

IV. El model cel.lular: Les línies cel.lulars de túbul proximal murí

Cartier *et al* (87), estableixen dos línies cel.lulars de túbul proximal renal, 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. Ambdues línies crescudes en un medi ric en glucosa presenten una expressió estable de l'antigen T gran de SV40, com a conseqüència de l'activació del promotor de la L-PK (L-piruvat quinasa), i una vida prolongada, però no indueixen tumors quan són injectades subcutàniament a ratolins atímics *nude/nude*. Els cultius confluents d'aquests tipus cel.lulars, crescuts en plaques de plàstic o filtres porosos, estan organitzats en monocapes de cèl.lules cuboïdals polaritzades amb microvillis apicals desenvolupats i formen doms.

PKSV-PCT i PKSV-PR presenten les principals característiques morfològiques i funcionals de les cèl.lules de túbul proximal que són: importants quantitats de villina (proteïna d'unió a actina) en els microvillis i quantitats substancials d'activitat hidrolasa i aminopeptidasa N en els dominis apicals de les cèl.lules delimitats per *tight junctions*, indicadors enzimàtics de diferenciació cel.lular proximal i intestinal. Es suggereix que les cèl.lules PKSV-PCT i PKSV-PR romanen diferenciades, fet que es pot observar per la detecció de villina en els microvillis de cèl.lules en creixement, és a dir, l'estat de diferenciació no es veu alterat pel creixement cel.lular. Aquestes cèl.lules també presenten sensibilitat a la parathormona, transport de glucosa depenent de sodi i una gran capacitat d'endocitosi apical (88). Per altra banda, per anàlisi de Scatchard, Ouar *et al* (89), van observar que el citoplasme de dites cèl.lules unia [³H]DHT amb la mateixa afinitat que el de

les cèl.lules renals obtingudes a partir de ratolins castrats i adrenalectomitzats. Tanmateix, el número de llocs d'unió (Nmàx) per les línies és del mateix ordre que el del ronyó. Aquests resultats demostren que les línies PKSV-PCT i PKSV-PR conserven 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 línies cel.lulars (89). Per últim, Vallet *et al* (90), determinen que l'expressió renal de l'isoenzim aldolasa B es troba restringida als túbuls proximals renals, on els transcripts de HNF1 α , HNF1 β , C/EBP α i DBP són també abundants i que les línies cel.lulars PKSV-PCT i PKSV-PR conserven les mateixes característiques, fet demostrat per experiments de transactivació de 190 bp del promotor del gen de l'aldolasa B.

A part de les línies cel.lulars esmentades també existeixen les línies *tsMPT* (91) i MCT (92), que de la mateixa manera que PKSV-PCT i PKSV-PR, són línies cel.lulars de túbul proximal murí, i per últim, també es pot comentar l'existència d'una línia cel.lular de túbul proximal de rata (93). Totes les línies cel.lulars esmentades estan immortalitzades degut a l'expressió de l'antigen T gran de SV40, però només en les línies murines PKSV-PCT, PKSV-PR i *tsMPT*, la transformació per SV40 és condicional. És a dir, en MCT, l'expressió constitutiva de l'antigen T gran de SV40 impedeix que s'aconsegueixi un fenotip plenament diferenciat (92). No obstant, en PKSV-PCT i PKSV-PR, l'expressió de l'antigen T gran de SV40 desapareix quan creixen en medi sense glucosa, degut a que està dirigida per la regió promotora de la L-piruvat quinasa de rata (87, 88) i, en *tsMPT*, la transformació per SV40 està controlada per un promotor condicional per temperatura que pot ser induït per INF- γ , de manera que poden proliferar sota condicions permissives, a 33°C i en presència d'INF- γ , i diferencien sota condicions no permissives, a 39°C i en absència d'INF- γ (91). Ambdues línies cel.lulars presenten les característiques de les cèl.lules de túbul proximal renal.

L'elecció de les línies PKSV-PCT i PKSV-PR recau en el fet de que constitueixen un sistema més adequat per estudiar la regulació hormonal del gen del KAP, degut als estudis prèvis realitzats per Ouar *et al* (89) i Vallet *et al* (90), que per una banda demostren que dit model cel·lular pot ser candidat a respondre als andrògens i, que presenten l'expressió de determinats factors de transcripció que poden trobar-se implicats en l'especificitat de l'expressió del gen del KAP.

V. La Kidney Androgen-regulated Protein (KAP) com model d'estudi del control multihormonal de l'expressió gènica en el ronyó.

El mRNA de KAP representa el 4% del total de RNA poly A que s'indueix per andrògens en el ronyó de ratolí. El gen del KAP presenta una expressió diferent (84, 94) a la d'altres gens regulats per andrògens en el ronyó de ratolí. Les peculiaritats en l'expressió de KAP, fan referència al fet que, és molt sensible a la inducció per andrògens (95), ja que l'expressió del gen del KAP s'indueix més ràpidament, concretament en menys de 6 hores, que la del gen de la β -glucuronidasa, que necessita de 12 a 24 hores de tractament per respondre (96) i de 15 a 21 dies de tractament crònic amb testosterona per assolir una resposta màxima (97, 98). Així mateix, l'expressió de KAP també és particularment insensible a l'acció dels antiandrògens com la flutamida (94) i és induïble per andrògens en ratolins que presenten feminització testicular (Tfm/Y), els quals són deficients en el receptor d'andrògens (95). L'expressió del mRNA de KAP es troba en les cèl·lules epitelials de túbul proximal renal i per RT-PCR i hibridació *in situ*, no s'ha detectat en altres teixits del ratolí

(99). Excepcionalment, però, s'ha trobat expressió del gen en l'úter de femelles prenyades en els últims dies de gestació i s'ha observat un augment de l'expressió en el ronyó murí durant els dies previs al naixament (100). Posteriorment, Runic *et al* (101), detecten un patró d'expressió de KAP en úter de rata diferent al del ratolí (100). El KAP de rata presenta nivells elevats d'expressió en l'úter de rates en ciclació i el perfil d'expressió que s'observa concorda amb els nivells plasmàtics d'estrògens de l'animal (101). Per altra banda, la funció de la proteïna és desconeguda i es va descriure inicialment com un producte majoritari de la traducció *in vitro* d'espècies de mRNA induïbles per andrògens (102). Recentment, Cebrian *et al* (99), han descrit que la proteïna KAP interacciona específicament amb la ciclofilina B. Ratolins mascles C57BL/6 tractats amb ciclosporina A exhibeixen una disminució significativa dels nivells de proteïna de KAP i, per altra banda, la sobreexpressió de KAP controlada per tetraciclina en cèl.lules del túbul proximal renal (PKSV-PCT) establiment transfectades, disminueix significativament els efectes tòxics de ciclosporina A (99). Així doncs, aquests resultats indiquen l'existència d'una relació funcional entre KAP, ciclofilina B i la nefrotoxicitat deguda a ciclosporina A, suggerint, en conseqüència, un paper important de KAP en la fisiologia renal (99).

V.a. Control multihormonal de l'expressió del mRNA de KAP

Tal com s'ha indicat, l'expressió del gen del KAP es produeix en les cèl.lules epitelials del túbul proximal. A dosis fisiològiques d'andrògens, el gen s'expressa en tots els segments del túbul proximal, mentre que existeix una expressió basal elevada en absència d'andrògens, en femelles i mascles castrats, que es localitza en les cèl.lules S3 de la zona externa de la medul.la externa del ronyó (103). Aquesta expressió també s'observa en animals Tfm/Y,

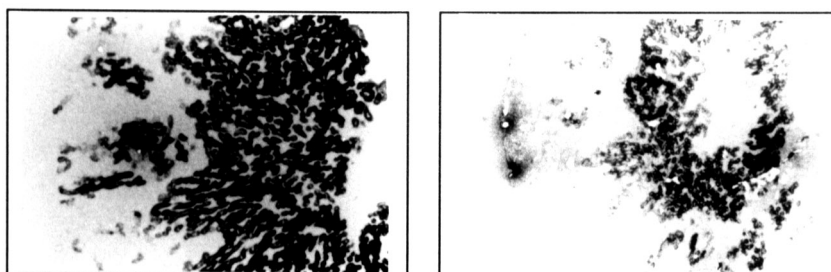
portadors d'un receptor d'andrògens mutat, però no en els segments corticals S1/S2, ja que són necessaris, simultàniament, andrògens i receptors funcionals per l'expressió del gen en el còrtex renal (104), i per aquesta raó els animals Tfm/Y no expressen el gen del KAP en S1/S2 quan se'ls hi administra andrògens de forma exògena.

Els estrògens incrementen l'expressió en S3, mentre que les cèl.lules de la part cortical no responen a l'acció estrogènica (105). De la mateixa manera, que quan no hi ha andrògens desapareix el senyal cortical, s'ha demostrat que l'eliminació de les hormones esteroïdals (gònades i glàndules suprarenals) no és capaç d'eliminar el senyal a S3 (105), la qual desapareix en animals hipofisectomitzats. El tractament d'aquests animals amb diferents hormones de la hipòfisi anterior, així com la utilització d'animals deficients en GH i PRL (*little*) (106) i GH, PRL i TSH (*dwarf*) (107), va indicar que la TSH era la responsable de l'expressió de KAP a S3 (108). Posteriorment, utilitzant animals *hyt/hyt* (109, 110) deficients en T_3 per un defecte en el receptor de la TSH de la glàndula tiroide, es va comprovar que la T_3 era la responsable final de l'expressió del gen en aquestes cèl.lules (111). Aquesta expressió específica de S3 no està relacionada amb la presència selectiva dels receptors α i β de T_3 , tota vegada que estudis immunohistoquímics han demostrat l'existència d'aquests al llarg de tot el túbul proximal, indicant doncs, la participació de factors nuclears específics presents en S3 i no en S1/S2, els quals encara resten per determinar (111). Curiosament i malgrat que T_3 no té efecte en el segment cortical d'animals castrats, sí que la seva absència disminueix les respostes corticals dependents d'andrògens en animals control, suggerint la necessitat d'una col.laboració de les dues hormones per obtenir una expressió cortical màxima. Aquest efecte ha estat constatat en tres models d'hipotiroïdisme diferents (112).

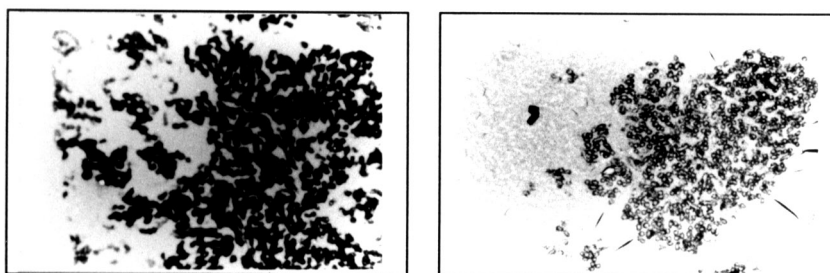
S'han estudiat els efectes que l'hipotiroïdisme prenatal i postnatal exerceixen sobre

l'expressió del gen del KAP durant el desenvolupament. A més a més de l'efecte de la falta de T_3 sobre l'expressió de KAP en les cèl.lules S3, s'ha observat que els animals adults, deprivats de T_3 des del dia 12 de gestació fins al moment del sacrifici, no presenten senyal cortical deguda a andrògens i que aquests resultats no estan relacionats ni amb la deficiència d'expressió de l'AR ni tampoc dels andrògens circulants en l'animal (112). Els resultats dels experiments realitzats amb animals sotmessos a hipotiroïdisme entre els dies 10-14 de gestació fins al naixement, comparats amb aquells als que l'hipotiroïdisme se'ls indueix en el moment de néixer, demostren que la falta de T_3 en el període prenatal no és responsable de la falta d'expressió cortical dependent d'andrògens en la vida adulta (Fig.15), és a dir, es produeix quan la falta de T_3 ha sigut en algun moment del període postnatal (Resultat de la tesi doctoral d'Esther Solé i llop).

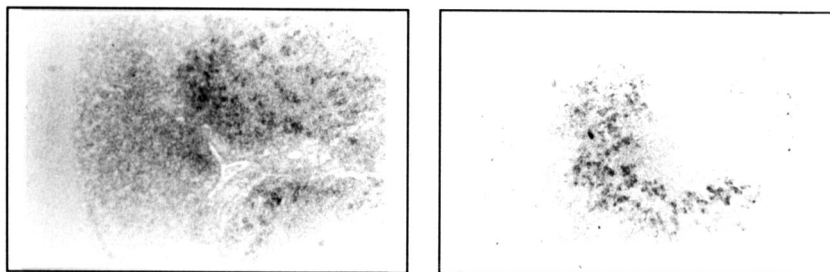
GRUP 1)



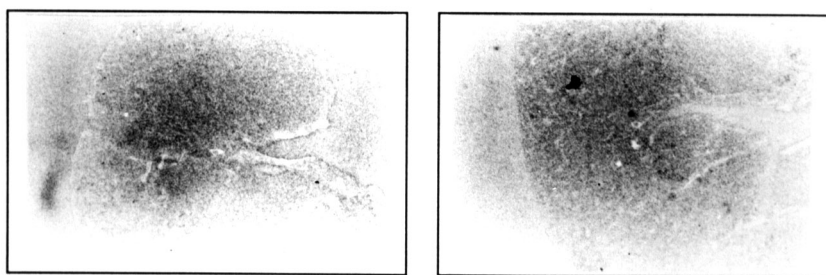
GRUP 2)



GRUP 3)



GRUP 4)



*Fig.15. Efecte de la deficiència prenatal respecte la postnatal d'hormona tiroïdal en l'expressió del gen del KAP en ratolins mascles i femelles C57BL/6 amb hipotiroïdisme farmacològic. Anàlisi d'hibridació *in situ* de seccions de ronyó de mascles i femelles amb hipotiroïdisme prenatal produït per l'administració de KClO₄ 1% en l'aigua de beguda des del dia 10 de gestació fins al naixement (grup 2) i ratolins amb hipotiroïdisme postnatal (induït de la mateixa manera) des del naixement fins al moment del sacrifici (grup 3) van ser comparades amb les d'animals control no tractats (grup 1) i animals amb hipotiroïdisme pre i postnatal tractats amb KClO₄ 1% des del dia 10 de gestació fins al moment del sacrifici (grup 4). Les microfotografies de la figura presenten els resultats obtinguts amb la sonda del cRNA de KAP marcat amb ³⁵S. Resultat de la tesi doctoral d'Esther Solé i llop. (Manuscrit en preparació).*

	sexe	Pes (g)	Tamany (cm)
Grup 1	Mascle	19,7 ± 1,9**	5,6 ± 0,3
	Femella	18,9 ± 1,5**	5,5 ± 0,3
Grup 2	Mascle	15,1 ± 3,6*	4,8 ± 0,4
	Femella	13,2 ± 2,7*	4,6 ± 0,3
Grup 3	Mascle	10,3 ± 1,7*	4,3 ± 0,3
	Femella	11,5 ± 2,5	4,4 ± 0,4
Grup 4	Mascle	7,8 ± 1,8*	3,6 ± 0,3
	Femella	8 ± 1,9*	3,6 ± 0,4

** p = 0,001

* p = 0,05

Taula.1. *Determinació del tamany i del pes de ratolins C57BL/6 amb hipotiroïdisme*; Grup1: Control; Grup2: Hipotiroïdisme prenatal; Grup3: Hipotiroïdisme postnatal; Grup4: Hipotiroïdisme pre- i postnatal. Valors ± desviació estàndar, analitzats amb el test T-Student i es consideren significatius amb $p \leq 0,05$.

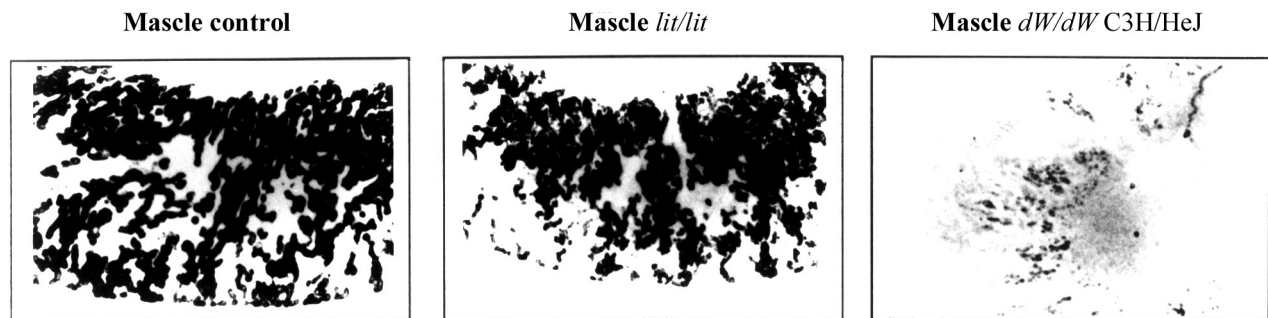


Fig.16. *Expressió del gen del KAP en ratolins lit/lit i Jackson dw/dw*. Seccions congelades de ronyons de ratolins mascles control (esquerra), *lit/lit* (mig) i *Jackson dw/dw* (dreta) van ser hibridades amb el cRNA de KAP marcat amb ^{35}S . Resultat de la tesi doctoral d'Esther Solé i llop. (Manuscrit en preparació; Soler, M., Solé, E., Menoyo, A., Hardy, D., Catterall, J. F., Vandewalle, A., Meseguer, A: Differential hormone-specific regulation of the kidney androgen-regulated gene promoter in cultured mouse early and late proximal tubule cells).

S'ha observat que tots els animals mascles hipotiroïdals, per tractament farmacològic en l'aigua de beguda (KClO_4 1%), arriben a la vida adulta sense expressió del gen del KAP en el còrtex renal, mentre que els animals mascles hipotiroïdals congènits de la soca *hyt/hyt*, presenten només una disminució de la resposta cortical. Per altra banda, els animals tractats amb KClO_4 són de mida i pes significativament inferior als animals *hyt/hyt*, suggerint que l'hipotiroïdisme farmacològic és més sever que el congènit i que nivells més baixos d'hormona tiroïdal poden provocar la deficiència associada de GH (72), fet que explicaria el tamany inferior i la total mancança de senyal cortical de KAP dels animals mascles C57BL/6 amb hipotiroïdisme produït per KClO_4 1%, en comparació amb els *hyt/hyt* (Taula.1, resultats sotmessos a publicació). Encara que els efectes de GH sobre l'expressió del gen del KAP havien estat prèviament estudiats en animals mascles hipofisectomitzats i en animals castrats de la soca *little* (108), no es coneixen els efectes de la GH sobre l'expressió del gen del KAP mitjançada per andrògens, en els segments corticals del ronyó de ratolí. Els anàlisis d'hibridació *in situ* realitzats amb mostres de ronyó de ratolins mascles *lit/lit* i control, mostrades en la fig.16, suggereixen que l'expressió cortical del gen del KAP és sensible a la GH. Per altra banda, la deficiència combinada de GH i TSH, amb la consegüent deficiència d'hormona tiroïdal, que presenten els ratolins de la soca Jackson *dwarf* (Fig.16), provoca l'absència de l'expressió del mRNA de KAP en els segments corticals del ronyó (resultats sotmessos a publicació). Per tant, aquests resultats impliquen la participació de la GH i de la T_3 en la resposta androgènica del gen del KAP.

V.b. Seqüència genòmica de KAP

El gen del KAP és un gen de còpia única, altament polimòrfic en el genome de ratolí.

Té 3.807 nucleòtids de longitud distribuïts en quatre exons i tres introns. *L'exó 1*, té la seqüència 5' no codificant i els primers 73 nucleòtids de la regió codificant que inclou el possible pèptid senyal i els primers 6 aminoàcids de la proteïna madura. *L'exó 2* té una longitud de 177 nucleòtids i codifica pels aminoàcids 25 al 83, que constitueixen la regió hidrofílica més important de la proteïna. *L'exó 3* codifica un domini curt hidrofílic de 20 aminoàcids i l'exó 4 té 17 codons carboxi-terminals, el codó stop de la traducció i 197 nucleòtids d'una regió 3' no codificant. Els *introns 1, 2, 3* tenen una longitud de 1.450, 126 i 1.620 nucleòtids, respectivament, i constitueixen la major part del gen (113).

En el primer intró existeixen dos dinucleòtics repetits: $(ag)_{33}$ i $(gt)_{16}$, des dels nucleòtids 674 al 739 i del 1.013 al 1.044, respectivament, i les unions entre introns i exons tenen seqüències consens descrites pel processament del mRNA en eucariotes (114, 115).

L'estructura genòmica de KAP pot esquematitzar-se de la següent manera (Fig.17):

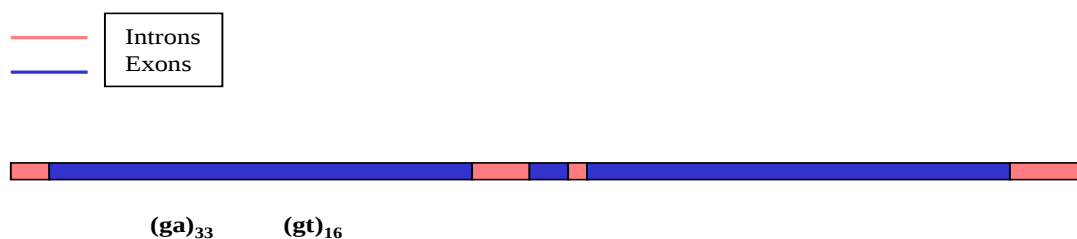


Fig.17. Estructura genòmica de KAP (113).

La regió proximal 5' flanquejant (Fig.18) té una seqüència TATAAA des de -28 a -23 nucleòtids respecte el lloc d'inici de la transcripció i, també existeix un element CCAAC (-69 a -65) que podria ser un inici de la transcripció. Aquests elements s'han descrit com típics de gens eucariotes que es transcriuen per acció de la RNA polimerasa II. No obstant, s'ha comprovat que aquestes seqüències es repeteixen en una localització més distal (TATA box a -877; CAAT box a -764), però no estan orientades la una respecte l'altra en la forma adequada perquè siguin un lloc d'inici de la transcripció (113).

-1000	taggaatttcataaattcattctttttaatagctgagtagtactccattgtgtagatgta
-940	ccacatcttctgtatccattcctctgttgaggggcatctagggtctttccagcttctggc
-880	tattataaataaggctgctatgaacatagtgagcatgtgtccttcttaccagttggggc
-820	atcttctggatataatgccaggagaggtattgctggatcctccggtagtactatgtccaa
-760	tttctgaggaaccgccagactgattccagagtgggtgtacaagcctgcaatcccacca
-700	acaatggaggagtgttctcttttctccacatccacgccagcatctgtgtcacctgaatt
-640	tttgatcttagccattctgactataacccatgttcttgacccattgtacagagccagca
-580	tccttggtaaatgtggagtatcaactctcaacctcaacctcccgctggggaaacgggg
-520	cgaatggctactgctaggctactgttgagaatcacatggcttggcacttctagatagtt
-460	ctgcttttgcaatgagcagttcttctactgttctccagcaatctgccaggatgaggactct
-400	aatgcgtacatgagggttttcttagagtaaaacagtcatttttttgacacaaaacc
-340	atctttggggtgcagaaaagactagctctagcctagaggacaaaagaacagcaatgggggt
-280	gatctggtggagtagatgaccctggccattagagggtaatggtgctaattggcaatgggt
-220	ggtgcacctagtcagactttctcctaccccagattctattgtttctatggttcctagtta
-160	gtttttcttaacttcttctgggtgcattctttaatagttcataaagggtccttccaaac
-100	ccctccccgcccccttttttctctccagccaactgtgaaaaccacctcaggggaga
-40	gggtacaggatgtataaaagcccaggaggactcttttgg

Fig.18. Seqüència nucleotídica de 1 Kb de la regió 5' flanquejant, adjacent al gen del KAP. Es mostren les seqüències d'alguns elements de resposta (*cis-acting*) que poden està implicats en la regulació hormonal de KAP (113).

Altres motius que poden funcionar com elements reguladors han sigut identificats per similitud amb seqüències conegudes. S'ha detectat un element de resposta a andrògens (ARE) (116), que es localitza a -39 bp del lloc d'inici de la transcripció i que es troba solapat amb una part de la TATA. També s'ha observat un element de resposta a estrògens (ERE) no

consens en posició -1.189, molt allunyat del lloc d'inici de la transcripció. Semblant a aquest element, se n'ha descrit un que funciona com ERE en el gen de la uteroglobina (117). En el promotor del gen del KAP també existeixen migs palíndroms d'ERE més propers al lloc d'inici de la transcripció (-604 i -264). Aquestes seqüències podrien exercir alguna acció sobre KAP, ja que s'ha descrit funció reguladora per aquests mateixos motius en el promotor del gen de l'ovoalbúmina de pollastre (118).

Un altre possible element de resposta és un element de resposta a hormona tiroïdal (TRE) en la posició -609. Per computació s'han identificat tres llocs putatius d'unió a C/EBPs, a part del ja identificat en la posició -66, que són els següents: -110, -429, -457. També hi ha seqüències semblants als llocs d'unió dels factors de transcripció Sp1 i AP-2 (-92 i -261 respectivament). Aquest últim factor de transcripció confereix inducció per AMPc als gens en els que la seqüència que reconeix és funcional (119). També apareix un element de resposta consens per la vitamina D (VDRE) en posició -886.

La presència d'aquests elements en el promotor del gen del KAP no significa que tinguin un paper funcional en la seva regulació. No obstant, alguns d'aquests llocs podrien ser funcionals en base als estudis hormonals realitzats *in vivo*.

V.c. Seqüència nucleotídica del cDNA de KAP

La proteïna KAP està codificada per un cDNA de 607 nucleòtids excloent la cua de poliA (104).

```

1   atttctttctcctgttcaactgggtgccttaaccctactaaagcatgatgcttttcaaggt
61  cctgggtgatcactgtcttctgtgggtctgactgtgggtttccccctgtcagaattagtttc
121 aatcaataaagaactacagaattcaatcattgacctactaaactcagtctttgaccaact
181 gggatcatacgagggacaaaagctcctctagaggattatacagatgatgatttaagcac
241 tgactctgagcagatcatggacttcacgccagccgcaaacaacagaattctgagttctc
301 tactgatgttgagacagtctctcctccggctttctggaagaattcactgagaacacagacat
361 cacagtgaaaattccattagctgggaatccagtctccctacttctgagaagactccaa
421 ctttgaaataaacctgcgactgccattcaggatattgtctttgtagaaaatgatataaat
481 ctaagatgctcccagcaaagaagaagaacgaggaagtgatcctggatgagaaatgctgt
541 gccaggcatctctaagctctaccctactctgtgtgggtttaagaaataaacggttcattt
1   gaattgc

```

Fig.19. Seqüència nucleotídica que codifica per a la proteïna KAP.

La seqüència codificant indicada a la fig.19 representa la pauta oberta de lectura més llarga identificada a partir del primer ATG (120). Aquesta assignació ve reforçada per la presència en pauta de dos codons d'stop TAA a 5' d'aquest primer ATG. El mRNA de KAP conté 43 nucleòtids no codificants a la regió 5' i 198 nucleòtids a la 3', que inclou els senyals de poliadenilació AATAAA a 23 nucleòtids del lloc de poliadenilació (121). Resten doncs, 366 nucleòtids de seqüència codificant.

V.d. Anàlisi computacional i funcional de la proteïna KAP

Ni la seqüència de DNA de KAP ni la seqüència deduïda d'aminoàcids presenta cap homologia significativa en comparar-la amb les bases de dades disponibles; BLAST i FAST-A (122). Pel que fa a les prediccions estructurals de la proteïna deduïda KAP s'han utilitzat diferents programes d'anàlisi de seqüència: PROSITE database (123), PSORT II, ProtParam ExPASy i NetOGlyc 2.0.

MMLFKVLVTTVFCGLTVAFPLSELVSINKELQNSIIDLLNSVFDQLGSYR
GTKAPLEDYTDDDLSTDSEQIMDFTPAANKQNSEFSTDVETVSSGFLEE
FTENTDITVKIPLAGNPVSPTS

Fig.20. Seqüència aminoacídica deduïda per a la proteïna KAP.

No es detecten seqüències indicatives de localització nuclear, mitocondrial, peroxisomal, vacuolar o reticular, així com tampoc s'han trobat motius consens d'unió a DNA o RNA.

La seqüència de KAP té 121 aminoàcids, amb una certa predominança dels residus carregats negativament (19) respecte dels positius (6). Destaquen per la seva abundància els aminoàcids leucina, serina i treonina.

Segons la composició de la proteïna deduïda, se li suposa un pes molecular de 13,3 KDa, sense considerar les possibles modificacions postraduccionals, i un punt isoelectric teòric de 3,92. Recentment, en el nostre laboratori, Cebrian *et al* (99), han aconseguit anticossos monoclonals contra KAP, que reconeixen específicament una proteïna d'un pes molecular aparent de 20 kDa en homogenats cruus de ronyó. La distribució i regulació de la proteïna reconeguda per dits anticossos coincideix amb la del seu mRNA. Per conèixer la funció de la proteïna, Cebrian *et al* (99), van utilitzar la tècnica del doble híbrid en llevat i van determinar que dita proteïna interacciona específicament amb la ciclofilina B. Per altra banda, també han pogut constatar que el tractament amb ciclosporina A disminueix els nivells proteics de KAP i que la sobreexpressió de KAP en cèl.lules del túbul proximal renal establiment transfectades disminueix significativament els efectes tòxics de la ciclosporina A. Conseqüentment, es fa evident una relació funcional entre KAP, ciclofilina B i la nefrotoxicitat mediada per ciclosporina A i, per tant, es suggereix un paper clau per la proteïna KAP en la fisiologia renal.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

El gen que codifica per la Kidney Androgen-regulated Protein (KAP) s'ha utilitzat com a model d'estudi del control hormonal de l'expressió gènica en ronyó de ratolí, tant per la seva expressió teixit específica com pel control multihormonal cel.lular específic que presenta en aquest teixit. L'aprofundiment en l'estudi d'aquest gen permetrà avançar en la comprensió tant dels mecanismes moleculars que controlen la regulació hormonal de l'expressió gènica, com dels que controlen l'especificitat de teixit.

Encara que s'han identificat les hormones que intervenen en el control de l'expressió del gen del KAP en un sistema *in vivo*, existeixen molts interrogants sobre els seus mecanismes d'acció a nivell molecular. Per aquesta raó s'ha intentat caracteritzar un model cel.lular que permeti l'anàlisi mecanístic dels fenòmens observats *in vivo*.

Segons els coneixements que es tenien sobre l'expressió del gen del KAP en el ronyó de ratolí, es van proposar els següents objectius:

- 1- Determinar el període del desenvolupament murí en el que la T_3 permet la resposta cortical dependent d'andrògens del gen del KAP.
- 2- Estudiar la relació entre l'hormona tiroïdal, les C/EBPs i l'expressió del gen del KAP en el ronyó murí durant el desenvolupament postnatal.

- 3- Determinar la capacitat de resposta a andrògens de les línies cel.lulars renals PKSV-PCT i PKSV-PR, utilitzant com a model del gen del KAP. Estudi de l'especificitat cel.lular del promotor del gen del KAP.
- 4- Correlacionar 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.