomas SE Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, Johnson RJ. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* - 1998. - págs. 897-908.

Thornton JM Todd AE, Milburn D, Borkakoti N, Orengo CA. From structure to function: Approaches and limitations. *Nature*. - 2000. - págs. 991-994.

Thuaud F Ribeiro N, Nebigil CG, Desaubry L. Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chem Biol* - 2013. - págs. 316-331.

Tora L Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature*. - 1988. - págs. 185–188.

Tornavaca O Anàlisi funcional de la kidney androgen-regulated protein (kap) i caracterització de nous mecanismes de regulació posttranscripcional. (Tesis doctoral) - 2007.

Tornavaca O Pascual G, Barreiro ML, Grande MT, Carretero A, Riera M, Garcia-Arumi E, Bardaji B, González-Núñez M, Montero MA, López-Novoa JM, Meseguer A. Kidney Androgen-Regulated Protein Transgenic Mice Show Hypertension and Renal Alterations Mediated by Oxidative Stress. *Circulation*. - 2009. - págs. 1908-1917.

Tornavaca O Sarro E, Pascual G, Bardaji B, Montero MA, Salcedo MT, Plana M, López-Hellin J, Itarte E, Meseguer A. KAP Degradation by Calpain Is Associated with CK2 Phosphorylation and Provides a Novel Mechanism for Cyclosporine A-Induced Proximal Tubule Injury. *PLoS One* - 2011.

Troys MV Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* - 2008. - págs. 649-667.

Tsubakimoto Y Yamada H, Yokoi H, Kishida S, Takata H, Kawahito H, Matsui A, Urao N, Nozawa Y, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin AT1 Receptor Regulates Differentiation of Monocyte Lineage Progenitors From Hematopoietic Stem Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* - 2009. - págs. 1529-1536.

Uversky VN Dunker AK. Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys* - 2010. - págs. 1231-1264.

Uversky VN Intrinsically Disordered Proteins and Their Environment: Effects of Strong Denaturants, Temperature, pH, Counter Ions, Membranes, Binding Partners, Osmolytes, and Macromolecular Crowding. *Protein J.* - 2009. - págs. 305-325.

UverskyVN OldfieldCJ, Dunker AK. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition. *J. Mol. Recognit.* - 2005. - págs. 343-384.

van den Heuvel S Dyson NJ. Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2008. - págs. 713-724.

Vera J Estanyol JM, Canela N, Llorens F, Agell N, Itarte E, Bachs O, Jaumot M. Proteomic analysis of SET-binding proteins. *Proteomics* - 2007. - págs. 578-587.

Verzola D Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, Berruti V, Gandolfo MT, Garibotto G, Deferrari G. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol.* - 2004. - págs. 85-87.

Vessal M Mishra S, Moulik S, Murphy LJ. Prohibitin attenuates insulin-stimulated glucose and fatty acid oxidation in adipose tissue by inhibition of pyruvate carboxylase. *FEBS J.* - 2006. - págs. 568–576.

Virlon B Cheval L, Buhler JM, Billon E, Doucet A, Elalouf JM. Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1999. - págs. 96-124.

Waldherr R Gretz N. Natural course of the development of histological lesions after 5/6 nephrectomy. *Contrib Nephrol.* - 1988. - págs. 64-72.

Wang L Raikwar N, Deng L, Yang M, Liang L, Shao C, Evan AP, Stambrook PJ, Sahota A, Tischfield JA. Altered gene expression in kidneys of mice with 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Kidney Int* - 2000. - págs. 528-536.

Wang M Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* - 2006. - págs. 6170–6182.

Watson CS Salomon D, Catterall JF. Structure and Expression of Androgen-regulated Genes in Mouse Kidney. *Annals of the New York Academy of Science* - 1984. - págs. 101-114.

Watson G Paigen K. mRNA synthesis rates in vivo for androgen-inducible sequences in mouse kidney. *Mol and Cell Biol* - 1988. - págs. 152-165.

Wei SC Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, Chen AC, Sah RL, Taylor SS, Engler AJ, Yang J. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nature cell biology* - 2015. - págs. 678-688.

Wilson PWF D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* - 2005. - págs. 3066-3072.

Wilson SE de Groen PC, Aksamit AJ, Wiesner RH, Garrity JA, Krom RA. Cyclosporin A-induced reversible cortical blindness. *Journal of Clinical Neuro-ophthalmology* - 1988. - págs. 215-220.

Wilson WD Ratmeyer L, Zhao M, Strekowski L, Boykin D. The search for structure-specific nucleic acid-interactive drugs: Effects of compound structure on RNA versus DNA interaction strength. *Biochemistry* - 1993. - págs. 4098-4104.

Woodhall PB Tisher CC, Simonton CA. Relationship between para-aminohippurate secretion and cellular morphology in rabbit proximal tubules *Clin Invest* 61(5). - 1978. - págs. 1320–1329.

Wu FCW Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clinical Chemistry* - 1997. - págs. 1289-1292.

- Wu HZ Guo L, Mak YF, Liu N, Poon WT, Chan YW, Cai Z.** Proteomics investigation on aristolochic acid nephropathy: a case study on rat kidney tissues. *Anal Bioanal Chem* - 2001. - págs. 3431-3439.
- Wu Q Wu S.** Lipid rafts association and anti-apoptotic function of prohibitin in ultraviolet B light-irradiated HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* - 2012. - págs. 640-642.
- Wunderlich CM Hövelmeyer N, Wunderlich FT.** Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT*. - 2013.
- Yabuki A Suzuki S, Matsumoto M, Nishinakagawa H.** Sex and strain differences in the brush border and PAS-positive granules and giant bodies of the mouse renal S3 segment cells. *Exp Anim* - 2001. - págs. 59-66.
- Yabuki A Suzuki S, Matsumoto M, Nishinakagawa H.** Sexual dimorphism of proximal straight tubular cells in mouse kidney. *American Association for Anatomy* - 1999. - págs. 316-323.
- Yamaguchi T Goto H, Yokoyama T, Sillje H, Hanisch A, Uldschmid A, Takai Y, Oguri T, Nigg EA, Inagaki M.** Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J. Cell Biol* - 2005. - págs. 431-436.
- Yeoh S Pope B, Mannherz HG, Weeds A.** Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J Mol Biol* - 2002. - págs. 911-925.
- Yilmaz M Christofori G.** EMT the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* - 2009. - págs. 15-33.
- Yoshino T Saito D, Atsuta Y, Uchiyama C, Ueda S, Sekiguchi K, Takahashi Y.** Interepithelial signaling with nephric duct is required for the formation of overlying coelomic epithelial cell sheet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* - 2014. - págs. 6660-6665.
- Yu H Yue X, Zhao Y, Li X, Wu L, Zhang C, Liu Z, Lin K, Xu-Monette ZY, Young KH, Liu J, Shen Z, Feng Z, Hu W.** LIF negatively regulates tumour-suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers. *Nature*. - 2014.
- Yvan-Charvet L Quignard-Boulangé A.** Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int* - 2011 - págs. 162-168.
- Zeisberg M Neilson EG.** Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* - 2009. - págs. 1429-1437.
- Zhai XY Birn H, Jensen KB.** Digital three-dimensional reconstruction and ultrastructure of the mouse proximal tubule *J Am Soc Nephrol* 14(3). - 2003. - págs. 611-619.
- Zhang H Fan Q, Xie H, Lu L, Tao R, Wang F, Xi R, Hu J, Chen Q, Shen W, Zhang R, Yan X.** Elevated Serum Cyclophilin B Levels Are Associated with the Prevalence and Severity of Metabolic Syndrome. *Front. Endocrinol* - 2017.
- Zhang H Wada J, Kanwar YS, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Hida K, Shikata K, Makino H.** Screening for genes up-regulated in 5/6 nephrectomized mouse kidney. *Kidney Int* - 1999. - págs. 549-558.
- Zhang L Ji Q, Ni ZH, Sun J.** Prohibitin induces apoptosis in BGC823 gastric cancer cells through the mitochondrial pathway. *Asian Pac J Cancer Prev* - 2012. - págs. 3803-3807.

Zhang Y Chen Y, Qu C, Zhou M, Ni Q, Xu L. siRNA targeting prohibitins inhibits proliferation and promotes apoptosis of gastric carcinoma cell line SGC7901 in vitro and in vivo. *Cell Mol Biol.* - 2014. - págs. 26-32.

Zhao K Li J, He W, Song D, Zhang X, Zhang D, Zhou Y, Gao F. Cyclophilin B facilitates the replication of Orf virus. *Virology Journal* - 2017.

Zheng B Han M, Bernier M, Wen JK. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J* - 2009. - págs. 2669-2685.

Zhong N Cui Y, Zhou X, Li T, Han J. Identification of prohibitin 1 as a potential prognostic biomarker in human pancreatic carcinoma using modified aqueous two-phase partition system combined with 2D-MALDI-TOF-TOF-MS/MS. *Tumour Biol* - 2015. - págs. 1221–1231.

Zhou TB Qin YH, Li ZY, Xu HL, Zhao YJ, Lei FY. All-trans retinoic acid treatment is associated with prohibitin expression in renal interstitial fibrosis rats. *Int J Mol Sci* -2012- págs. 2769-2782.

Zhou TB Qin YH, Zhou C, Lei FY, Zhao YJ, Chen J, Su LN, Huang WF. Less expression of prohibitin is associated with increased caspase-3 expression and cell apoptosis in renal interstitial fibrosis rats. *Nephrology* - 2012. - págs. 189-196.

Zhou TB Qin YH. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. *J Recept Signal Transduct Res* - 2013. - págs. 28–36.

Anexo I: Publicación “Kidney Androgen-Regulated Protein (KAP) Transgenic Mice Are Protected Against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome”

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Kidney Androgen-Regulated Protein (KAP) Transgenic Mice Are Protected Against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome

Beatriz Bardaji de Quixano¹, Josep A. Villena², Miguel Aranda¹, Gemma Brils¹, Antoni Cuevas¹, Théana Hespel¹, Haizea Lekuona¹, Cristina Suárez¹, Olga Tornavaca¹ & Anna Meseguer^{1,3,4,5}

Metabolic Syndrome (MS) is reaching epidemic proportions with significant social and economical burden worldwide. Since the molecular basis of MS remains poorly defined, we investigated the impact of KAP, a kidney specific androgen-regulated gene, in the development of high fat-diet (hfd)-induced MS. Tg mice overexpressing KAP specifically in proximal tubule cells of the kidney exhibited reduced body weight and lower liver and adipose tissue weight compared to control littermates when fed a hfd. KAP Tg mice showed diminished adipocyte hypertrophy and reduced hepatic steatosis, significantly correlating with expression of relevant molecular markers and lower lipid content in liver. KAP transgenic were protected from hfd-induced insulin resistance, increased blood pressure and exhibited lower IL-6 serum levels and diminished expression of inflammatory markers in the adipose. Moreover, KAP was localized in the secretory pathway of proximal tubule cells and it is released to the extracellular media, preventing IL-6 induction and STAT-3 activation upon TNF α stimulation. We conclude that KAP, which might act as a hormone-like product in extra-renal tissues, protects Tg mice against hfd-induced MS by preventing inflammatory related events that are mediated, in part, through the IL-6 pathway.

The metabolic syndrome (MS) is defined by a constellation of interconnected physiological, biochemical, clinical, and metabolic factors that directly increase the risk of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) and type 2 diabetes mellitus (T2DM)¹. MS affects over 20% of adults in Western populations and is reaching an epidemic proportion globally².

One of the main underlying risk factors for MS is obesity³. Accumulating evidence suggests that chronic inflammation in adipose tissue is instrumental in the development of obesity-related metabolic dysfunction^{4,5}. The resulting hyperinsulinemia and hyperglycemia, as well as the release of adipocyte cytokines, play a critical role in vascular endothelial dysfunction, abnormal lipid profile, arterial hypertension (AHT), and vascular inflammation, which work in concert to enhance atherosclerosis⁶. Other obesity-related disorders associated with MS such as fatty liver disease, hyperuricemia and chronic kidney disease (CKD), defined as a glomerular filtration rate (GFR) below 60 ml/min per 1.73 m², are major causes of morbidity and mortality.

Recent epidemiologic studies have demonstrated that patients with MS are also at increased risk of microalbuminuria, an early marker of glomerular injury, endothelial dysfunction and/or CKD. Data from the NHANES III database, which includes more than 6000 adults, revealed that the multivariate-adjusted risk for both microalbuminuria and CKD was significantly raised in individuals with MS, and that this risk increased progressively with the number of the syndrome's components detected in each patient⁷.

How the functional changes in the kidney affect MS pathophysiology remains speculative. Factors such as insulin resistance (IR), inflammation, renal endothelial dysfunction, oxidative stress, altered renal hemodynamics,

¹Fisiopatologia Renal. Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM). Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Spain. ²Laboratory of Metabolism and Obesity. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain. ³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Unitat de Bioquímica de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain. ⁴Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo, Álvarez de Toledo, Spain. ⁵Red de Investigación Renal (REDINREN), Instituto Carlos III-FEDER, Madrid, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.M. (email: ana.meseguer@vhir.org)

activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and the sympathetic nervous system (SNS)⁸ may play a role.

Kidney-androgen regulated protein, which is one of the most abundant and specific genes expressed in proximal tubule epithelial cells⁹, undergoes a strict and unique regulation by thyroid and sexual steroid hormones, mainly androgens, in the proximal tubules¹⁰. The function of KAP, which shares no significant homology with other known proteins in various databases, is almost unknown. Our results in mice with transgenic overexpression of KAP in the proximal tubule demonstrated for the first time a key role for this protein in the induction and/or activation of several extra renal pathways, including cardiovascular disease and arterial hypertension^{11,12}. It was noteworthy that KAP provided a mechanistic insight into the higher prevalence of arterial hypertension in males.

In this study, we describe the impact of KAP overexpression in the kidney proximal tubule on the development of metabolic syndrome induced by high fat diet.

Results

KAP overexpression improves diet-induced obesity. KAP Tg and control littermates (WT) were fed either a regular diet (chow) or hfd to induce MS. In spite of similar water and food intake (Fig. 1B), hfd-fed KAP overexpressing mice exhibited reduced body weight (Fig. 1A), as well as, lower liver and adipose tissue weight than controls (Fig. 1C). Consistently with reduced fat mass, hfd-fed Tg mice showed lower lipid accumulation in white and brown adipocytes than controls (Fig. 2A). In hfd-fed WT mice, adipose hypertrophy and augmented adipocyte size correlated with leptin circulating levels (Fig. 2B) and up-regulation of leptin mRNA in the adipose (Fig. 2C). Leptin mRNA was strongly down-regulated in hfd-fed Tg. These results paralleled those found for the *Apelin* gene (Fig. 2C), which encodes for a peptide hormone linked to IR and obesity¹³. Up-regulated adipose RAS in obese individuals, contributes to IR and hypertension. We found that angiotensinogen (Agt) and receptor of Angiotensin II type 1 (AT1) are up-regulated in adipose of Tg and that AT1 is also up-regulated in hfd fed controls. Once again, up-regulation of AT1 by hfd in WT mice was significantly blunted in Tg (Fig. 2C). Figure 2C represents the relative quantification (RQ) of gene expression differences between the four experimental groups, with two variables under study including the Tg vs control condition and the hfd vs regular chow diet. It shows that changes in gene expression produced by the Tg (C1) or the hfd (C2) situations are lost when both conditions occur simultaneously (C3). (C4) indicates that the effects of the HFD in the Tg are actually stronger than those shown in C3, since the C3 comparison includes the effects of the Tg condition itself, observed in the chow diet-fed Tg (C1).

Liver histological analyses confirmed hepatic lipid accumulation in hfd-fed control mice but not in Tg (Fig. 2D,E), indicating that KAP overexpression protects from hfd-induced hepatic steatosis. The most relevant mRNA changes in liver were the significant up-regulation of *Cyp4A14* and *Acaa1b* genes in hfd-fed controls. *Acaa1b* became significantly down-regulated in hfd-fed Tg when compared to controls; thereby, reverting the phenotype induced by the diet (Fig. 2F).

KAP transgenic mice exhibit improved glucose homeostasis upon a hfd feeding. Glucose tolerance test showed no significant differences between chow-fed WT and Tg mice. Hfd induced a severe glucose intolerance in WT whereas KAP overexpressing mice were partially protected (Fig. 3A). Similarly, insulin tolerance tests revealed that KAP protected Tg mice from the development of IR when fed a diabetogenic fat rich diet (Fig. 3B). Insulin levels, in serum of 5h-fasted animals, revealed that the hfd-induced compensatory hyperinsulinemia in WT mice, was significantly prevented in Tg (Fig. 3C), supporting the notion that KAP protects from hfd-induced IR.

Hfd-induced obesity is often associated with alterations in blood lipid profile. No major differences in serum FFA or triglycerides were observed between Tg and WT, either fed with chow or hfd. However, KAP Tg mice showed lower total cholesterol levels than WT littermates when fed with hfd (Table 1), indicating that KAP protects from the hypercholesterolemia associated to hfd-induced obesity.

Arterial blood pressure in Tg and control mice on chow or hfd. Consistent with the concept that obesity increases the risk of developing hypertension¹⁴, hfd-fed WT mice exhibited a significantly higher systolic, diastolic and mean arterial pressure (SAP, DAP, and MAP, respectively) than chow-fed WT mice (Fig. 3D, left panel). Albeit the characteristic hypertensive phenotype of KAP Tg mice^{11,12}, hfd-fed Tg mice maintained the same blood pressure than those fed with chow (Fig. 3D, left panel), indicating that KAP overexpressing mice are resistant to the hypertensive effects prompted by hfd. Differences in blood pressure do not correlate with alterations in heart rate (Fig. 3D, right panel). SAP and DAP measurements, evaluated during morning and afternoon periods gave similar results (Fig. S1).

Serum and tissue inflammatory markers in WT and Tg mice. Since MS represents a state of chronic low-grade inflammation, we aimed to observe circulating levels of inflammatory markers (i.e. IL-6, PAI-1, TNF- α and resistin) in sera from WT and Tg mice fed with chow or hfd. Resistin levels appeared significantly up-regulated in Tg and in hfd-fed WT mice, while PAI-1 followed the opposite pattern (Table 2). Correlating with the development of obesity and IR, IL-6 serum levels showed an increment in hfd-fed WT mice that was blunted in Tg mice, indicating that KAP prevents systemic hfd-induced up-regulation of IL-6, with no effect on resistin and PAI-1 levels (Table 2). In this same assay we intended to measure TNF- α levels but it did not work under our conditions of assay. It is described that serum TNF- α levels are particularly susceptible to changes in sample collection and storage procedures which might preclude the obtention of a measurable value. The effects of hfd on the expression of inflammatory markers in WAT, assessed by qRT-PCR, revealed that MCP-1, TNF-alpha and IL-6 mRNA levels were increased in WT mice by hfd, in correlation with a statistically significantly up-regulation of mRNA levels for the macrophage marker CD68 (Fig. 4). Interestingly, these inflammatory markers remain lower in hfd-fed Tg mice, indicating that KAP overexpression might counteract the inflammatory impact of hfd in adipose tissue.

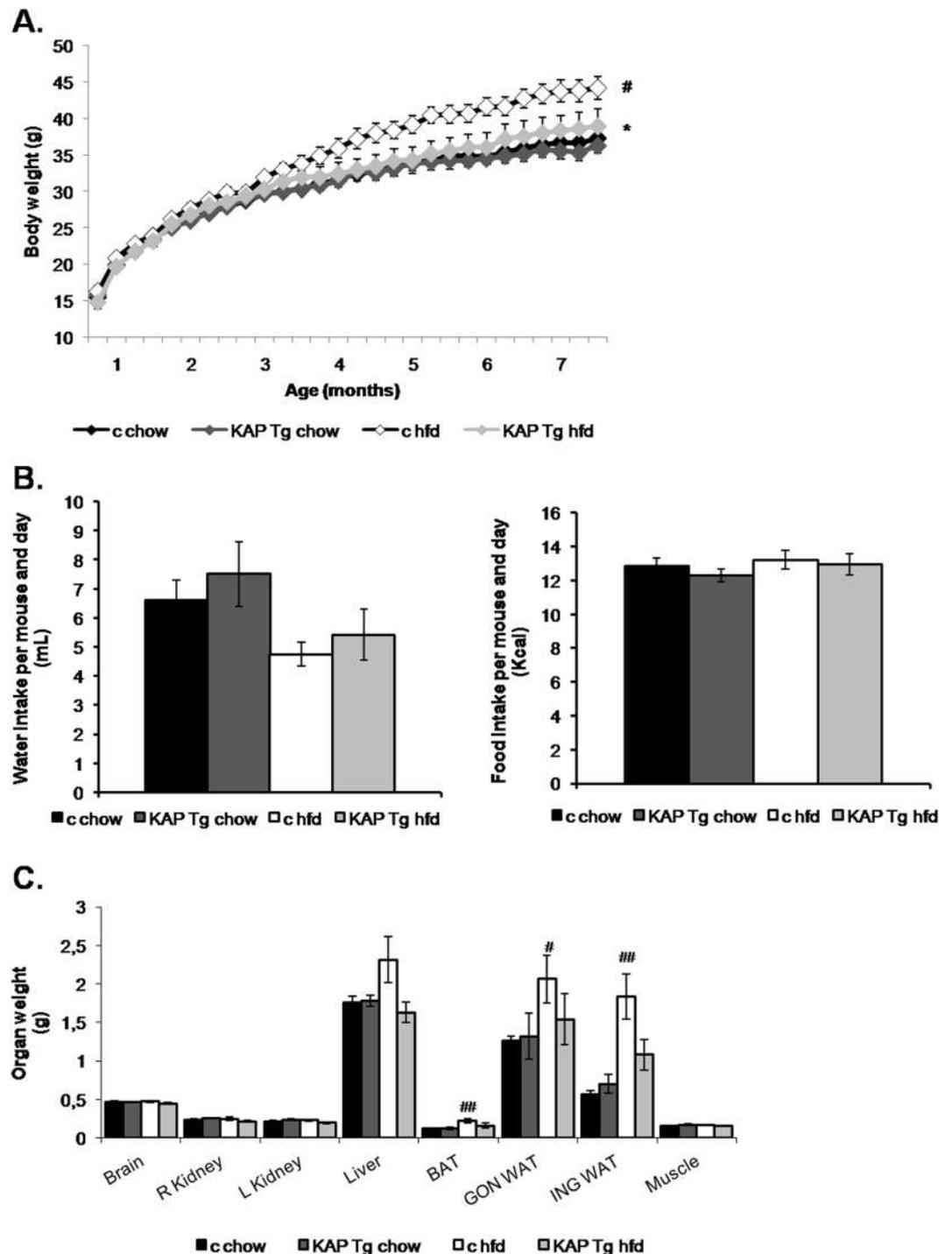


Figure 1. Body weight control. (A) Weekly body weight of KAP Tg male mice (Tg) and control male littermates (c) fed on regular control diet (chow) or high fat diet (HFD). Results correspond to mean values from 3 independent set of experiments including $n = 8$ animals/group. Statistical analysis performed on area under the curve (AUC). * $p < 0.05$ between controls and Tg. # $p < 0.05$ between chow and HFD. (B) Weekly water (in grams) and food (kcal) intake. Results for this figure correspond to mean values from 1 experiment including control and Tg mice fed on regular chow or HFD ($n = 8$ per group). (C) Organ's weight at the time of sacrifice at 7 months of life. Results correspond to mean values from 2 independent set of experiments including $n = 8$ animals/group. Significant differences between chow and HFD, ## $p < 0.01$. Error bars correspond to SEM.

KAP over expression prevents TNF α -mediated IL-6 transcription in the proximal tubule derived cell line HK-2. Because KAP overexpressing mice do not exhibit ectopic KAP mRNA expression and this is confined to proximal tubule cells¹¹, we next aimed to determine whether the effects of KAP on IL-6 levels in hfd-fed Tg would directly relate with KAP or, rather, with other systemic events occurring *in vivo*. The effects

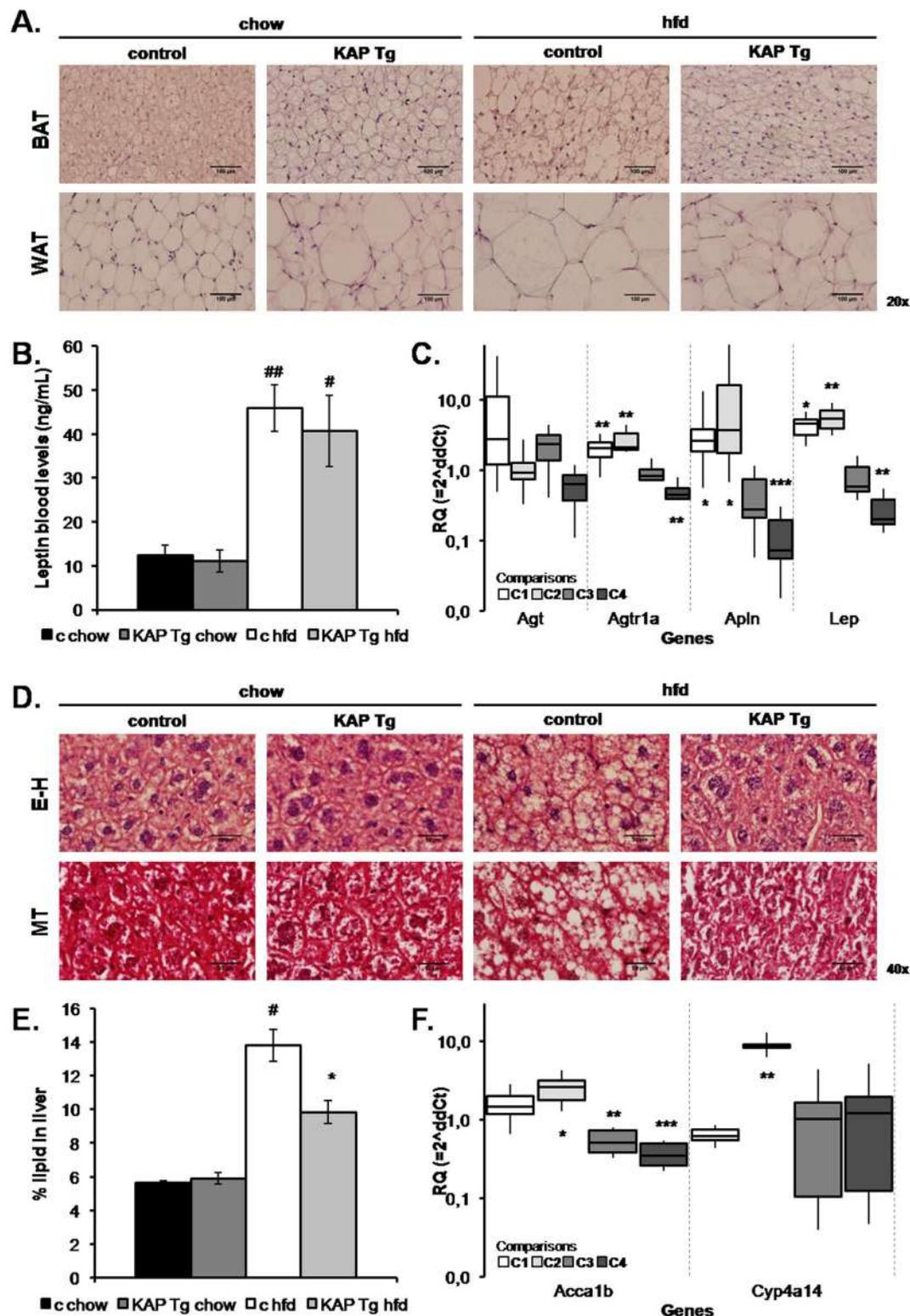


Figure 2. Adipose tissue and liver analyses. (A) Eosin-haematoxylin (E-H) staining of white and brown adipose tissues. (B) Serum leptin levels measured in 6-month old 5-h fasted mice. Results correspond to mean values from 2 independent set of experiments including $n = 8$ animals per group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.05$, between chow versus HFD. Error bars correspond to SEM. (C) Comparative differential gene expression assays in white adipose tissues were performed by qRT-PCR using microfluidic cards. The figure represents the relative quantification (RQ) of gene expression differences between 4 experimental groups, with two variables under study including the Tg vs control condition and the hfd vs regular chow diet. Data is expressed in a logarithmic scale meaning that values above or below 1 correspond to up- or down-regulated expression, respectively. The box-plots represent the median value and the standard deviation (SD) for each comparison: C1, C2, C3, C4. The vertical dashed lines limit the information for each one of the four genes selected. C1 = Comparison 1 “Tg

chow - c chow", represents the differences of gene expression in relation to the genotype, calculated by the Livak method; C2 = "c HFD - c chow" represents the differences of gene expression in relation to the diet; C3 = "Tg HFD - c HFD" represents the impact of the genotype on HFD effects; C4 = "(Tg HFD - c HFD) - (tg chow - c chow)" represents the effects that HFD produces in Tg versus control littermates once eliminated the effects caused by the Tg condition itself. * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.001$. (D) Eosin-haematoxylin (E-H) (upper panel) and Masson trichrome (MT) staining (lower panel) of livers from control and Tg mice fed with chow or high fat diet. (E) Relative hepatic lipid content. Results for this figure correspond to percentage of lipid weight over total liver weight from a single experiment ($n = 8$ per group). * $p < 0.05$ control vs Tg, # $p < 0.05$ chow vs HFD. Error bars correspond to SEM. (F) Comparative differential gene expression assays in liver tissues were performed by qRT-PCR using microfluidic cards. The groups, according to the genotype and the diet, were compared as described in panel C. * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$.*

were investigated in the HK-2 cell line, in basal conditions and upon TNF α stimulation. Stably transduced HK-2 cells, carrying control or KAP-HA lentiviral vectors, were treated with increasing doses of TNF α , and IL-6 mRNA levels measured by qRT-PCR. Figure 5A shows the successful overexpression of exogenous KAP-HA fused protein in HK-2 cells and the stimulatory effects of TNF α on IL-6 mRNA levels (Fig. 5B), which were significantly prevented in the presence of KAP (Fig. 5B, right). Correlating with diminished IL-6 expression, p705YSTAT-3 levels in TNF α stimulated cells were also lowered in the presence of KAP, suggesting the functional impact of KAP on the IL-6/gp130/STAT-3 signaling pathway in proximal tubule cells (Fig. 5C). Non-significant changes on cell viability were observed as a consequence of KAP overexpression or TNF α treatments (not shown).

Our results suggest that KAP overexpression in a pro-inflammatory context, as the one produced by hfd, reduces inflammation and prevents the pathological signs of MS induced by hfd.

The KAP protein is located in the secretory pathway and is released to the extracellular media of cultured proximal tubule cells.

To decipher how KAP, which is exclusively expressed in kidney, could exert metabolic effects in distal tissues, including the liver and the adipose, we aimed to detect the KAP protein in plasma samples of Tg and control mice by WB assays. We did not get any specific signal perhaps due to low circulating KAP levels or to the poor sensitivity of our antibody. Commercial ELISA kits proved to be non-specific for the KAP protein and therefore not suitable to detect and measure KAP in plasma samples. Then, we aimed to observe KAP subcellular location in transiently transfected mouse proximal tubule derived PCT3 cells. By indirect immunofluorescence and confocal microscopy in KAP-HA transfected PCT3 cells, we observed that KAP overlays with endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus specific markers, indicating that KAP is located in the secretory pathway (Fig. 5D upper and lower panels, respectively). Pulse-chase experiments using S³⁵-methionine/cysteine metabolic labeling in KAP-HA transfected PCT3 cells showed a strong signal for the KAP protein in crude extracts at pulse time zero (Fig. 5E, left panel) that was taken to the secretory pathway with time. KAP was detected in the conditioned media after 30 min chase, reaching maximal expression at 6 h (Fig. 5E, right panel). Levels of KAP protein in crude cell extracts were diminishing over time in good correlation with increments found in conditioned media. These *in vitro* experiments proved that KAP is secreted from proximal tubule epithelial cells to the extracellular media and, possibly, into the bloodstream *in vivo* where it might act as a hormone-like product in extra-renal tissues.

Discussion

Our study provides relevant and novel information on the impact that the kidney can exert on the pathophysiology of the MS. Diminished expression of the KAP gene has been associated to diabetic nephropathy and atherosclerosis^{15,16}, reinforcing the concept that KAP might be involved in processes linked to metabolic disorders. Because MS constitutes an extraordinary health problem worldwide, we aimed to investigate the role of KAP overexpression in proximal tubule and, by extension, the contribution of the kidney in MS pathophysiology.

In the present report, we have observed that in WT mice hfd induces a MS phenotype that includes severe hypertension and significant body gain weight associated to increased fat mass, highly hypertrophied adipocytes, impaired glucose homeostasis and IR. Serum levels of leptin, insulin, resistin and IL-6 inflammatory markers were higher in hfd-fed WT mice, correlating with the MS phenotype. Adipocyte hypertrophy resulted in significantly up-regulation of apelin, leptin and AT1 mRNA levels; as well as, augmented expression of inflammatory markers in the adipose including TNF, IL-6 and CCL2/MCP-1, that correlated with augmented macrophage content, as indicated by the significant overexpression of CD68. These results fit with reports describing that RAS over-activation in adipose tissue has a metabolic and inflammatory impact in obesity¹⁷⁻²⁰, as well as, an effect on the differentiation of monocytes from hematopoietic progenitors²¹, influencing their chemotaxis, through up-regulation of CCR2/CD68²². Blocking RAS with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and AT1 blockers represent an established therapy for hypertension, diabetic nephropathy and arteriosclerosis²³. The hfd provoked an overt hepatic steatosis in WT mice that correlated with a significant increment of hepatic lipids and augmented mRNA levels of the fatty-acid, steroid and cholesterol biosynthesis related genes Cyp4A14 and Acaa1b, in liver^{24,25}. Although the underlying mechanisms linking obesity to hepatic lipid accumulation and IR are incompletely understood, TNF α and IL-6 production in adipose tissue are critical for the development of steatohepatitis and NF κ B has been recognized as an obligatory mediator of most of these TNF α responses²⁶. Blocking IL-6 cytokine signaling in adipocytes has been recently suggested as a novel approach to blunt detrimental fat-liver crosstalk in obesity²⁷.

Up-regulation of IL-6 mRNA in adipose tissue and augmented IL-6 serum levels found in hfd-fed WT mice were blunted in KAP Tg littermates, indicating that KAP beneficial effects preventing hepatic steatosis and IR

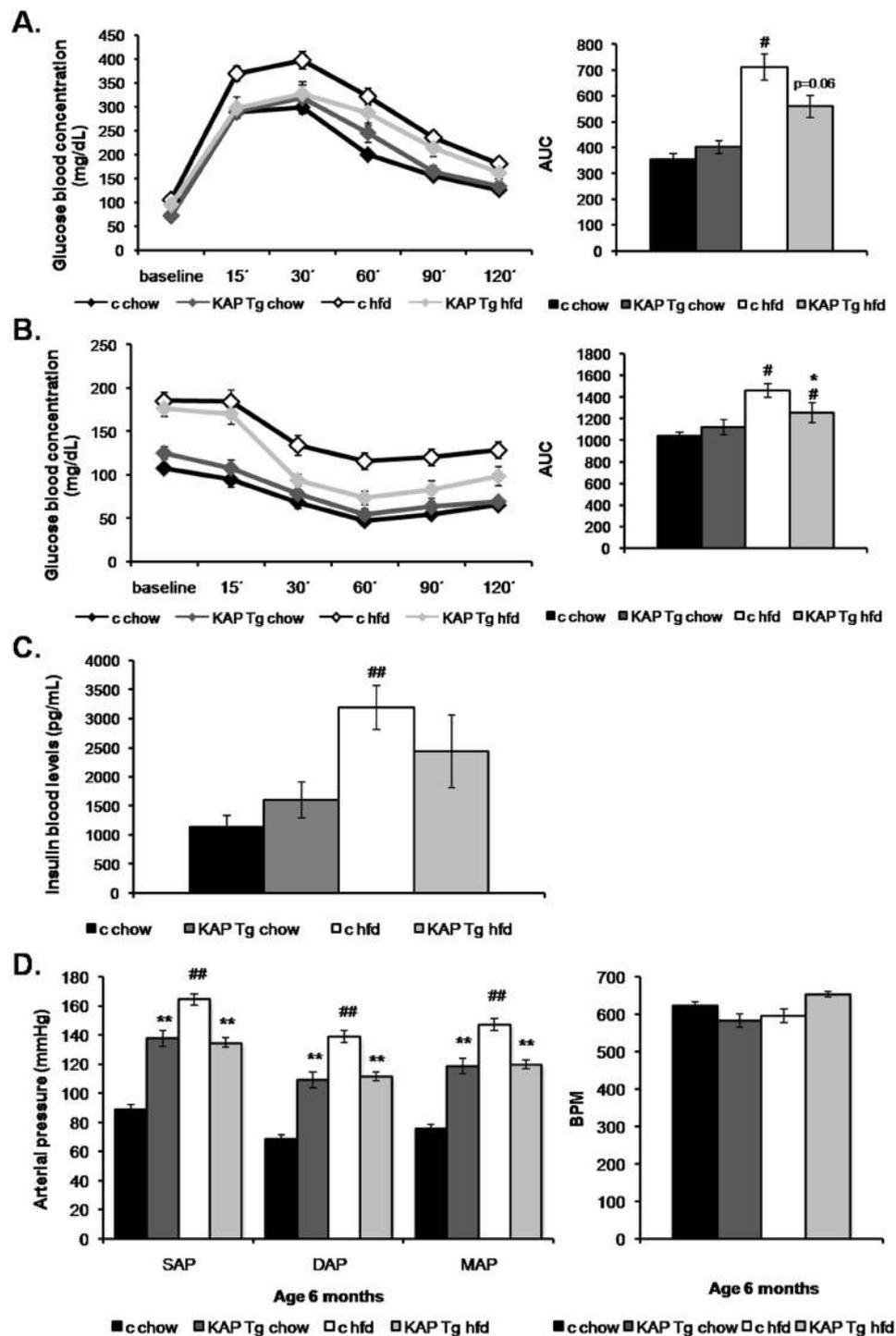


Figure 3. Glucose metabolism and Hemodynamic analyses. Glucose metabolism assessment in Tg mice and control littermates fed on regular control diet or high fat diet, at 6 months of age. Results from three independent experiments, (n = 8 per group) are shown. **(A)** Glucose tolerance test (GTT) in awoken animals after 12 h o/n fasting. Results correspond to mean absolute values in basal conditions (pre glucose bolus) and at 15, 30, 60, 90 and 120 min after glucose bolus. Statistical analysis performed on area under the curve (AUC). ##p < 0.05 chow versus HFD. **(B)** Insulin tolerance test (ITT) in awoken animals after 5 h o/n fasting. Mean absolute values in same conditions as in A. Statistical analysis on AUC *p < 0.05 control vs Tg, #p < 0.05 chow vs HFD. **(C)** Insulin levels measured in 6-month old 5-h fasted mice, using the Mouse Serum Adipokine Milliplex kit. Two independent set of experiments (n = 8 per group). Blood samples were taken after 5-h over fasting. *p < 0.05 chow vs HFD. **(D)** Morning tail-cuff measurements of systolic (SAP) diastolic (DAP) and mean arterial pressure (MAP) in Tg and control littermate mice fed on standard control diet (chow) or high fat diet (HFD), at 6-month of age (left panel). Mean and SEM from one experiment (n = 8 per group) are represented. Statistical analysis on AUC **p < 0.01 control vs Tg, ##p < 0.01 chow vs HFD. Heart rate measurements in the four groups of mice (right panel). For all panels error bars correspond to SEM.

		chow		hfd	
		control	KAP Tg	control	KAP Tg
Glucose	Mean ± sem (mg/dl)	107,81 ± 4,25	125,50 ± 7,34 (*)	185,31 ± 9,62 (##)	176,94 ± 9,49 (##)
Total cholesterol	Mean ± sem (mg/dl)	139,02 ± 4,83	128,37 ± 6,81 (n.s.)	226,06 ± 9,98 (##)	155,84 ± 6,41 (**)(##)
Triglycerides	Mean ± sem (mg/dl)	55,26 ± 2,95	51,36 ± 5,38 (n.s.)	56,36 ± 5,00 (n.s.)	62,55 ± 4,48 (n.s.)
FFA	Mean ± sem (mM)	0,51 ± 0,02	0,48 ± 0,04 (n.s.)	0,55 ± 0,03 (n.s.)	0,69 ± 0,03 (**)(##)

Table 1. Clinical chemistry parameters. Six-month old animals were fasted for 5 h. Serum glucose levels correspond to mean values from three independent experiments of controls and transgenic mice fed on chow or HFD (n = 8 per group). *P < 0.05 control vs Tg, **P < 0.01 chow vs Tg. Serum total cholesterol, triglycerides and FFA quantification correspond to mean values from two independent experiments, **P < 0.01 control vs Tg, ##P < 0.01 chow vs Tg.

		chow		hfd	
		control	KAP Tg	control	KAP Tg
IL-6	Mean ± sem (pg/dl)	30,837 ± 3,453	32,978 ± 3,345 (n.s.)	45,765 ± 8,192 (n.s.)	33,608 ± 3,290 (n.s.)
PAI-1 (total)	Mean ± sem (pg/dl)	8247,600 ± 2078,861	10581,000 ± 3179,562 (n.s.)	6732,208 ± 1212,884 (n.s.)	6943,542 ± 1654,839 (n.s.)
Resistin	Mean ± sem (pg/dl)	5725,100 ± 530,788	5254,227 ± 378,057 (n.s.)	7483,042 ± 294,662 (#)	7883,607 ± 754,882 (p < 0,06)

Table 2. Cytokines and adipokines measurement. IL-6, PAI-1 (total) and resistin levels in 6-month old animals using the Mouse Serum Adipokine Milliplex kit. Blood samples were taken after 5-h over morning fasting. Results correspond to mean values from 2 independent set of experiments including n = 8 animals per group, #p < 0.05 chow vs HFD.

might be related with its capacity to impair IL-6 production and inactivation of the IL6/gp130 axis in hfd-fed mice. To assess whether disrupted IL-6 production in hfd-fed KAP Tg could be attributed to direct KAP action on IL-6 expression or to other indirect systemic effects occurring in Tg, we used HK-2 cells over-expressing a fused KAP-HA protein, to observe the putative impact of KAP on IL-6 expression, upon treatment with TNF α . Elevated levels of TNF α are detected in the bloodstream and in the peripheral tissues of insulin-resistant mice and, both, TNF α neutralization and deficiency each prevent high-fat diet-induced IR²⁸. Our results clearly demonstrated that KAP overexpression in HK-2 cells has a direct effect on IL-6 production by TNF α . Since TNF α induces the NF κ B pathway, which has a key role in the development of inflammation associated metabolic diseases²⁹, we postulate that KAP positive effects may be linked to the blunting of the NF κ B signaling pathway. Moreover, we have shown that KAP overexpression in HK-2 cells has an impact in the IL-6/gp130/JAK/STAT-3 pathway preventing 705YSTAT-3 activation, likely due to the impairment on IL-6 production. This is a very important pathway in obesity since increased circulating leptin levels lead to development of leptin resistance by chronic activation of JAK/STAT3 in the CNS, whereas in the peripheral organs chronic IL-6-induced JAK/STAT3 impairs insulin action³⁰. Whether KAP can activate/block these pathways by a direct action in target tissues or through indirect mediators is an open question. Because KAP is located in the secretory pathway and was also found in conditioned media of cultured cells, it is plausible to think that it might act as a kidney-specific hormone-like molecule that binds to putative KAP receptors in distal tissues.

It is intriguing to understand the sometimes opposite metabolic actions of KAP in basal and in hfd conditions. While KAP overexpression in proximal tubule cells counteracts negative effects produced by an obesogenic diet, KAP can also promote hypertension, proteinuria, glucosuria and focal segmental glomerulosclerosis in chow-fed Tg mice. It was reported that those effects are in part due to over-activation of Cyp4A, systemic oxidative stress¹¹, sympathetic and renin-angiotensin (RAS) systems¹². Obesity induced by hfd is characterized by increased circulating levels of the adipocyte-derived hormone leptin, which can increase sympathetic nerve activity and raise blood pressure through up-regulation of central RAS and pro-inflammatory cytokines. Systemic oxidative stress is also part of the alterations reported during chronic obesity³¹ and ROS and the NF κ B pathway interact to each other in many ways. Depending on the context, ROS can both activate and inhibit NF κ B signaling³². Our results suggest that KAP may indirectly activate the NF κ B pathway through ROS production and possibly behave as a putative agonist of IKb α , in the presence of other pro-inflammatory stimuli. KAP and IKb α share the same serine/threonine residues of a PEST domain that permits NF κ B activation by ROS³³. This H₂O₂-inducible phosphorylation of IKb α does not depend on I kappa B kinase (IKKB) activation, but involves CK2. Upon phosphorylation by CK2, IKb α and KAP are degraded by calpain proteases or through the proteasome^{33,34}. Aligned with this rationale, we had earlier described that, *in vitro*³⁵ and also in Tg mice³⁴, KAP overexpression protects from cyclosporine A-induced proximal tubule injury. As recently reported, inflammation represents a key pathogenic event leading to kidney damage and fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity³⁶.

Overall, our results indicate that under regular diet feeding, KAP overexpression activates pathways that are also activated by hfd in wild type mice. When the Tg and the hfd conditions are associated, KAP might saturate key enzymes and/or receptors in those common pathways, functionally counteracting the effects of hfd in MS development. Because KAP is secreted to conditioned media, we claim that it might act as a hormone-like product in extra-renal tissues, constituting a potential target for therapeutic interventions against MS.

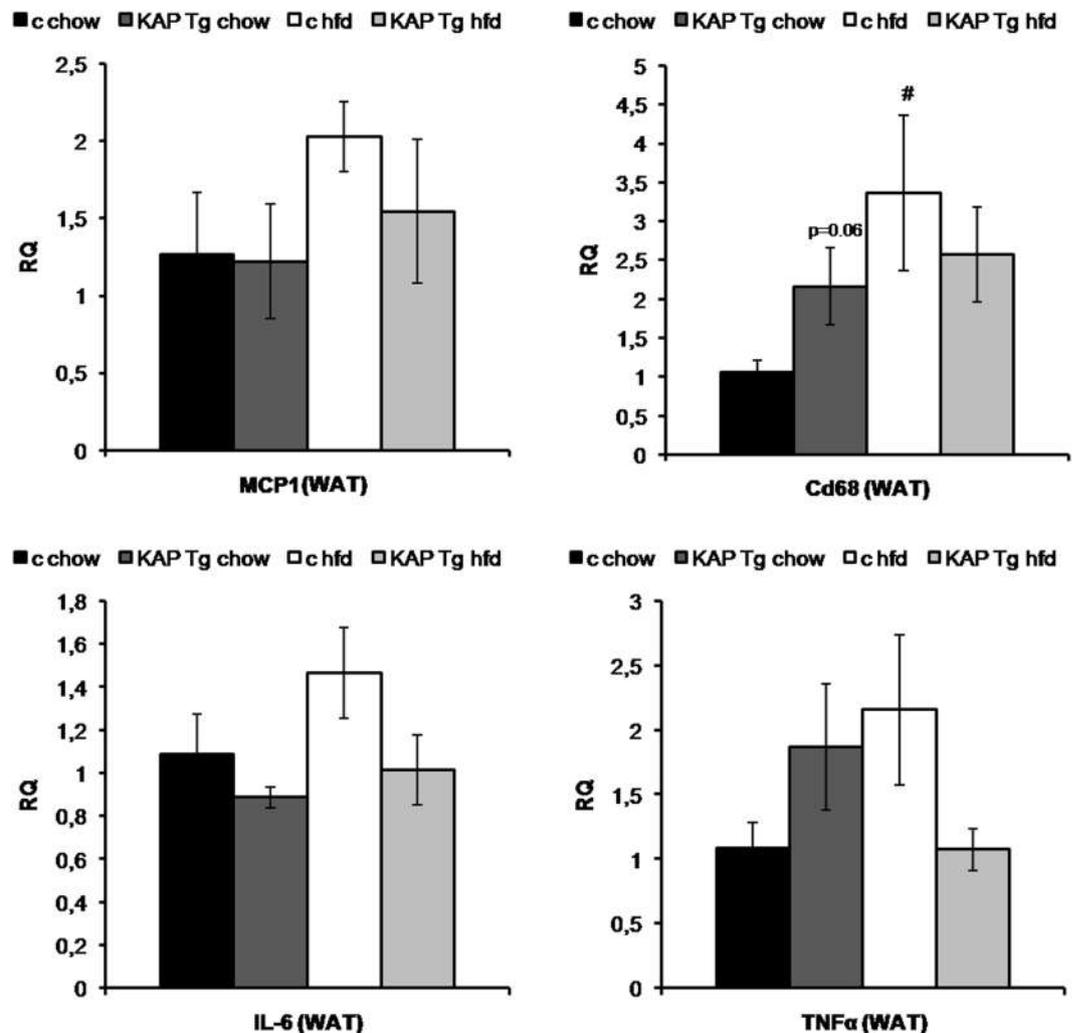


Figure 4. Gene expression assays. Quantitative RT-PCR gene expression assays (qReal Time TaqMan probes PCR) in white adipose tissues of Tg and control littermate mice fed with chow or HFD, upon sacrifice at 7-month of age. Relative expression of MCP-1, Cd68, IL-6 and TNF- α pro-inflammatory genes are given in fold change (FC) $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Peptidyl-prolyl isomerase A (CypA) probe was used as endogenous control (n = 8 per group), #p < 0.05 chow vs HFD. Results correspond to mean values from three independent set of experiments including n = 8 animals/group. For all panels error bars correspond to SEM.

Experimental Procedures

Animals. The generation of KAP Tg mice has been described¹¹. Tg and control littermate male mice were fed ad libitum with standard chow diet (2018 Harlan Global Diet 18% Protein Rodent Diet) or with high fat diet (TD.06435 Tekland custom research diet: 45% kcal fat, 35% kcal carbohydrates, 20% kcal protein) from weaning until euthanasia, for a 6-months period. Three independent set of experiments were performed along time (n = 8/group/experiment).

Mice were housed under constant conditions of temperature (22 °C) and humidity (60%) and subjected to a 12-h light/dark cycle. Mouse body weight was measured weekly throughout the duration of the experiment. Mice were euthanized under isoflourane anesthesia and organs collected for further analyses. Organs were weight and kept frozen at -80 °C or fixed with formalin 4% for further studies.

All experimental procedures were in compliance with the rules of the European Union guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All procedures were approved by the Animal Experimentation and Ethics Committee of the Vall d'Hebron Research Institute (CEEA 07/11).

Blood pressure measurements. Arterial pressure was measured using tail-cuff method (Niprem 546, Cibertec SA, Madrid, Spain) adapted for mice as previously described^{11,12}.

Glucose and insulin tolerance tests. For glucose tolerance tests, mice were given an intra-peritoneal injection of glucose (1 g/Kg) after 12 h over-night fasting. For insulin tolerance tests, mice were first fasted for

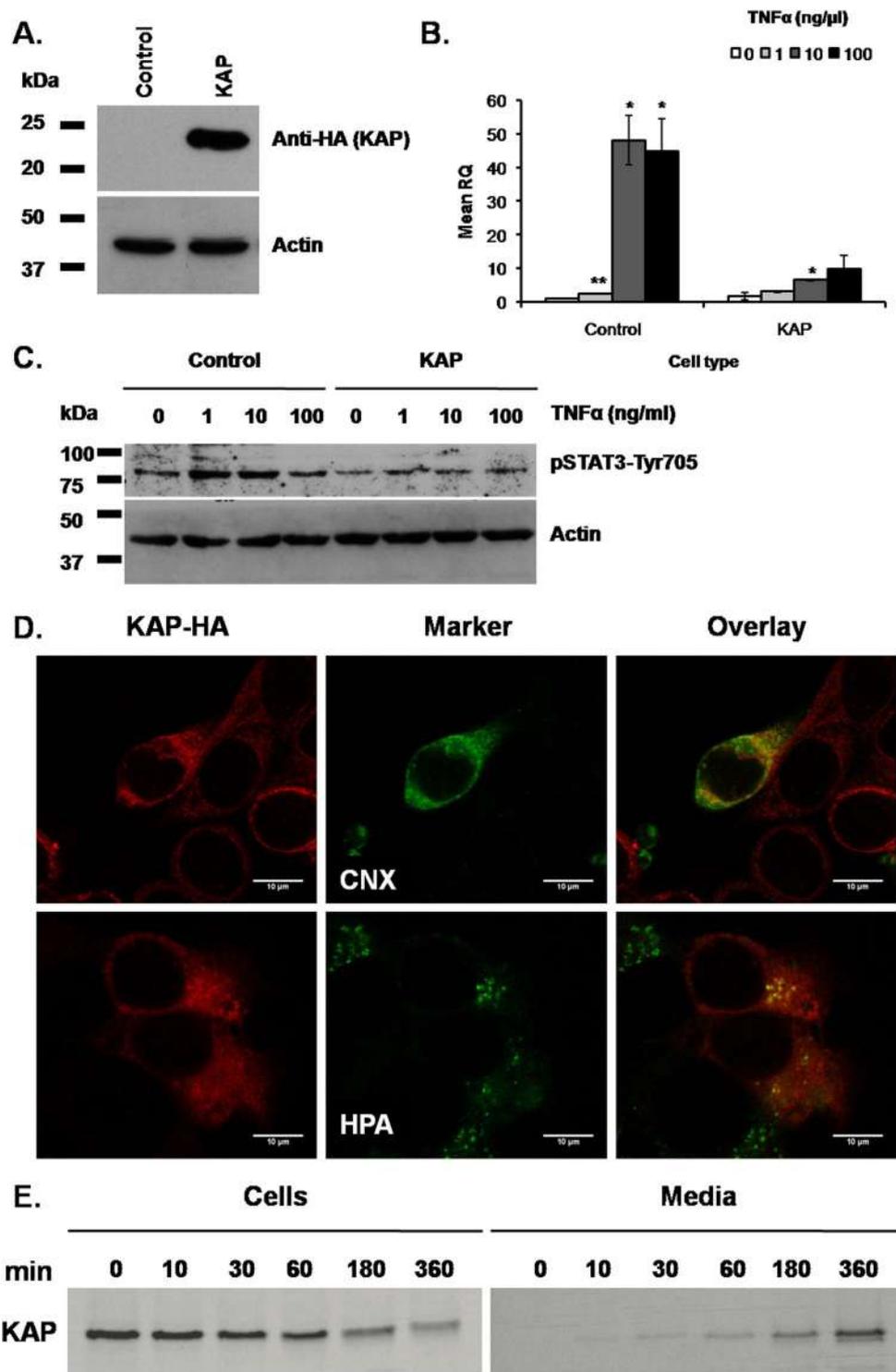


Figure 5. KAP effects on IL-6 expression by TNF- α . KAP subcellular location and secretion. (A) KAP-HA expression (KAP) in the HK-2 cell line. Empty lentiviral vector transduced cells were used as a control (Control). KAP-HA expression by determined by Western blot analyses using anti-HA antibody (ROCHE). (B) IL-6 mRNA induction upon TNF- α stimulation in HK-2 cells. Control and KAP transduced HK-2 cells were treated with increasing doses of TNF- α (0,1,10 and 100 ng/ μ l) for 24 h and IL-6 expression performed by qRT-PCR using IL-6 TaqMan probes. CypA was used as endogen control. Results represented in this figure are the average of three independent biological replicas. *p < 0.05; **p < 0.01, all versus TNF- α at 0 ng/ μ l, one-way ANOVA. Error bars correspond to SEM. (C) Effects of KAP-HA expression (KAP) on p705YSTAT-3 levels in HK-2 cells treated with increasing doses of TNF- α (0,1,10 and 100 ng/ μ l) for 24 h, in comparison to control transduced cells. Actin and total STAT-3 proteins were following the same expression pattern in all samples (not shown). The experiment represented in Fig. 5C has been done once. Samples derive from the same experiment and that gels/blots were processed in parallel. (D) Mouse proximal tubule derived PCT3 cells

transiently transfected with KAP were incubated with anti-HA antibody (Roche) (upper and lower left panel). For subcellular co-localization cells were co-incubated with antibodies anti Calnexin for endoplasmic reticulum detection (upper middle panel), or with the Helix pomatia (HPA) Alexa Fluor 488 (lower middle panel) for Golgi detection. Overlay images indicate that KAP co-localizes with endoplasmic reticulum (ER) and Golgi specific markers (upper and lower right panels, respectively). Results in Fig. 5D have been repeated at least three times using different biological replicas. (E) For metabolic labelling and pulse-chase experiments, pHA-CMV/KAP-HA transiently transfected PCT3 cells were incubated with Methionine and Cysteine depleted labelling media and further incubated with Trans 35^S-Label. Cells and conditioned media were harvested at different times. S³⁵-labeled KAP recombinant protein was immunoprecipitated from crude cell extracts (left panel. 1 o/n exposition) and conditioned media (right panel. 5 o/n exposition) with anti-HA antibodies. IP- proteins were run in SDS-PAGE and exposed to auto-radiographic films. Levels of KAP protein in crude cell extracts were diminishing over time in good correlation with increments found in conditioned media. Western blot images shown in this figure have not been cropped and each come from a single representative gel/blot experiment.

5 h and then injected with insulin (0.75 IU/Kg). Blood glucose concentration was determined with an ELITE glucometer (Bayer).

Serological parameters. Blood from KAP Tg mice and control littermates was collected after a 5 h fasting. Concentration of Triglycerides and total cholesterol in serum was determined using commercial kits based on the Trinder colorimetric method (FAR Diagnostics, Italy)³⁷. Free fatty acids content was analyzed with the NEFA-C kit (Wako Chemicals GmbH, Germany). Insulin, leptin, resistin, IL-6 and PAI-1 were determined with the Milliplex Map Mouse Serum Adipokine Panel multiplex assay (Merck Millipore).

Hepatic lipid content. Neutral Lipid fraction was isolated from mouse livers by the Folch method in order to quantify the lipids content³⁸.

Histological analysis. Paraffin-embedded liver, white and brown adipose tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome, according to standard procedures.

RNA isolation and cDNA synthesis. Total RNA was isolated from tissues with Trizol (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Total RNA was retro-transcribed using the High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems) and used to perform gene expression analyses by qRT-PCR using TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) or microfluidic cards.

Microfluidic cards. Microfluidic cards (ref.: Applied Biosystems Taqman[®] Low Density Array, format 32, Part. N 434799 G) were used to evaluate differential expression of genes involved in RAAS axis, oxidative stress, inflammation and glucose and lipid metabolism in white adipose tissue and liver. Samples were randomized among the cards in order to ensure that no samples from the same experimental group were loaded in the same card or in the same position of a different card. The best endogenous genes were sought among those included commercially in the cards using DataAssist[™] software v. 2.0, so that data were corrected using the geometric mean of the more stable endogenous genes (GAPDHs, CypA and β -actin).

Real-time qRT-PCR. qRT-PCR for IL-6, TNF- α , MCP-1 and CD68 was performed in the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using TaqMan probes. Peptidyl-prolyl-isomerase A (CypA) probe was used as reference gene.

KAP expression in mouse proximal tubule cells. The pHA-CMV/KAP-HA mammalian expression vector containing the full coding sequence of the mouse *Kap* gene fused to the HA epitope has been previously reported³⁴. For transfection experiments, PCT3 cells were grown to about 50% confluence in medium containing 2% fetal calf serum (FCS). Transfections were done in serum-free medium with the indicated cDNA using 0.4–0.8 μ g/well of a 24-well plates or 5 μ g/ 6 cm dish by LipofectAMINE PLUS (Life Technologies) method according to the supplier's manual and as previously reported^{10,34}.

Immunocytochemistry in cultured cells. Transfected PCT3 cells were fixed in -20°C methanol for 4 min at room temperature. After blocking for 30 min in blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS), cells were incubated for 1 h at room temperature with anti-HA (1 μ g/ml, Roche Molecular Biochemicals) diluted in blocking buffer. For subcellular co-localization analyses cells were co-incubated with antibodies anti Calnexin (1:50 Stressgen), which detects the endoplasmic reticulum, or with the Helix pomatia (HPA) Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) that binds to the Golgi Apparatus. The cells were washed in PBS and further incubated with FITC-conjugated anti-rat IgG (1:350, Sta. Cruz Biotechnology) or TRITC-conjugated anti-rabbit antibodies (1:300, Sigma). After washing with PBS, coverslips were mounted on a glass slide and images were obtained using a Leica DM IRBE confocal microscope.

Metabolic labelling. Pulse-chase experiments. pHA-CMV/KAP-HA transiently transfected PCT3 cells were incubated with Methionine and Cysteine depleted labelling media for 30 min, and further incubated with 0,1 mCi/ml Trans 35^S-Label (ICN PHARMACEUTICALS, INC.) for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO₂. Upon washing, cultures were incubated with complete media and cells and conditioned media harvested at different time points, including: 0, 10 min, 30 min, 1 h, 3 h and 6 h. S³⁵-labeled KAP recombinant protein was immunoprecipitated (IP) with rat mAb against HA epitope (ROCHE) following standard protocols. Conditioned culture

media was centrifuged at 5000 rpm for 5 min and concentrated with Amicon® Ultra-4 de 5000 NMWL filters (Millipore). IP proteins and concentrated media were loaded in 15% SDS polyacrylamide gels (SDS-PAGE). After electrophoresis, gels were fixed in a solution containing 50% methanol and 10% acetic acid for 30 min, followed for 5 min incubation in 7% methanol, 7% acetic acid and 1% glycerol. Gels were exposed to autoradiographic films.

Lentiviral vector production and stable KAP expression in HK-2 cells. Viruses were generated in HEK293T cells with four plasmids providing vector, gag-pol and env functions at a ratio of 1:1:3:5 (VSVG:RTR2:PKGPIR:Transfer vector encoding for KAP fused to the HA epitope), as previously described³⁹. The viral vector-containing medium was applied to the HK-2 cell line twice. The human proximal tubule epithelial cell line HK-2 (CRL-2190), immortalized by transduction with HPV-16, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Seventy-two h post-infection, the medium was removed and cells were incubated with normal growth medium for 5 days until Puromycin (Sigma–Aldrich) at 1 µg/mL was added to culture medium for selection of transduced cells. Cells infected with the empty transfer vector FUW served as a control.

Western blot analysis. Control and KAP-HA expressing HK-2 cells were washed with PBS and lysed in whole-cell lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM HEPES [pH 7.4], 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 mM β-glycerophosphate, 10% glycerol, 1 mM NaVO₄) with proteinase inhibitors. Western blot assays were performed as previously described³⁹, using rat mAb against HA (ROCHE), rabbit mAb against β-actin (Sigma–Aldrich) and mouse mAb against pSTAT3 Y705 (Cell Signaling) diluted in blocking solution. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from DAKO (Glostrup, Denmark). Blots were developed with the enhanced chemiluminescence substrate ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK).

Statistical Analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0d (GraphPad Software, USA). Unless otherwise stated, data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey test.

Regarding microfluidic cards analysis, the selection of differentially expressed elements was performed following the Livak method and implemented with R scripts, using Student's *t*-test in order to find significant differences in expression levels between groups⁴⁰. Raw data was provided as SDS format files from ABI 7900 PCR System. All of them were loaded and properly re-formatted with custom R scripts⁴¹ developed for this purpose at the VHIR's Statistics and Bioinformatics Unit (UEB). The steps of the analysis have been defined in three main points: (a) quality control of the samples, focused on outliers detection; (b) data normalization; and (c) selection of differentially expressed features, separately for each specific comparison (named C1, C2, C3 and C4 in Fig. 2). These process have been applied independently for each type of tissue considered in the experiment (Adipose tissue and Liver). Quality control has been conducted with specific R scripts implemented at the UEB, adapting the *HTqPCR Bioconductor's package* described by Dvinge⁴². No outliers have been detected, and thus no samples have been ruled out after these quality control checking. Data normalization was performed with UEB customized R scripts, based on the standard Livak method known as $\Delta\Delta$ Ct computation⁴⁰, using as endogenous controls the genes *Actb*, *Gapdh* and *Ppia* for the liver, and *Ppia* for the adipose. They were the most stable ones, following statistical criteria based on its coefficient of variation.

The selection of differentially expressed elements has been done by the Livak method and implemented with R scripts, using Student's *t*-test, to find significant differences in expression levels between groups. More specifically, in comparisons C1, C2 and C3, Δ Ct values between groups have been used for the test; while $\Delta\Delta$ Ct against $\mu = 0$ have been tested in comparison C4. Significance levels have been established at $\alpha = 0.05$ in all cases.

Data Availability. All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

References

- Wilson, P. W. F., D'Agostino, R. B., Parise, H., Sullivan, L. & Meigs, J. B. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **112**, 3066–3072 (2005).
- Ford, E. S. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the international diabetes federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* **28**, 2745–2749 (2005).
- Carr, D. B. *et al.* Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* **53**, 2087–2094 (2004).
- Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
- Lumeng, C. N. & Saltiel, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Investig* **121**, 2111–2117 (2011).
- Lindsay, R. S. & Howard, B. V. Cardiovascular risk associated with the metabolic syndrome. *Current Diabetes Reports* **4**, 63–68 (2004).
- Chen, J. *et al.* The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Annals of Internal Medicine* **140**, 167–139 (2004).
- Raimundo, M. & Lopes, J. A. Metabolic Syndrome, Chronic Kidney Disease, and Cardiovascular Disease: A Dynamic and Life-Threatening Triad. *Cardiol Res Pract.* 747861 (2011).
- Meseguer, A. & Catterall, J. F. Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1240–1248 (1990).
- Teixidó, N., Soler, M., Rivera, N., Bernués, J. & Meseguer, A. CCAAT/enhancer binding protein-mediated role of thyroid hormone in the developmental expression of the kidney androgen-regulated protein gene in proximal convoluted tubules. *Mol Endocrinol* **20**, 389–404 (2006).
- Tornavaca, O. *et al.* Kidney androgen-regulated protein transgenic mice show hypertension and renal alterations mediated by oxidative stress. *Circulation* **119**, 1908–1917 (2009).
- Grande, M. T. *et al.* Increased oxidative stress, the renin-angiotensin system, and sympathetic overactivation induce hypertension in kidney androgen-regulated protein transgenic mice. *Free Radic Biol Med* **51**, 1831–41 (2011).
- Xu, S., Tsao, P. S. & Yue, P. Apelin and insulin resistance: another arrow for the quiver? *J Diabetes* **3**, 225–231 (2011).
- Poirier, P. *et al.* Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 968–76 (2006).

15. Coschigiano, K. T. *et al.* Identification of differentially expressed genes in the kidneys of growth hormone transgenic mice. *Growth Horm IGF Res* **20**, 345–355 (2010).
16. von zur Muhlen, C. *et al.* Urine proteome analysis reflects atherosclerotic disease in an ApoE^{-/-} mouse model and allows the discovery of new candidate biomarkers in mouse and human atherosclerosis. *Mol Cell Proteomics* **11**(M111), 013847 (2012).
17. Frigolet, M. E., Torres, N. & Tovar, A. R. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry* **24**, 2003–2015 (2013).
18. Yvan-Charvet, L. & Quignard-Boulangé, A. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int* **79**, 162–8 (2011).
19. Skurk, T., van Harmelen, V., Blum, W. F. & Hauner, H. Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes Res* **13**, 969–73 (2005).
20. Azrak, Z., Kfoury, C., Ghantous, C. & Zeidan, A. Molecular Mechanisms of Angiotensin II-Induced Leptin Synthesis in Vascular Smooth Muscle. *The FASEB Journal* **30**, Supplement 1197.7 (2016).
21. Tsubakimoto, Y. *et al.* Bone marrow angiotensin AT1 receptor regulates differentiation of monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1529–1536 (2009).
22. Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
23. Prasad, A. & Quyyumi, A. A. Renin-Angiotensin System and Angiotensin Receptor Blockers in the Metabolic Syndrome. *Circulation* **110**, 1507–12 (2004).
24. Hardwick, J. P., Osei-Hyiaman, D., Wiland, H., Abdelmegeed, M. A. & Song, B.-J. PPAR/RXR Regulation of Fatty Acid Metabolism and Fatty Acid omega-Hydroxylase (CYP4) Isozymes: Implications for Prevention of Lipotoxicity in Fatty Liver Disease. *PPAR Res* **952734** (2009).
25. Fidaleo, M. *et al.* A role for the peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase B enzyme in the control of PPAR α -mediated upregulation of SREBP-2 target genes in the liver. *Biochimie* **93**, 876–91 (2011).
26. Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T. R., Van Parijs, L. & Lodish, H. F. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes* **51**, 1319–36 (2002).
27. Wueest, S. *et al.* Mesenteric Fat Lipolysis Mediates Obesity-Associated Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Diabetes* **65**, 140–148 (2016).
28. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* **389**, 610–4 (1997).
29. Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metab* **13**, 11–22 (2011).
30. Wunderlich, C. M., Hövelmeyer, N. & Wunderlich, F. T. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT* **2**, e23878 (2013).
31. Marseglia, L. *et al.* Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci* **16**, 378–400 (2015).
32. Morgan, M. J. & Liu, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research* **21**, 103–115 (2011).
33. Shen, J., Channavajhala, P., Seldin, D. C. & Sonenshein, G. E. Phosphorylation by the Protein Kinase CK2 Promotes Calpain-Mediated Degradation of I κ B α . *The Journal of Immunology* **167**, 4919–4925 (2001).
34. Tornavaca, O. *et al.* KAP degradation by calpain is associated with CK2 phosphorylation and provides a novel mechanism for cyclosporine A-induced proximal tubule injury. *PLoSOne* **6**(9), e25746 (2011).
35. Cebrián, C. *et al.* Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J Biol Chem* **276**, 29410–92001 (2001).
36. González-Guerrero, C. *et al.* TLR4-mediated inflammation is a key pathogenic event leading to kidney damage and fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Archiv Toxicol* **91**, 1925–1939 (2017).
37. Enguix, N. *et al.* Mice lacking PGC-1 β in adipose tissues reveal a dissociation between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Mol Metab* **5**, 215–26 (2013).
38. Folch, J., Lees, M. & Sloane, S. G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509 (1957).
39. Cuadros, T. *et al.* HAVCR/KIM-1 activates the IL-6/STAT-3 pathway in clear cell renal cell carcinoma and determines tumor progression and patient outcome. *Cancer Res* **74**, 1416–28 (2014).
40. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
41. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (2014).
42. Dvinge, H. Htpcr-high-throughput qpcr analysis in r and bioconductor. *Bioconductor version: Release (2.10)* (2010).

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011–2950 and SAF2014–59945-R to A. Meseguer), the Fundación Senefro (SEN to A. Meseguer), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012–39484 to J.A. Villena), Instituto de Salud Carlos III (PIE13/00027), and Red de Investigación Renal REDinREN (12/0021/0013 to A. Meseguer). Meseguer's research group holds the Quality Mention from the Generalitat de Catalunya (2014 SGR). We deeply thank Dr. Manoocher Soleimani (University of Cincinnati Ohio, USA) and Dra. Angela Nieto (Instituto de Neurociencias, CSIC-UMH, Alicante, Spain) for critical reading of the manuscript, and Dra. Esther Solé and Verónica Olmedo for technical help and advice.

Author Contributions

A.M. Conception and design of research, interpreted results of experiments and writing manuscript; B.B.d.Q. and J.A.V. Design of research, data acquisition, interpreted results of experiments, edited and revised manuscript; O.T. Design of research, data acquisition, interpreted results of experiments, approved final version of the manuscript; M.A., A.C., G.B., T.H., H.L., C.S. Data acquisition, interpreted results of experiments, approved final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16487-y>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017