

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

I. Determinació del període del desenvolupament murí en el que la T_3 permet la resposta cortical dependent d'andrògens del gen del KAP

Els estudis d'hibridació *in situ* en el ronyó de ratolí, han mostrat que existeixen dos compartiments renals ben definits pel que fa a l'expressió del gen del KAP (103). La regió S_1/S_2 o cortical, que expressa el gen en presència d'andrògens i de ARs funcionals (105) i la regió S_3 medul·lar, que expressa el gen gràcies a la intervenció de la T_3 (111), encara que en aquesta regió també és induïble per estrògens (105).

L'anàlisi de l'expressió del gen del KAP durant el desenvolupament, ha manifestat diferents respostes corticals androgèniques segons el model d'hipotiroïdisme utilitzat. Els animals *hyt/hyt*, deficients en el receptor de TSH, i per tant, deficients en T_3 , arriben als 40 dies de vida postnatal, amb un fenotip, pel que fa a pes i mida, semblant al dels animals eutiroïdals *hyt/+* i els mascles no castrats, presenten respostes corticals disminuïdes (111). D'altra banda, l'hipotiroïdisme congènit farmacològic, induït amb l'administració de $KClO_4$ 1% en l'aigua de beguda a femelles prenyades, a partir del dia 12 de gestació, produeix ratolins de mida i pes inferior al normal i absència absoluta de senyal cortical en mascles, en qualsevol moment del desenvolupament postpuberal (112).

Degut a que les mares de les cries *hyt/hyt* són heterozigotes obligades, ja que aquest és un caràcter d'herència autosòmica recessiva, es va hipotetitzar que la TH

materna que atravessa la placenta marca el futur desenvolupament de les respostes corticals androgèniques. D'aquesta manera, doncs, les mares que durant la gestació bevien *goitrogens* (inhibidors de la síntesis de TH) (154) haurien de tenir cries sense expressió cortical del gen del KAP. Aquesta hipòtesi es va rebutjar, donat als resultats no publicats del nostre laboratori mostrats en l'apartat V.a de la Introducció, que demostren que els efectes de la TH sobre l'expressió cortical de KAP mitjançada per andrògens, es produeixen en el període postnatal i no prenatal dels animals.

Per aquesta raó, la diferència entre els dos models d'hipotiroïdisme no és doncs, deguda a la presència de TH materna durant el període prenatal. La mida i pes dels animals tractats amb KClO_4 1%, era significativament inferior a la dels animals control i, per tant, es va relacionar l'absència d'expressió del gen del KAP amb un dèficit de GH, com a conseqüència del hipotiroïdisme profund que patien aquests animals i pel fet que es coneix que la TH controla l'expressió del gen de la GH a nivell transcripcional (82). Aquesta idea es va veure recolzada pel fet que animals de la soca *dwarf* Jackson (deficients en *pit-1*, que és un factor de transcripció específic de pituïtària que regula la síntesis de TSH, PRL i GH, a través del control transcripcional dels seus corresponents gens) són nans a més d'hipotiroïdals i tampoc presenten expressió de KAP en el còrtex renal, en la vida adulta, com els animals sotmessos a hipotiroïdisme farmacològic (Manuscrit en preparació). A fi de demostrar que la GH també intervé en la regulació androgènica de KAP i determinar el moment del desenvolupament en el que es necessita la presència de TH, es van dissenyar els experiments presentats en aquest treball.

Els nostres resultats han demostrat que la presència de T_3 a partir del dia 11 de vida postnatal, permet iniciar una resposta cortical feble que es va fent més intensa cap al voltant

del dia 15-16, coincidint amb el període en el que els nivells plasmàtics de T_4 mostren un pic i s'inicia el desenvolupament puberal del ratolí. La presència de T_3 , en qualsevol moment després del període crític mencionat, té com a conseqüència una resposta cortical. És important ressaltar que la presència de la TH és sempre puntual, de forma que només retirant l'aigua de beguda amb $KClO_4$ 1% durant 48 h i, per tant, permetent la síntesi endògena de TH, es produeix l'efecte facilitador de la resposta androgènica, encara que en el moment del sacrifici de l'animal no hi sigui present.

Les nostres dades estan en concordança amb les d'altres treballs en els que s'indica que els nivells sèrics de TH elevats durant el desenvolupament postnatal (155), poden jugar un paper important en el desenvolupament renal (138). L'hormona tiroïdal ha estat implicada en diferents aspectes del desenvolupament renal. Hi ha evidències que la TH és un factor que intervé en l'augment de diferents enzims oxidatius mitocondrials del túbul contornejat proximal renal, durant el desenvolupament (144). El creixement del ronyó està alterat en rates hipotiroïdals (156) i el túbul proximal també és més curt en aquests animals. Conills hipotiroïdals per tractament amb PTU (6-propil-2-tiouracil), *goitrogen* reversible que inhibeix la síntesi de T_4 i la desionització perifèrica de T_4 a T_3 , durant 8 setmanes després del naixement, presenten una reducció important del volum tubular en comparació amb els control, no obstant, el tractament amb T_3 dels animals hipotiroïdals, durant 4 dies, augmenta la taxa del transport de NaCl tant total com passiu, fins els nivells detectats en els control (157). Per tant, l'hormona tiroïdal també està involucrada en el desenvolupament postnatal del transport de NaCl del túbul recte proximal renal.

L'hormona tiroïdal també té una funció primordial en el desenvolupament postnatal del cervell i cerebel murí. L'estat de desenvolupament anormal de rates hipotiroïdals perinatals

només pot revertir-se amb el subministrament de TH durant les dues primeres setmanes de vida postnatal. Aquest període crític d'acció de la TH succeeix en el període en el que alguns dels gens diana de TH estan regulats a nivell transcripcional (158). Oppenheimer *et al* (159), han proposat un model en el que l'expressió gènica en resposta a TH està dividida en tres etapes: 1) un estat refractari durant el període prenatal; 2) un període de resposta a T_3 que correspon a la segona i tercera setmana de la vida postnatal, durant la qual TH accelera l'expressió dels gens que regula; i 3) un tercer període en el que l'expressió gènica és independent de la regulació de TH. Martínez de Arrieta *et al* (160), hipotetitzen que l'efecte de la TH en el cerebel murí podria estar influenciada per la quantitat relativa de proteïnes coactivadores i corepressores *in vivo*, que poden estar modulades d'una manera edat específica i/o per hormones, generant d'aquesta manera, el període crític d'acció de TH.

El model d'actuació de la TH en el cerebel murí, podria aplicar-se al ronyó sí el patró d'expressió de KAP durant el desenvolupament, pogués ser extrapolat a altres gens renals, ja que el gen del KAP presenta les tres etapes descrites:

- 1) Durant els primers 10 dies de vida, el gen del KAP no respon a T_3 .
- 2) A partir dels dies 15-16 postnatsals, la T_3 és necessària per induir la resposta cortical dependent dels andrògens de KAP.
- 3) La T_3 té un efecte puntual i concret, és a dir, la T_3 només és necessària per engegar la resposta, ja que aquesta perdura encara

que la T_3 sigui eliminada per l'administració de *goitrogens* abans del sacrifici de l'animal. Per tant, l'expressió gènica de KAP, en el còrtex renal, acaba sent independent de TH.

També, cal recalcar que l'acció puntual de T_3 només té efecte sobre la resposta cortical de KAP en mascles, a partir de la segona setmana de vida de les cries. Per tant, s'hipotetitza que a més de T_3 es necessiten els andrògens per induir la resposta cortical de KAP, en un ratolí que en el moment del sacrifici és hipotiroïdal. Per altra banda, és conegut que l'hipotiroïdisme suposa un retard en el desenvolupament puberal a més a més del renal i d'altres conseqüències, però d'animals mascles C57BL/6 amb hipotiroïdisme farmacològic produït per $KClO_4$ 1%, s'obtenen nivells de testosterona en plasma similars als dels animals controls, els quals mostren una important variabilitat interindividual. S'ha observat que l'expressió màxima de KAP està relacionada amb la presència de T_3 i d'andrògens, però no amb la concentració puntual de testosterona en plasma (112). Aquest concepte es veu recolzat pel fet que el mateix tractament en femelles i, per tant, en absència d'andrògens, no resulta en cap moment en l'expressió del gen.

Segons les dades obtingudes, la primera hipòtesi de treball va ser que: la T_3 induïa, inicialment un factor necessari per permetre la resposta androgènica, que era regulat, posteriorment, pels andrògens o amb capacitat d'autoregulació. D'aquesta manera, la presència puntual de T_3 , que engegaria el sistema, necessitaria els andrògens per perpetuar respostes que ella havia marcat inicialment. Per aquesta raó no tindria cap efecte quan es permetés la síntesi d'aquest factor abans de la pubertat.

Alguns treballs (161) utilitzen la tècnica dels *microarrays*, com a primera aproximació,

per l'anàlisi de la regulació hormonal per T_3 de l'expressió gènica *in vivo*, ja que aquesta és d'una gran complexitat. L'hormona tiroïdal afecta a l'expressió gènica a través d'un ampli ventall de vies i funcions cel·lulars, com poden ser: la gluconeogènesi, la lipogènesi, la via de senyalització de la insulina, la proliferació cel·lular i l'apoptosi. D'entre les enumerades també cal mencionar l'efecte permissiu de T_3 (162), que via l'adenilat ciclase actua sobre la formació d'AMPc, que és un segon missatger cel·lular de gran importància. L'hipotiroïdisme segons el teixit i per exemple en l'adipós, pot alterar respostes mitjançades pels receptors β -adrenèrgics i potenciar la inhibició de l'adenilat ciclase.

Els membres de la família de factors de transcripció bzip anomenats CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBPs) són possibles candidats a ser els factors que integren tant la resposta a T_3 com la dels andrògens, a nivell de l'expressió del gen del KAP. Primerament, perquè es troben caixes putatives de ser reconegudes per C/EBP en el fragment de 1542 bp del promotor del gen del KAP, segonament, perquè les C/EBPs estan implicades en alguns dels diferents processos mencionats controlats per T_3 i, finalment, perquè membres d'aquesta família de factors de transcripció són induïts per hormones esteroïdals.

Per exemple, Chung *et al* (163), descriuen que el gen que codifica per l'enzim màlic està altament expressat en hepatòcits embrionaris de pollastre (CEH, *chick embryo-hepatocytes*) tractats amb T_3 però no en absència de T_3 , i que en fibroblasts embrionaris de pollastre (CEF, *chick embryo-fibroblasts*), l'expressió de dit gen és baixa i no està regulada per T_3 . Els resultats obtinguts indiquen que C/EBP α està present en el complex que s'uneix al lloc C/EBP en els extractes nuclears de CEH però no de CEF i que l'element C/EBP és necessari i suficient per què es pugui donar, plenament, la resposta a T_3 . És a dir, l'hormona tiroïdal pot actuar d'una manera directa sobre els gens que regula o indirectament sobre gens

o proteïnes intermediàries com són els factors de transcripció i d'entre els que els factors C/EBP, implicats en la regulació transcripcional d'alguns gens implicats en el metabolisme intermediari, proliferació i diferenciació cel·lular, són considerats com uns dels factors involucrats.

Dels estudis de *Brady et al* (164), es dedueix que l'AR amb col·laboració amb altres proteïnes, d'entre les que hi ha C/EBP α , regula l'expressió del factor IX durant el desenvolupament postnatal humà i murí. El factor IX, és una proteïna dependent de vitamina K, que està altament regulada durant el desenvolupament. En el fetus, els nivells de mRNA i proteïna del factor IX són < 10% que els que es detecten a les 20 setmanes de gestació. Un patró d'expressió semblant s'observa en el ratolí. Tant en l'home com en el ratolí, els nivells primerencs postnatsals de factor IX són aproximadament un 50% dels nivells adults, els quals augmenten a aproximadament un 75% en la pubertat. Per estudis *in vitro* realitzats en hepatòcits, s'ha pogut descriure com la transfecció de només l'AR no indueix l'expressió del promotor del factor IX i que la cotransfecció de C/EBP produeix un augment sinèrgic de l'activitat transcripcional.

Per totes aquestes evidències, es va analitzar si existia alguna correlació entre l'expressió del gen del KAP i l'existència de C/EBPs, en el ronyó murí. El resultat va indicar la presència de C/EBP α i C/EBP β en extractes nuclears de ronyons de mascles control i castrats però no en els de ratolins mascles amb hipotiroïdisme congènit induït farmacològicament, que és quan l'expressió del gen del KAP és gairebé nul·la.

La presència de TH en el període puberal i postpuberal permet la resposta cortical, però el senyal cortical de KAP obtingut és menor al dels animals control, indicant que algun

altre factor o hormona hauria d'intervenir per aconseguir l'activació transcripcional màxima del gen del KAP, en el còrtex renal.

Les diferències de tamany entre dos models d'hipotiroïdisme diferents: dèficit de GH, PRL i TSH, en el cas dels animals *dwarf* Jackson, i de T₃ en el dels animals *hyt/hyt*, va suggerir la participació de la GH en la transactivació del gen del KAP, degut a que en el model *dwarf* Jackson no es detectava senyal cortical de KAP mentre que en el *hyt/hyt* sí. Conseqüentment, es va estudiar l'efecte de la GH sobre l'expressió cortical de KAP i s'ha demostrat que és necessària la combinació de TH i GH perquè s'aconsegueixi plenament la resposta cortical dependent d'andrògens del gen del KAP.

La T₄, a través d'un efecte permissiu, indueix ràpidament la fosforilació i la translocació nuclear de la MAPK en cèl.lules HELA i CV-1, en absència de citoquines o factors de creixement (165). És a dir, l'hormona tiroïdal podria activar la via de senyalització que també pot ser estimulada per IGF-I, factor de creixement estimulat principalment per GH i produït majoritàriament pel fetge, d'on és transportat als llocs on exerceix la seva acció, i que podria mitjançar la resposta a GH de KAP, en el còrtex renal. No obstant, en la resposta androgènica cortical de KAP, no hi intervé només una de les dues hormones sinó que tant la TH com la GH hi estan implicades.

La GH pot regular l'expressió gènica alterant la concentració o l'activitat de factors de transcripció. Strand *et al* (166), conclueixen que la GH augmenta tant els nivells de mRNA i de proteïna de C/EBP α com la seva capacitat d'unió al DNA, en cultius d'hepatòcits de rata. Per altra banda, Rastegar *et al* (84), demostren que l'efecte estimulador de GH sobre el promotor del gen *hnf6* que codifica per l'HNF-6 (*Hepatocyte Nuclear Factor-6*) és degut a

la disminució ràpida que provoca de la proteïna C/EBP α , que té un efecte inhibidor sobre dit promotor.

Per tot això, hipotetitzem que tant GH com TH podrien regular l'expressió de determinats gens a través de la modulació, a diferents nivells, dels factors de transcripció C/EBP, sense que això signifiqui que queden excloses altres vies d'actuació d'ambdues hormones, que poden potenciar el seu efecte.

II. Relació entre l'hormona tiroïdal, les C/EBPs i l'expressió del gen del KAP en el ronyó murí durant el desenvolupament postnatal

Com ja s'ha esmentat, l'hipotiroïdisme congènit altera el desenvolupament de l'organisme i a nivell molecular modifica l'expressió de diferents gens, d'entre els que es poden citar alguns membres de la família de factors de transcripció C/EBP, pels que s'han identificat possibles llocs d'unió en el promotor de KAP i, s'ha demostrat que la proteïna desapareix en ronyons d'animals hipotiroïdals, coincidint també, amb la manca d'expressió del gen del KAP. Aquest resultat va ser corroborat pel fet que l'expressió de KAP i la presència de C/EBP α i C/EBP β , es veuen recuperades quan a aquests animals amb hipotiroïdisme farmacològic, se'ls administra paral·lelament al tractament amb KClO₄ 1%, T₃ 1,2 μ g/dia durant el 7è i 21è dia postnatal.

El patró d'expressió de C/EBP α i C/EBP β en el fetge ha estat estudiat en detall (167).

En humans, C/EBP α i C/EBP β apareixen, primerament, en l'últim trimestre de la vida fetal, disminueixen en el període després del naixament i augmenten fins als nivells de l'adult després del deslletament. Wang *et al* (168), mostren clarament que C/EBP α és necessària pel desenvolupament normal d'una sèrie de gens implicats en funcions metabòliques, tals com la gluconeogènesi, la síntesi de glicogen, el desenvolupament del teixit adipós blanc i marró (proteïna desacopladora), i en el desenvolupament de la morfologia normal del pulmó. També es coneix que els ratolins que se'ls hi ha deletat el gen C/EBP α moren a les 8 hores després del naixament degut a la hipoglucèmia que presenten (168), però també s'ha demostrat que l'efecte que té la T₃ sobre l'expressió de C/EBP és específica de teixit i, per tant, l'efecte dràstic que produeix l'hipotiroïdisme sobre aquestes proteïnes en ronyó no es pot extrapol·lar a altres teixits sense l'estudi previ d'aquests, ja que pel contrari no es mantindria l'homeostasi i els ratolins morien.

III. Capacitat de resposta a andrògens de les línies cel·lulars renals PKSV-PCT i PKSV-PR, utilitzant com a model el gen del KAP.

Encara que Asadi, Dimaculangan i Berger (169) han observat els efectes de la testosterona en la inducció de gens regulats per andrògens en cultius primaris de cèl·lules de ratolí de túbul proximal renal, la manca de línies cel·lulars establertes de túbul proximal murí, ben definides, obstaculitza els estudis *in vitro* de l'acció dels andrògens en l'expressió gènica i en el creixement cel·lular i diferenciació. Cartier *et al* (87), han establert dues línies de cèl·lules de túbul proximal, PKSV-PCT i PKSV-PR, derivades de la microdissecció de

la part contornejada (PCT) i del final de la part recta (PR), de túbuls proximals superficials de ronyó de ratolins mascles transgènics L-PK/Tag, d'un mes de vida. Les dues línies sintetitzen l'antigen T gran de SV40 quan es cultiven en un medi ric en glucosa. Aquestes cèl·lules presenten el fenotip i les característiques funcionals del túbul proximal: expressió de villina i aminopeptidasa N en els microvillis, sensibilitat a la parathormona, transport de glucosa dependent de sodi i una gran capacitat d'endocitosi apical i d'activitat hidrolasa (88). Per altra banda, estudis amb [³H]DHT mostren que, tan les cèl·lules PCT com les PR, tenen una classe de receptors d'andrògens d'alta afinitat. Pel què fa a l'expressió de gens controlats per andrògens en el ronyó murí (KAP i β -Glucuronidasa), s'ha comprovat que també són estimulats per andrògens en aquestes dues línies cel·lulars (89).

Com ja s'ha assenyalat en l'apartat V.b de la introducció, en un fragment de 1542 bp respecte de l'inici de transcripció del gen del KAP, s'han trobat elements de resposta hormonal, la importància dels quals en la inducció del gen encara no es coneix, degut a la mancança fins fa poc temps, d'un sistema cel·lular adequat. Per altra banda, s'ha comprovat que aquest fragment de 1542 bp, és suficient per dirigir l'expressió regulada per andrògens d'un gen *reporter* heteròleg de manera teixit i cèl·lula específica en un ratolí transgènic (146), però no s'observa l'expressió del transgen en les cèl·lules S₃ (PR) del túbul proximal renal, que és on l'expressió de KAP depèn absolutament de T₃ (111), fet que indica que en aquest fragment no hi ha l'element de resposta a T₃ (TRE) o el/els elements encara no identificats que controlen l'expressió del gen en aquest compartiment renal. No obstant això, el podem utilitzar per estudiar l'acció androgènica i determinar si existeix una acció indirecte de T₃ (es desenvoluparà en l'apartat següent).

Per a l'estudi funcional dels HRE identificats en el promotor del gen del KAP i per

a la identificació de proteïnes d'unió a DNA, corepressors i coactivadors que intervenen, tant en la regulació de l'expressió del gen com en la seva especificitat de teixit, és necessari un sistema homòleg, on el gen s'expressi endògenament i estigui regulat hormonalment de la mateixa forma que la que s'ha observat *in vivo*. Per aquesta raó, primerament, es va caracteritzar l'expressió endògena i la regulació hormonal del gen del KAP en els clons PCT3 i PR10, derivats de les línies parentals PKSV-PCT i PKSV-PR. Aquests clons van ser seleccionats per la seva capacitat de diferenciació (formació de doms) i per la capacitat o incapacitat d'expressar endògenament el gen del KAP. La utilització de dits clons va permetre analitzar la capacitat de transactivació del gen del KAP per diferents estímuls, en un sistema homòleg (PCT3) al còrtex renal pel què fa a la resposta androgènica del promotor del gen del KAP (resposta dependent d'AR i de lligand), i en un sistema que el podríem anomenar no homòleg (PR10), ja que no expressa el gen del KAP, degut possiblement, a la pèrdua d'algun factor intermediari de dita resposta, ja que aquest sistema cel·lular deriva d'un model cel·lular en el que sí s'expressa i en el que també respon als andrògens.

És necessària la transfecció del receptor d'andrògens induït pel seu lligand per incrementar l'expressió endògena basal del gen del KAP, en PCT3. Per aquesta raó, es pot hipotetitzar que el clon PCT3 seleccionat pels seus nivells elevats d'expressió endògena de KAP, no presenti els nivells de receptor d'andrògens d'alta afinitat pel lligand, detectats en la línia parental per Ouar *et al* (89), o que l'expressió basal endògena de KAP ja reflecteixi l'efecte de receptors d'andrògens endògens i, que la sobreexpressió d'aquests no es vegi reflectada per un augment significatiu de la resposta del gen. Per altra banda, en PR10, no s'aconsegueix induir l'expressió endògena del gen del KAP ni amb andrògens ni amb hormona tiroïdal, amb o sense transfecció dels respectius receptors horminals.

L'assaig dels diferents fragments del promotor de KAP (construccions de 224, 638 i 1542 bp respecte de l'origen de transcripció del gen) en diferents tipus cel·lulars com; N2a, CV-1, PCT3 i PR10, va permetre determinar que la resposta androgènica de KAP és específica de cèl·lula. En N2a, el promotor de KAP no respon als andrògens, i en CV-1, l'activació androgènica del promotor és significativament inferior a l'obtinguda en PCT3, que és on s'aconsegueix la màxima inducció del *reporter* amb la construcció K224, en presència d'AR i DHT. En PR10, quan s'utilitza el fragment K638 s'observa una inducció de KAP independent de lligand que és específica de promotor, ja que pel fragment de 1430 bp del promotor del pepsinogen C (gen d'expressió ubíquua) assajat com a control del tractament per andrògens, s'obté una inducció dependent de lligand, també observada per dit plàsmid, en PCT3. Per tant, es disposa de quatre sistemes en els que la comparació dels nivells de diferents factors, possiblement implicats en la resposta androgènica cèl·lula específica de KAP, pot ser de gran importància per identificar els elements i mecanismes que intervien en la regulació transcripcional del gen del KAP.

La resposta androgènica obtinguda pel fragment de 224 bp del promotor de KAP disminueix amb l'augment del fragment de promotor assajat sota les mateixes condicions, en PCT3. Així, la inducció de 5 vegades respecte el nivell basal produïda per hAR i DHT en K224, disminueix gairebé a la meitat en K638 i desapareix en K1542. Aquesta resposta també ha sigut descrita per Calmont *et al* (170). En l'assaig per transfecció transitòria de 4 fragments del promotor del gen del receptor tipus 2 de la vasopressina, expressat en els túbuls col·lectors renals, observen la màxima inducció pel fragment de 1004 bp, la qual és nul·la pels fragments de 2061 i 4046 bp i és recuperada parcialment pel fragment de 4255 bp. Aquests autors, identifiquen l'existència d'un repressor ubíquu, els efectes inhibidors del que poden ser contrarestats per un altre factor que té el seu lloc d'unió en el fragment

de 4255 bp de dit promotor. D'aquesta manera, podríem postular, també, l'existència d'un inhibidor, el qual podria no tenir efecte en la totalitat de la seqüència del promotor de KAP o que, *in vivo*, no tingués capacitat per reconèixer el seu lloc d'unió en el promotor degut a que aquest no sigués accessible com a conseqüència de l'estructura de la cromatina.

Finalment, es recalca que els assaigs de transfecció transitòria dels fragments de 1542, 638 i 224 bp des de l'inici de transcripció del promotor del gen del KAP, en diferents línies cel·lulars, han demostrat, primerament, la capacitat de les cèl·lules PCT, derivades del segment S2 del túbul proximal renal, de promoure la transactivació dependent d'andrògens del fragment de 224 bp del promotor, d'una manera dependent de lligand i d'AR. La mutació de l'ARE putatiu, definit en la posició -39 bp des de l'inici de transcripció, en la construcció K224, i que va ser prèviament identificat com un element que unia l'AR *in vitro*, en assaigs de retardament en gel, impedeix la transactivació dependent d'andrògens del *reporter*, demostrant que els andrògens controlen l'expressió del gen del KAP de forma directa a nivell transcripcional a través del seu motiu d'unió a DNA, només en PCT.

Encara que en el promotor de KAP, l'ARE es solapa amb la caixa TATA, els assaigs de transfecció transitòria ens indiquen que aquest element és funcional i que no interfereix amb la unió a DNA dels factors que constitueixen la maquinària basal de transcripció, a diferència del que succeeix en el promotor de l'osteocalcina, on es va identificar un lloc d'unió del receptor de glucocorticoïdes totalment solapat amb la caixa TATA, pel que el receptor i el TFIID competien, i en conseqüència la transcripció era reprimida (171). Tot i així, es pot diferenciar clarament la posició de la caixa TATA en un i altre promotor, fet que ens indica un possible mecanisme diferent de control, ja que en el promotor de KAP, l'ARE i la TATA estan disposats en sèrie amb el solapament de només 4 nucleòtids mentre que, en el de

l'osteocalcina, la TATA es troba dins del GRE.

Els resultats exposats indiquen que el fragment de 224 bp del promotor del gen del KAP conté els elements *cis* necessaris per la transactivació mitjançada per andrògens del *reporter*, en un context cel·lular específic, i conseqüentment, que les cèl·lules PCT però no les PR presenten els factors en *trans* específics i/o els coreguladors del receptor d'andrògens necessaris per permetre la transactivació androgènica del promotor de KAP. Degut a que existeixen diferents exemples de coactivadors teixit específics de receptors esteroidals (172, 173), el sistema cel·lular PCT/PR serà primordial per a la identificació futura dels coactivadors cel·lulars específics del receptor d'andrògens, implicats en el control de l'expressió gènica dependent d'andrògens en el ronyó murí. A més a més, el comportament de les construccions en aquestes línies cel·lulars recorda a la situació *in vivo*, on s'observa una resposta androgènica diferent en la *pars recta* i en la *pars convoluta* del túbul proximal.

IV. Correlació de la regulació multihormonal del gen del KAP observada en el ronyó de ratolí amb el comportament del promotor de KAP en les línies cel·lulars renals PKSV-PCT i PKSV-PR

L'expressió del gen del KAP està mitjançada per T₃ (111) en les cèl·lules S3 del túbul proximal renal. En les posicions -604 i -264 del promotor de KAP, s'hi identifica la seqüència TGACC, dita seqüència que consisteix en un mig palíndrom invertit, ha sigut

descrita per Ribeiro *et al* (174), com un element capaç d'unir hTR β en forma monomèrica en presència de T₃. Altres autors (175, 176), descriuen l'existència d'aquest tipus de seqüència actuant com un element de resposta funcional, i es va especular sobre la seva possible implicació en la regulació per T₃ del gen del KAP, en ronyó (111). No obstant, degut a que, posteriorment, es va conèixer que les seqüències reguladores implicades en la transactivació dependent de T₃ en S₃, no es trobaven en el fragment del promotor de KAP de 1542 bp (146), no es va assajar l'efecte de T₃ sobre els diferents fragments del promotor de KAP en PR10, i es va desestimar la intervenció de la seqüència anteriorment esmentada, TGACC, en la regulació transcripcional de KAP, encara que pugui ser funcional en el context d'un promotor determinat. Per altra banda, l'anàlisi realitzat per determinar la capacitat de T₃ per modificar la resposta androgènica de KAP, en PCT3, ha demostrat que cap de les tres construccions de KAP (K224, K638 i K1542) assajades, en presència de TR β i RXR α en medi lliure d'hormones tiroïdals o amb T₃ afegida, respon a l'hormona. Els mateixos experiments realitzats en cèl.lules transfectades amb el receptor d'andrògens i tractades amb DHT, mostren que la cotransfecció dels receptors tiroïdals sols o en combinació amb T₃, reprimeix l'efecte androgènic presentat pel fragment de 224 bp del promotor de KAP. Aquest resultat concorda amb els nivells d'expressió del mRNA de KAP endogen, els quals segueixen el mateix patró de regulació hormonal que el de les construccions de KAP, en aquestes mateixes cèl.lules. Per tant, degut a que els resultats en el sistema cel.lular no es correlacionen amb els observats en el ronyó (111, 112), es va hipotetitzar que els efectes de l'hormona tiroïdal sobre l'activació androgènica cortical podrien ser indirectes a través de l'acció d'una altra hormona o factor. Per altra banda, el fi control multihormonal que exhibeix el gen del KAP en el ronyó, podria requerir un estricte equilibri molar de receptors hormonaals, coreguladors i altres factors de transcripció, que és difícil que es presenti i mantingui en un sistema aïllat *in vitro*.

Degut a que en el ronyó s'observa una correlació perfecta entre la presència de T_3 , l'expressió de les proteïnes C/EBP α i C/EBP β i l'expressió del mRNA del gen del KAP, ens va interessar l'estudi d'aquestes dues isoformes a nivell funcional.

Les dades que s'han obtingut a l'analitzar els nivells de proteïna de C/EBP α i C/EBP β en el ronyó de ratolí, mostren la inducció per andrògens i T_3 de dites proteïnes. Resultat recolzat per altres autors que també identifiquen la deprivació androgènica com la causa de la disminució en l'expressió de C/EBP α (85). No obstant, encara que en els extractes nuclears dels models cel·lulars PCT3 i PR10, C/EBP α i C/EBP β es detecten de forma abundant, no s'observa l'augment l'increment de la proteïna però sí dels seus respectius mRNAs després de la inducció amb DHT i la transfecció de l'AR, en PCT3. Cal recalcar que, ni en els extractes renals ni en els cel·lulars, els nivells d'expressió de C/EBP α i C/EBP β es correlacionen amb els nivells de proteïna, resultat obtingut també per altres autors (129, 139) i que s'atribueix a la complexitat de la regulació tant a nivell transcripcional, traduccional i postraduccional que poden presentar aquest tipus de proteïnes.

L'expressió de les isoformes C/EBP està altament regulada i la relació d'aquestes isoformes és important en el control de la proliferació i diferenciació. Primerament, es va proposar un mecanisme de degoteig en l'exploració ribosomal que produïa que la traducció s'iniciés en diferents codons AUG interns (177), com a causa de la generació de les isoformes C/EBP truncades, però, recentment, també s'ha suggerit que l'existència de dites isoformes amb l'amino-terminal truncat, s'explicaria a través d'un fenomen de tall proteolític limitat (178). Calkhoven *et al* (179), observen que les vies que modulen l'activitat d' eIF-2 i eIF-4E alteren la relació d'isoformes de C/EBP en conjunció amb el seu ORF. Segons el model descrit, les vies que activen la traducció proteica, per exemple, per diferents

factors de creixement, provoquen l'increment de l'expressió d'isoformes C/EBP truncades, que al seu torn afavoreixen la proliferació. Al contrari, les vies que reprimeixen les funcions eIF, preferentment desvien l'expressió de C/EBP cap a les isoformes *full-length*, fet que recolza l'aturada del creixement cel·lular i la diferenciació. També, es suggereix que els ORF actuen com a mediadors de l'activitat dels factors de traducció per ajustar la relació de les isoformes C/EBP en concordança, i, conseqüentment, determinar el destí de la cèl·lula.

El model proposat per Calkhoven *et al* (179), s'ajusta als resultats obtinguts en el ronyó murí, PCT3 i PR10. En els tres sistemes esmentats, es detecten les isoformes *full-length* de C/EBP α i C/EBP β , és a dir; p42C/EBP α , p38C/EBP β (en PCT3 i PR10) i p35C/EBP β (en ronyó, PCT3 i PR10), que concordaria amb l'estat de diferenciació del teixit i de les cèl·lules.

No obstant, en aquests moments, no podem explicar els nivells de mRNA de C/EBP α i C/EBP β amb la quantitat de proteïna, tant en el model animal com en el cel·lular. Aquest és un fet comú a altres treballs sobre C/EBPs (181), ja que encara es coneix poc sobre la complicada regulació que presenten aquests factors de transcripció. Per altra banda, també es podria fer un estudi més exhaustiu sobre la cinètica d'acumulació del mRNA i de la inducció de la proteïna (129).

Assaigs de transfecció transitòria realitzats en aquest treball també han demostrat que, en PCT3, tant C/EBP α com C/EBP β o l'heterodímer C/EBP α -C/EBP β , tenen un efecte additiu al dels andrògens en el fragment de 638 bp respecte l'inici de transcripció del promotor de KAP. No obstant, és notori el fet de que C/EBP α per si sola aconsegueix la mateixa inducció que la produïda pels andrògens sobre el promotor de KAP, i que la

sobreexpressió de dita proteïna acompanyada per la inducció amb DHT 10^{-6} M, assoleix la mateixa magnitud de resposta que la desencadenada per l'AR induït i C/EBP β o l'heterodímer C/EBP α -C/EBP β . Per altra banda, si es té en compte la dada que indica que 1) la quantitat de proteïna C/EBP α , visualitzada en els extractes nuclears renals d'animals mascles control, és major que la identificada en els extractes dels castrats, a més a més de l'increment observat en l'expressió del gen de dita proteïna, en cèl.lules PCT3 transfectades amb l'AR i induïdes amb DHT 10^{-6} M; juntament amb la dada de que 2) l'activitat del *reporter* augmenta amb la presència d'andrògens i C/EBP α ; es pot suggerir que els andrògens podrien influir indirectament sobre l'activitat del promotor del gen del KAP a través de C/EBP α , mitjançant mecanismes tals com: increment de la síntesi, capacitat d'unió a DNA o interacció amb un altre factor de transcripció o coactivador.

A tot això, cal recordar que C/EBP α : a) pot participar en la mediació de la resposta a T_3 (180); b) pot actuar com una molècula efectora de la via de senyalització d'AMPC (181); c) la seva expressió està temporalment regulada i d) sembla tenir una funció com a factor de transcripció important en el desenvolupament. Aquesta última tasca la porta a terme en col.laboració amb els andrògens en la regulació del patró d'expressió del factor IX (164), durant la vida de l'individu. A més a més, és interessant esmentar que el promotor del gen de C/EBP α murina s'autoregula (encara que també altres proteïnes C/EBP relacionades hi poden participar) (182), de manera que l'estímul pot desaparèixer però l'efector es perpetua, fet que també ajudaria a explicar com, *in vivo*, la resposta cortical de KAP mitjançada per andrògens necessita només l'efecte puntual de T_3 perquè es mantingui quan es reestableix la situació d'hipotiroïdisme.

Pels resultats i raons esmentades, es va intentar induir per C/EBP α i andrògens el

promotor de KAP, en cèl·lules en que endògenament no s'hi expressa el gen, aquestes van ser PR10 i CV-1. Curiosament, en PR-10, C/EBP α actua com a un inhibidor de l'activitat basal del promotor, funció totalment oposada a la desenvolupada en PCT3 i específicament pel promotor de KAP, ja que és nul·la pel promotor no teixit-cèl·lula específic dependent d'andrògens utilitzat com a control androgènic (pepsinogen C). Un comportament semblant ha sigut descrit per un nou coactivador anomenat mZac1b (40), que actua tant com a activador o com a repressor de l'activitat de receptor nuclears depenent del gen *reporter* i del tipus cel·lular. Per altra banda, en CV-1, el *reporter* no respon a C/EBP α . Pel que s'ha esmentat, es pot dir que l'efecte de C/EBP α sobre el promotor de KAP és específic de cèl·lula, i que la presència de repressors i/o l'absència de coactivadors podria explicar la incapacitat de C/EBP α per transactivar el promotor del gen del KAP en CV-1. Fet recolzat per la funció que se li ha descrit a C/EBP α , que és la de contribuir en el patró cel·lular específic d'expressió gènica i en la diferenciació tissular (183).

Per analitzar l'efecte de C/EBP sobre el promotor de KAP s'ha utilitzat el fragment de 638 bp des de l'inici de transcripció d'aquest promotor perquè és en aquest fragment en el que s'hi han identificat 4 caixes putatives de ser reconegudes per C/EBP. La devallada dràstica de l'activitat basal del promotor de KAP, irrecuperable per la sobreexpressió de C/EBP α i C/EBP β , és conseqüència de la deleció de les caixes localitzades en les posicions 429-420 (CTCCAGCAAT) i 457-448 (CTTTTGCAAT) del promotor. Dites caixes són un 70% i 60% idèntiques a la seqüència consens C/EBP (A/gTTGCGT/acAAT/c), i conserven les timines en posició 2 i 3 (en 457-448, i només la 2 en 429-420) i les adenines en posició 8 i 9, nucleòtids importants per la unió de la proteïna a l'element de resposta, a més de les posicions 4 i 7, també, significativament importants per a la unió al DNA (la posició 7 està conservada en ambdues seqüències) (149).

La disminució de l'activitat basal del promotor del gen del KAP encara es veu més accentuada, doncs passa a ser de 35 a 136 vegades respecte el plàsmid no mutat, quan es realitza el mateix assaig amb privació d'andrògens. D'altra banda, la mutació de les dues seqüències descrites i de l'ARE localitzat en la posició -39 (dita mutació ja ha sigut descrita anteriorment), produeix el mateix efecte que la privació d'andrògens. Ambdues situacions experimentals indiquen que C/EBP i els andrògens intervien en la transactivació del promotor de KAP amb un efecte sinèrgic, ja que la presència de l'ARE natiu impedeix que la inhibició produïda per la deleció de les dues putatives caixes C/EBP disminueixi fins als nivells detectats amb medi no depleccionat d'andrògens per la construcció que té les tres mutacions (caixes C/EBPs i ARE). Per aquesta raó, les cèl·lules PCT3, també han de posseir receptors d'andrògens funcionals com la línia PCT parental de la que deriven (89), els quals no poden actuar quan es priva d'andrògens. Aquest fet, juntament amb la presència de grans quantitats de C/EBP α i C/EBP β , en PCT3, impedeix que els resultats d'activitat dels promotors nadius, en els assaigs de transfecció transitòria, siguin més elevats, ja que el nivell basal correspon a un estat en el que, possiblement, les C/EBP i els AR endògens influeixen al promotor de KAP. És interessant observar, també, que la presència de T₃ no modifica els nivells endògens de C/EBP α i C/EBP β en les cèl·lules PCT3, contràriament al que passa en el ronyó i, que per aquest motiu es pot explicar, almenys en part, la resposta diferent de KAP a T₃ entre el model animal i el cel·lular.

Per altra banda, Boruk *et al* (184), mitjançant assaigs de GST *pull-down* i immunoprecipitació, observen que tant C/EBP α com C/EBP β i C/EBP δ interaccionen amb l'AR. També, es coneix que membres de la família C/EBP poden interaccionar directament amb factors de la maquinària basal de transcripció. Per tot això, es poden postular mecanismes d'acció independents per C/EBP i els andrògens o dependents, a través

de la interacció de C/EBP i AR.

Són necessaris els assaigs de retardament en gel, que actualment s'estan realitzant en el laboratori, per poder corroborar l'assaig funcional presentat per C/EBP. Aquests experiments també permetran identificar quin membre de la família C/EBP interacciona amb més afinitat amb les seqüències esmentades, candidates a ser un element de resposta de proteïnes C/EBP o de proteïnes relacionades com DBP (185), que pertany a la família de factors de transcripció que inclou Fos, Jun, CREB, i C/EBP, degut a que comparteixen el domini bàsic d'unió a DNA, altament conservat, i s'ha demostrat que es troba en ronyó i en les cèl·lules PCT i PR (90). També, no podem oblidar altres dificultats afegides, tals com que C/EBP α , C/EBP β i C/EBP δ mostren la mateixa especificitat d'unió (149) i que la modificació d'aquests factors de transcripció produïda per fosforilació, glicosilació, i reaccions de reducció-oxidació, altera la seva capacitat d'unió i funció.

Com ja s'ha discutit anteriorment, les C/EBPs poden formar part de la via d'activació de GH/IGF-I, mecanisme també relacionat amb la regulació androgènica i amb l'hormona tiroïdal.

L'IGF-I produeix un increment en l'activitat transcripcional dependent d'andrògens del fragment de 224 bp del promotor del gen del KAP en PCT3. Aquesta dada, conjuntament amb els resultats prèviament obtinguts en els experiments *in vivo* (111, 112), suggereix que, almenys en part, l'hormona tiroïdal pot induir l'expressió de KAP en el còrtex renal a través del control de l'expressió de GH (82) i, al seu torn, d'IGF-I, ja que l'IGF-I té una funció essencial en la inducció per GH del creixement postnatal del ratolí (186). Per altra banda, és necessari recordar que T₃ i IGF-I poden actuar en paral·lel i independentment un de l'altre.

En aquest punt de la discussió, cal tornar a remarcar que, la necessitat de GH es fa evident quan es comparen els resultats observats en els ratolins congènits *hyt/hyt* deficients en hormona tiroïdal, que encara presenten mRNA de KAP en el còrtex renal (111), respecte els resultats obtinguts en ratolins amb hipotiroïdisme congènit induït farmacològicament, en els que l'expressió del mRNA de KAP és totalment inexistent en el còrtex (112). No obstant, encara que els nivells de T_3 i T_4 en plasma i ronyó demostrin l'existència d'un hipotiroïdisme profund en ambdós models, els ratolins tractats amb *goitrogen* presenten una deficiència de GH associada, que és evident pel tamany i mida corporals reduïts. A més a més, el fenotip dwarf exhibit pels animals amb hipotiroïdisme farmacològic suggereix que no només l'hormona tiroïdal sinó també la GH pot estar implicada en el control androgènic de l'expressió de KAP.

Com que la resposta androgènica es veu augmentada amb la mateixa intensitat tant per IGF-I com per ortovanadat sòdic, en PCT3, es pot especular sobre la participació de la via de les MAPKs en dita resposta (187). Ikonen *et al* (55), demostren que es pot donar una activació sinèrgica produïda per la transactivació dependent d'AR i activadors de proteïna quinases, que no implica canvis en el contingut cel·lular d'AR o en l'afinitat del receptor per un determinat element de DNA, sinó que sembla que sigui el resultat d'una interacció alterada per fosforilació, de l'AR activat per lligand amb altres proteïnes de la maquinària transcripcional.

En PCT3, els mecanismes d'acció de l'IGF-I no estan del tot clars. En primer lloc, els receptors d'IGF-I, en el ronyó madur murí, només es localitzen en els túbuls distals i en les cèl·lules epitelials del glomèrul renal (188) i la seva expressió està bloquejada en cultius de ronyó murí (189). En segon lloc, la cotransfecció del receptor d'IGF-I aboleix completament

la inducció produïda per l'IGF-I sobre l'activació androgènica del gen del KAP, indicant que l'efecte d'aquest factor podria ser dut a terme a través d'un altre receptor, de manera que l'expressió heteròloga del receptor d'IGF-I podria segrestar el seu lligand i inhibir la seva acció. Per tot això, i degut que en altres models cel·lulars s'observa un augment de l'activació transcripcional produïda per IGF-I amb la cotransfecció de l'IGF-I R, com en la línia cel·lular de rata GH4C1 (187), que és el resultat invers a l'obtingut, s'ha d'hipotetitzar sobre la possible acció d'IGF-I a través del receptor d'insulina. Aquest receptor està present en les cèl·lules epitelials del túbul proximal renal, PCT i PR, a diferència del d'IGF-I, que com s'ha esmentat anteriorment, no hi és present. Com a resultat d'una alta homologia entre l'IGF-I i la insulina i entre els seus receptors, l'IGF-I pot unir-se al receptor d'insulina encara que amb una afinitat molt més baixa que la presenta pel seu propi receptor i viceversa. Per altra banda, s'ha demostrat que les cèl·lules del túbul proximal renal expressen els gens de diferents IGFBPs, que són els principals moduladors de l'acció d'IGF-I (190).

En PR10, es fa evident l'efecte de l'ortovanadat sòdic sobre la capacitat d'inducció per andrògens de K224, però no d'IGF-I. Encara que amb un inhibidor de fosfatases, com l'ortovanadat sòdic, s'aconsegueix que l'AR i el seu lligand, no capaços d'induir per sí sols el fragment de 224 bp del promotor de KAP, en PR10, augmentin gairebé 4 vegades l'activitat basal del *reporter*, aquesta és inferior a la produïda per l'AR sol en K638, en aquestes mateixes cèl·lules. Recentment, ha estat descrita l'activació independent d'andrògens de l'antigen específic prostàtic (PSA, *prostate-specific antigen*) en cèl·lules humanes de càncer de pròstata per una via dependent d'AR, en la que s'hi implica la PKA (191) i la via de transducció de senyal de les MAPKs (192). La fosforilació de l'AR afavoreix una afinitat més alta del receptor pel seu element de resposta a andrògens en el promotor del gen del PSA (191) o indueix la interacció entre AR i activadors tals com

ARA70 (192). Si es donguessin mecanismes semblants en K637 s'esperaria un resultat semblant per K224, degut a que tots dos fragments contenen el mateix element de resposta a andrògens (ARE). Però, com que l'efecte és específic del fragment de 638 bp del promotor del gen del KAP, s'intueix que aquest fragment té elements reguladors que s'utilitzen de manera diferent segons el context cel·lular sigui PCT o PR. Es podria hipotetitzar que l'AR és capaç d'activar un factor de transcripció que pot unir-se a elements *cis* en K638 o, alternativament, que AR dereprimeix el fragment de 638 bp del promotor mitjançant el reclutament d'un corepressor limitant d'altres factors de transcripció que actuen en dit fragment. El fet que l'addició de DHT inhibeixi els efectes positius de l'AR recolzaria la segona hipòtesi, si es considera que el lligand pot alliberar el corepressor de l'AR (29).

Finalment, es va començar a estudiar la proteïna activadora de transcripció AP-2, ja que juntament amb els factors C/EBP, s'ha descrit la seva participació en la regulació de l'expressió d'alguns gens específics de cèl·lules epitelials del túbul proximal renal (150, 151, 152). AP-2 també ha estat identificat com un factor de transcripció que media els efectes de dos sistemes de transducció de senyal diferents que estan implicats en el control de la proliferació cel·lular (120); en un dels que hi està involucrada la PKC i en l'altre, la formació d'AMPc i la PKA. La seva funció pot ser de coactivador o de factor de transcripció. Pena *et al* (193), conclueixen que AP-2 indueix el promotor de *CYP11A1* oví a través de la interacció i estimulació de Sp1 independentment de la seva unió a DNA. Aquests autors proposen que AP-2 podria ser un factor intermediari que actuaria com a pont entre Sp1 i coactivadors de l'aparell basal de transcripció. Johnson *et al* (194), també impliquen AP-2 i Sp1 com a reguladors de la resposta a AMPc del promotor de la gonadotropina coriònica β , encara que en aquest cas actuen via el seu element de resposta i els seus efectes són oposats. Aquests pocs exemples ja ens permeten veure que AP-2 és un factor amb un gran ventall de

possibilitats, les quals es diversifiquen degut a l'existència d'isoformes.

S'ha comprovat que AP-2 s'expressa a ronyó i a PCT3, però no a PR10, que és on la sobreexpressió de la proteïna converteix la inducció androgènica independent de lligand del fragment de 638 bp del promotor de KAP, en dependent de lligand. Aquest fet suggereix la possibilitat de que AP-2 sigui un factor necessari perquè la resposta androgènica del promotor del gen del KAP sigui dependent de lligand, en ronyó.

IV. Model proposat

De les dades presentades en surt la següent hipòtesi:

La presència de l'hormona tiroïdal en el període del desenvolupament en el que es produeix el pic fisiològic de dita hormona, permet que es desencadeni el patró d'expressió teixit específic preestablert. En el cas del ronyó, la TH i la GH col.laborarien potenciant diferents vies, que poden convergir en algun efector, possiblement membre de la família de factors de transcripció CCAAT/Enhancer-Binding Protein, implicat en la regulació teixit específica de determinats gens durant el desenvolupament, i que, conjuntament amb el pic androgènic de la pubertat, permetria la resposta cortical androgènica del gen del KAP.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1- La síntesi puntual de T_3 a partir del dia 11 de vida postnatal, inicia una resposta cortical de KAP feble que es va fent més intensa cap al voltant del dia 15-16, que és quan es produeix un pic fisiològic de T_4 i s'inicia el desenvolupament puberal de l'animal. L'efecte puntual de la TH perdura en un ratolí C57BL/6 mascle que en el moment del sacrifici és hipotiroïdal i la presència simultània de TH i GH, en aquests animals hipotiroïdals, recupera l'expressió cortical del gen del KAP observada en animals control adults.
- 2- La presència de C/EBPs es troba correlacionada amb l'expressió del gen del KAP en el ronyó de ratolí. Es detecten les formes p42C/EBP α i p35C/EBP β , en extractes nuclears de ronyons de ratolins mascles control i hipotiroïdals induïts amb T_3 durant el 7è i 21è dia postnatal, però no en els d'hipotiroïdals no tractats. Les mateixes isoformes p42C/EBP α i p38C/EBP β i p35C/EBP β , apareixen també, en els extractes nuclears de PCT3 i PR10.
- 3- Les línies PKSV-PCT i PKSV-PR permeten l'estudi de promotors regulats per andrògens, en assaigs de transfecció transitòria.
- 4- La resposta androgènica del gen del KAP és específica de cèl.lula:
 - En N2a, el promotor de KAP no respon als andrògens, i en CV-1,

l'activació androgènica del promotor és significativament inferior a l'obtinguda en PCT3.

- En PCT3, s'aconsegueix la transactivació dependent d'andrògens del fragment de 224 bp del promotor de KAP, d'una manera dependent de lligand i d'AR. Dita resposta androgènica es veu augmentada amb la mateixa intensitat tant per IGF-I com per ortovanadat sòdic.
- En PR10, s'observa la inducció dependent d'AR i independent de lligand del fragment de 638 bp del promotor de KAP, que també és específica de promotor.

- 5- La mutació de l'ARE putatiu, definit en la posició -39 bp del promotor de KAP, impedeix la transactivació dependent d'andrògens del *reporter*, demostrant que els andrògens controlen l'expressió del gen del KAP de forma directa a nivell transcripcional, en PCT3.
- 6- Els nivells endògens d'expressió de mRNA del gen del KAP segueixen el mateix patró de regulació hormonal que el de les construccions del promotor del mateix gen, en PCT3. És a dir, en aquest tipus cel·lular, la resposta androgènica es veu reprimida per T_3 però la T_3 per sí sola no té efecte sobre l'activitat transcripcional del gen del KAP, contràriament al que s'observa en el model animal.
- 7- L'efecte positiu de l'IGF-I en l'activitat transcripcional del fragment de 224 bp del promotor de KAP, en les cèl·lules PCT3, junt amb els resultats primarencs obtinguts dels experiments en animals *hyt/hyt*, *lit/lit* i Jackson *dwarf*, es suggereix que, almenys en part, l'efecte produït per la T_3 sobre l'expressió del gen del KAP, en el ronyó de ratolí, podria

produir-se sobre el control de l'eix GH/IGF-I.

- 8- La sobreexpressió de C/EBP α , C/EBP β o d'ambdues simultàniament, a cèl.lules PCT3 transfectades amb el fragment de 638 bp del promotor del KAP, mostra que tant C/EBP α com C/EBP β , participen en la inducció del promotor i que ho fan amb la mateixa intensitat que els andrògens. A més a més, s'observa que, en presència d'andrògens, tant C/EBP α com C/EBP β són capaces d'induir respostes màximes del promotor del gen del KAP.
- 9- C/EBP α contribueix en el patró cèl.lula específic d'expressió gènica, ja que a diferència de la funció estimuladora que exerceix en PCT3, en PR10 actua com a un inhibidor de l'activitat basal del promotor de KAP, i en CV-1 no té cap efecte sobre aquesta.
- 10- La devallada dràstica de l'activitat basal del promotor de KAP, irrecuperable per la sobreexpressió de C/EBP α i C/EBP β , és conseqüència de la deleció de les caixes localitzades en les posicions 429-420 (CTCCAGCAAT) i 457-448 (CTTTTGCAAT) del promotor, homòlogues a la seqüència consens C/EBP (A/gTTGCGT/acAAT/c). En aquestes condicions, la sobreexpressió de C/EBP α i C/EBP β no aconsegueix restituir la capacitat de transactivació del promotor, indicant que l'efecte d'aquests factors de transcripció és a través de la unió a les caixes esmentades.
- 11- Tant la deplecció androgènica com la mutació de l'ARE, conjuntament amb la deleció de les caixes C/EBP putatives (429-420 i 457-448), augmenta significativament la disminució de l'activitat basal del promotor produïda per la deleció de dites caixes C/EBP. Per tant, els andrògens i les proteïnes C/EBP col.laboren en la transactivació del

gen del KAP.

12- Els andrògens i la T_3 a través del control de C/EBPs sinergitzen en l'activació transcripcional del gen del KAP. És interessant recalcar, en aquest punt, que la presència de T_3 no modifica els nivells endògens de C/EBP α i C/EBP β en les cèl.lules PCT3, contràriament al que passa en el ronyó de ratolí i, que per aquest motiu es pot explicar, almenys en part, la resposta diferent del promotor del gen del KAP a T_3 entre el model animal i el cel.lular.

13- Les cèl.lules PCT3 però no les PR10, presenten els factors en *trans* específics i/o coreguladors del receptor d'andrògens necessaris per permetre la transactivació androgènica del promotor del gen del KAP. Per aquesta raó, el sistema cel.lular PCT/PR serà primordial per a la identificació futura dels coactivadors cèl.lula específics de l'AR, implicats en el control de l'expressió gènica dependent d'andrògens en el ronyó murí. AP-2 pot ser un factor necessari perquè la resposta androgènica del promotor del gen del KAP sigui dependent de lligand, en ronyó.