



## **TESI DOCTORAL**

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

### **ESTUDI DELS MECANISMES IMPLICATS EN LA REGULACIÓ HORMONAL I CÈL.LULA ESPECÍFICA DEL GEN DE LA KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN (KAP), EN EL RONYÓ DE RATOLÍ.**

Memòria presentada per Montse Soler i Codina per optar al grau de Doctora  
en Bioquímica i Biologia Molecular

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

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

**Tutor: Dr. Simó Schwartz Riera**

La interessada:

La directora de Tesi:

**Montse Soler i Codina**

**Dra. Anna Meseguer Navarro**

## ÍNDEX

# ÍNDEX

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓ                                                                       | 1  |
| I. Control transcripcional de l'expressió gènica en eucariotes. Aspectes generals | 2  |
| II. Les hormones en el control de l'expressió gènica                              | 10 |
| II.a.Hormones esteroïdals, tiroïdals, vitamina D i àcid retinoic                  | 10 |
| II.a.1. Receptors                                                                 | 13 |
| A) Estructura                                                                     | 14 |
| B) Mecanismes d'acció hormonal                                                    | 16 |
| a) Unió a DNA                                                                     | 16 |
| b) Proteïnes reguladores                                                          | 17 |
| c) Fosforilació                                                                   | 22 |
| d) Efectes no genòmics de les hormones esteroïdals i tiroïdals                    | 25 |
| II.b. La cromatina en la regulació hormonal                                       | 27 |

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.c. Regulació androgènica i tiroïdal                                                                                         | 30 |
| II.c.1. CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBPs)                                                                               | 35 |
| II.d. GH i IGF-I                                                                                                               | 38 |
| II.d.1. Mecanismes d'acció de GH i d'IGF-I                                                                                     | 40 |
| III. El ronyó de ratolí                                                                                                        | 42 |
| III.a. El ronyó com a model de l'acció androgènica                                                                             | 42 |
| III.b. Descripció anatòmica                                                                                                    | 42 |
| III.c. Túbul contornejat proximal                                                                                              | 45 |
| IV. El model cel·lular: Línies cel·lulars de túbul proximal renal murí                                                         | 48 |
| V. La Kidney Androgen-regulated Protein (KAP) com a model d'estudi del control multihormonal de l'expressió gènica en el ronyó | 50 |
| V.a. Control multihormonal de l'expressió del mRNA de KAP                                                                      | 51 |

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| V.b. Seqüència genòmica de KAP                               | 56        |
| V.c. Seqüència nucleotídica del cDNA de KAP                  | 59        |
| V.d. Anàlisi computacional i funcional de la proteïna KAP    | 60        |
| <b>OBJECTIUS</b>                                             | <b>62</b> |
| <b>MATERIAL I MÈTODES</b>                                    | <b>65</b> |
| <b>I. Animals i tractaments</b>                              | <b>66</b> |
| I.a. Castració                                               | 66        |
| I.b. Tractament amb $\text{KClO}_4$ 1%                       | 66        |
| I.c. Tractament amb 3,5,3'-triiodotironina ( $\text{T}_3$ )  | 67        |
| I.d. Tractament amb hormona de creixement (GH)               | 67        |
| I.e. Sacrifici dels animals                                  | 67        |
| I.f. Disseny experimental                                    | 68        |
| I.f.a. Anàlisi de la necessitat de $\text{T}_3$ postnatal    | 68        |
| I.f.a.1. Per administració exògena de $\text{T}_3$           | 68        |
| I.f.a.2. Per substitució del $\text{KClO}_4$ 1% per<br>aigua | 69        |
| <b>II. Hibridació <i>in situ</i></b>                         | <b>70</b> |

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.a. Preparació de seccions de teixit i tractament<br>dels portaobjectes   | 70        |
| II.b. Preparació de material lliure de ribonucleases                        | 71        |
| II.c. Síntesi de sondes de RNA                                              | 72        |
| II.c.1. Preparació del motlle de la transcripció<br><i>in vitro</i>         | 72        |
| II.c.2. Reacció de transcripció <i>in vitro</i>                             | 73        |
| II.c.3. Protocol d'Hibridació <i>in situ</i>                                | 76        |
| II.c.4. Autorradiografia                                                    | 77        |
| <b>III. Cultiu cel.lular</b>                                                | <b>79</b> |
| III.a. Línies cel.lulars                                                    | 79        |
| III.b. Medis de cultiu                                                      | 79        |
| III.c. Deplecció d'hormones esteroïdals i tiroïdals<br>del sèrum boví fetal | 80        |
| III.d. Hormones                                                             | 81        |
| III.e. Tripsinització                                                       | 82        |
| III.f. Contatge de cèl.lules                                                | 83        |
| III.g. Congelació                                                           | 83        |
| III.h. Descongelació                                                        | 84        |
| III.i. Clonació per dilució al límit                                        | 85        |
| <b>IV. Soques bacterianes</b>                                               | <b>86</b> |
| <b>V. Vectors</b>                                                           | <b>86</b> |

|                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>VI. Clonatge de DNA</b>                                        | <b>90</b>  |
| VI.a. Preparació del vector i de l'insert                         | 90         |
| VI.b. Clonatge de productes de PCR                                | 91         |
| VI.c. Reacció de lligació                                         | 92         |
| VI.d. Electro-transformació amb elevada eficiència<br>d'E. coli   | 93         |
| VI.d.1. Preparació de bacteries competents                        | 94         |
| VI.d.2. Electroporació                                            | 95         |
| <b>VII. Purificació i extracció d'àcids nucleics</b>              | <b>96</b>  |
| VII.a. Extracció de RNA total de teixit i de cèl.lules            | 96         |
| VII.b. Purificació de DNA plasmídic a petita escala<br>(Miniprep) | 98         |
| VII.c. Purificació de DNA plasmídic a gran escala<br>(Maxiprep)   | 98         |
| VII.d. Digestió del DNA                                           | 98         |
| VII.e. Electroforesi de DNA de gels d'agarosa                     | 99         |
| VII.e.1. Electroforesi analítica                                  | 99         |
| VII.e.2. Electroforesi preparativa                                | 99         |
| VII.f. Obtenció de DNA a partir de gels d'agarosa                 | 99         |
| VII.g. Purificació de productes de RT-PCR o PCR                   | 100        |
| <b>VIII. RT-PCR semiquantitativa</b>                              | <b>100</b> |
| VIII.a. Plàsmids                                                  | 101        |
| VIII.b. Oligonucleòtids                                           | 102        |

|                                                   |         |
|---------------------------------------------------|---------|
| VIII.c. Condicions d'amplificació                 | 103     |
| VIII.c.1. Transcripció reversa (RT)               | 103     |
| VIII.c.2. PCR                                     | 104     |
| VIII.d. RT-PCR semiquantitativa en un sol pas     | 104     |
| VIII.e. RT-PCR semiquantitativa en dos passos     | 105     |
| <br>IX. Seqüenciació automàtica                   | <br>107 |
| <br>X. Extracció de proteïna                      | <br>109 |
| X.a. Separació de la fracció nuclear a partir de: | 109     |
| X.a.1.Extracció de proteïna a partir de teixit    | 109     |
| X.a.2.Extracció de proteïna a partir de cèl.lules | 111     |
| X.b. Mètode de Bradford                           | 111     |
| <br>XI. Western blot                              | <br>112 |
| XI.a. Electroforesi i transferència de proteïnes  | 113     |
| XI.b. Immunodetecció de la proteïna               | 114     |
| <br>XII. Assaig de retardament en gel (EMSA)      | <br>116 |
| <br>XIII. Mutagènesi dirigida                     | <br>117 |
| XIII.a. Protocol                                  | 117     |
| XIII.b. Oligonucleòtids                           | 120     |
| <br>XIV. Transfecció transitòria                  | <br>122 |



|                                                                                                                                                     |                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| XIV.a. Plàsmids                                                                                                                                     | 122             |
| XIV.b. Protocol de transfecció transitòria                                                                                                          | 124             |
| XIV.c. Assaig CAT                                                                                                                                   | 126             |
| XIV.c.1. Preparació d'extractes cel·lulars                                                                                                          | 126             |
| XIV.c.2. Reacció $\beta$ -galactosidasa                                                                                                             | 127             |
| 1- Colorimetria                                                                                                                                     | 127             |
| 2- Fluorimetria                                                                                                                                     | 128             |
| XIV.c.3. Reacció CAT                                                                                                                                | 128             |
| XIV.d. Assaig Luciferasa                                                                                                                            | 130             |
| XIV.d.1. Preparació d'extractes cel·lulars                                                                                                          | 130             |
| XIV.d.2. Reacció dual luciferasa                                                                                                                    | 130             |
| <br>RESULTATS                                                                                                                                       | <br>131         |
| <br>I. Determinació del període del desenvolupament murí<br>en el que la $T_3$ permet la resposta cortical dependent<br>d'andrògens del gen del KAP | <br><br><br>132 |
| I.a. Efecte de $T_3$ i GH en la resposta cortical del gen del KAP<br>en ratolins C57BL/6 amb hipotiroïdisme postnatal                               | <br><br>132     |
| I.b. Diferències en l'expressió cortical mitjançada per $T_3$ en<br>mascles i femelles C57BL/6                                                      | <br>139         |

|                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| II. Estudi de la relació entre l'hormona tiroïdal, les C/EBPs i l'expressió del gen del KAP en el ronyó murí durant el desenvolupament postnatal                                                        | 140 |
| II.a. Expressió endògena de KAP, C/EBP $\alpha$ i C/EBP $\beta$ en ratolins mascles C57BL/6 control, hipotiroïdals i castrats, a nivell transcripcional i de proteïna (C/EBP $\alpha$ i C/EBP $\beta$ ) | 141 |
| II.b. Efecte de la T <sub>3</sub> sobre p42C/EBP $\alpha$ i p35C/EBP $\beta$ i la capacitat de transactivació del gen del KAP                                                                           | 143 |
| III. Determinació de la capacitat de resposta a andrògens de les línies cel.lulars renals PKSV-PCT i PKSV-PR, utilitzant com a model el gen del KAP                                                     | 145 |
| III.a. Clonació de PKSV-PCT i PKSV-PR                                                                                                                                                                   | 146 |
| III.b. Transactivació dependent d'andrògens del promotor del gen del KAP en PCT3 i PR10                                                                                                                 | 147 |
| III.c. Especificitat cel.lular del promotor del gen del KAP                                                                                                                                             | 149 |
| III.d. Assaig de retardament en gel del putatiu element de resposta a andrògens (ARE)                                                                                                                   | 151 |

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.e. Assaig funcional de l'element de resposta a andrògens<br>(ARE)                                                                                                                            | 153 |
| IV. Correlació de la regulació multihormonal del gen<br>del KAP observada en el ronyó de ratolí amb el<br>comportament del promotor de KAP en les línies<br>cel·lulars renals PKSV-PCT i PKSV-PR | 155 |
| IV.a. La $T_3$ i el promotor del gen del KAP en PCT3                                                                                                                                             | 155 |
| IV.b. Expressió endògena del gen del KAP en PCT3 i PR10                                                                                                                                          | 157 |
| IV.c. L'IGF-I i el vanadat sòdic modifiquen la capacitat de<br>transactivació dependent d'andrògens del promotor del<br>gen del KAP en PCT3 i PR10                                               | 159 |
| IV.d. Assaig funcional de la capacitat transactivadora de<br>C/EBP $\alpha$ i C/EBP $\beta$ sobre el promotor de KAP                                                                             | 163 |
| IV.e. Expressió endògena de C/EBP $\alpha$ i C/EBP $\beta$ en PCT3 i<br>PR10                                                                                                                     | 165 |
| IV.f. Identificació de dos putatius elements de resposta a<br>proteïnes de la família de C/EBPs                                                                                                  | 169 |

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV.g. Andrògens i C/EBPs en la transactivació del promotor<br>del gen del KAP | 172 |
| IV.h. Expressió endògena d'AP-2 en PCT3, PR10 i ronyó<br>murí                 | 175 |
| IV.i. Assaig funcional d'AP-2 $\alpha$ amb el promotor de KAP                 | 176 |
| V. Model proposat                                                             | 178 |
| DISCUSSIÓ                                                                     | 181 |
| CONCLUSIONS                                                                   | 209 |
| BIBLIOGRAFIA                                                                  | 214 |
| ABREVIATURES                                                                  | 247 |
| AGRAÏMENTS                                                                    | 252 |