

Tesi doctoral presentada per En/Na

Marta PUIGMULÉ RAURICH

amb el títol

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

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

BIOLOGIA

Barcelona, 29 de maig de 2008

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



RESULTATS

1. CARACTERITZACIÓ DELS SISTEMES CEL·LULARS TUBULARS RENALS

La CsA és un potent immunosupressor àmpliament utilitzat en el trasplantament d'òrgans sòlids que com a principal efecte secundari mostra una elevada toxicitat renal que pot conduir a la pèrdua de la funció renal (Borel J.F. et al., 1976; Bennet W.M. et al., 1983). Els mecanismes moleculars pels quals la CsA exerceix els seu efecte immunosupressor han estat ben estudiats (Schreiber S.L., 1991; Liu J. et al., 1992), no obstant poc es coneix dels mecanismes d'acció a nivell molecular implicats en el dany renal. Tot i que inicialment es creia que la nefrotoxicitat era causada per un desequilibri entre vasoconstrictors i vasodilatadors, estudis clínics i experimentals demostren que la nefrotoxicitat també inclou l'acumulació del fàrmac a les cèl·lules tubulars renals, la vacuolització i inflamament del reticle endoplasmàtic majoritàriament del segment S3 del túbul proximal, la fibrosi intersticial, la hialinosi arteriolar i l'atròfia tubular (Mihatsch M.J. et al., 1998). Aquests fets evidencien l'efecte directe de la CsA sobre les cèl·lules tubulars renals. Darrerament, Healy i col·laboradors demostren en cultius *in vitro* de cèl·lules derivades de túbul proximal de porc i de gos, LLC-PK1 i MDCK respectivament, que la CsA actua directament a la zona tubular renal concretament a la zona proximal tubular (Lally C. et al., 1999). Ara bé, els mecanismes cel·lulars pels quals es produeix aquesta nefrotoxicitat tubular encara estan per elucidar. Per tot això, es pretén caracteritzar diferents línies cel·lulars tubulars renals derivades de ratolí i d'humà en presència del fàrmac immunosupressor CsA. Aquesta caracterització ens ha de permetre determinar el comportament de les cèl·lules tubulars renals tractades amb CsA.

1.1. ESTUDI DE LA VIABILITAT I LA TOXICITAT CEL·LULAR

1.1.1. Efecte dels diferents fàrmacs en la viabilitat cel·lular

En una primera aproximació es va realitzar un estudi de la toxicitat cel·lular causada per la ciclosporina SANDIMMUN® (NOVARTIS), que és la que prenen els pacients i està formada per CsA (50 mg/ml), Cremophor® EL (650 mg/ml) i etanol (94%). Per tal diferenciar la toxicitat causada pels diferents compostos i estudiar exclusivament els efectes causats per la CsA es van tractar les cèl·lules amb la ciclosporina SANDIMMUN®, amb el principi actiu ciclosporina A (CALBIOCHEM®) i amb el vehicle, format per la barreja de Cremophor® EL (650 mg/ml) i etanol (94%). Les cèl·lules de túbul proximal renal procedents de ratolí (PCT3) i d'humà (HK-2) es tracten durant 24h amb dosis creixents (entre un rang de 0 i 50 µM) dels diferents components anteriorment descrits. L'anàlisi de la viabilitat cel·lular en front dels diferents fàrmacs i dosis s'ha estudiat amb el *Cell Proliferation Kit II* (XTT) seguint el protocol especificat a l'apartat de MÈTODES.

En un primer anàlisi, els resultats obtinguts es van sotmetre a una ANOVA multifactorial que ha permès analitzar l'efecte de la dosi i l'efecte dels diferents fàrmacs sobre la viabilitat cel·lular. Aquest anàlisi demostra que tant la dosi (PCT3 $p < 0.0001$; HK-2 $p < 0.0001$) com el fàrmac (PCT3 $p < 0.0013$;

HK-2 $p < 0.0013$) afecten a la viabilitat cel·lular. Degut a que, dosi i fàrmac presenten una forta interacció entre ells (PCT3 $p < 0.0001$; HK-2 $p < 0.0001$) es realitza un anàlisi *post-hoc* per a cada un dels factors. Aquest anàlisi revela que per ambdues línies cel·lulars, les dosis de 20 i 50 μM produeixen una disminució de la viabilitat cel·lular significativament més gran que la resta de dosis assajades. Pel que fa l'efecte del fàrmac, l'anàlisi *post-hoc* detecta que per les dues línies cel·lulars, el fàrmac SANDIMMUN és significativament més tòxic que la CsA i el vehicle.

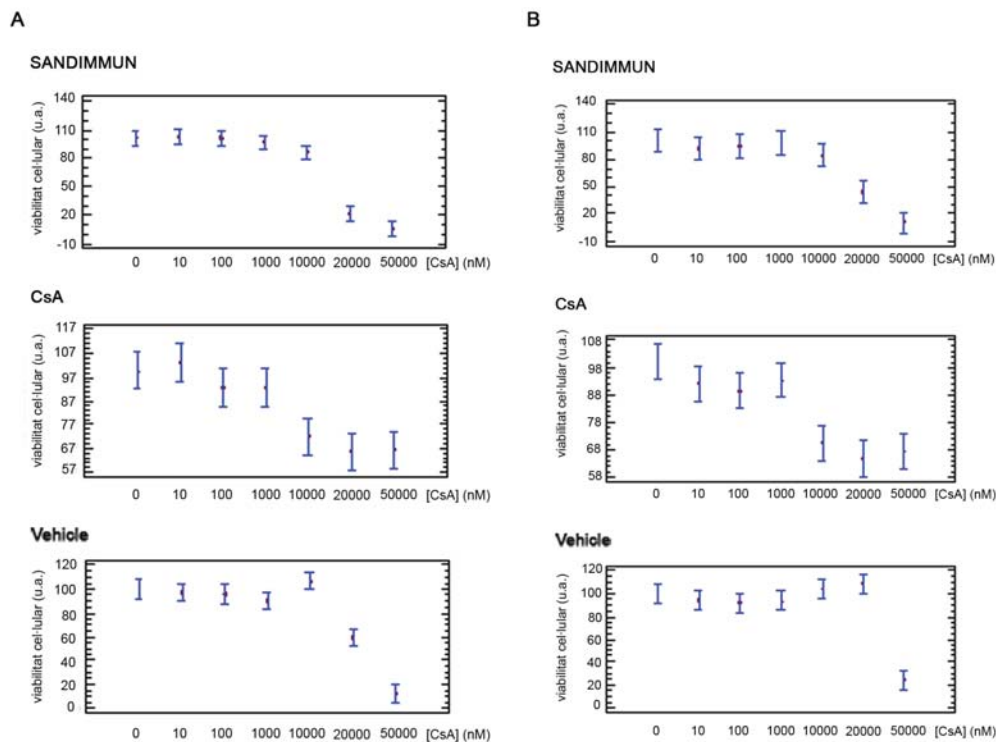


Figura 27. Efecte dels diferents fàrmacs i dosis sobre la viabilitat cel·lular. (A) Les cèl·lules PCT3 es sotmeten durant 24h al tractament amb SANDIMMUN, vehicle i CsA. La viabilitat cel·lular s'analitza mitjançant el *Cell Proliferation Kit II* (XTT). Hi ha 3 rèpliques de cada situació per experiment i l'experiment es realitza per triplicat. Es mostra la mitjana i l'interval de confiança al 95%. (B) Les cèl·lules HK-2 sotmeses als mateixos tractaments i anàlisi que en A.

Seguidament i per tal d'estudiar més detalladament l'efecte de la dosi i del fàrmac i fer més evident la interacció entre ells es realitza una ANOVA univariant pel factor dosi i una ANOVA univariant pel factor fàrmac. Aquests anàlisis permeten estudiar l'efecte del fàrmac per a cada dosi estudiada i l'efecte de la dosi per a cada fàrmac emprat per ambdues línies cel·lulars.

A la FIGURA 27 s'observa que en cèl·lules PCT3 la toxicitat cel·lular causada pels fàrmacs SANDIMMUN i el vehicle s'evidencia a partir de la concentració de 20 μM . En aquesta dosi el SANDIMMUN és més tòxic que el vehicle. La toxicitat cel·lular s'igualava a la concentració de 50 μM (FIGURA 28). La citotoxicitat causada per la CsA s'inicia a la dosi de 10 μM , fent-se més evident en les dosis superiors. La CsA és el fàrmac menys tòxic ja que la citotoxicitat que produeix mai és tant elevada com els altres compostos. Pel que fa al comportament de les cèl·lules HK-2 (FIGURA 27 i 28) és molt similar al de les cèl·lules PCT3. La única diferència roman en la toxicitat creada pel vehicle, ja que aquest només és tòxic a la concentració més elevada.

En resum, aquests resultats indicarien que el vehicle i el SANDIMMUN són fàrmacs molt tòxics a

les dosis elevades mentre que la CsA tot i provocar la disminució de la viabilitat cel·lular a partir de la dosi de 10 μ M, la toxicitat en cap cas és tant elevada com en la resta de fàrmacs. Per aquests motius en tots els experiments que es van realitzar a continuació es va utilitzar la CsA (CALBIOCHEM®).

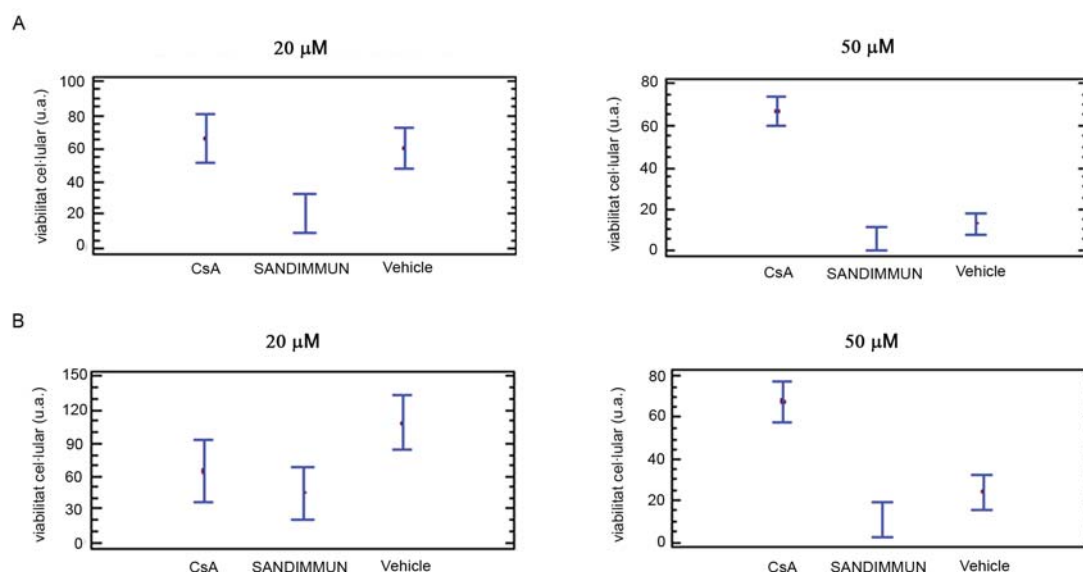


Figura 28. Efecte de les dosis de 20 i 50 μ M sobre la viabilitat cel·lular. (A) Les cèl·lules PCT3 es sotmeten durant 24h al tractament amb SANDIMMUN, vehicle i CsA. La viabilitat cel·lular s'analiza mitjançant el *Cell Proliferation Kit II* (XTT). Hi ha 3 rèpliques de cada situació per experiment i l'experiment es realitza per triplicat. Es mostra la mitjana i l'interval de confiança al 95%. (B) Les cèl·lules HK-2 sotmeses als mateixos tractaments i anàlisis que en A.

1.1.2. Efecte dels temps de tractament i de les dosis de CsA en la viabilitat cel·lular

A continuació les línies cel·lulars renals PCT3, PR10 i HK-2 i la línia cel·lular no renal, HeLa, han estat sotmeses al tractament de diferents dosis de CsA (de 0 fins a 50 μ M) durant diferents temps de tractament (24, 48 i 72h). L'anàlisi de la viabilitat cel·lular en front les diferents dosis i temps de tractament s'ha analitzat amb el *Cell Proliferation Kit II* (XTT) seguint el protocol especificat a l'apartat de MÈTODES.

Els resultats obtinguts es van sotmetre a una ANOVA multifactorial. Aquest test estadístic indica que tant la dosi com el temps de tractament afecten a la viabilitat cel·lular i que ambdós factors presenten una forta interacció. Tal i com s'observa a la FIGURA 29 les dosis inferiors a 10 μ M, per qualsevol de les situacions assajades, no produeixen canvis en la viabilitat cel·lular ($p > 0.05$). Després de 24h de tractament, la dosi 10 μ M de CsA, produeix una significant davallada de la viabilitat cel·lular en les tres línies renals estudiades ($p < 0.05$). Aquesta disminució de la viabilitat cel·lular és similar a la observada a les dosis superiors de 20 μ M i 50 μ M de CsA. Les dosis de CsA superiors a 10 μ M produeixen un augment significatiu de la toxicitat cel·lular de manera temps dependent, siguent màxima a les 48h per a les cèl·lules PCT3 i HK-2 ($p < 0.05$) i a les 72 h per les cèl·lules PR10 ($p < 0.05$).

La CsA no afecta la viabilitat cel·lular de HeLa en aquestes dosis i temps. Per tant es confirma que la CsA, en aquestes dosis i temps de tractament assajats només causa dany a les línies cel·lulars renals (FIGURA 29).

De tots aquests resultats, es conclou, que la concentració de CsA 10 µM és una dosi lliandar que provoca canvis significatius en la viabilitat cel·lular després de les 24h de tractament.

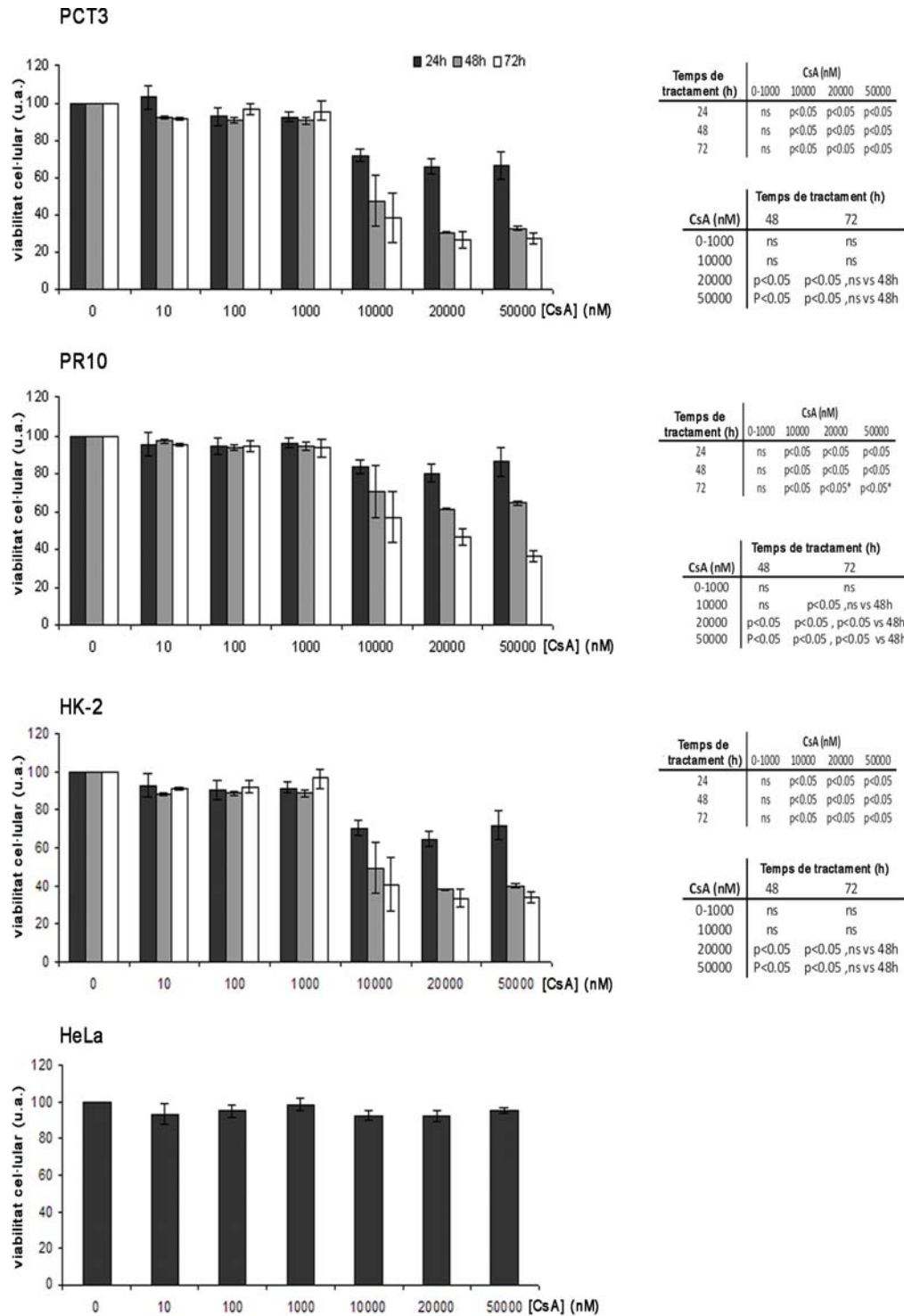


Figura 29. Efecte dels temps de tractament i de les dosis de CsA en la viabilitat cel·lular. Les diferents línies cèl·lules renals PCT3, PR10 i HK-2 i la línia no renal HeLa es sotmeten al tractament de diferents dosis de CsA (entre 0 i 50 µM) durant 24, 48 i 72h. La viabilitat cel·lular s'analitza mitjançant el *Cell Proliferation Kit II* (XTT). Hi ha 3 rèpliques de cada situació per experiment i l'experiment es realitza per triplicat. Es mostra la mitjana ± SEM.

El que hem vist fins ara és que la disminució de la viabilitat cel·lular en cèl·lules tubulars renals causada per la CsA s'inicia a la concentració de 10 µM després de les 24 hores de tractament. A continuació, amb la col·laboració del laboratori de Fisiopatologia Renal de l'Hospital Universitari Gregorio Marañón, dirigit pel Dr. Alberto Tejedor, s'analitza l'efecte que causa la CsA sobre la capacitat reductora de les mitocondries en temps real, mesurant la reducció de l'MTT per les deshidrogenases mitocondrials de cèl·lules metabòlicament actives en un període de temps concret.

Com ja s'ha explicat a l'apartat de MÈTODES, el funcionament de l'MTT i de l'XTT és el mateix. Aquestes salts de tetrazoli són reduïdes a formazan per les deshidrogenases mitocondrials de cèl·lules metabòlicament actives. La única diferència entre aquestes dues salts és la solubilitat en medi aquós del formazan creat. Així doncs, un augment en la quantitat de formazan format (que correspon amb un augment d'absorbància) correlaciona amb un augment del nombre de cèl·lules viables

i viceversa. Per aquest experiment realitzat en temps real, no es pot parlar d'un augment del nombre de cèl·lules viues ja que en els 5.000 segons que dura l'assaig les cèl·lules no han tingut temps de duplicar-se o dividir-se i per tant es parlarà de capacitat reductora de les mitocondries o d'activitat deshidrogenasa mitocondrial.

Les cèl·lules PCT3 i HK-2 han estat sotmeses al tractament de diferents dosis de CsA (0, 10, 100 i 1.000 nM CsA) i durant 5.000 segons s'ha mesurat la capacitat reductora mitocondrial. En els resultats obtinguts s'observa com la situació control, per ambdós tipus cel·lulars, presenta un augment de l'absorbància a mesura que les cèl·lules van reduint l'MTT. Quan s'afegeix la CsA, sigui quina sigui la dosi assajada, l'activitat deshidrogenasa mitocondrial de les cèl·lules disminueix notablement respecte l'activitat de les cèl·lules control (FIGURA 30).

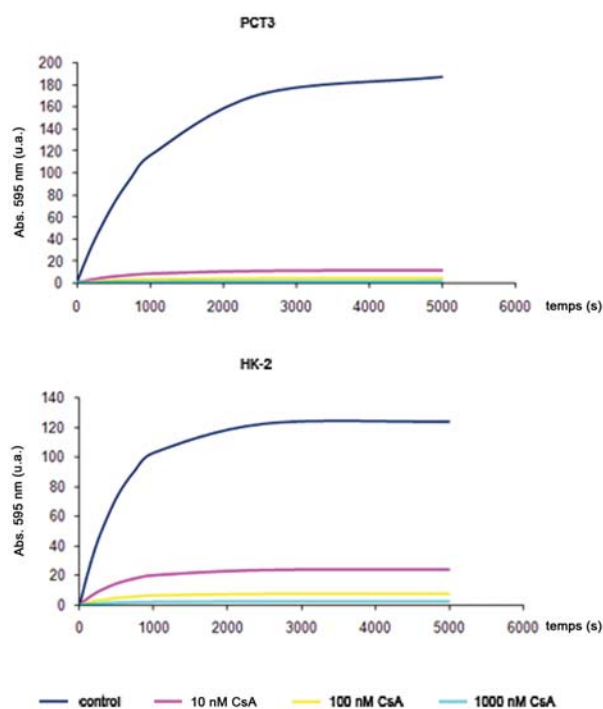


Figura 30. Efecte de la CsA en l'activitat deshidrogenasa mitocondrial en temps real. Les cèl·lules PCT3 i HK-2 es sotmeten al tractament de diferents dosis de CsA (entre 0 i 1 µM) i durant 5.000 s es mesura l'activitat deshidrogenasa mitocondrial mitjançant la reducció de l'MTT en temps real.

Com s'ha explicat anteriorment l'addició de CsA, fins a la dosi de 1 µM, altera la capacitat reductora mitocondrial de les cèl·lules tubulars renals a l'inici del tractament. Aquest fet, juntament amb què el tractament amb dosis de CsA inferiors a 10 µM durant temps llargs de tractament (24h, 48h i 72h) no causen una disminució de la viabilitat cel·lular suggereixen la recuperació de les alteracions causades per la CsA poc després d'haver-la afegit al medi de cultiu.

Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, les cèl·lules PCT3 i HK-2 es van tractar amb diferents dosis de CsA (de 0 fins a 10 µM) durant un espai temporal d'entre 2 i 7 hores. La capacitat reductora mi-

tocondrial s'ha avaluat utilitzant el *Cell Proliferation Kit II* (XTT) especificat a l'apartat de MÈTODES.

Els resultats obtinguts es van sotmetre a una ANOVA multifactorial que ha permès analitzar

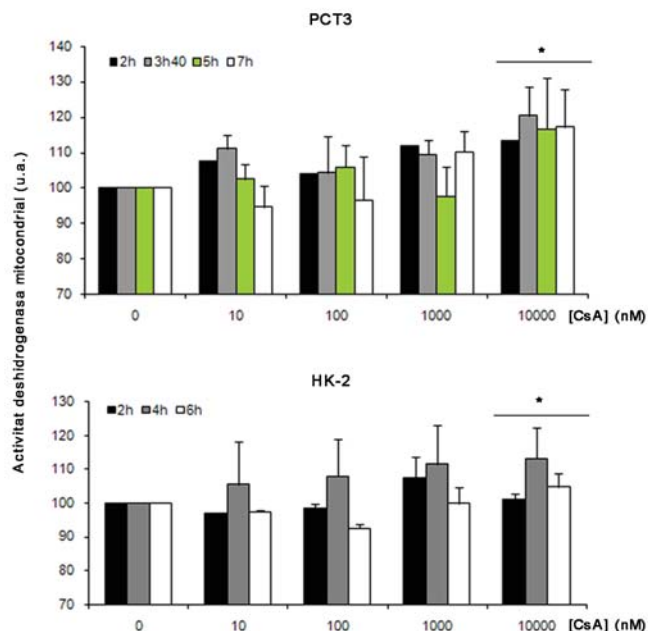


Figura 31. Efecte de la CsA en l'activitat deshidrogenasa mitocondrial durant temps de tractament curts. Les cèl·lules PCT3 i HK-2 es sotmeten al tractament de diferents dosis de CsA (entre 0 i 10 μ M) durant un període de temps comprès entre 2h i 7h. L'activitat deshidrogenasa mitocondrial s'avalua mitjançant un assaig colorimètric basat en el sistema XTT. Hi ha 3 rèpliques de cada situació per experiment i l'experiment es realitza per triplicat. Es mostra la mitjana \pm SEM, * $p < 0.05$.

l'efecte de la dosi de CsA en el període de tractament entre 2 i 7 hores. Tal i com s'observa a la FIGURA 31, per a la finestra temporal estudiada i per ambdues línies cel·lulars, en el rang de dosis entre 0 i 1.0000 nM de CsA s'observa la recuperació de l'activitat deshidrogenasa mitocondrial perduda en els moments inicials del tractament (FIGURA 30). En aquest experiment també s'observa que la capacitat reductora mitocondrial durant aquestes hores de tractament a la concentració de 10 μ M de CsA és significativament més elevada que el control i que la resta de dosis ($p < 0.05$) per ambdues línies estudiades (FIGURA 31).

Analitzant el conjunt d'aquestes dades obtingudes fins aquest

moment, s'observa com en els moments inicials del tractament amb CsA, les cèl·lules tubulars renals responen a l'agressió disminuint dràsticament la seva capacitat reductora mitocondrial, recuperant-la poques hores després en tots els casos estudiats. Quan es prolonga el temps de tractament amb la CsA durant 24, 48 i 72 hores, les dosis inferiors a 10 μ M de CsA no afecten la viabilitat cel·lular mentre que dosis iguals o superiors a 10 μ M produeixen una disminució de la viabilitat cel·lular entre un 30% i un 70%.

1.1.3. Efecte de la CsA en la respiració mitocondrial

La disminució de l'activitat deshidrogenasa mitocondrial causada per la CsA descrita anteriorment, ens planteja la pregunta de si la CsA altera també la respiració mitocondrial de les cèl·lules tubulars renals. Amb l'ajuda de la Dra. Elena García-Arumí del grup de Malalties Neuromusculars i Mitocondrials de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron, s'ha mesurat el consum d'oxigen mitjançant la utilització de l'elèctrode de Clark (vegeu l'apartat 6.2.4 dels MÈTODES i la FIGURA 26).

Les cèl·lules HK-2 han estat sotmeses al tractament amb CsA 10 μ M durant 2, 6 i 24h. Cada temps de tractament té el seu respectiu control. A continuació s'ha mesurat el consum d'oxigen. Cada

situació s'ha repetit per duplicat i l'experiment s'ha realitzat dues vegades. Com que la nombre d'experiments i de rèpliques per aquest tipus d'experiment que es realitza *in vivo* és molt baix, es creen

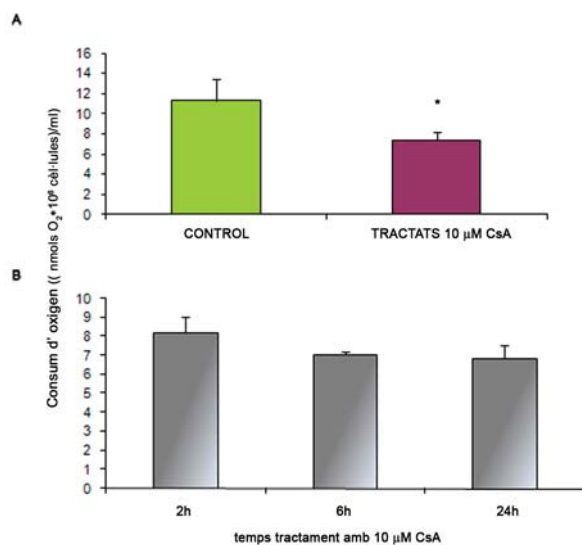


Figura 32. Efecte de la CsA en el consum d'oxigen. Les cèl·lules HK-2 es sotmeten al tractament amb 10 µM CsA durant 2, 6 i 24h. L'activitat deshidrogenasa mitocondrial s'avalua mitjançant un assaig colorimètric basat en el sistema XTT. Hi ha 3 rèpliques de cada situació per experiment i l'experiment es realitza per triplicat. Es mostra la mitjana ± SEM, * p<0.05.

dos tipus de mostres: la mostra CONTROL, que inclou tots els valors de consum d'oxigen de les situacions control i la mostra TRACTAMENT que inclou tots els valors de consum d'oxigen de cèl·lules tractades amb 10 µM CsA durant els diferents temps. Com que les desviacions estàndards són molt diferents entre elles (p<0.05) (TAULA 19), s'apliquen dos testos no paramètrics que ens permetran comparar com de diferents són les mitjanes entre les dues poblacions. Tant el test de *Mann-Whitney*, com el de *Kolmogorov-Smirnov* presenten una p<0.05 i per tant ens informen que les dues mitjanes són significativament diferents.

El consum d'oxigen de les mostres TRACTAMENT és significativament inferior al consum d'oxigen de les mostres CONTROL (FIGURA 32A).

Seguidament s'estudia quina relació existeix entre el consum d'oxigen de les mostres tractades amb CsA 10 µM i els diferents temps de tractament (2h, 6h, i 24h). S'observa com el consum d'oxigen disminueix al augmentar el temps de tractament seguint el model de cinètica recíproca o model de *Michaelis-Menten* (FIGURA 32B).

	CONSUM D'OXIGEN	
	Mitjana	Desviació estàndard
CONTROL	11.32	2.15
TRACTAMENT	7.1	0.73

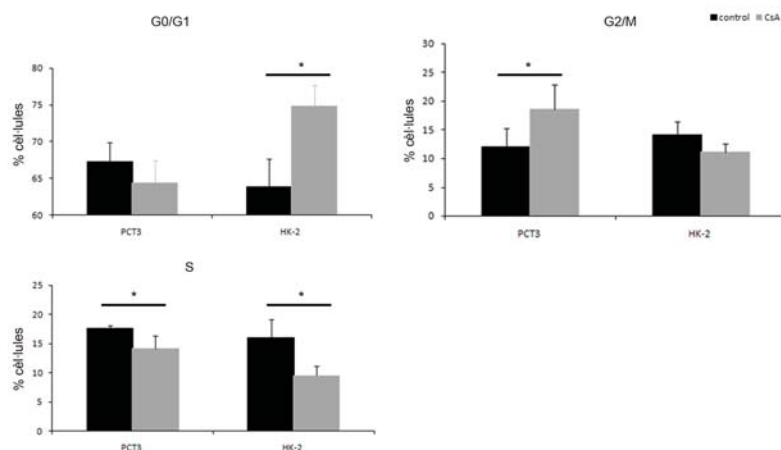
Taula 19. Mesures del consum d'oxigen de la mostra CONTROL i de la mostra TRACTAMENT. La mitjana de la mostra control inclou tots els valors de consum d'oxigen de les situacions control. La mitjana de la mostra tractament inclou els valors de consum d'oxigen de totes les mostres tractades amb 10 µM CsA durant 2, 6 i 24h.

1.1.4. Efecte de la CsA en el cicle cel·lular

La divisió cel·lular en mamífers es divideix tradicionalment en 4 fases, G1 (*gap 1*), S (síntesi de DNA), G2 (*gap 2*) i M (mitosi). El pas ordenat per a cada una d'aquestes fases està controlat per l'activitat cooperativa de diferents quinases dependents de ciclins (CDK) i les seves subunitats reguladores, les ciclins, així com també pels seus inhibidors (Sherr C.J. et al., 1999).

Per determinar si la CsA afecta al cicle cel·lular, les cèl·lules PCT3 i HK-2, 15-18 hores després de la sembra es tracten durant 24 hores amb la concentració de CsA 10 µM. A continuació, per citometria de flux, s'ha analitzat la quantitat de cèl·lules presents en les diferents etapes del cicle cel·lular. En els resultats obtinguts s'observa com el tractament amb CsA produeix una disminució significativa del percentatge de cèl·lules en fase S (p<0.05) per ambdues línies estudiades. Aquesta disminució correlaciona amb un increment del percentatge de cèl·lules en fase G0/G1 per la línia cel·lular HK-2 i amb un augment de cèl·lules en fase G2/M per les cèl·lules PCT3 (FIGURA 33).

Figura 33. Efecte de la CsA en el cicle cel·lular. Anàlisi per citometria de flux del percentatge de cèl·lules presents en les diferents etapes del cicle cel·lular. Els resultats representen la mitja dels percentatges de cèl·lules presents en cada fase del cicle cel·lular de 3 experiments independents \pm la desviació estàndard. * $p < 0.05$.



1.2. ESTUDI DE LA MORT CEL·LULAR PRODUÏDA PER LA CsA

La mort cel·lular pot esdevenir-se per apoptosi o necrosi. Recentment, s'ha hipotetitzat que elevades dosis de CsA indueixen necrosi de les cèl·lules tubulars renals, mentre que dosis més baixes d'aquest fàrmac, produeixen la mort cel·lular tubular per apoptosi (Healy E. et al., 1998).

A continuació, per tal de determinar si la disminució de la viabilitat cel·lular (FIGURA 29) corresponia amb un augment de la mort cel·lular, s'han analitzat els diferents tipus cel·lulars tractats amb diferents dosis de CsA durant 24h amb l'assaig enzimàtic TUNEL que permet detectar la fragmentació del DNA en les fases inicials de l'apoptosi, així com l'immunoassaig enzimàtic que permet detectar la presència de fragments de DNA acomplexats amb histones al citoplasma de cèl·lules en un estadi apoptòtic més avançat en el temps.

Les cèl·lules destinades a l'assaig de TUNEL es van créixer i es van tractar amb dosis creixents de CsA (entre 0 i 20 μ M) durant 24 h en un medi de cultiu lliure de sèrum fetal i de factors de creixement com és l'Opti-MEM. La quantificació de cèl·lules per l'assaig de TUNEL s'ha realitzat per microscòpia de fluorescència (vegeu l'apartat 6.3.2.1 dels MÈTODES). En les condicions cel·lulars anteriorment descrites, es detecta apoptosi a les concentracions de CsA de 100 nM i 1 μ M (FIGURA 34 i Taula 20). Aquest mateix experiment es realitza de nou en medi de cultiu complet. En aquestes condicions no es detecta apoptosi en cap situació assajada.

Les cèl·lules destinades a l'immunoassaig enzimàtic es van créixer i tractar amb el medi de cultiu complet amb les mateixes dosis de CsA i temps de tractament que per l'assaig de TUNEL. Contràriament el que s'observa amb la tècnica de TUNEL, quan s'estudia la mort cel·lular amb l'assaig immunoenzimàtic, aquesta és present, només a les dosis de 10 μ M i 20 μ M de CsA (FIGURA 35 i Taula 20).

L'ús de medis de cultius diferents ens ha permès observar que l'absència de factors de creixement i sèrum fetal sensibilitza a les cèl·lules al tractament amb CsA. La raó per la qual amb la tècnica de TUNEL no es detecti apoptosi a les dosis iguals o superiors a 10 μ M podria ser degut a la pèrdua d'aquestes cèl·lules durant els rentats previs a la fixació. D'aquesta manera les cèl·lules que queden enganxades al cobreobjectes són les cèl·lules vives que només es tenyeixen amb el IP un cop han estat permeabilitzades.

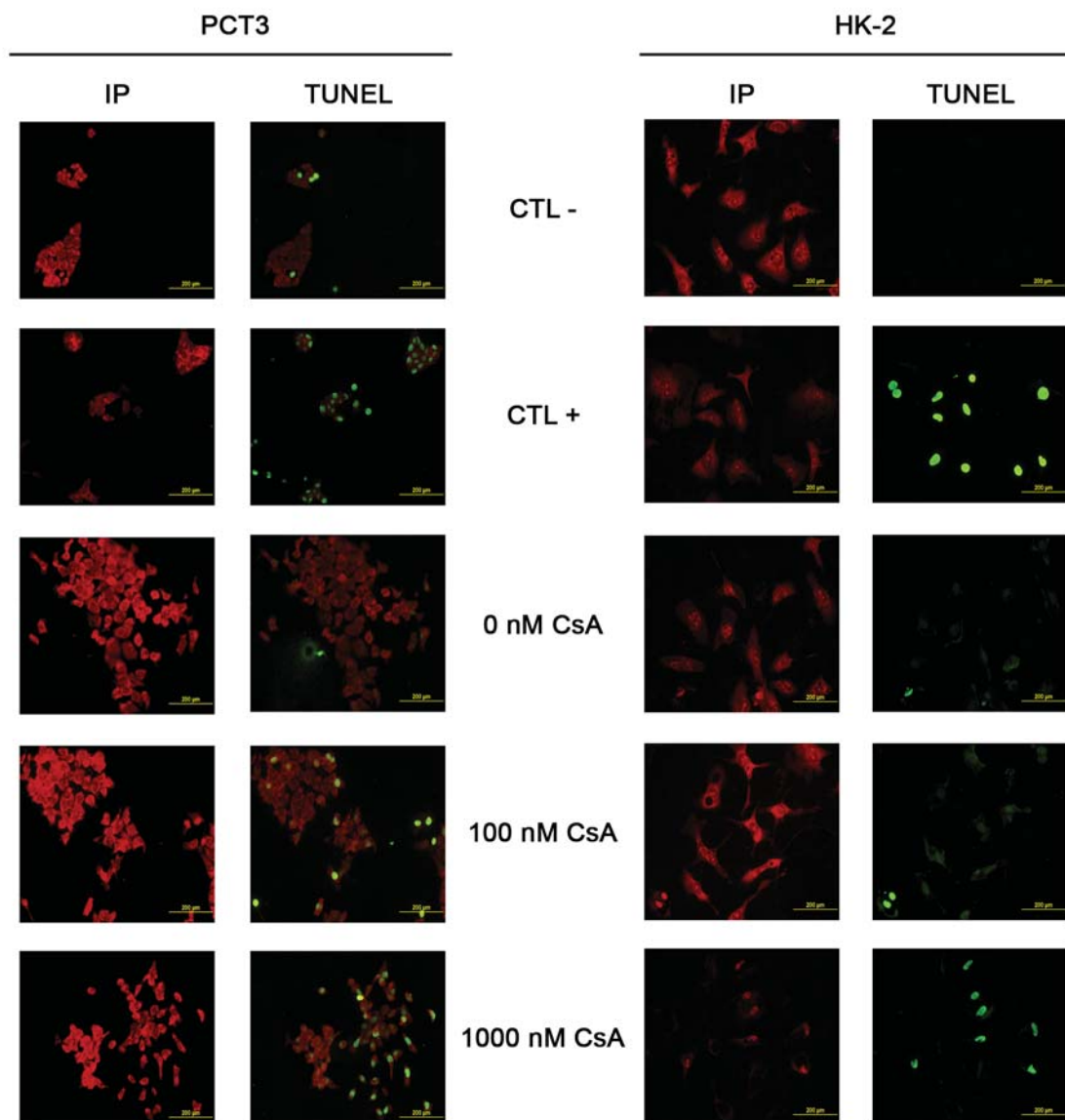


Figura 34. Apoptosi en cèl·lules PCT3 i HK-2 induïda per la CsA. Les cèl·lules PCT3 i HK-2 es tracten amb diferents dosis de CsA (entre 0 i 20 μ M) durant 24h. La mort cel·lular s'avalua per la tècnica de TUNEL. Les cèl·lules es contratenyeixen amb IP. La visualització s'ha dut a terme per microscòpia de fluorescència. CTL - : control negatiu; CTL+ : control positiu.

Com que tots els experiments fets al llarg d'aquesta tesi doctoral s'han realitzat amb el medi de cultiu complet, decidim quedar-nos amb els resultats d'apoptosi obtinguts amb la tècnica d'ELISA. Així, l'apoptosi cel·lular apareix a les dosis de 10 i 20 μ M de CsA coincidint també amb l'inici de la davallada de la viabilitat cel·lular. Aquests resultats també mostren que les cèl·lules PCT3 són més sensibles a l'apoptosi que les cèl·lules HK-2 (TAULA 20).

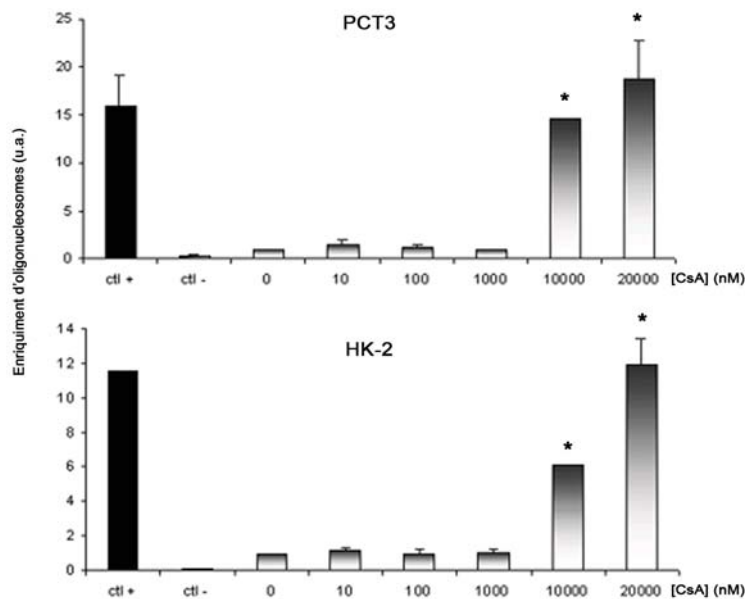


Figura 35. Enriquament oligonucleosomal en cèl·lules PCT3 i HK-2 induït per la CsA. Les cèl·lules PCT3 i HK-2 es tracten amb diferents dosis de CsA (entre 0 i 20 μ M) durant 24h. L'enriquament oligonucleosomal s'analitza mitjançant un assaig immunoenzimàtic. Es realitzen duplicats de cada situació i l'experiment es repeteix dues vegades. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm la desviació estàndard, * $p < 0.05$.

DOSI DE CsA	% CÈL·LULES TUNEL POSITIVES		ENRIQUIMENT MONO- I OLIGONUCLEOSOMAL (u.a.)	
	PCT3	HK-2	PCT3	HK-2
Control + (a)	97.2	100	15.9	11.5
Control - (b)	0	0	0.2	0.1
0 nM	2	3.3	1	1
10 nM	-	-	1.5	1.2
100 nM	21.7	19.8	1.2	1
1 μM	57.7	76	1	1
10 μM	No det*	No det *	14.5	6
20 μM	No det *	No det *	18.7	12

Taula 20. Quantificació de cèl·lules apoptòtiques per la tècnica de TUNEL i per la tècnica d'immunoassaig enzimàtic Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit. Per a l'assaig de TUNEL el percentatge de cèl·lules s'obté a partir del comptatge de 8 caps visuals obtinguts per microscòpia de fluorescència per a cada línia cel·lular. Per l'assaig d'ELISA s'han realitzat dos experiments independents amb duplicats per cada situació.

(a) Per l'assaig de TUNEL el control positiu consisteix en un tractament amb DNasa previ a la incubació amb l'enzim TdT. D'aquesta manera es fragmenta el DNA deixant els extrems 3'-OH lliures perquè s'hi puguin incorporar els nucleòtids marcats amb fluoresceïna. Pel que fa a l'assaig d'ELISA el control positiu són complexos estabilitzats formats per DNA-Histones.

(b) EL control negatiu de l'assaig de TUNEL, consisteix en incubar el tampó de marcatge en absència de l'enzim TdT, mentre que, per l'immunoassaig enzimàtic s'incuba tampó d'incubació en absència de lisat cel·lular.

*Valors no determinats. En aquestes condicions i concentracions de CsA les cèl·lules es desenganxen del cobreobjectes fent impossible la quantificació.

2. ESTUDI PROTEÒMIC DIFERENCIAL I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES IMPLICADES EN LA TOXICITAT RENAL PRODUÏDA PER LA CsA

El dany causat per la CsA a les cèl·lules tubulars renals derivades de ratolí (PCT3 i PR10) i humana (HK-2) és dosi i temps dependent. Temps molt curts de tractament amb diferents dosis de CsA causen una disminució de la capacitat reductora de les mitocondries (FIGURA 30). Aquesta disfunció mitocondrial es recupera totalment al cap d'unes hores d'haver iniciat el tractament (entre 2 i 7h) (FIGURA 31). Quan es prolonga el tractament durant 24, 48 i 72h amb el fàrmac immunosupressor, els efectes observats en la viabilitat i la mort cel·lular són diferents en funció de la dosi de CsA utilitzada, existint uns dosi llindar que correspon a la concentració de CsA 10 μ M. La viabilitat de cèl·lules tractades amb dosis de CsA inferiors a 10 μ M, roman intacte. El tractament amb dosis superiors, produeix una disminució de la viabilitat d'un 30 fins a un 70 % en funció del temps de tractament (FIGURA 29). La CsA en aquestes dosis i temps causa la mort cel·lular per apoptosi (FIGURES 34 i 35).

Què està passant a nivell molecular? Actualment es desconeixen quins són els mecanismes moleculars pels quals aquest fàrmac immunosupressor causa la toxicitat renal. Per aquest motiu, a continuació s'ha realitzat un estudi proteòmic diferencial que ens permetrà determinar a quina dosi de CsA canvia el perfil proteòmic i quines són les proteïnes i/o complexos proteics implicats en la toxicitat renal causada per la CsA.

2.1. ANÀLISI PROTEÒMIC DIFERENCIAL DE CÈL·LULES PCT3 TRACTADES AMB DIFERENTS DOSIS DE CsA

En primer lloc es realitza un anàlisi diferencial dels mapes proteòmics obtinguts de cèl·lules renals tubulars PCT3 tractades amb diferents dosis de CsA (FIGURA 36). Les cèl·lules han estat

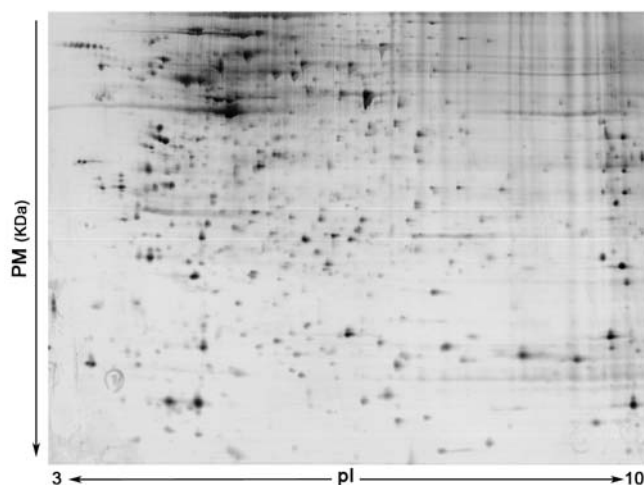


Figura 36. Mapa proteic de cèl·lules PCT3. L'electroforesi bidimensional consta de dues etapes. Una primera etapa que es basa en la separació proteica per punt isoelèctric (pI) seguida d'una segona etapa on les proteïnes es separen segons el seu pes molecular (PM). Tot seguit els mapes proteics resultants són tenyits amb plata i analitzats amb el programa informàtic PD-Quest.

sotmeses al tractament amb dosis creixents de CsA: 0, 10 nM, 100 nM, 1.000 nM, 10 μ M i 20 μ M de CsA durant 24h. Els proteomes obtinguts s'analitzen i es processen amb el programa PD-Quest de BIO-RAD. No ha estat possible analitzar la dosi més elevada de CsA (50 μ M) per falta de proteïna, ja que tal i com s'ha dit anteriorment en aquesta dosi hi ha molta mortalitat cel·lular (FIGURA 29).

Per aquest tipus d'estudi el programa informàtic PD-Quest s'utilitza per-

detectar proteïnes diferencialment expressades quan es sotmeten les cèl·lules al tractament amb CsA. El *software* permet l'anàlisi simultani dels mapes proteics corresponents a cada una de les dosis de CsA utilitzades. A partir dels 6 mapes proteics que es volen analitzar el programa crea una imatge digitalitzada que s'utilitza com a mapa proteòmic de referència. A continuació es trien zones del proteoma i s'observa el comportament de les proteïnes per a cada una de les dosis estudiades. Tal i com s'observa a la FIGURA 37, la variació de l'expressió proteica de la majoria de proteïnes analitzades es dona a partir de la concentració de CsA 10 µM. L'expressió proteica en aquesta situació pot augmentar, disminuir, aparèixer o desaparèixer respecte la situació control.

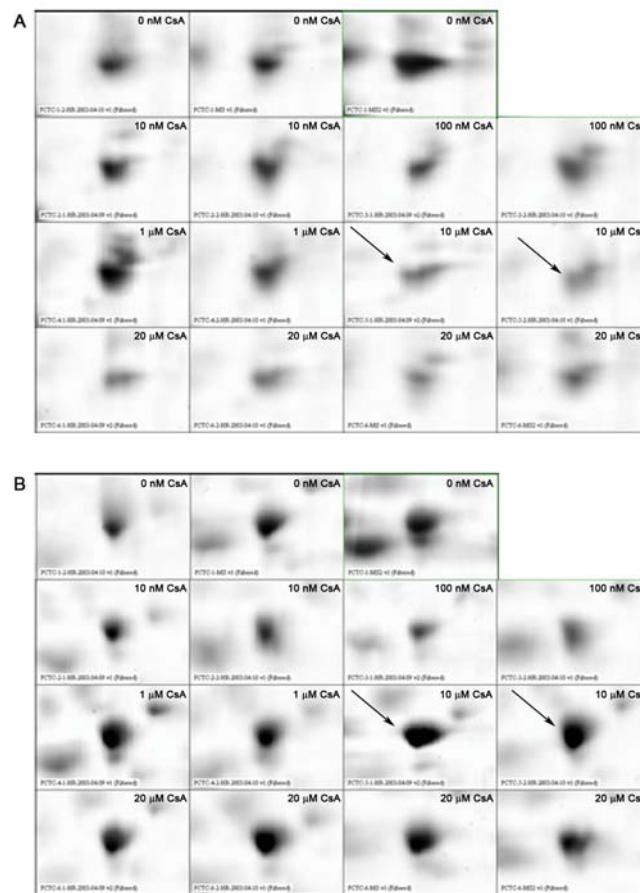


Figura 37. Comportament d'algunes proteïnes al sotmetre's al tractament amb dosis creixents de CsA. Després de tractar de les cèl·lules PCT3 amb dosis creixents de CsA durant 24h i resoldre l'electroforesi bidimensional, s'analitzen els mapes proteics obtinguts per a cada situació per estudiar l'evolució del proteoma al augmentar la dosis de CsA. En la majoria de proteïnes analitzades la variació de l'expressió proteica es dona a partir de la concentració de CsA 10 µM. A, B i C són proteïnes escollides a l'atzar. S'indica amb una fletxa la dosi on comença a canviar l'expressió proteica.

2.2. ANÀLISI PROTEÒMIC DIFERENCIAL DE CÈL·LULES PCT3 I CÈL·LULES PCT3 TRACTADES AMB 10 μ M CsA

2.2.1. Estudi proteòmic diferencial i identificació de proteïnes

En els diferents estudis realitzats fins ara en aquest treball, s'ha demostrat que la concentració de CsA 10 μ M és una dosi crítica a partir de la qual es posen de manifest varis esdeveniments cel·lulars tals com la disminució de la viabilitat cel·lular de manera dosi i temps dependent, la mort cel·lular per apoptosi, la disminució de la respiració mitocondrial i del percentatge de cèl·lules en fase S i per últim també s'ha demostrat que a aquesta dosi apareixen els canvis en l'expressió proteica.

En aquest apartat ens centrarem en aquest últim punt i per aquest motiu es realitza un estudi proteòmic diferencial entre cèl·lules PCT3 control i cèl·lules PCT3 tractades amb la dosi 10 μ M de CsA seguit de la identificació de proteïnes implicades en aquesta citotoxicitat causada pel fàrmac immunosupressor. Així, les cèl·lules PCT3 es sotmeten al tractament durant 24h amb 10 μ M de CsA. Després de la resolució i la tinció dels mapes proteics, especificat a l'apartat de MÈTODES, s'analitzen els triplicats de cada situació (control i tractats) amb el programa PD-Quest. En primer lloc, el programa crea una imatge idealitzada de cada situació. Seguidament, l'assignació proteica realitzada pel programa es valida visualment per tal de corregir les assignacions incorrectes. La intensitat de cada proteïna es normalitza respecte la suma d'intensitats de totes les proteïnes detectades. Finalment, s'agrupen els gels en dos grups: control i tractats, i el programa realitza un anàlisi diferencial entre els dos grups utilitzant un criteri estadístic (*t-student*). Per tal de verificar les proteïnes seleccionades pel programa informàtic es comproven visualment una a una. Finalment les proteïnes validades s'identifiquen per MALDI-TOF al servei de proteòmica de la Unitat Científico-Tècnica de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (FIGURA 38).

Al comparar les cèl·lules PCT3 control (n=3) amb les cèl·lules PCT3 tractades (n=3), es detecten 72 proteïnes diferencialment expressades, 38 de les quals han estat identificades ($p < 0.05$). Un 34% de les proteïnes identificades augmenten la seva expressió al ser sotmeses al tractament amb la CsA i el 66% la disminueixen (TAULA 21).

La identificació de proteïnes no es va aturar aquí, sinó que actualment al nostre laboratori s'està treballant per d'identificar el nombre màxim de proteïnes possible. Aquest, és un treball que deixa moltes portes obertes i molts camins interessants a ser explorats en un futur molt pròxim pel grup de Fisiopatologia Renal.

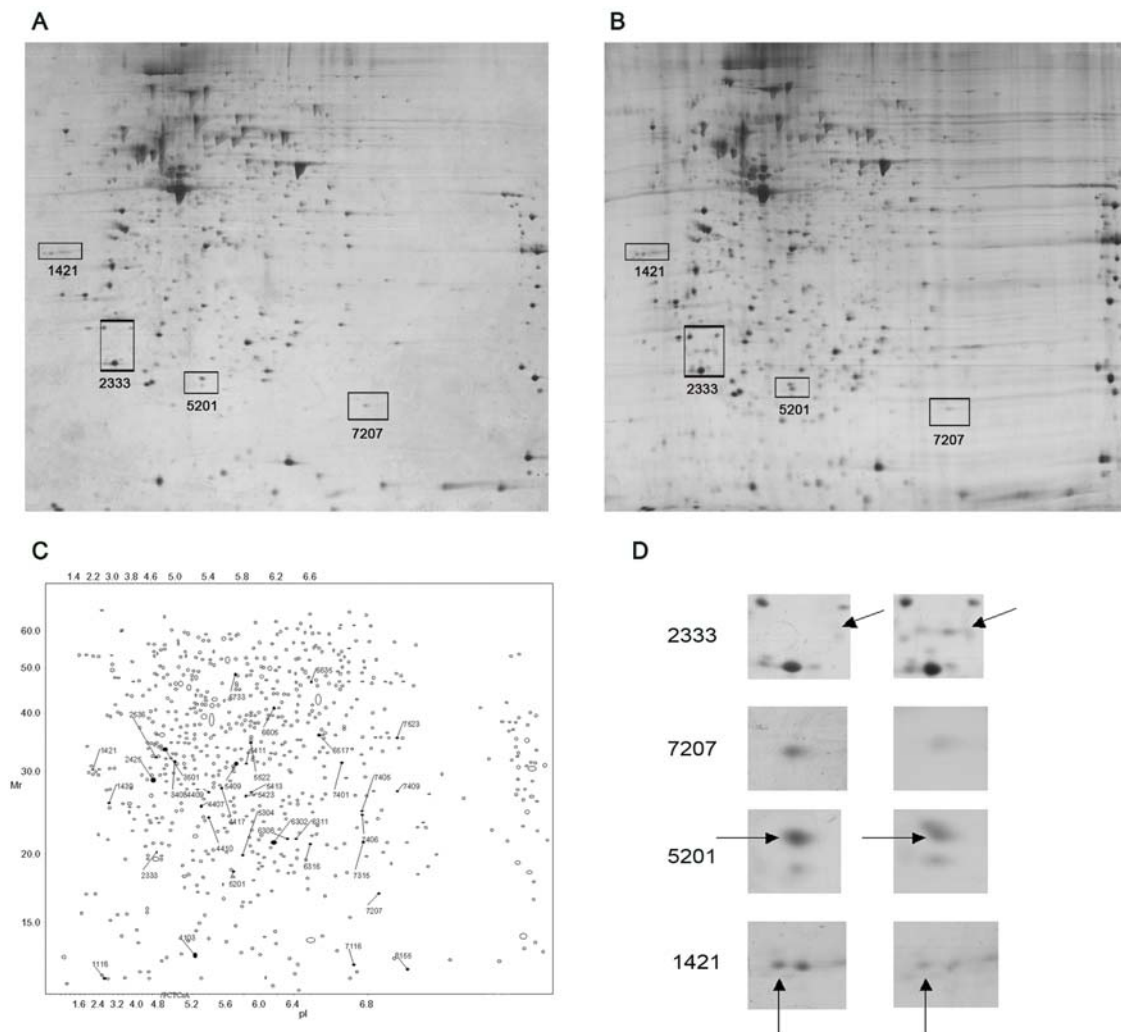


Figura 38. Anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 i cèl·lules PCT3 tractades amb CsA. En A i B es mostren mapes proteics representatius de cèl·lules control i cèl·lules tractades amb la concentració de CsA 10 μ M durant 24h respectivament. (C) Després de resoldre i tenir els proteomes, triplicats de cada situació són analitzats amb el programa PD-Quest creat per a cada situació. L'assignació proteica creada pel software és validada visualment. Les proteïnes validades són identificades per MALDI-TOF. (D) Exemples de proteïnes diferencialment expressades en presència de 10 μ M CsA. Amb fletxes s'indica la proteïna que varia la seva expressió al sotmetre-la al tractament amb CsA.

2.2.2. Agrupació i classificació de les proteïnes diferencialment expressades amb CsA

Els experiments de proteòmica generen gran quantitat d'informació. Aquesta informació es pot analitzar de manera ràpida i eficaç gràcies a l'aparició d'eines bioinformàtiques. En aquest treball, els dos programes informàtics utilitzats han estat el *MAPPFinder* i el *FatiGO*. Ambdós programes, es basen en les categories creades pel Consorci *Gene Ontology* (GO) (Ashburner M. et al., 2000). El Consorci GO és un projecte que uneix les bases de dades de tres organismes model com són *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Mus musculus* per tal de crear un vocabulari de termes GO controlat, precís, comú i estructurat que descriu el rol del gens i de les proteïnes de qualsevol organisme. Així, classifica la informació (gens, proteïnes...) en 3 categories (*ontologies*) clarament estructurades: i) procés biològic: es refereix a l' objectiu biològic el qual participa el gen o la proteïna, ii) funció molecular: és l'activitat bioquímica d'una proteïna, iii) component cel·lular: es

Spot ID	Protein ID	Access ID ^a (Swiss Prot)	CsA Effect	ANOVA	Theor. MW (KDa)	Exp. MW (KDa)	Theor. IP	Exp. IP	Score	Peptide match	% sequence coverage
1118	myosin light polypeptide 6	Q60605	Down	p<0.05	16,96	11,50	4,6	4,4	57	5	40
1421	NACA	Q60817	Down	p<0.03	23,37	30,32	4,52	4,3	109	8	35
1439	P32-RACK	Q8R5L1	Down	p<0.02	31,35	25,69	4,77	4,5	66	4	26
2424	PCNA	P17918	Down	p<0.03	29,09	29,48	4,57	4,7	161	10	45
2536	Nucleophosmin 1	Q5SQB0	Down	p<0.03	29,68	32,20	4,45	4,76	50	5	26
3408	HSP 8	Q6NZD0	Down	p<0.02	71,06	31,50	5,28	4,99	65	5	13
3518	HSP 8	Q6NZD0	Down	p<0.05	71,06	35,71	5,28	5,04	58	5	10
4103	Eukariotic traslation initiation factor 5A	Q5NCX0	Down	p<0.02	16,52	12,80	4,85	5,20	98	13	47
4409	APC-binding protein EB1	Q61166	Down	p<0.006	30,17	27,12	5,12	5,39	90	8	48
5201	ATP synthase D chain, mitochondrial	Q9DCX2	Down	p<0.005	18,62	18,60	5,53	5,70	64	6	31
5403	Prohibitin	P67778	Down	p<0.05	29,86	25,90	5,57	5,60	75	6	27
5522	isocitrate dehydrogenase	Q9D6R2	Down	p<0.02	36,71	34,60	5,6	5,89	71	5	21
6302	peroxiredoxin 6	O08709	Down	p<0.05	24,84	21,20	5,72	6,20	104	8	50
6308	peroxiredoxin 4	Q9D634	Down	p<0.05	31,26	21,55	6,67	6,32	65	6	28
6311	HSP 25-HSP 27 (inter del variant)	P14602	Down	p<0.02	22,02	21,55	6,45	6,43	53	4	32
6316	peroxiredoxin 6	O08709	Down	p<0.05	24,74	21,00	5,72	6,60	76	5	18
6517	alpha-complex protein 1	P60335	Down	p<0.02	37,99	35,91	6,66	6,63	104	12	50,6
6605	Actin cytoplasmic 2	P63260	Down	p<0.007	41,34	41,00	5,56	6,16	118	10	39
6635	uridin monophosphate synthetase	Q544K9	Down	p<0.02	52,77	46,65	6,17	6,60	76	9	16
7116	CypA	P17742	Down	p<0.05	18,00	12,27	7,88	6,75	63	5	41
7207	alpha-crystallin	P23927	Down	p<0.02	20,06	17,20	6,76	6,84	175	14	66
7406	S-Methyl-5-thioadenosine phosphorilase	Q9CQ65	Down	p<0.04	31,61	24,25	6,71	6,78	82	12	39
7406	glutathione transferase omega-1	O09131	Down	p<0.04	27,50	24,25	6,91	6,78	110	14	57
7409	electron-transfer flavoprotein alpha subunit	Q99LC5	Down	p<0.05	35,00	27,22	8,62	7,2	136	16	50
7523	T-complex protein 1	Q8CAY6	Down	p<0.04	41,30	35,44	7,16	7,2	68	8	28
8155	CypA	P17742	Down	p<0.04	18,00	12,01	7,88	7,3	94	9	72
2333	TCTP	P63028	Up	p<0.04	19,46	20,17	4,76	4,77	62	8	38
3501	Nucleophosmin 1	Q5SQB0	Up	p<0.02	29,68	33,46	4,45	4,87	92	11	38
4407	Chloride intracellular channel protein 1	Q9Z1Q5	Up	p<0.002	27,21	25,29	5,09	5,30	119	9	45
4410	pyruvate kinase M2	P52480	Up	p<0,05	57,78	23,92	7,42	5,39	77	10	31
4417	Annexin A4	P97429	Up	p<0.04	35,86	27,70	5,43	5,50			
5304	Proteasome subunit beta 4	Q91VV7	Up	p<0.03	29,23	19,88	5,47	5,79	64	8	35
5409	Annexin A3	O35639	Up	p<0.02	36,39	31,19	5,33	5,72	282	24	58
5411	F-actin capping protein alpha-2 subunit	P47754	Up	p<0.0004	32,93	31,19	5,58	5,84	112	10	54,7
5413	Purine nucleoside phosphorilase	P23492	Up	p<0.04	32,54	27,11	5,93	5,90	166	19	55
5733	Keratin II cytoskeletal 8	P11679	Up	p<0.03	53,21	48,44	5,42	5,70	124	14	36
7315	proteasome subunit alpha2	P49722	Up	p<0.03	25,79	21,22	8,42	6,79	77	9	49
7401	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	Q99LC5	Up	p<0.04	35,36	31,33	8,62	6,71	68	6	26
7405	S-methyl-5-thioadenosine phosphorilase	Q9CQ65	Up	p<0.05	31,61	24,71	6,71	6,78	82	12	39
7405	Glutathione transferase omega-1	O09131	Up	p<0.05	27,50	24,71	6,91	6,78	10	42	51.3

Taula 21. Proteïnes diferencialment expressades de cèl·lules PCT3 tractades amb la dosi de 10 µM de CsA. El número de proteïna (spot identification, ID), correspon al número assignat a la proteïna pel programa PD-Quest. De cada proteïna s'indica el nom, l'efecte que li produeix el tractament amb la CsA, el pes molecular (PM) i el punt isoelèctric (PI) experimental i teòric, el número d'accés de la proteïna a la base de dades SwissProt, 3 paràmetres informatius de la probabilitat de què la identificació proteica sigui certa.

refereix al lloc de la cèl·lula on la proteïna és activa. Cada categoria s'estructura en termes. Aquests termes GO creen una xarxa en què les connexions entre ells s'anomenen nodes. De manera que les connexions entre els diferents nodes (pares i fills) formen els gràfics acíclics (FIGURA 39).

Degut a que la informació sobre la funció de la majoria proteïnes és incompleta i molt dinàmica cada node està relacionat amb altres bases de dades com per exemple el *SwissProt*. Per tant les categories GO són actives, de manera que la xarxa varia en funció de la informació acumulada.

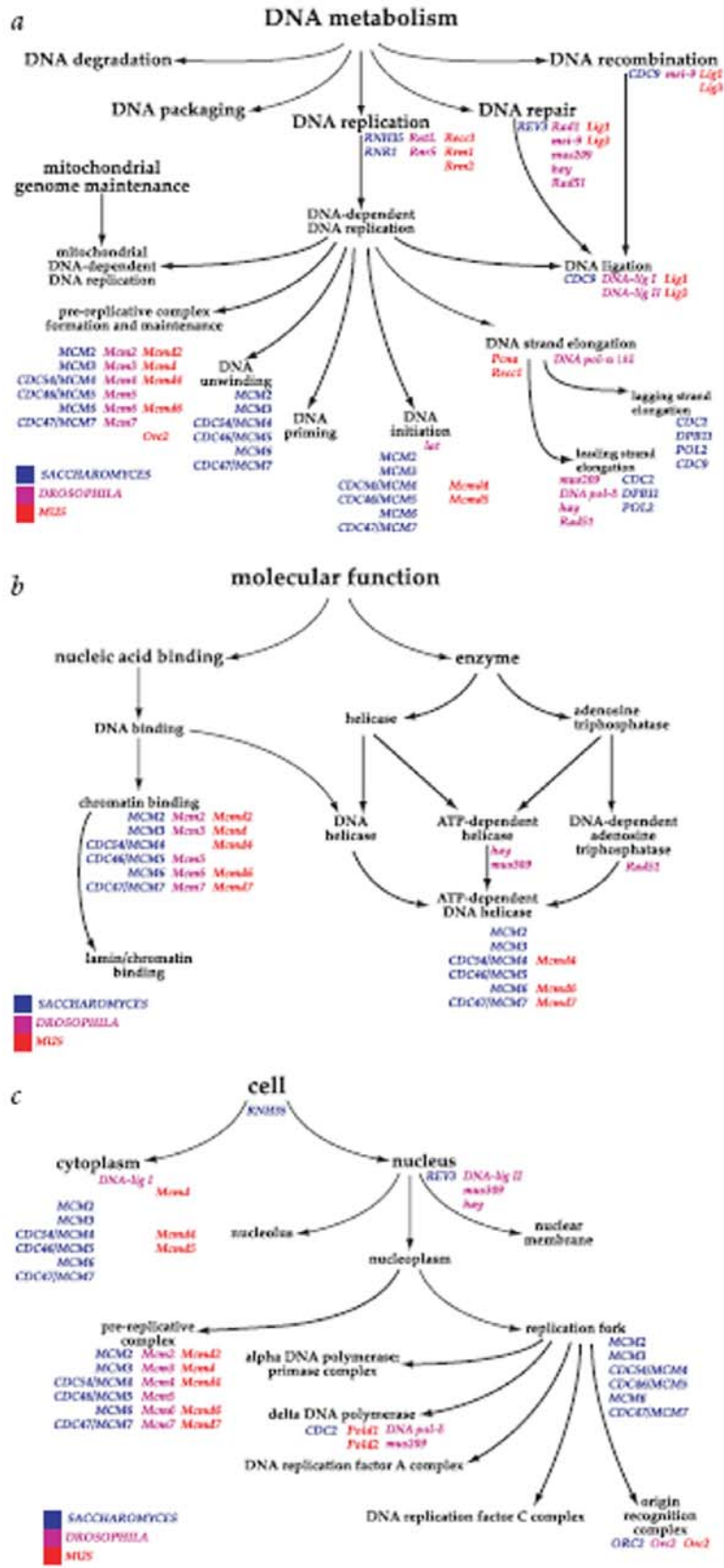


Figura 39. Exemples de classificació del GO. Aquests 3 exemples mostren l'estructura utilitzada pel Consorci GO alhora de representar les categories i com els gens o proteïnes s'associen amb nodes dins de cada categoria. (a) Es mostra una part de la categoria procés biològic on es descriu el metabolisme del DNA. S'observa com un node pot tenir més d'un pare, així per exemple, *DNA ligation* té 3 pares. (b) Categoria funció molecular. S'observa com una proteïna es pot associar a més d'un node dins de la mateixa categoria GO. (c) Categoria component cel·lular (Extret i modificat de Ashburner M. et al., 2000).

El *FatiGO* (*Fast assignment and Transference of information*) és una eina que divideix gràficament en nivells cada una de les categories basades en la classificació GO, classificant les proteïnes en funció del percentatge que representen dins de cada categoria (Al-Sahrou F. et al., 2004; Al-Sahrou F. et al., 2005) (FIGURA 40). El *MAPPFinder* (Doniger S.W. et al., 2003) és un programa informàtic accessori que treballa juntament amb el *GenMAPP* (*Gene MicroArray Pathway Profiler*) (Dahlquist K.D. et al., 2002) i amb la classificació del projecte GO. El *MAPPFinder* relaciona els canvis d'expressió proteica observats (augment, disminució, aparició o desaparició) per a cada una de les categories GO, calculant el percentatge de proteïnes que varien en cada procés biològic, component cel·lular i funció molecular. Creant un gràfic complet del nombre de proteïnes associades a un terme GO concret. En el nostre cas, després de donar-li al programa el llistat de proteïnes diferencialment expressades, aquest, busca els termes GO associats a aquestes proteïnes, calculant la probabilitat de cada associació. A continuació el programa informàtic crea un arbre on mostra les proteïnes associades a cada terme GO indicant per un sistema de colors quina troba modificada i un llistat amb les associacions trobades per ordre de probabilitat. Al seleccionar un terme GO concret, dibuixa el grup funcional associat al les proteïnes diferencialment expressades (FIGURA 41).

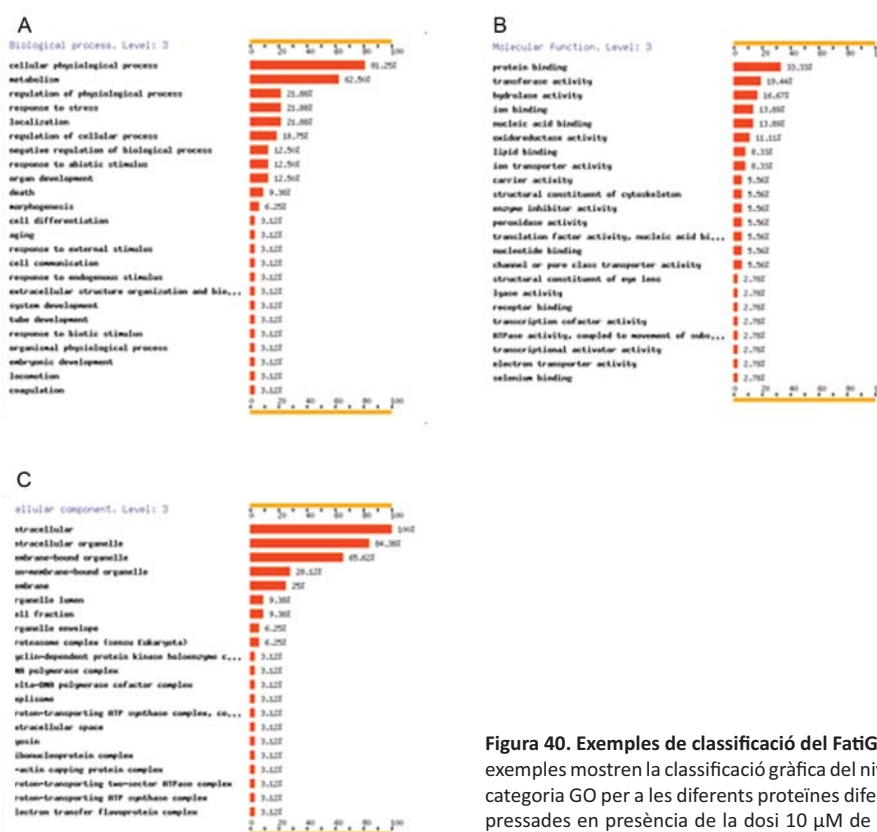


Figura 40. Exemples de classificació del *FatiGO*. Aquests tres exemples mostren la classificació gràfica del nivell 3 per a cada categoria GO per a les diferents proteïnes diferencialment expressades en presència de la dosi 10 µM de CsA. (A) Procés biològic, (B) funció molecular i (C) component cel·lular.

L'ús de les diferents eines informàtiques anteriorment explicades i la recerca bibliogràfica per a cada proteïna identificada ens ha permès agrupar les proteïnes segons 6 categories diferents: metabolisme de proteïnes (21%), resposta al dany cel·lular (21%), organització cel·lular i citoesquelet (20%), metabolisme energètic (13%), cicle cel·lular (11%) i metabolisme d'àcids nucleics (7%).

Organització cel·lular i citoesquelet: cadena lleugera de la miosina 6, *APC-binding protein EB1*, HSP 25-HSP 27 (inter del variant), Actina citoplasmàtica 2, TCTP, Annexin aA4, CAPZA (*F-actin capping protein alpha-2 subunit*), Keratin II cytoskeletal 8 i Nucleofosmina 1.

Cicle cel·lular: PCNA, HSP 8, *APC-binding protein EB1*, Prohibitina i Nucleofosmina 1.

Resposta al dany cel·lular: Nucleofosmina 1, peroxiredoxina 6, HSP 25-HSP 27 (inter del variant), α -cristalina, TCTP (*Translationally controlled tumor protein*), peroxiredoxina 4, Glutathione transferase omega-1, HSP 8, PCNA i *S-methyl-5-thioadenosine phosphorilase*.

Metabolisme enrgètic: cadena D de l'ATP sintetasa mitocondrial *, Prohibitina *, isocitrat deshidrogenasa, *electron-transfer flavoprotein alpha subunit **, T-complex protein 1 i piruvat quinasa M2.

* relacionades amb la cadena de transport d'electrons

Metabolisme de proteïnes: NACA (*nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-2*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), Nucleofosmina 1, HSP 8 (*heat shock protein*), eIF5A (*Eukariotic traslation initiation factor 5A*), complex- α de la proteïna 1, CypA, subunitat- β 4 del proteosoma, subunitat- α 2 del proteosoma i α -B-cristalina.

Metabolisme d'àcids nucleïcs: uridin monophosphate synthetase, S-Methyl-5-thioadenosine phosphorilase i Purine nucleoside phosphorilase.

Altres: P32-RACK, Chloride intracellular channel protein 1 i Annexin A3.

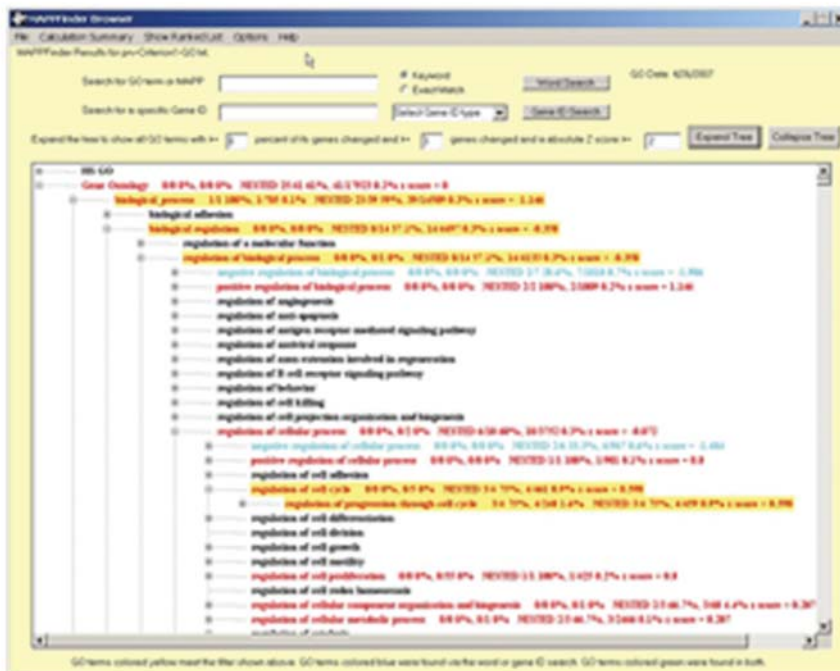


Figura 41. Exemple de classificació del MAPPFinder. Dibuix d'un grup funcional on s'hi observen les proteïnes diferencialment expressades per ordre de probabilitat.

2.2.3. Comprovació d'algunes de les proteïnes identificades per *Western blot*

Tal i com s'ha dit anteriorment s'han identificat per espectrometria de masses 38 proteïnes de les 72 diferencialment expressades. Totes les proteïnes identificades són bones candidates a ser estudiades més a fons i per tant, poder determinar quina és participació de cada una d'elles en la toxicitat renal creada per la CsA a la concentració de 10 μ M. En primer lloc però, cal verificar per *Western blot* que el seu comportament (és a dir si la seva expressió augmenta, disminueix, apareix o desapareix en presència de CsA) sigui el mateix que el trobat en l'anàlisi proteòmic diferencial. Les proteïnes elegides són: α -B-cristalina, RACK-1, NACA (*nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-2*), eIF5A (*eucariotic translation initiation factor 5A*), CAPZA (*F-actin capping protein alpha-2 subunit*) i ciclofilina A (CypA). Es trien aquelles proteïnes que els seus anticossos reconeixen rata, ratolí i humà i que sigui vàlids per *Western blot* i immunohistoquímica.

L'expressió proteica d'aquestes sis proteïnes s'ha estudiat en cèl·lules PCT3 i també en ronyons de ratolins. Les cèl·lules PCT3, després d'haver estat tractades durant 24h amb 10 μ M de CsA es recullen i s'obtenen els extractes proteics que s'analitzen per SDS-PAGE (1 dimensió), *Western blot* i es quantifiquen per densitometria (vegeu l'apartat 7.2.2 dels MÈTODES). Així mateix s'han analitzat i quantificat els extractes proteics procedents de ronyons de ratolins control i tractats amb CsA durant 14 dies amb 80 mg/kgxdia de CsA, que han estat amablement cedits per la Dra. Olga Tornavaca del mateix grup de Fisiopatologia Renal, de l' HUVH. S'utilitzen aquestes dosis i temps perquè alteren la funció renal augmentant els nivells de creatinina i urea en sang. En ambdós casos s'ha utilitzat l'actina o la MAPKt com a control de càrrega.

Previ a la comprovació de l'expressió proteica de cada una de les proteïnes elegides, es van posar a punt els diferents anticossos. S'ha de dir que els anticossos corresponents a les proteïnes eIF5A i CAPZA tot i provar gran quantitat de variacions encara no funcionen. Per tant, finalment la verificació dels resultats obtinguts per la tècnica de 2D s'ha realitzat per les proteïnes α -B-cristalina, RACK-1, NACA i CypA.

Si s'observa la Taula 21, l'expressió d'aquestes proteïnes en l'anàlisi proteòmic diferencial disminueix en presència de CsA. Així mateix, el *Western blot* de la Figura 42, mostra com les proteïnes α -B-cristalina, NACA presenten una disminució de l' expressió entre un 60-70% quan les cèl·lules PCT3 són sotmeses al tractament amb la CsA 10 μ M durant 24h (Figura 42A). Pel que fa a la proteïna CypA, les dues concentracions de CsA testades indiquen, igual que l'assaig XTT, que la disminució de l'expressió proteica és dosi dependent, essent la concentració de 10 μ M la que produeix els canvis d'expressió proteica més evidents. Aquest fet s'observa tant en cèl·lules PCT3 com en cèl·lules HK-2 (Figura 42B). Per últim, es pot observar que l'expressió de la proteïna RACK-1 roman inalterada (Figura 42A).

La pregunta que ens fem a continuació és per què l'expressió de la proteïna RACK-1 disminueix en l'anàlisi proteòmic diferencial i no es veu modificada en el *Western blot*? Seguidament i per tal de respondre aquesta pregunta, es realitza de nou un *Western blot* per a les proteïnes RACK-1 i α -B-cristalina i CypA, però ara, a partir de gels procedents d'una electroforesi bidimensional (que

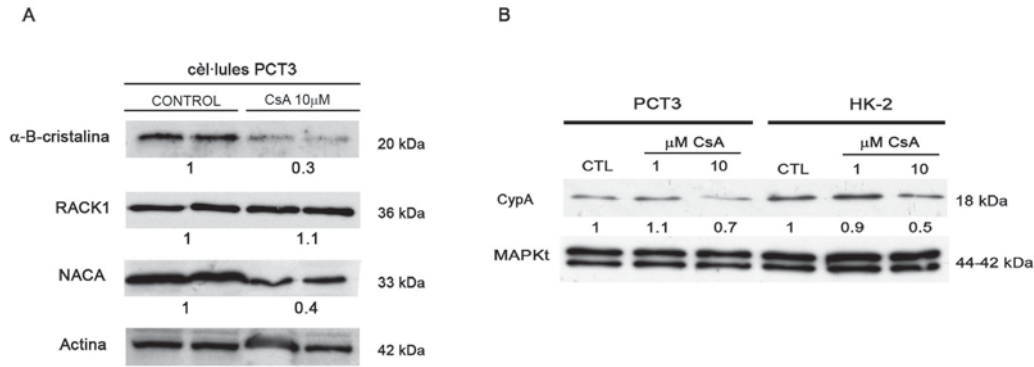
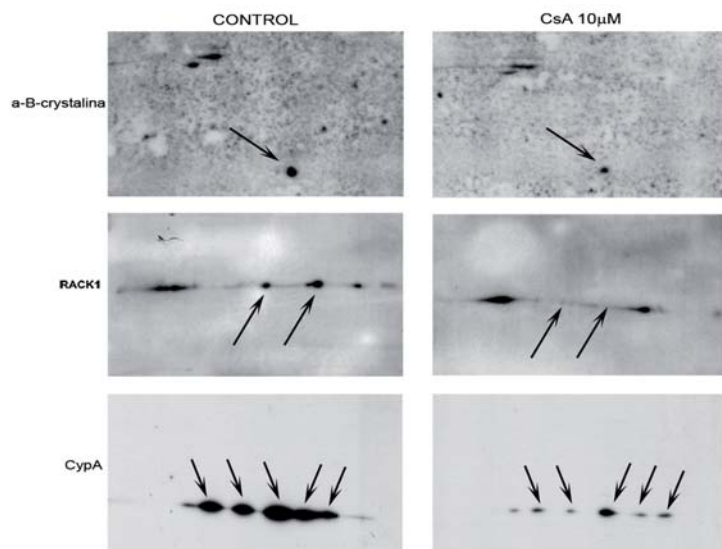


Figura 42. Anàlisi de l'expressió proteica d'algunes proteïnes diferencialment expressades al sotmetre les cèl·lules PCT3 al tractament amb CsA 10 μ M. Les cèl·lules PCT3 o HK-2 es tracten durant 24h a la dosi anteriorment descrita. A continuació s'obtenen els lisats cel·lulars i es resolten en un SDS-PAGE al 12% diferents quantitats de proteïna en funció de l'anticòs a utilitzar. (A) Western blot (descriu a l'apartat de MATERIALS I MÈTODES) per a les proteïnes α -B-cristalina, RACK-1 i NACA. (B) Western blot (descriu a l'apartat de MATERIALS I MÈTODES) per a la CypA. En números el resultat de la densitometria.

són els mateixos a partir dels quals s'ha realitzat l'anàlisi proteòmic diferencial). Tal i com s'observa a la FIGURA 43, els resultats provinents de gels de 1D amb els provinents de gels 2D correlacionen per les proteïnes CypA i α -B-cristalina, però això no passa per la proteïna RACK-1 (FIGURA 43). Les proteïnes RACK-1 i CypA presenten diferents isoformes en els gels bidimensionals que es veuen afectades de manera diferent al tractament amb CsA. Mentre la CsA provoca una disminució en totes les isoformes de CypA, només afecta a dues isoformes minoritàries de RACK-1 que desapareixen quan tractem les cèl·lules amb l'immunosupressor (FIGURA 43). La desaparició d'aquestes dues isoformes minoritàries en presència de CsA no té cap impacte sobre els nivells totals de proteïna quan s'analitzen per *Western blot* en gels d'una dimensió (FIGURA 42). Per tant, fixem-nos que mentre l'anàlisi de gels bidimensionals pot revelar canvis proteics importants des d'un punt de vista fisiopatològic, aquests poden passar desapercebuts en un anàlisi utilitzant gels d'una dimensió.



Tal i com s'ha esmentat anteriorment, aquests mateixos anticossos s'han analitzat en ronyons de ratolí tractats amb CsA. Tal i com s'observa a la FIGURA 44 els resultats trobats són molt similars als obtinguts per a les cèl·lules PCT3 exceptuant per a la proteïna CypA que presenta els mateixos nivells proteics en els ronyons de ratolins tractats i controls (FIGURA 44).

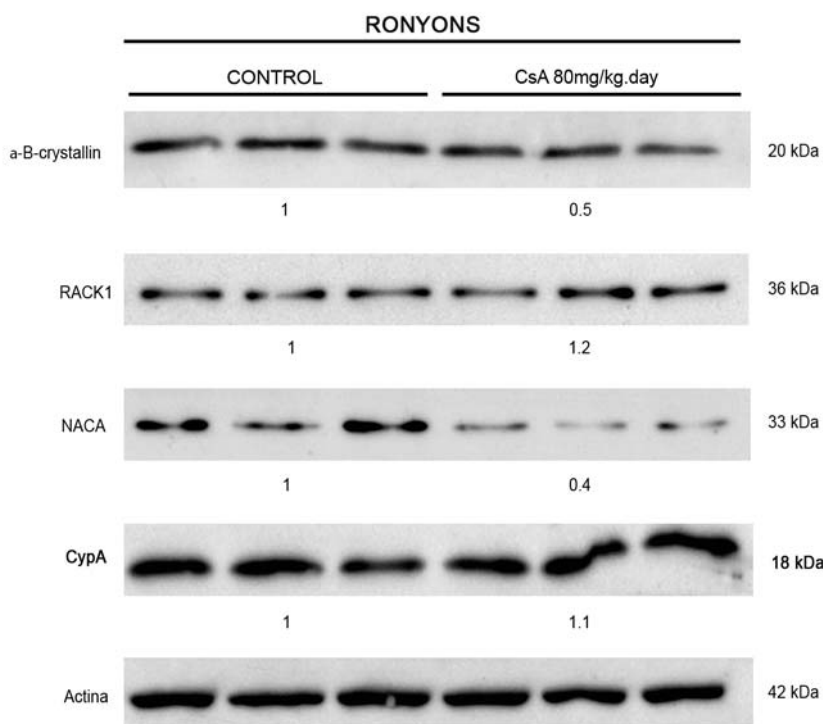


Figura 44. Anàlisi de l'expressió proteica d'algunes proteïnes diferencialment expressades al sotmetre els ratolins al tractament amb CsA (80 mg/kg.dia) durant 14 dies. Un cop tractats els ratolins s'extreuen els ronyons. Els extractes proteics obtinguts han estat cedit per la Dra. Olga Tornavaca. Western blot (descriu a l'apartat de MATERIALS I MÈTODES) per a les proteïnes α -B-cristalina, RACK-1, NACA i CypA. En números el resultat de la densitometria.

2.3. ANÀLISI PROTEÒMIC DIFERENCIAL DE CÈL·LULES PCT3 I CÈL·LULES HK-2

2.3.1. Estudi proteòmic diferencial i identificació de proteïnes

En els diferents estudis de viabilitat i de toxicitat cel·lular, s'ha demostrat que les cèl·lules tubulars renals d'origen humà, HK-2, es comporten de manera molt similar a les cèl·lules tubulars renals de ratolí PCT3. L'objectiu del següent estudi és determinar com s'assemblen els dos proteomes en absència i presència de CsA i si les proteïnes diferencialment expressades són les mateixes en els dos models cel·lulars. Les cèl·lules PCT3 i HK-2 es tracten i es processen tal i com es descriu als MÈTODES. Seguidament i per tal de poder comparar els dos proteomes, s'afegeix a l'anàlisi proteòmic de les cèl·lules PCT3 (vegeu l'apartat 2.2.1 del MÈTODES), els proteomes corresponents a les cèl·lules HK-2, i el programa PD-Quest realitza l'aparellament de proteïnes. Aquest programa

informàtic busca per a cada proteïna identificada a les cèl·lules PCT3 la seva parella en el mapa proteòmic de les cèl·lules HK-2. Aquest no és un procés trivial ni automàtic ja que entre les proteïnes humanes i de ratolí poden existir petites variacions de pes molecular i punt isoelèctric, això fa que a simple vista els mapes proteics no es vegin iguals i que per tant s'hagi d'ajudar al programa a fer l'assignació (FIGURA 45A i 45B). Així, es treballa amb zones ampliades, de manera que l'aparellament proteic es pot realitzar més fàcilment (FIGURA 45C). El resultat d'aquest estudi és que només 3 proteïnes queden desapparellades.

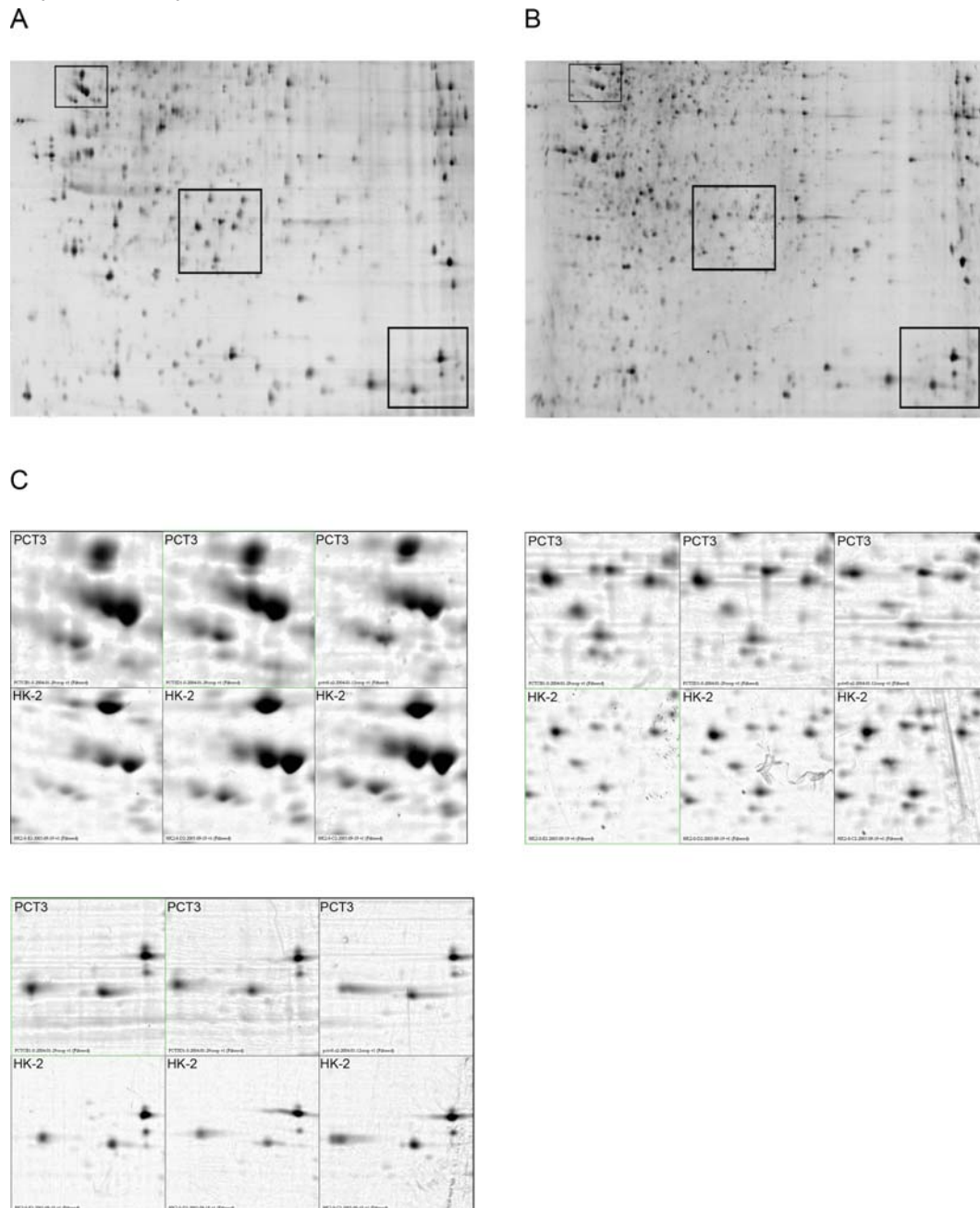


Figura 45. Anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 i cèl·lules HK-2. (A) Mapa proteic de cèl·lules PCT3. (B) Mapa proteic de cèl·lules HK-2. Els requadres són les zones ampliades a (C). Quan es realitza la comparació detallada entre els dos proteomes s'observa que totes les proteïnes excepte 3 estan aparellades.

2.3.2. Validació del model cel·lular PCT3

Per tal de confirmar aquesta equivalència, el que es fa a continuació és seqüenciar 11 proteïnes a l'atzar. Aquestes proteïnes, segons l'aparellament fet anteriorment, són la mateixa en les dues espècies cel·lulars. La seqüenciació confirma que realment es tracta de la mateixa proteïna (TAULA 22).

Spot ID mouse	Acces Nº mouse (Swiss Prot)	Protein ID	Spot ID human	Acces Nº human (Swiss Prot)	Score	Peptide match	% sequence coverage
1008	Q60605	myosin light polypeptide 6	1204	P60661	58	5	49
1118	Q60605	myosin light polypeptide 6	1219	P60661	70	4	36
1421	Q60817	NACA	1516	S49326	68	5	26
2424	P17918	PCNA	1444	A27445	161	10	45
4103	Q5NCX0	Eukariotic traslation initiation factor 5A (fragm)	2204	Q6EWQ7	95	8	46
6311	P14602	HSP 25-HSP 27 (inter del variant)	4414	P04792	75	7	59
8155	P17742	CypA	5214	P62938	79	4	45
2333	P63028	TCTP/IgE- dependent histamine-releasing factor	1333	P13693	62	7	31
2327	P63028	TCTP/IgE- dependent histamine-releasing factor	1318	P13693	95	9	37
2533	P14206	Ribosomal protein RS40/laminin receptor	1530	P08865	96	9	41
6109	P18760	Cofilin, non-muscle isoform (cofilin-1)	4317	P23528	99	6	25
6413	Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.4)	5402	P18669	170	12	49

Taula 22. Proteïnes d'humà i de ratolí seqüenciades per a confirmar la semblança entre els dos proteomes. Per a cada proteïna s'indica l' *spot identification*, ID, que correspon al número assignat a la proteïna pel programa PD-Quest per a cada mapa proteic. També s'indica el número d'accés de la proteïna a la base de dades *SwissProt* i 3 paràmetres informatius de la probabilitat de què la identificació proteica sigui certa.

Aquests resultats demostren la semblança dels dos proteomes cel·lulars i validen les cèl·lules PCT3 com a model cel·lular per l'estudi de la toxicitat renal produïda pel fàrmac immunosupressor CsA.

3. ELIMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES CICLOFILINES A I B MITJANÇANT RNA D'INTERFERÈNCIA (RNAi)

El terme RNA d'interferència (RNAi) va ser utilitzat per primera vegada al 1998 per Fire i col·laboradors per descriure el bloqueig de l'expressió gènica observat a l'introduir a l'interior de *C. elegans* una doble cadena de RNA (*double strand RNA*, dsRNA). Posteriorment l'RNAi va ser observat i àmpliament estudiat en insectes (Kennerdell J.R. et al., 1998) i ratolins (Svoboda P. et al., 2000). Aquest fenomen es troba estretament lligat amb el silenciament gènic post transcripcional (*post transcriptional gene silencing*, PTGS) descrit en plantes per Hamilton A.J. et al., 1999.

La funció natural de l' RNAi i del PTGS és la protecció del genoma vers la invasió de virus o transposons, que produeixen dsRNA o RNA aberrants, quan aquests s'activen a l'interior la cèl·lula hoste. La degradació específica de l' RNA missatger (mRNA) preveu/evita la replicació del virus i/o del transposó (Elbashir S.M. et al., 2001).

Malgrat haver-hi nombrosos estudis de silenciament gènic produït per la dsRNA en embrions de ratolí i en algunes cèl·lules de mamífer, la seva utilitat en la majoria de cultius de cèl·lules de mamífer és limitada degut a que la introducció de dsRNA a l'interior de les cèl·lules desencadenen respostes inespecífiques com la síntesi de l'interferó (Elbashir S.M. et al., 2002). Zamore P.D. i col·laboradors l'any 2000 van descobrir que la introducció de molècules de doble cadena d'RNA de longitud entre 21-23 nucleòtids (*small interference RNA*, siRNA) a l'interior de cèl·lules de mamífer produïa el silenciament gènic sense desencadenar respostes inespecífiques. Aquestes molècules de siRNA un cop a l'interior de la cèl·lula s'uneixen a un complex ribonucleotèic anomenat RISC (*RNA induced silencing complex*), que dirigit pels siRNA reconeixerà l'mRNA que conté la seqüència homòloga, la qual donarà lloc a l'eliminació total o parcial del gen (Bernstein E. et al., 2001).

En els últims anys l'RNAi s'ha convertit en una potent eina genètica. Aquest descobriment ha accelerat l' anàlisi del genoma humà a través de la genètica inversa.

Les ciclofilines són un grup de proteïnes intracel·lulars distribuïdes de forma ubiqua en diferents tipus cel·lulars i òrgans, inicialment identificades com a receptors del fàrmac immunosupressor CsA. Les ciclofilines també posseeixen activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa, que és inhibida quan s'uneixen al seu lligand.

Tot i que el mecanisme d'acció de la CsA sobre el sistema immunitari ha estat ben caracteritzat (vegeu els apartats 2.3 i 2.4 de la INTRODUCCIÓ), es coneix molt poc sobre els mecanismes teixit i cèl·lula específics implicats en el dany renal produït per la CsA, l'efecte secundari més indesitjat. Tampoc es coneix quina és la participació de la CypA i/o la CypB en la nefrotoxicitat.

Per tots aquests motius, s'ha procedit a l'eliminació de l'expressió gènica de les ciclofilines CypA i CypB, mitjançant RNAi. Seguidament s'ha estudiat la sensibilitat de les cèl·lules tubulars renals a la CsA en absència dels seus receptors i quines són les proteïnes que es veuen afectades quan s'elimina l'expressió de les ciclofilines A i B.

3.1. ELIMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES CICLOFILINES A I B

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, l'eliminació de l'expressió de les ciclofilines A i B s'ha realitzat mitjançant l' RNA d'interferència. A continuació es descriuen els resultats obtinguts per als diferents protocols utilitzats.

3.1.1. Transfecció transitòria del vector d'expressió mU6pro

En primer lloc cal dir que es comença eliminant l'expressió de la proteïna CypB. Cèl·lules PCT3 es cotransfecten amb quantitats creixents del constructe mU6CypB (0, 1.6 i 6.4 µg) i amb el plàsmid d'expressió pEGFP (4 µg). Després de 72h, les cèl·lules es tripsinitzen (vegeu l'apartat 5.1.1 dels MÈTODES) i mitjançant citometria de flux es separen aquelles cèl·lules que han incorporat els constructes mU6CypB i pEGFP de les que no. Tal i com s'observa a la Taula 23 els percentatges de transfecció són molt baixos, fet que dificulta la quantificació de la disminució de l'expressió de la ciclofilina B per *Western blot* i RT-PCR quantitativa i la realització dels posteriors anàlisis de sensibilitat a la CsA i proteòmic.

QUANTITAT DE CONSTRUCTE mU6 CypB TRANSFECTAT *(µg)	EFICIÈNCIA TRANSFECCIÓ (%)
0	12.6
1.6	13.3
6.4	8.8

Taula 23. Eficiències de transfecció del vector d'expressió mU6pro. Cèl·lules PCT3 es cotransfecten amb diferents quantitats del constructe mU6pro i el plàsmid d'expressió pEGFP. 72h post-transfecció, es calcula l'eficiència de transfecció mitjançant citometria de flux. * la quantitat de plàsmid pEGFP transfectat en totes les situacions és de 4 µg.

L'eficiència de transfecció de les cèl·lules PCT3 no millora tot i utilitzar altres agents caotrópics o inclús l'eletroporació.

3.1.2. Transfecció transitòria de siRNA sintetitzats químicament i marcats amb Cy3

Aquests resultats preliminars condueixen a pensar en una transfecció estable del siRNAs. Amb aquest tipus de transfecció els siRNA no només s'incorporaran a totes les cèl·lules sinó que també permetran l'observació dels efectes del silenciament gènic més enllà de les 72 hores post-transfecció. Previ a la transfecció estable, però, es transfecten de forma transitòria 3 siRNA per a cada una de les ciclofilines a fi de trobar quin d'ells disminueix de forma més eficaç l'expressió de la CypA i de la CypB respectivament.

Una vegada dissenyats els 3 siRNA per a cada ciclofilina (vegeu l'apartat 4.1.2 dels MATERIALS), es comprova mitjançant un BLAST que cap d'ells presenti homologia amb cap altre proteïna dipositada als bancs de dades. A continuació es segueixen els protocols 4.1.2. i 5.2.1 de l'apartat de MÈTODES. Breument, es transfecten a les cèl·lules PCT3 els diferents siRNA marcats amb Cy3™ a les concen-

tracions de 10 i 20 nM amb els diferents agents subministrats pel *Kit*: el siPORT *Amine* i el siPORT *Lipid*. Després de 8, 24, 48 i 72 h es determina l'eficiència de transfecció mitjançant un microscopi invertit de fluorescència DM IRBE (LEICA). A continuació, a les 48 i 72h post-transfecció es recullen les cèl·lules i mitjançant *Western blot* i RT-PCR a temps real (sempre que sigui possible) es determina quin dels 3 siRNA és més eficaç disminuint l'expressió de la ciclofilina A i de la ciclofilina B.

L'eficiència de transfecció depèn, en aquest cas, dels agents utilitzats. Quan s'utilitza siPORT *Lipid* l'eficiència de transfecció és aproximadament d'un 20%, en canvi quan s'utilitza el siPORT *Amine*, tot i que poques hores després de produir-se la transfecció, les cèl·lules PCT3 sembla que s'hagin de morir, aquestes es recuperen i l'eficiència assoleix un 30-40%. A continuació es mostren els resultats obtinguts utilitzant el siPORT *Amine*.

La ciclofilina B

El *Western blot* (FIGURA 46) demostra que l'siRNA CypB2 és el que produeix una disminució de l'expressió de la proteïna menor, ja que en la majoria de situacions analitzades les quantitats de proteïna no són massa diferents a les del control. El CypB1 i el CypB3, en canvi, produeixen una disminució de l'expressió d'un 20% i 30% respectivament a les 48 hores post-transfecció i d'un 10% i 18% després de 72h.

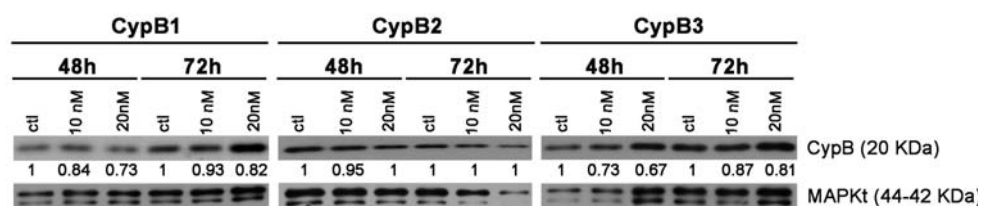


Figura 46. *Western blot* de les mostres interferides amb els diferents siRNA CypB, recollides a les 48 i 72 hores post-transfecció. Les cèl·lules PCT3 es transfecten amb diferents concentracions de siRNA. A cada punt s'obté el lisat cel·lular i 0.5µg de proteïna es resolen en un SDS-12% PAGE i *Western blot*. La immunodetecció es du a terme amb l'anticòs anti-ciclofilina B tal i com es descriu a l'apartat de MÈTODES. Com a control intern s'utilitza la proteïna MAPKt. Les bandes es densitometren i s'expressen respecte el seu control.

Cal recordar però, que la disminució de l'expressió màxima esperada és d'un 30-40%, ja que és a l'eficiència de transfecció màxima obtinguda en aquests experiments. També es pot observar que la concentració 20 nM de siRNA en les diferents situacions assajades és el que produeix una davallada de l'expressió proteica més elevada.

Tot seguit, alguns dels resultats anteriors es confirmen per qRT-PCR. Aquesta tècnica permet la determinació en temps real dels nivells de cDNA de la CypB per a les diferents condicions assajades. Com a control intern s'ha utilitzat la β2-microglobulina. No ha estat possible utilitzar el mateix control intern que en el *Western blot* ja que la sonda *Taqman* per la MAPKt en aquells moments no es comercialitzava. Tal i com s'observa a la TAULA 24, només s'han comprovat els nivells de cDNA corresponents a la CypB a les 48 hores post-transfecció dels siRNA CypB1 i CypB3. Aquests resul-

tats indiquen que l'siRNA que més eficientment disminueix l'expressió de la ciclofilina B és el CypB1, ja que els nivells de cDNA 48h després de la transfecció són més baixos que els nivells trobats per l'siRNA CypB3.

SITUACIÓ	% EXPRESSIÓ DE CypB
CypB control*	100
CypB1 10 nM	38
CypB1 20 nM	65
CypB3 10 nM	100
CypB3 20 nM	95

Taula 24. Nivells transitoris d'expressió de CypB en cèl·lules PCT3a les 48h post-transfecció. Cèl·lules PCT3 es transfecten amb els siRNA marcats amb Cy3™ a les concentracions de 10 i 20 nM. 48h posttransfecció es determinen els nivells de cDNA de la CypB per qRT-PCR. * el control equival a cDNA de cèl·lules PCT3 sense transfectar.

La ciclofilina A

El *Western blot* (FIGURA 47) demostra que els siRNA que disminueixen l'expressió de la CypA de forma més eficaç són el CypA1 i el CypA3. Aquests siRNA produeixen una davallada de l'expressió de la ciclofilina A d'un 82-84% a les 48 hores després de la transfecció. Aquest efecte no s'observa a les 72 hores post-transfecció, ja que només la concentració de 20 nM del siRNA CypA3 i CypA2 disminueixen l'expressió de CypA. Aquests resultats no s'han pogut confirmar per qRT-PCR degut a que la sonda *Taqman* per a la ciclofilina A en aquells moments no es comercialitzava.

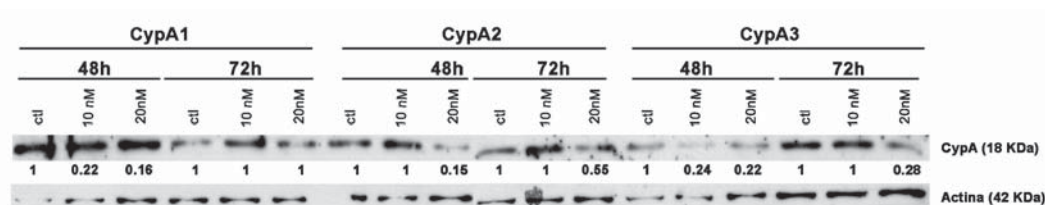


Figura 47. Western blot de les mostres interferides amb els diferents siRNA CypA, recollides a les 48 i 72 hores post-transfecció. Les cèl·lules PCT3 es transfecten amb diferents concentracions de siRNA. A cada punt s'obté el lisat cel·lular i 5µg de proteïna es resolen en un SDS-12% PAGE i Western blot. La immunodetecció es du a terme amb l'anticòs anti-ciclofilina A tal i com es descriu a l'apartat de MÈTODES. La normalització s'ha realitzat amb la proteïna actina. Les bandes es densitometren i s'expressen respecte el seu control.

Seguidament els siRNA més eficaços per a cada una de les ciclofilines es transfecten de forma estable en les cèl·lules PCT3.

3.1.3. Transfecció estable: pSILENCER™ 4.1-CMV Hygro

Els siRNA CypA1, CypB1 i un control negatiu (un siRNA que la seva seqüència no presenta homologia amb cap proteïna dipositada als bancs de dades), es transfecten de forma estable a les cèl·lules PCT3 tal i com es descriu als apartats 4.2 i 5.2.2 dels MÈTODES. Breument, s'anellen els oligonucleòtids que donaran lloc al *hairpin* i es clonen al vector d'expressió *pSilencer™ 4.1-CMV*

hygro. Seguidament, 4 µg de plasmidi es transfecten a les cèl·lules PCT3 i gràcies a la pressió selectiva de l'antibiòtic higromicina es seleccionen només aquelles cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi. Aquests clons s'expandeixen i se'n comprova l'expressió de la ciclofilina pertinent per *Western blot* i qRT-PCR sempre que sigui possible.

La ciclofilina B

Tal i com s'observa al *Western blot* de la FIGURA 48, els quinze clons assajats presenten diferents nivells d'expressió de la ciclofilina B que van des del 10% fins a valors del 180%.

A continuació, l'expressió de la CypB d'alguns d'aquests clons es determina per q RT-PCR. Els resultats obtinguts es resumeixen a la Taula 25.

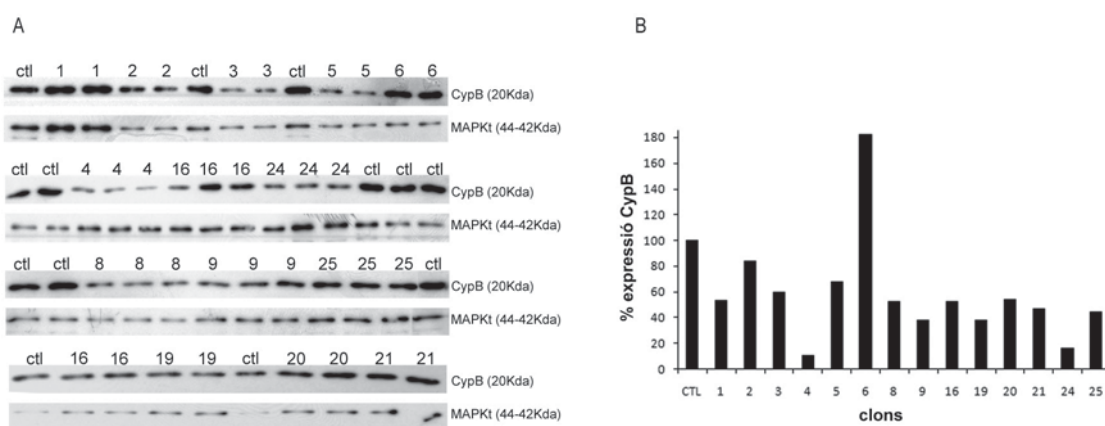


Figura 48. Anàlisi dels clons resultants de la interferència estable de la ciclofilina B. (A) 0,5 µg de proteïna es resolen en un SDS-PAGE12% i *Western blot*. La immunodetecció es du a terme amb l'anticòs anti-ciclofilina B tal i com es descriu a l'apartat de MÈTODES. (B) A la gràfica es mostra el percentatge d'expressió de la ciclofilina B després de densitometrar els films i normalitzar el senyal amb el senyal obtingut per la proteïna normalitzadora MAPKt.

CLON	% EXPRESSIÓ DE CYPB
ctl*	100
2	132
3	98
4	43.3
6	54
8	53
9	45.3
10	57.7
16	39
20	100
24	17.6
25	81.3

Taula 25. Nivells d'expressió de CypB en cèl·lules PCT3 després de la transfecció estable. Cèl·lules PCT3 es transfecten amb 4 µg el vector d'expressió *pSilencer™ 4.1-CMV Hygro* que conté clonat el *hairpin* CypB1. Gràcies a la pressió selectiva de l'antibiòtic higromicina es seleccionen els clons que contenen el plasmidi. Després d'expandir cada un dels clons, s'analitza per qRT-PCR els nivells de cDNA de la CypB. * el control equival a cDNA de cèl·lules PCT3 transfectades amb el control negatiu.

En general, els nivells de cDNA de CypB són més elevats que els nivells de proteïna.

Finalment es trien 4 clons per realitzar els estudis proteòmics i de toxicitat cel·lular. Concretament s'escullen els dos clons que presenten una disminució de l'expressió de CypB màxima (al voltant del 85%) com són el clon 4 i el clon 24, i dos més que presenten uns nivells d'expressió de la CypB al voltant del 50% com són el clon 8 i el clon 16.

La ciclofilina A

La determinació dels nivells d'expressió de ciclofilina A només s'ha realitzat mitjançant el *Western blot*, ja que, tal i com s'ha explicat a l'apartat anterior, no ha estat possible contrastar els resultats amb la qRT-PCR per falta de sonda *Taqman*. Tal i com s'observa a la FIGURA 49 els nivells màxims d'eliminació de l'expressió gènica per aquesta ciclofilina estan al voltant del 75%, mentre que per a la CypB s'ha obtingut fins a un 85% de davallada de l'expressió proteica. La resta de valors són molt homogenis ja que la disminució de l'expressió de la ciclofilina A oscil·la entre un 50% i 70% en la majoria dels clons assajats.

Els clons escollits per a dur a terme els estudis posteriors han estat el 12 i el 22 que provoquen

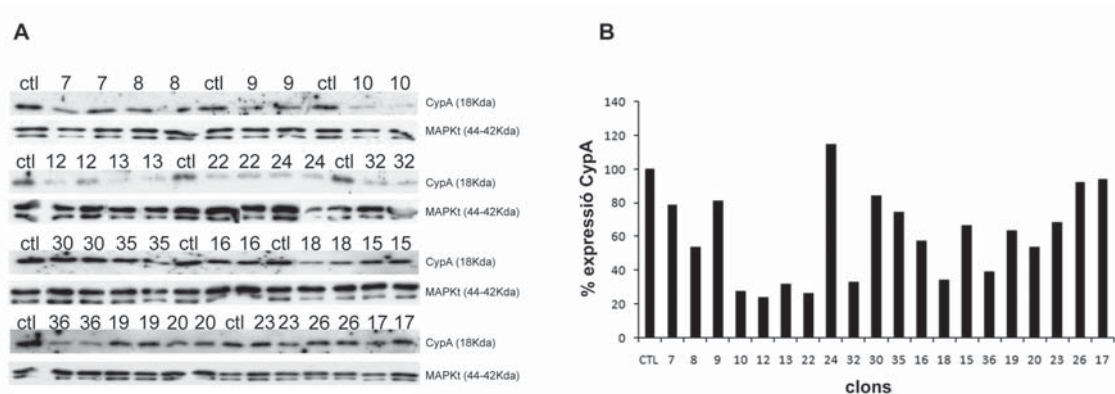


Figura 49. Anàlisi dels clons resultants de la interferència estable de la ciclofilina A. (A) 5 µg de proteïna es resolen en un SDS-PAGE12% i *Western blot*. La immunodetecció es du a terme amb l'anticòs anti-ciclofilina A tal i com es descriu a l'apartat de MÈTODES. (B) A la gràfica es mostra el percentatge d'expressió de la ciclofilina A després de densitometrar els films i normalitzar el senyal amb el senyal obtingut per la proteïna normalitzadora MAPKt.

una disminució de l'expressió de la CypA d'un 75% i els clons 8 i 20 que la disminueixen en un 20%.

3.2. ESTUDI DE L'EFECTE DE LA CsA EN ABSÈNCIA DELS SEUS RECEPTORS: LA CypA I LA CypB

Tal i com s'ha explicat en varies ocasions al llarg d'aquest treball experimental, les ciclofilines són els receptors intracel·lulars del fàrmac immunosupressor CsA. Fins ara, s'ha estudiat com afecta la CsA a les cèl·lules renals d'origen tubular de ratolí i humà i quines són les proteïnes i/o mecanismes moleculars implicats en aquesta nefrotoxicitat produïda per la CsA en aquests sistemes. Ara bé, la pregunta que ens plantejem tot seguit és quin serà l'efecte de la CsA en aquestes cèl·lules, ara que s'ha eliminat bona part de l'expressió de la ciclofilina A o B?.

3.2.1. Estudi de la viabilitat cel·lular

En primer lloc es va realitzar un estudi de la viabilitat cel·lular amb el *Cell Proliferation Kit II* (XTT) seguint el protocol especificat a l'apartat de MÈTODES. Breument, els diferents clons cel·lulars control negatiu 1: ctl 1, control negatiu 10: ctl 10, interferit amb la CypB 4: CypB4, interferit amb la CypB 24: CypB24, interferit amb la CypA 12: CypA12, i interferit amb la CypA 22: CypA22 es van sotmetre al tractament amb diferents concentracions de CsA (entre un rang de 0 fins a 50 μ M) durant 24 h.

Els resultats obtinguts es van sotmetre a una ANOVA multifactorial que ha permès estudiar quin és l'efecte de les diferents dosis de CsA sobre la viabilitat cel·lular. Tal i com s'observa a la FIGURA 50, el control negatiu negatiu presenta un comportament cel·lular similar a l'obtingut per les cèl·lules PCT3 (FIGURA 29), és a dir, la disminució de la viabilitat cel·lular comença a evidenciar-se a partir de la dosi 10 μ M de CsA fent-se més evident a les concentracions superiors. La davallada de la viabilitat dels clons que presenten una disminució de l'expressió de les ciclofilines A o B, s'inicia a la dosi de 20 μ M. Aquesta disminució es manté a la dosi de fàrmac més elevada. Aquests resultats demostren que la disminució de la viabilitat cel·lular en els clons amb una de les ciclofilines interferida s'inicia a la dosi de 20 μ M de CsA. Aquests resultats suggereixen que els clons interferits amb la CypA i/o la CypB són menys sensibles a la toxicitat per CsA i que el fàrmac necessita els seus receptors cel·lulars per produir la toxicitat cel·lular

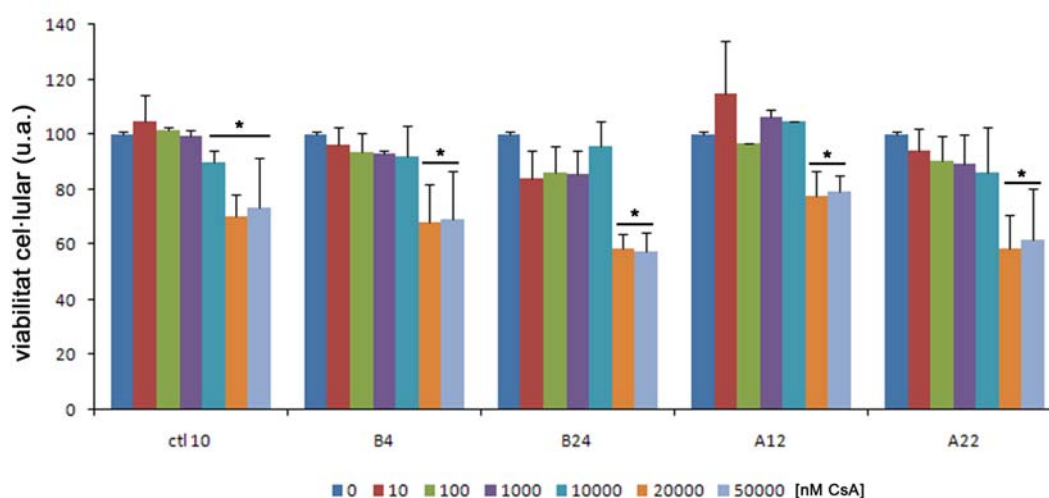


Figura 50. Efecte de les dosis en la viabilitat cel·lular dels clons interferits. Els diferents clons es sotmeten al tractament amb diferents dosis de CsA (entre 0 i 50 μ M) durant 24h. La viabilitat cel·lular s'analiza mitjançant el Cell Proliferation Kit II (XTT). Hi ha 3 rèpliques de cada situació i l'experiment es realitza per duplicat. Es mostra la mitjana \pm la SEM, $p \leq 0.05$.

3.2.2. Estudi de la mort cel·lular

A continuació, i per tal de determinar si la mort cel·lular produïda per la CsA en les cèl·lules PCT3 amb una de les dues ciclofilines silenciades es dona en les mateixes condicions en les cèl·lules PCT3 (vegeu l'apartat 1.2 dels RESULTATS), es quantifica la mort cel·lular mitjançant l'immunoassaig enzimàtic. Aquest assaig permet detectar la presència de fragments de DNA acomplexats amb histones en el citoplasma de les cèl·lules. Així, els diferents clons cel·lulars ctl 1, CypB4, CypB24,

CypA12, i CypA22 es van tractar amb dosis creixents de CsA (entre 0 i 20 μ M) durant 24h. Tal i com s'observa a la FIGURA 51 la mort cel·lular en tots els clons estudiats és present només a les dosis de CsA de 10 i 20 μ M. Recordem que aquestes són les mateixes dosis a les quals es produeix la mort cel·lular per apoptosi en cèl·lules PCT3 i HK-2 (FIGURA 35). Els nivells d'apoptosi dels clons amb una de les dues ciclofilines interferides tendeixen a ser inferiors als valors obtinguts pel control. Aquesta tendència és molt més marcada quan es disminueixen els nivells d'expressió de CypA. Aquest fet suggeriria que l'absència de les ciclofilines, especialment la CypA, protegiria de la mort cel·lular per apoptosi. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi calen més experiments.

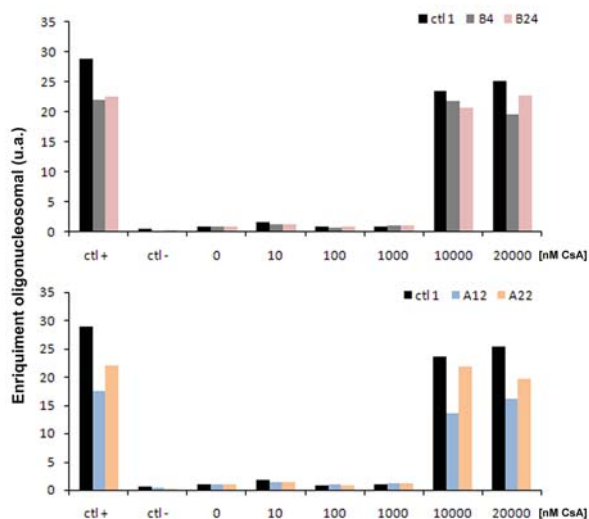


Figura 51. Enriquiment oligonucleosomal en els diferents clons induït per la CsA. Les cèl·lules PCT3 interferides de forma estable amb un control negatiu, amb Cyp A o CypB es tracten amb diferents dosis de CsA (entre 0 i 20 μ M) durant 24h. L'enriquiment oligonucleosomal s'analiza mitjançant un assaig immunoenzimàtic. Es realitzen duplicats de cada situació

3.2.3. Estudi de l'adhesió cel·lular

El seguiment i l'observació a diari dels diferents clons ens va portar a estudiar si l'adhesió cel·lular es veu afectada al disminuir l'expressió gènica d'una de les dues ciclofilines. Es sembren 66.000 cèl·lules per pou de placa de 24 pous i es fotografien els diferents clons a les 8, 24, 48 i 72h després de la sembra. Per aquest experiment s'utilitzen les cèl·lules parentals PCT3 i diferents clons: ctl 1, CypB4, CypB24, CypA12 i CypA22.

Tal i com s'observa a la FIGURA 52, els clons que tenen un 75% de la CypA silenciada s'adhereixen més lentament a la placa i presenten una mortalitat més elevada. Aquest fet, fa que arribin a la confluència, unes 18-24h hores més tard que la resta de clons i que per tant no s'observin domes en els temps estudiats. Segurament aquests apareixerien amb un retard de 24h respecte la resta de clons. Aquests resultats preliminars suggereixen que la disminució de la ciclofilina A alenteix l'adhesió cel·lular.

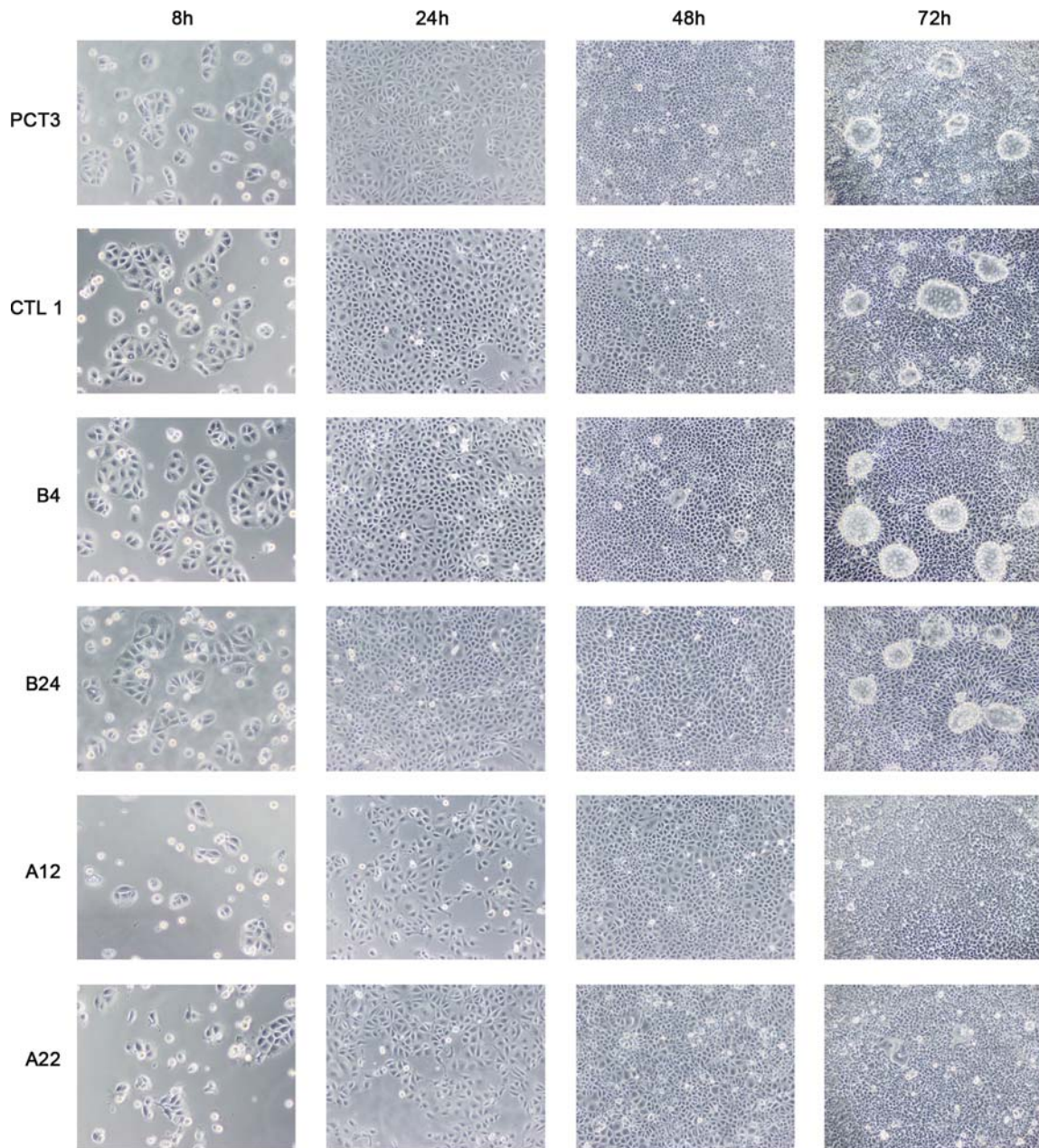


Figura 52. Estudi de l'adhesió i (proliferació) cel·lular. Les cèl·lules PCT3, un control negatiu de la transfecció estable (CTL1) i dos clons per a cada una de les cilofilines interferides (CypB4, CypB24, CypA12 i CypA22) es sembren en placa de 24 pous i es fotografien a les 8, 24, 48 i 72h després de la sembra.

3.3. ESTUDI PROTEÒMIC I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES AFECTADES PER L'ELIMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LA CypA I LA CypB

Seguidament i per tal de determinar quines proteïnes i/o processos moleculars s'alteren després d'haver disminuït l'expressió de les ciclofilines A o B, es realitza un estudi proteòmic diferencial entre les cèl·lules PCT3 interferides amb la CypA o la CypB i les cèl·lules PCT3 transfectades amb el control negatiu. Breument, un cop s'han resolt i tenyit els proteomes, s'analitzen els triplicats de cada situació amb el programa PD-Quest. L'assignació proteica realitzada pel programa es valida visualment per tal de corregir les assignacions incorrectes. Finalment s'agrupen els proteomes amb dos grups: control i interferits, i el programa realitza un anàlisi diferencial entre els dos grups utilitzant un criteri estadístic (*t-student*). Per tal de verificar les proteïnes seleccionades pel programa informàtic es comproven visualment una a una. Finalment les proteïnes validades s'identifiquen per MALDI-TOF al servei de proteòmica de la Unitat Científic-Tècnica de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (FIGURA 53).

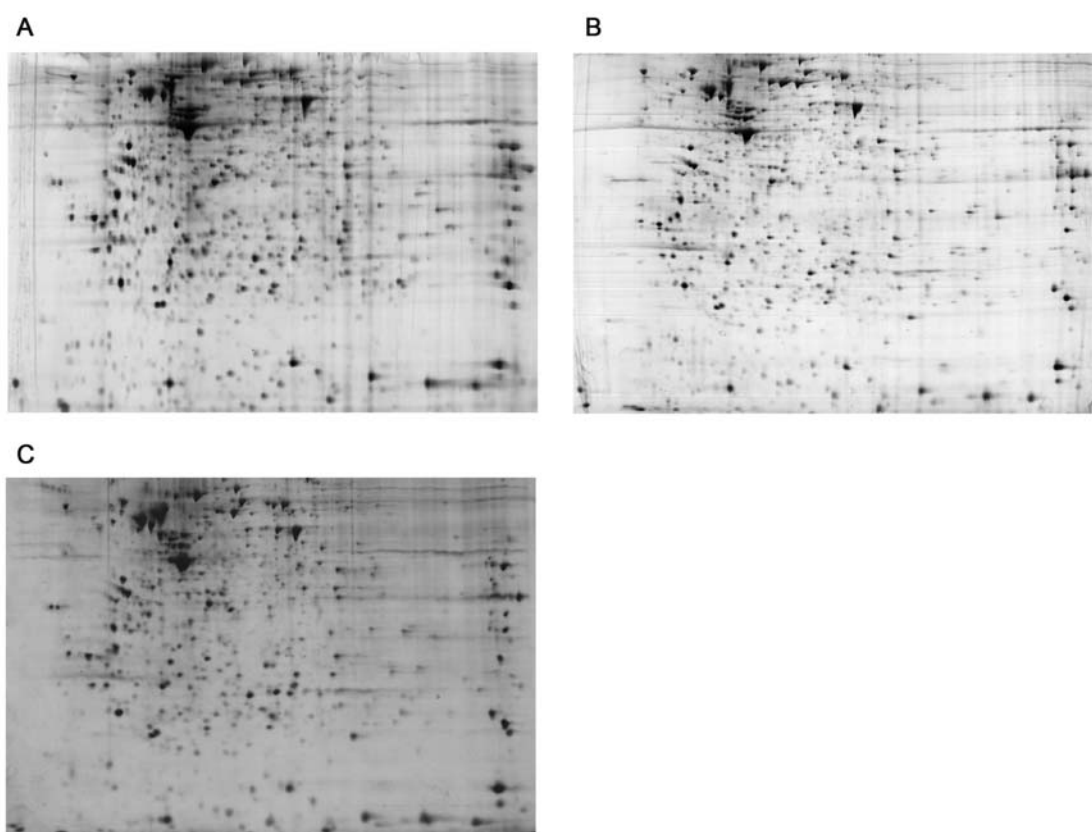


Figura 53. Anàlisi proteòmic diferencial de les cèl·lules PCT3 interferides amb la CypA o la CypB. A, B i C representen els mapes proteics representatius de cèl·lules PCT3 transfectades amb un control negatiu, cèl·lules PCT3 interferides amb la CypB i cèl·lules PCT3 interferides amb la CypA respectivament.

Per a la ciclofilina A l'anàlisi diferencial detecta 49 proteïnes diferencialment expressades, 25 proteïnes de les quals han estat identificades. D'aquestes un 12% preseten la seva expressió proteïca disminuïda i un 88% augmentada (TAULA 26). Per a la ciclofilina B quan es comparen les cèl·lules PCT3 control negatiu amb les cèl·lules PCT3 amb la CypB interferida es detecten 68 proteïnes diferencialment expressades, 21 de les quals han estat identificades. Un 9,5% preseten la seva expressió proteïca augmentada i un 90,5% disminuïda (TAULA 27).

Spot ID	Protein ID	Access IP (Swiss Prot)	iCypA Effect	ANOVA	Theor. MW (kDa)	Exp. MW (kDa)	Theor. IP	Exp. IP	Score	Peptide match	% sequence coverage
2330	Translationally-controlled tumor protein	P63028	Down	p<0.0002	19,6	19,9	4,8	4,9	62	8	38
2440	Tropomyosin alpha 3 chain	P21107	Down	p<0.0001	32,9	27,4	4,7	4,9	112	16	41
2442	LASP-1, LIM and SH3 domain protein 1	Q61792	Down	p<0.0001	30,4	35,3	6,6	4,7	147	18	44
3316	Lgul, Lactoylglutathione lyase	Q9CPU0	Down	p<0.0025	20,8	19,0	5,3	5,0	106	13	69
3316	PEPB-1, Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P70296	Down	p<0.0001	20,8	19,0	5,3	5,0	103	10	60
4312	Annexin2	P07356	Down	p<0.003	38,8	20,6	7,9	5,2	58	5	12
4322	Uncharacterized protein C15orf38 homolog	Q9D0A3	Down	p<0.0001	25,3	24,6	5,1	5,1	77	11	55
4323	Crk protein	Q8JZR2	Down	p<0.0006	22,9	20,3	5,3	5,2	155	16	85
4407	Chloride intracellular channel protein 1	Q9Z1Q5	Down	p<0.05	27,2	26,8	5,1	5,1	119	9	45
4417	Annexin A4	P97429	Down	p<0.008	36,0	28,2	5,4	5,3	167	11	61
5202	ATP sintasa cadena D mitocondrial	Q9DCX2	Down	p<0.02	18,6	18,1	5,5	5,4	64	6	31
5323	KCY, UMP/CMP kinase	Q9DBP5	Down	p<0.0002	22,4	18,9	5,7	5,7	178	14	63
5522	Isocitrate dehydrogenase 3	Q8C8A1	Down	p<0.02	40,1	39,6	6,3	5,6	71	5	21
6109	Cofilin-1	P18760	Down	p<0.0002	18,6	13,8	8,3	6,6	99	6	25
6311	HSP 27 (HSP25 internal deletion variant)	P14602	Up	p<0.0003	22,0	22,0	6,5	6,3	53	4	32
6605	Actin cytoplasmic 2	P63260	Down	p<0.05	41,3	41,0	5,6	5,8	118	10	39
6607	Selenium binding protein 1	Q91X87	Down	p<0.0008	53,1	52,5	5,9	5,9	104	13	36
7207	Alpha crystallin	P23927	Up	p<0.0004	20,1	16,8	6,8	7,0	62	5	32
7307	PGAM1, phosphoglycerate mutase 1	Q9DBJ1	Down	p<0.017	28,8	23,6	6,8	6,9	184	20	62
7401	Electron transfer flavoprotein alpha	Q99LC5	Down	p<0.05	35,4	33,3	8,6	6,8	68	6	26
7406	Glutathione transferase omega-1	O09131	Down	p<0.0001	27,7	25,5	6,9	6,9	82	10	42
7407	Aldose reductase	P45376	Down	p<0.02	35,9	33,1	6,8	6,9	77	7	7
7523	T-complex protein 1	Q8CAY6	Down	p<0.019	41,7	41,3	6,6	7,2	68	8	28
7728	Far upstream element binding protein 1 (FUSEBP1)	Q3UUU2	Down	p<0.006	74,8	66,7	7,6	7,0	95	23	38
7740	Far upstream element binding protein 1 (FUSEBP1)	Q3TUE1	Up	p<0.002	67,6	66,5	7,2	7,1	153	20	43

Taula 26. Proteïnes diferencialment expressades de cèl·lules PCT3 interferides amb la CypA. El número de proteïna (spot identificat), correspon al número assignat a la proteïna pel programa PD-Quest. De cada proteïna s'indica el nom, l'efecte que li produeix el tractament amb la CsA, el pes molecular (PM) i el punt isoelèctric (PI) experimental i teòric, el número d'accés de la proteïna a la base de dades SwissProt, 3 paràmetres informatius de la probabilitat de què la identificació proteïca sigui certa. En sombrejat s'indiquen les proteïnes que són comunes per ambdues interferències

De totes aquestes proteïnes n'hi ha un grup que coincideixen al interferir la CypA o la CypB, indicades en sombrejat a les TAULES 26 i 27. En aquest grup hi trobem l' α -3 de la Tropomiosina, LASP-1 (LIM i SH3 domain protein 1), Lgul (lactoylglutathione lyase), PEPB-1 (phosphatidylethanolamine-binding protein 1), proteïna homòloga a C15orf38 (no caracteritzada), proteïna crk, KCY (UMP/CMP kinase), cofilin-1, selenium binding protein 1, PGAM-1 (phosphoglycerate mutase 1), glutathione transferase omega-1, FUSE binding protein-1 (far upstream element binding protein 1) i Anexina A4. Hi ha un altre grup de proteïnes que coincideixen amb algunes de les diferencialment expressades al tractar les cèl·lules PCT3 amb la dosi de CsA 10 μ M. Aquestes són la TCTP, chloride intracellular channel protein 1, ATP sintasa cadena D mitocondrial, isocitrat deshidrogenasa, HSP 27, actina citoplasmàtica 2, electron transfer flavoprotein alpha, T-complex protein 1, piruvat quiansa i Anexina A4. Un últim grup de proteïnes el formen aquelles que són exclusives de la interferència de CypA (Anexina A2 i Aldose reductase) o de CypB (vimentina, ionized calcium-binding adapter molecule 2: IAB2, glutamat deshidrogenasa i voltage dependent anion selective channel protein 1).

Spot ID	Protein ID	iCypB Effect	Acces N° (Swiss Prot)	ANOVA	Theor. MW (kDa)	Exp. MW (kDa)	Theor. IP	Exp. IP	Score	Peptide match	% sequence coverage
2440	Tropomyosin alpha 3 chain	Down	P21107	p<0.0001	32,9	27,4	4,7	4,9	112	16	41
2442	LASP-1, LIM and SH3 domain protein 1	Down	Q61792	p<0.0005	30,4	35,3	6,6	4,7	147	18	44
2616	Vimentin	Down	P20152	p<0.05	27,8	46,2	5,1	4,7	233	32	58
2620	Vimentin	Down	P20152	p<0.0009	27,8	46,5	5,1	4,8	193	24	46
3316	Lgul, Lactoylglutathione lyase	Down	Q9CPU0	p<0.0025	20,8	19,0	5,3	5,0	106	13	69
3316	PEBP-1, Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Down	P70296	p<0.0001	20,8	19,0	5,3	5,0	103	10	60
3603	Vimentin	Down	P20152	p<0.002	27,8	48,9	5,1	4,9	179	15	43
4322	Uncharacterized protein C15orf38 homolog	Down	C0038	p<0.0009	25,3	24,6	5,1	5,1	77	11	55
4323	Crk protein	Down	Q8JZR2	p<0.0051	22,9	20,3	5,3	5,2	155	16	85
4410	Pyruvate kinase, isozyme M2	Down	P52480	p<0.0004	58,3	25,0	7,4	5,2	77	10	31
4417	Annexin A4	Down	P97429	p<0.0052	36,0	28,2	5,4	5,3	167	11	61
5323	KCY, UMP/CMP kinase	Down	Q9DBP5	p<0.0048	22,4	18,9	5,7	5,7	178	14	63
6109	Cofilin-1	Down	P18760	p<0.0040	18,59	13,8	8,2	6,6	67	11	57
6116	IBA2, Ionized calcium-binding adapter molecule 2	Down	Q9EQX4	p<0.0062	17,1	12,1	6,6	6,1	166	25	81
6607	Selenium binding protein 1	Down	Q91X87	p<0.0008	53,05	52,5	5,9	5,9	104	13	36
7307	PGAM1, phosphoglycerate mutase 1	Down	Q9DBJ1	p<0.0109	28,8	23,6	6,8	6,9	184	20	62
7406	Glutathione transferase omega-1	Down	O09131	p<0.0004	27,708	25,5	6,9	6,9	82	10	42
7619	Glutamate dehydrogenase (NADP) 9	Down	P26443	p<0.0003	61,6	52,0	8,1	7,0	82	15	36
7728	Far upstream element binding protein 1 (FUSEBP1)	Down	Q3UUU2	p<0.0002	74,8	66,7	7,6	7,0	95	23	38
7740	Far upstream element binding protein 1 (FUSEBP)	Up	Q3TUE1	p<0.0032	67,6	66,5	7,2	7,1	153	20	43
8410	voltage dependent anion selective channel protein 1	Up	Q60932	p<0.0126	32,4	27,7	6,6	8,2	75	7	29

Taula 27. Proteïnes diferencialment expressades de cèl·lules PCT3 interferides amb la CypB. El número de proteïna (*spot identificati- on, ID*), correspon al número assignat a la proteïna pel programa PD-Quest. De cada proteïna s'indica el nom, l'efecte que li produeix el tractament amb la CsA, el pes molecular (PM) i el punt isoelèctric (PI) experimental i teòric, el número d'accés de la proteïna a la base de dades SwissProt, 3 paràmetres informatius de la probabilitat de què la identificació proteïca sigui certa. En sombreadat s'indiquen les proteïnes que són comunes per ambdues interferències