

Fig. III-1: Esquema dels homòlegs al clon 5.6 a la base de dades *non redundant*.

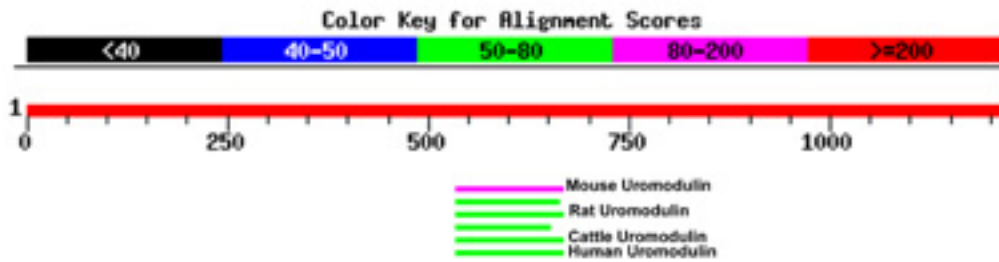


Fig. III-2: Esquema de les proteïnes homòles del clon 5.6

En utilitzar la base de dades *est's* (*expressed sequence tags*) la regió homòloga s'amplia fins a 640 nucleòtids, tots ells a la regió 3' (figura III-3).

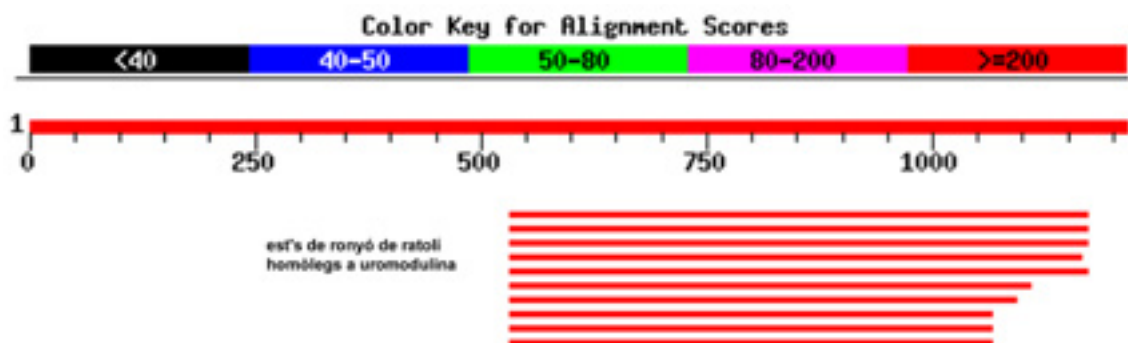


Fig. III-3: Esquema dels homòlegs de 5.6 a la base de dades de *est's*.



### 3.2.1. Homologies.

La recerca d'homologies mitjançant BLASTn amb la base de dades nr no ens informa de cap seqüència amb homologia significativa. En canvi, amb la utilització de la base de dades d'est's s'obtenen seqüències homòlogues que comprenen els nucleòtids (421-1113) així com un petit fragment corresponent a un est de rata entre els nucleòtids 174 i 261, figura III-6.

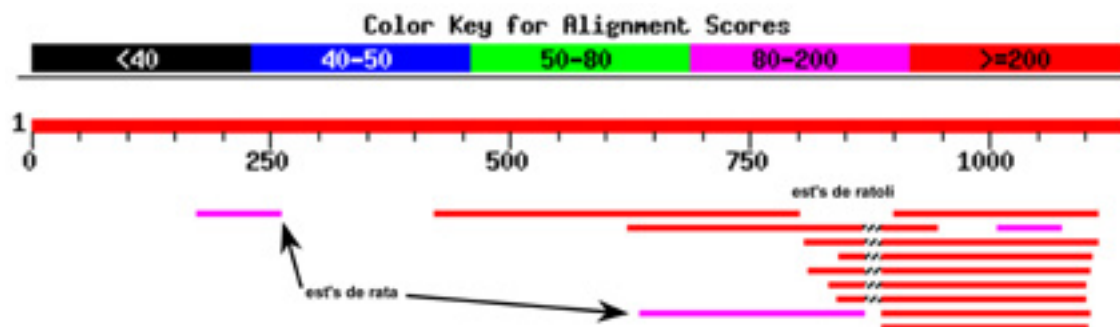


Fig. III-6: Representació esquemàtica dels homòlegs a P5 en la base de dades est's.

Ni P5 ni aquests est's homòlegs presenten, però, homologies amb cap proteïna coneguda, com es demostra amb l'absència d'homòlegs en utilitzar el programa BLASTx.

En utilitzar els fragments de 900 i 300 parells de bases en assaigs de Northern blot, no s'han obtingut resultats concluints, donada l'aparició de múltiples bandes de dubtosa especificitat. Igualment, els intents de síntesi *in vitro* de la proteïna codificada pels 900 parells de bases mitjançant reticulòcit de conill, tampoc han donat resultats satisfactoris.

## 3.3. Positiu B3: ciclofilina B.

### 3.3.1. Seqüència i homologies.

La digestió del plàsmid pADGAL4-B3 amb els enzims EcoRI i XhoI fa saltar un fragment de DNA d'aproximadament 1000 parells de bases. La seqüència de la mateixa és 100 % homòloga a la ciclofilina B de ratolí (GenBank M60456).

La ciclofilina B (CypB) és una proteïna altament conservada de 208 aminoàcids, ubiqüament distribuïda i que s'uneix a l'immunosupressor CsA.

### 3.3.2. GST-Pulldown.

El fragment EcoRI-XhoI contingut al plàsmid pAD-GAL4-B3 es va subclonar a pBluescript SK i es va procedir a la síntesi *in vitro* de la proteïna. L'escissió del pèptid senyal es va aconseguir mitjançant la utilització de membranes microsomals canines. Tant la CyPB nadiua com la seva forma truncada (sense el pèptid senyal), es van sintetitzar eficientment en el sistema de reticulòcit. A la figura s'observa que el processament de la CyPB per part de les membranes microsomals ha estat incomplet, ja que coexisteixen les dues formes de la proteïna. Aquest fenomen s'ha donat en major o menor grau en tots els assaigs realitzats i és atribuïble a la pèrdua d'activitat en el temps de les membranes microsomals.

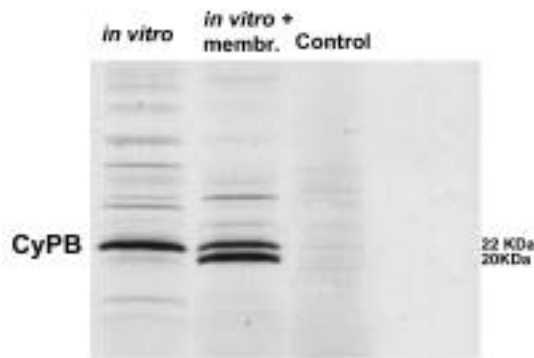


Fig. III-7: Producte de síntesi *in vitro* de la CyPB i tractament amb membranes microsomals. 1µl de reacció / pou.

Conjuntament a aquest producte de traducció *in vitro*, hem expressat i lligat a resina Sepharose 4B la proteïna de fusió GST-KAP i s'ha procedit als assaigs de GST-Pulldown. Com a control hem utilitzat el producte de síntesi *in vitro* del transportador d'anions orgànics murí OATP1 i la proteïna recombinant GST. Els resultats descrits a la figura demostren en un model *in vitro* l'especificitat de la interacció de GST-KAP amb CyPB.

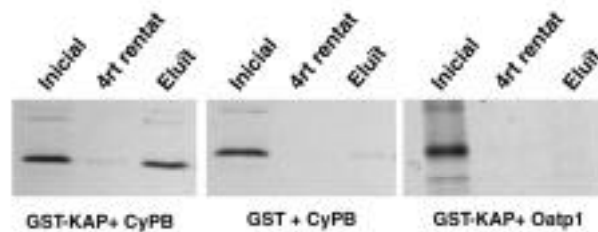


Fig III-8: Hem incubat GST-KAP o GST amb CypB o OATP1. Després de 4 rentats analitzem, per SDS-PAGE i autoradiografia, la presència del producte de traducció marcat radioactivament en els eluïts de la resina.

L'experiment recíproc no s'ha pogut realitzar donat el baix rendiment en la síntesi *in vitro* de la KAP.

### 3.3.3. Co-immunoprecipitació de KAP i CypB.

La capacitat immunoprecipitadora dels anticossos abKAP1, abKAP2 i abCypB (*Affinity BioReagents Inc.* CO, USA) a partir de teixit renal és limitada, com es dedueix dels resultats descrits a la figura III-9.

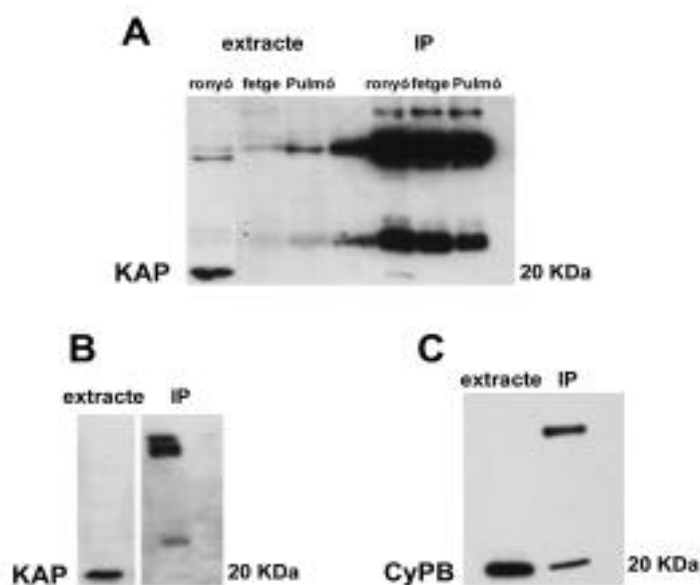


Fig. III-9: A i B: Western blot d'extracte total de ronyó de ratolí mascle (20  $\mu$ g) i de l'immunoprecipitat amb abKAP2 (A) i abKAP1 (B) a partir de 250  $\mu$ g del mateix extracte. C: Western blot d'extracte total de ronyó de ratolí mascle (5  $\mu$ g) i de l'immunoprecipitat amb abCypB a partir de 250  $\mu$ g del mateix extracte.

En comparació amb els carrils corresponents a l'extracte total, les immunoprecipitacions presenten quantitats molt inferiors de proteïna, tot i que la IP s'ha realitzat a partir de molta més proteïna inicial.

Tenint en compte aquests resultats, hem analitzat la presència de KAP i CypB en els immunoprecipitats amb abCypB i abKAP respectivament. Aquestes immunoprecipitacions s'han realitzat en condicions que permeten conservar les interaccions proteïna-proteïna. Així, la figura III-10 mostra el resultat d'aquests assaigs.

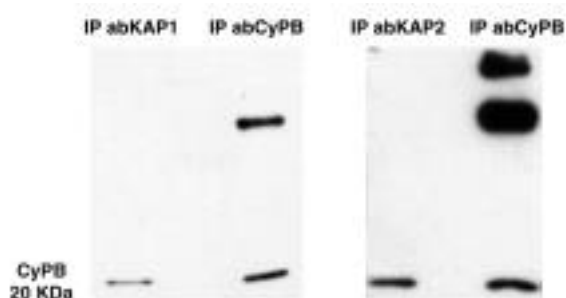


Fig. III-10: Detecció de CypB en els immunoprecipitats amb abKAP1 i abKAP2.

Quan l'extracte total s'immunoprecipita amb anticòs abKAP1 o abKAP2 podem detectar sense dificultats la presència de CyPB. En canvi l'experiment recíproc, immunoprecipitant amb abCyPB i detectant amb abKAP1 o abKAP2, dóna resultats negatius.

#### 3.3.4. Co-localització GFP-KAP i CypB.

La interacció KAP-CyPB s'ha identificat en el sistema de doble híbrid en llevat i s'ha confirmat, *in vitro*, amb assaigs de GST-pulldown i, en teixit, mitjançant co-immunoprecipitació. Per a la co-localització de les dues proteïnes en cultius cel·lulars hem utilitzat la transfecció transitòria de GFP-KAP conjuntament amb immunocitoquímica amb anticòs abCyPB. Els resultats s'han visualitzat amb microscopi confocal i es mostren a la figura III-11.

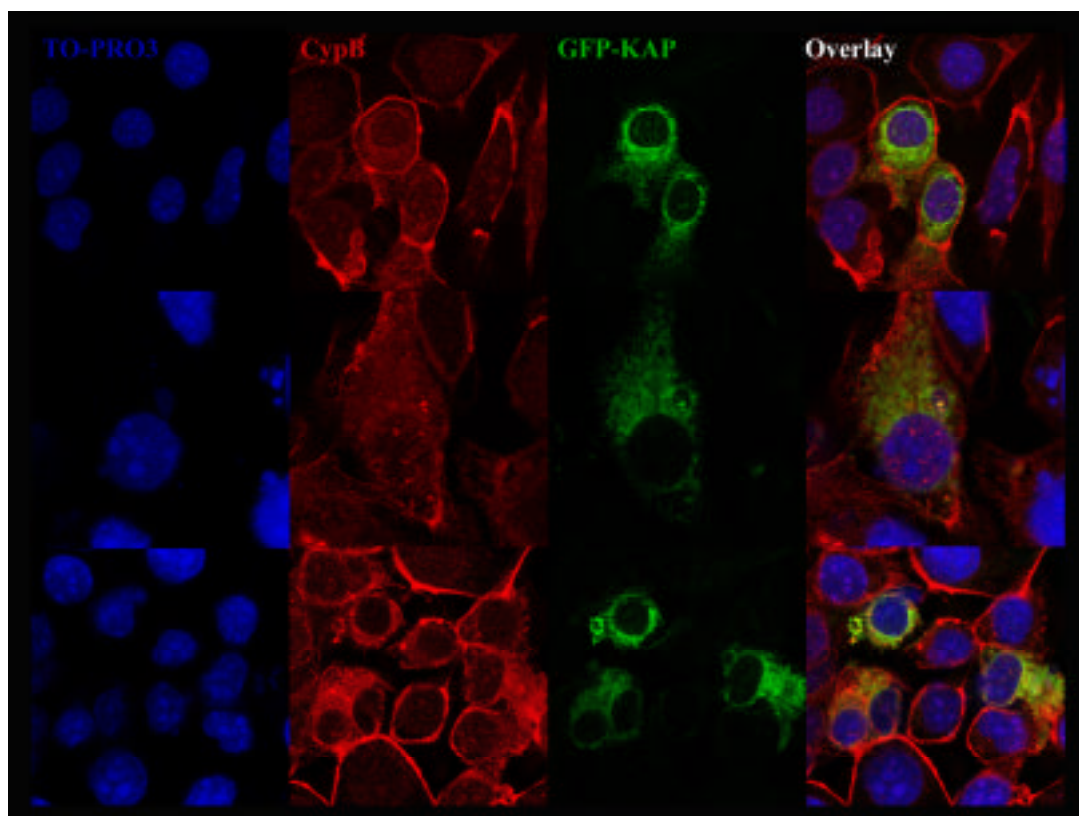


Fig. III-11: Immunocitoquímiques amb abCyPB (20 µg/ml) sobre cèl·lules transfectades amb GFP i GFP-KAP. Els nuclis s'han contrastat amb TO-PRO3.

---

La CyPB (en vermell) s'expressa abundantment en les cèl·lules PKS-V-PCT, presenta distribució reticular, i és en aquest compartiment on co-localitza amb la GFP-KAP. Observem, però, un marcatge molt evident a la membrana cel·lular on no detectem la GFP-KAP.

### 3.3.5. Identificació dels dominis responsables de la interacció.

Amb l'objectiu de determinar quins són els dominis responsables de la interacció KAP-CyPB, hem analitzat, mitjançant assaigs de doble híbrid, diferents fragments de cada una de les proteïnes. Fig III- 12.

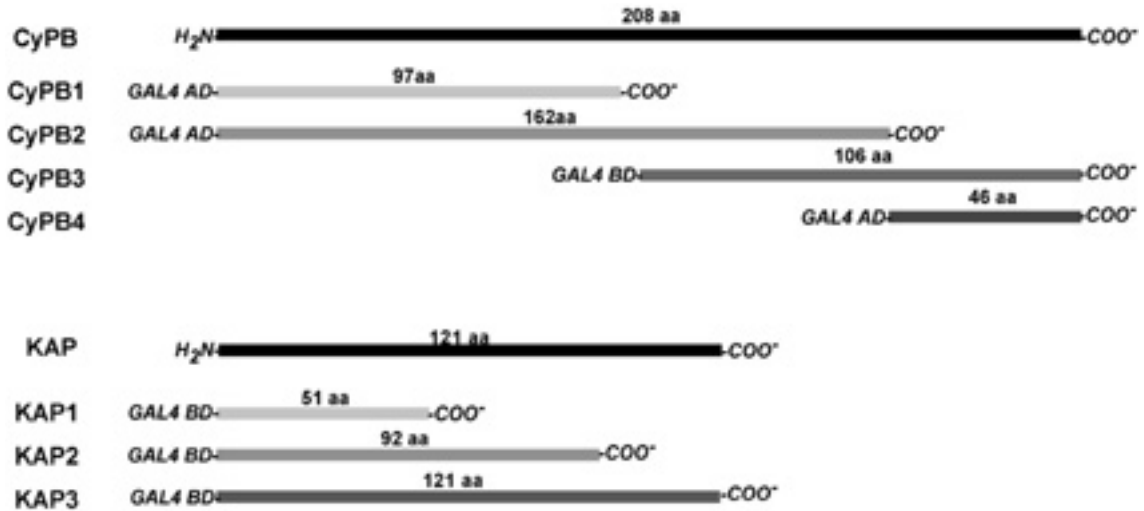


Fig III-12: Construccions assajades per a la interacció. En cada cas hem enfrontat la seqüència sencera de una de les proteïnes amb cada un dels fragments de l'altra i viceversa.

Els llevats transformats amb les diferents parelles de plàsmids es van créixer en medi selectiu (Leu-, Trp- i His-) i es va assajar la seva activitat  $\beta$ -galactosidasa en medi líquid.

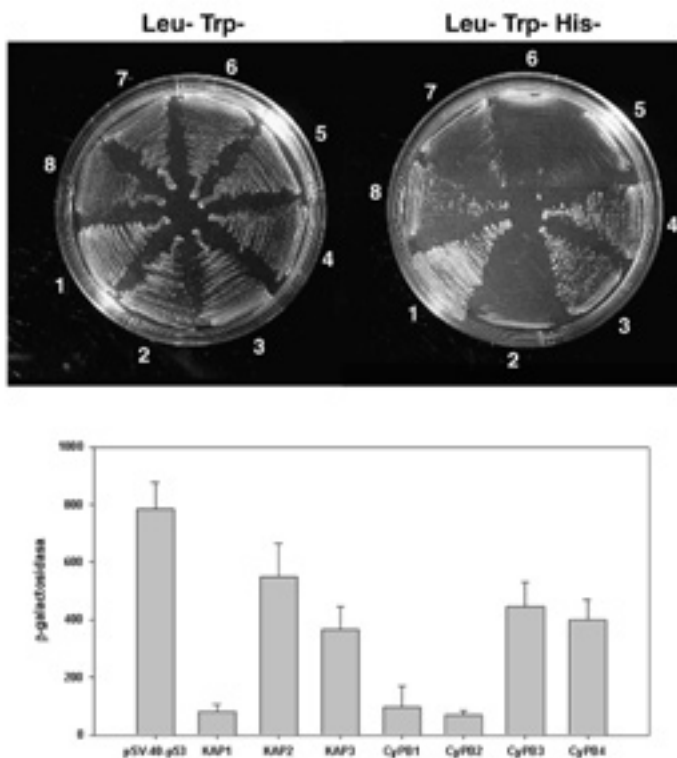


Fig III-13: Creixement en medi selectiu (A) i activitat  $\beta$ -galactosidasa (B) dels llevats transformats amb les parelles de la figura III-11. 1: pBD-P53+pAD-SV40, 2: pBD-KAP1+pAD-CyPB, 3: pBD-KAP2+pAD-CyPB, 4: pBD-KAP3+pAD-CyPB, 5: pBD-KAP+pADCyPB1, 6: pBD-KAP+pAD-CyPB2, 7: pBD-KAP+pAD-CyPB3 i 8: pBD-KAP+pAD-CyPB4.

Segons aquests resultats, la interacció KAP-CyPB depèn dels primers 92 aminoàcids de la KAP; els primers 51aa no són suficients per a la interacció, però poden ser necessaris. En el cas de la CyPB, la regió responsable de la interacció es troba situada a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna, ja que els últims 46 aminoàcids són suficients per a la interacció.

#### 4. EFECTES DEL TRACTAMENT AMB CSA

Donat que la CyPB és un receptor de l'immunosupressor CsA, ens hem plantejat l'estudi dels efectes, a nivell renal i en referència a la KAP, de la CsA, tant en ratolins com en cultius cel·lulars.

##### 4.1. Efectes transcripcionals del tractament amb CsA.

###### 4.1.1. Efectes sobre el ronyó de ratolí

El tractament amb 15 mg/Kg/dia de CsA augmenta significativament els nivells de mRNA de KAP en ronyons de mascles i de femelles, mentre que els valors corresponents als mascles castrats es mantenen invariables.

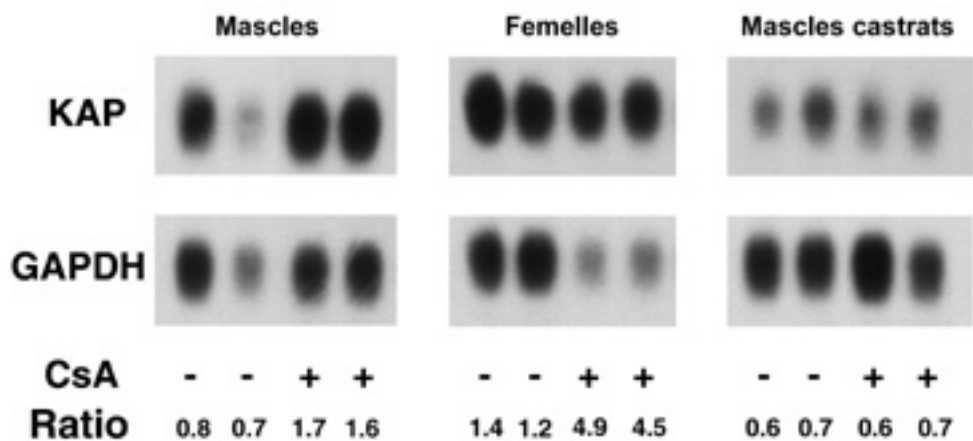


Fig. IV-1: Northern blot de mRNA de ronyó de ratolins mascles, femelles i mascles castrats, tractats durant 3 dies amb 15 mg/Kg/dia de CsA o amb vehicle. La quantitat i qualitat del mRNA s'ha normalitzat en hibridar amb sonda de GAPDH.

Aquest augment és ja evident a les 24 hores de tractament i assoleix el seu valor màxim a 3 dies. Els tractaments de 7 i 21 dies no provoquen un augment significatiu del mRNA respecte l'observat amb 3 dies de tractament. Per altra banda, els mascles



castrats no experimenten variacions en els seus nivells de mRNA de KAP a cap del temps assajats.

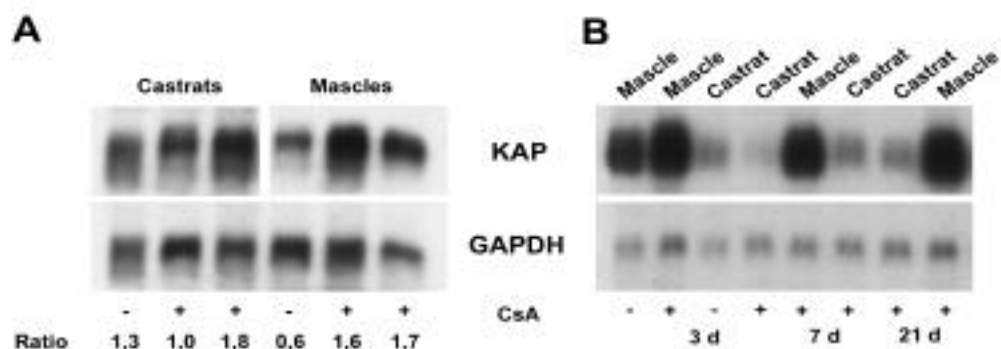


Fig. IV-2: Northern blot de RNA de ronyó de ratolí mascle i mascle castrat tractats durant 24 hores (A), 3, 7 i 21 (B) dies amb 15 mg/Kg/dia de CsA o amb vehicle. Normalitzat amb GAPDH.

## 4.2. Efectes post-transcripcionals. Nivells i distribució de la proteïna KAP.

### 4.2.1. Efectes sobre el ronyó de ratolí

Contràriament a l'observat als assaigs de Northern blot, l'anàlisi per Western blot dels nivells de la KAP en els ronyons dels animals tractats, ens indica un clara disminució de la quantitat de proteïna en femelles i en mascles castrats; essent, en aquest cas, els mascles intactes els que no alteren els seu valors.

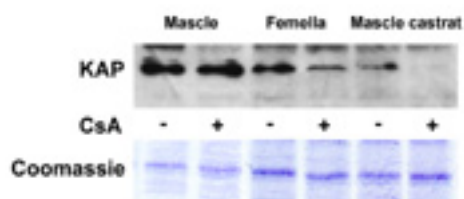


Fig. IV-3: Western blot d'extractes de ronyó de ratolí mascle(25 µg/pou), femella i mascle castrat castrat (100 µg/pou) tractats durant 3 dies amb 15 mg/Kg/dia de CsA o amb vehicle. abKAP (5 µg/ml)

L'estudi mitjançant immunohistoquímica dels nivells i la distribució de la proteïna en els ronyons d'aquests mascles tractats, posa de manifest una disminució de la KAP a les cèl·lules corresponents al segment S<sub>3</sub> respecte de S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub> com s'indica a la figura IV-4.

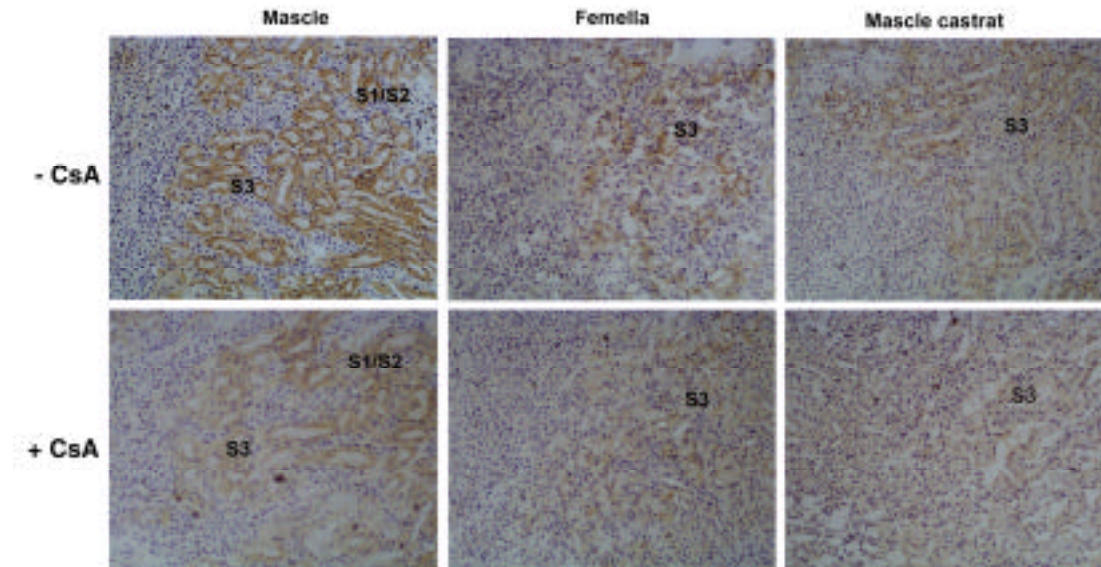


Fig. IV-4: Immunohistoquímica de ronyons de ratolins tractats amb CsA o amb vehicle (15 mg/kg/dia).

---

Aquest patró explicaria els resultats del Western blot. Així, tots els animals pateixen una disminució en la quantitat de proteïna a nivell del segment S<sub>3</sub>. En el Western blot de ronyó de ratolí mascle, però, aquesta disminució quedaria emmascarada per la proteïna dels segments S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>.

#### 4.2.2. Efectes de la CsA en la secreció de KAP

La CsA promou la secreció de la KAP per part de la cèl·lula epitelial renal murina. Així ho indiquen els assaigs de pols i caça realitzats amb KAP-FLAG en presència o absència de l'immunosupressor (1  $\mu$ M); el tractament s'inicia durant els 30 minuts de pols i es manté present fins al final de l'assaig. Com s'indica a la figura IV-5, la KAP es detecta molt abans en el medi de les cèl·lules tractades amb la CsA.

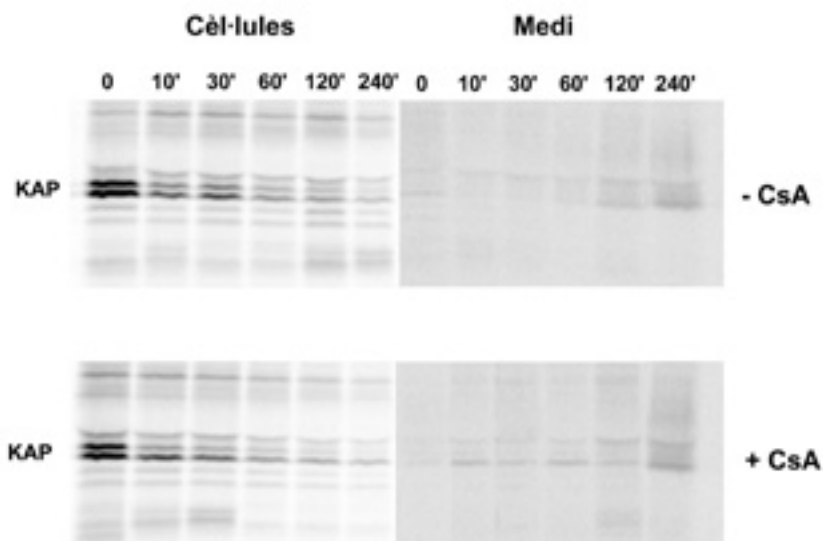


Fig. IV-5: Marcatge metabòlic de KAP-FLAG en presència o absència de CsA ( $1\mu\text{M}$ ). La proteïna de fusió es detecta al medi de les cèl·lules PKSV-PCT transfectades amb KAP-FLAG i tractades amb l'immunosupressor

### 4.3. Efectes de la CsA en la interacció KAP-CyPB

La possibilitat que la CsA interfereixi en la interacció KAP-CyPB s'ha contrastat en afegir CsA ( $25\mu\text{M}$  i  $50\mu\text{M}$ ) durant els assaigs de GST-Pulldown. A les dosis assajades, l'immunosupressor no desplaça la interacció KAP-CyPB com s'observa a la figura IV-6.



Fig. IV-6 : Assaig de GST-Pulldown. La CsA s'afegeix a l'últim rentat durant 30 min.

L'anàlisi densitomètrica d'aquestes bandes no revela diferències significatives entre els eluits amb CsA i els eluits sense CsA.

Per altra banda la incubació prèvia de la CyPB amb CsA, abans d'afegir GST-KAP, tampoc impedeix la unió d'aquesta última. La quantitat de proteïna CyPB que es manté lligada a la GST-KAP abans d'iniciar-se els rentats, no és significativament diferent en el grup tractat amb CsA respecte del no tractat.

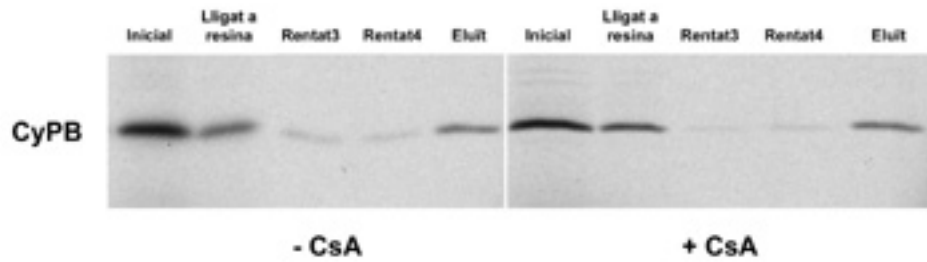


Fig. IV-7: Assaig de GST-Pulldown. La CyPB s'ha pre-incubat amb la CsA (50  $\mu$ M) durant 30 min.

---

La co-localització de GFP-KAP i CyPB, tampoc es veu afectada per la presència de CsA (1  $\mu$ M) en el medi de cultiu.

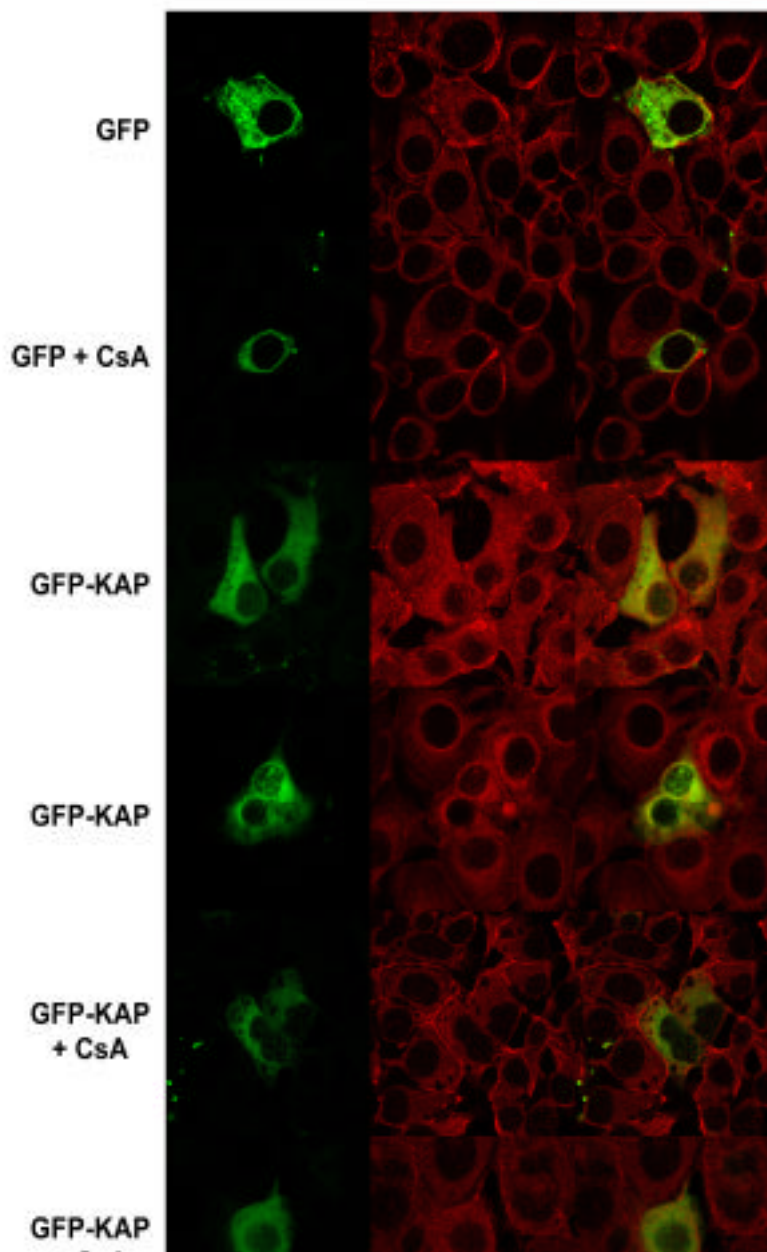


Fig. IV-8: Immunocitoquímica amb abCyPB (20 mg/ml) sobre cèl·lules transfectades amb GFP-KAP i GFP.

#### **4.4. Efectes tòxics de la CsA.**

##### **4.4.1. Toxicitat per CsA en cèl·lules en cultiu.**

Un dels principals inconvenients del tractament amb CsA és l'elevada nefrotoxicitat que produeix. Malgrat que aquest sigui el més evident efecte secundari del fàrmac, també se li han descrit altres citotoxicitats, així com múltiples efectes indesitjables. Per tal de comprovar l'especificitat renal de la toxicitat en el nostre model cel·lular, hem

estudiat els efectes tòxics de la CsA en diferents línies epitelials renals, així com en una línia epitelial no renal (CHO).

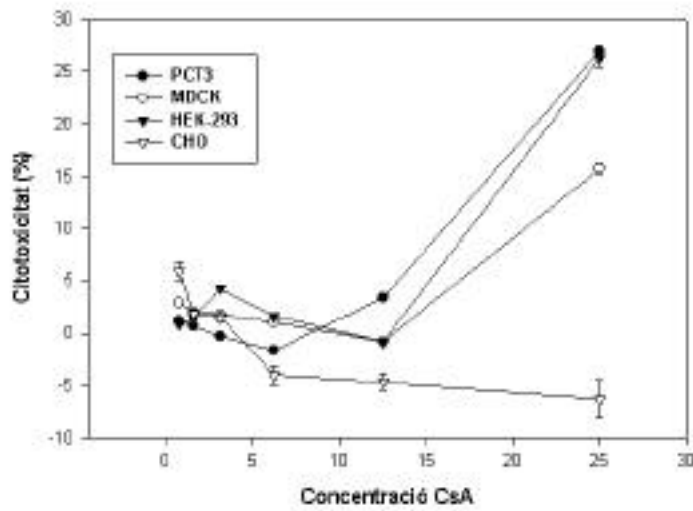


Fig. IV-10: Toxicitat per dosis creixents de CsA (0; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 µg/ml) en les línies epitelials: PKSV-PCT, MDCK, HEK-293 i CHO.

Com s'observa a la figura, la CsA produeix en les cèl·lules epitelials renal una citotoxicitat quantificable (per valoració d'activitat LDH del medi) a partir de 15 mg/ml, amb comportaments lleugerament diferents entre les línies estudiades. La línia epitelial d'ovari de hamster (CHO), contràriament, no es veu afectada per cap de les dosis de CsA analitzades.

#### 4.4.2. Efecte de l'expressió de KAP en la toxicitat provocada per CsA en PSKV-PCT.

Donada l'especial sensibilitat a la CsA per part de les cèl·lules epitelials renal, ens vam plantejar l'estudi de la seva toxicitat en el model cel·lular d'expressió de KAP, Tet-Off. Així, els clons 3-26-37, 3-26-71 i 3-26-310 crescuts amb i sense tetraciclina, es van tractar amb diferents dosis de CsA durant 24 hores (0; 6,25; 9,375; 12,5; 18,75; 25; 37,5 i 50 µg/ml). Com a control hem utilitzat el clon 3-26, també amb i sense tetraciclina.

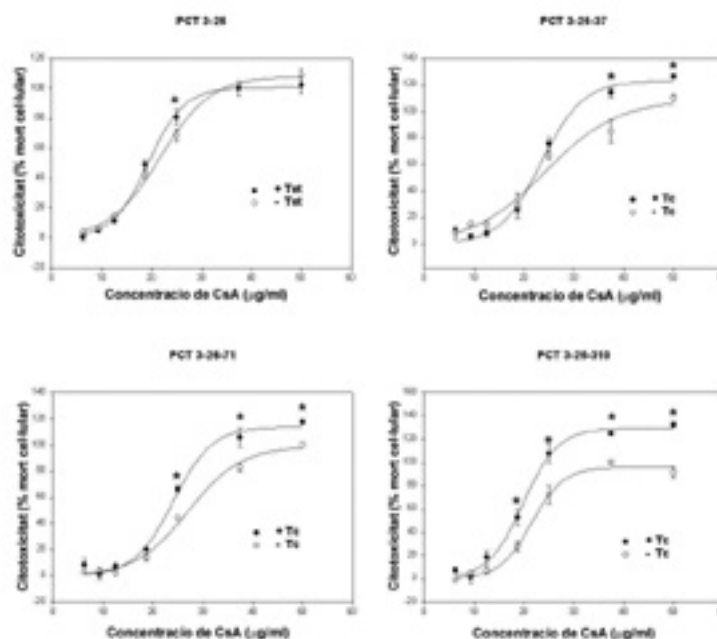


Fig. IV-11: Percentatge de mort cel·lular en els cultius dels diferents clons tractats amb dosis creixents de CsA. \*P 0,001).

A la figura es representen gràficament els percentatges de mort cel·lular amb les diferents dosis de CsA, per a cada clon amb i sense expressió de KAP.

Es confirmen els resultats previs de toxicitat cel·lular per CsA, essent evidents els efectes tòxics amb dosis superiors a 15 mg/ml. En el clon 3-26 no s'observen efectes de la tetraciclina en la viabilitat cel·lular, descartant-se possibles efectes citotòxics de l'antibiòtic. En canvi, en els clons que expressen la KAP en absència de tetraciclina s'observa un clar efecte protector envers la toxicitat per CsA. Així, en major o menor grau tots els clons mostren diferències significatives pel que fa a la mortalitat, segons s'expressi la KAP o no.





---

<b><u>1.</u></b>	<b><u>KAP: LES HOMOLOGIES</u></b>	<b>125</b>
<b><u>1.1.</u></b>	<b><u>ELS HOMÒLEGS REMOTS</u></b>	<b>126</b>
<b><u>1.2.</u></b>	<b><u>CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES</u></b>	<b>127</b>
<b><u>2.</u></b>	<b><u>KAP: LA PROTEÏNA</u></b>	<b>127</b>
<b><u>3.</u></b>	<b><u>KAP AL RONYÓ MURÍ</u></b>	<b>129</b>
<b><u>3.1.</u></b>	<b><u>ABUNDÀNCIA RELATIVA</u></b>	<b>130</b>
<b><u>3.2.</u></b>	<b><u>REGULACIÓ PER ANDRÒGENS</u></b>	<b>130</b>
<b><u>3.3.</u></b>	<b><u>LOCALITZACIÓ CEL·LULAR</u></b>	<b>131</b>
<b><u>4.</u></b>	<b><u>KAP: LES INTERACCIONS</u></b>	<b>132</b>
<b><u>5.</u></b>	<b><u>KAP: INTERACCIÓ AMB CICLOFILINA B</u></b>	<b>134</b>
<b><u>5.1.</u></b>	<b><u>ALTRES DIANES DE LA CYPB</u></b>	<b>135</b>
<b><u>6.</u></b>	<b><u>KAP I LA CICLOSPORINA A</u></b>	<b>137</b>



## 1. KAP: LES HOMOLOGIES

La regulació de la Kidney Androgen-regulated Protein ha estat subjecte d'estudis de la seva identificació per Toole i col·laboradors l'any 1979. Malgrat els avenços en el coneixement de la regulació hormonal de la KAP, l'estudi de la funció de la proteïna s'ha vist limitat, principalment, per l'absència d'homòlegs de funció coneguda.

La KAP de rata es va identificar posteriorment (Niu, 1996) i, tot i presentar una estructura gènica, una distribució tissular i una regulació equiparables a la KAP murina, l'homologia entre les dues proteïnes es pot considerar baixa. A aquest respecte, destaca que les dues seqüències presentin més homologia a nivell de nucleòtids (82% d'identitats) que no pas a nivell d'aminoàcids (54% d'identitats i 67% de positius); i que la regió que presenta més identitat entre ambdues proteïnes correspon al pèptid senyal, suggerint que el gen de la KAP presenta una molt elevada taxa de mutació. Una duplicació del gen ancestral K, prèvia a la divergència rata-ratolí també podria explicar aquests resultats. Evolutivament parlant, les diferents formes d'una mateixa família de proteïnes sovint apareixen com a conseqüència de processos de duplicació gènica (Ohno, 1970; Sidow, 1996). Així, amb la duplicació es podrien haver generat K1 i K2; una de les còpies del gen conserva la funció original mentre que l'altre pot evolucionar per donar lloc a noves formes. Si això fos cert, la KAP de rata i la de ratolí no serien ortòlegs sinó membres diferents d'una mateixa família, i caldria encara identificar els homòlegs de cada una d'elles a l'altre espècie.

Donada la homologia rata-ratolí, l'aparició a les bases de dades de seqüències d'origen humà 100% homòlogues a la KAP murina, resulta, si més no, inesperada. Homologies al 100% a nivell nucleotídic entre ratolí i humà són poc freqüents, i pròpies de seqüències altament conservades. Contràriament a la KAP de rata, la KAP humana no s'ha obtingut a partir de teixit renal, sinó de cultiu de càncer d'ovari i d'oligodendroglioma. Tanmateix, pel que fa a l'estudi del gen del KAP humà, i analitzant la regió sintènica del cromosoma 6 de ratolí (en humans cr. 12p13), no s'ha trobat cap homologia significativa. Tenint en compte que ja s'havien descrit homòlegs de KAP humans (100% homòlegs), els quals provenien de llibreries que posteriorment s'ha evidenciat que estaven contaminades amb cDNAs murins (veure clons AA075684,

AA075041 i AA131489), és lícit dubtar de l'origen real d'aquests clons suposadament humans.

### **1.1. Els homòlegs remots**

Mitjançant psi-blast hem estudiat els possibles homòlegs remots de la KAP. Només quan augmentem el valor de E fins a 0,5 apareix una seqüència significativament homòloga, la OL-protocadherina. Un valor de E = 0,5 significa que l'alineament descrit es pot donar de manera aleatòria 0,5 vegades.

Les cadherines formen una superfamília de proteïnes implicades en adhesió cèl·lula a cèl·lula i juguen un paper clau en la morfogènesi, proliferació i polarització cel·lular així com en transducció de senyal i creixement (Takeichi, 1988; Nathke, 1993; Suzuki, 1996; revisió a Angst, 2001). Són glicoproteïnes transmembrana amb un segment extracel·lular format per un nombre variable de dominis cadherina. Aquests dominis de 110 aminoàcids són els principals responsables de l'adhesió (Blaschuk, 1990) i s'estabilitzen en presència de calci (Pertz, 1999). El segment transmembrana i el citoplasmàtic, per la seva banda, juguen un paper important en la interacció amb el citosquelet (Nagafuchi, 1993).

Les protocadherines pertanyen a aquesta superfamília i contenen 6 dominis cadherina al seu segment extracel·lular, mentre que el segment citoplasmàtic no presenta homologia amb les cadherines clàssiques. Algunes protocadherines presenten una distribució tissular àmplia, encara que la majoria són específiques de teixit nerviós (Sano, 1993). La regió homòloga entre la KAP i la OL-protocadherina (clonada a partir de teixit olfatori de ratolí, Hirano, 1999) comprén els aminoàcids del 51 al 96 de la KAP murina, i del 138 al 183 de la protocadherina, corresponent a un troç del domini cadherina del segment extracel·lular. L'homologia entre la KAP murina i la OL-protocadherina (42% d'identitat i 55% positius) és més gran que no pas entre la KAP de rata i la OL-protocadherina; encara que això es podria explicar en base a la hipotètica divergència funcional entre la KAP murina i la de rata, ni la longitud del fragment alineat, ni l'homologia en aquest fragment, ni el valor d'E utilitzat, permeten afirmar amb garanties que les protocadherines siguin un parent llunyà de la KAP.

## 1.2. Característiques físico-químiques

S'ha suggerit que alguns grups de proteïnes amb funcions comunes convergeixen pel que fa a la composició amionacídica, pes molecular i punt isoelèctric (Hobohm, 1995; Galat, 1997). No observem, però, un patró funcional conservat entre les diferents proteïnes amb pI i pes molecular semblants als de la KAP. Així, la localització d'aquestes proteïnes és bàsicament extracel·lular (*Mastocytoma proteoglycan core protein*, *Salivary acidic proline-rich phosphoprotein*), encara que també trobem proteïnes de membrana (*Glycophorin HA*), intracel·lulars (*Oncomodulin*) o nuclears (*DNA-directed RNA polimerase II* o *Parathymosin*). Moltes d'elles estan glicosilades, presenten pèptid senyal i tres d'elles (*Oncomodulin*, *Salivary acidic proline-rich phosphoprotein* i *Parathymosin*) lliguen ions calci de manera específica. Tanmateix, mentre algunes d'aquestes proteïnes estan ubiquament expressades (*DNA-directed RNA polimerase II* o *parathymosin*) altres presenten una certa especificitat de teixit (*Trophoblast-specific protein precursor*).

## 2. KAP: LA PROTEÏNA

Malgrat els avenços en computació i en nombre de bases de dades disponibles, l'aproximació "in silico" a la funció del la KAP no ha resultat concluent. Per a l'aproximació "in poiata" resulta imprescindible l'obtenció d'anticossos específics contra la KAP. La utilització d'aquests anticossos ens ha permès contrastar la informació que es tenia sobre la KAP a nivell de mRNA.

Tot i reconèixer pèptids diferents de la KAP, els anticossos abKAP1 i abKAP2 han demostrat ser igualment útils en la localització de la proteïna mitjançant Western blot, immunohistoquímica i immunocitoquímica. Donat que reconeixen pèptids específics de la KAP, molt probablement tenen dificultat per detectar la proteïna nadiua no desnaturalitzada, explicant-se així la baixa eficiència de abKAP1 i abKAP2 per immunoprecipitar la KAP. Per altra banda, cal tenir en compte que els anticossos contra la KAP murina s'han obtingut a ratolí; això pot fer que el reconeixement de les cadenes lleugeres i pesades de les immunoglobulines emmascari la detecció de la KAP. Aquest no ha estat el cas, ja que les immunoglobines migren segons un pes molecular de 50 i 150 KDa, mentre que la KAP presenta un pes aparent d'aproximadament 20 KDa.

Aquest pes aparent, descrit ja des de la identificació de la KAP no es correspon al predit per a una proteïna de 121 aminoàcids (aprox. 13KDa). Tant la proteïna detectada en extractes de ronyó, com l'expressada de manera heteròloga en bacteri, com la sintetitzada *in vitro* en un sistema de reticulòcit de conill, migren segons un pes superior al predit. Així, no podem atribuir aquest augment aparent a possibles modificacions post-traduccionals. Més aviat són les característiques físico-químiques de la KAP i la seva composició aminoacídica les que condicionen aquest resultat. Ja s'havia descrit per a la KAP (Meseguer, 1989) que l'abundància d'aminoàcids prolina, serina, treonina, aspàrtic i glutàmic provocaven aquesta migració aberrant.

La presència de modificacions co-traduccionals i post-traduccionals (eliminació del pèptid senyal, glicosilacions, etc) s'ha avaluat mitjançant la utilització de reticulòcit de conill (Pelham 1976) conjuntament amb membranes microsomals canines (Walter, 1983). Destaca el baix rendiment en la síntesi *in vitro* de la KAP, sobre tot tenint en compte que es va identificar com el producte de traducció *in vitro* més abundant al ronyó de mascle (Toole, 1979). En el nostre cas no hem utilitzat mRNA total de ronyó; partim del cDNA de la KAP clonat en pBluescript-SK. Malgrat que aquest cDNA compta amb cua de poly-A i amb 21 nucleòtids de la regió 5'UTR, és possible que l'estabilitat del mRNA i l'eficiència de traducció sigui inferior que en el mRNA complet de la KAP.

Per altra banda, la utilització de les membranes microsomals canines disminueix la intensitat del senyal obtingut. Si tenim en compte que la KAP només té 3 metionines, i que dues d'elles formen part del putatiu pèptid senyal, és possible que l'escissió del mateix provoqui la disminució d'intensitat en l'autoradiografia. L'anàlisi per Western blot d'aquestes mostres, però, detecta la KAP amb menys intensitat en els carrils corresponents a les membranes microsomals. Així, o bé les membranes interfereixen en la transcripció i traducció de la KAP, o bé l'escissió del pèptid senyal va acompanyada d'altres modificacions que dificulten el reconeixement de la KAP per part dels anticossos.

La mobilitat electroforètica en SDS-PAGE de la proteïna sintetitzada *in vitro* sense membranes microsomals, és idèntica a l'observada per a la proteïna detectada en extractes de ronyó de ratolí. Una primera lectura d'aquests resultats seria que la proteïna present al teixit no ha sofert modificacions post-traduccionals; també és probable que aquestes modificacions s'hagin donat, però que no afectin a la migració de la proteïna.

Cal tenir en compte que el reticulòcit de conill sovint conté enzims contaminants (principalment quinases) que poden estar modificant la proteïna. Així, també és possible que ambdues proteïnes (provinent del reticulòcit i del teixit) estiguin igualment modificades.

L'anàlisi exhaustiva de les modificacions post-traduccionals de la KAP (utilització de quinases, glicosilases, endopeptidases i altres), requereix la immunoprecipitació de la proteïna. Donat que no disposem d'anticossos per immunoprecipitar la KAP, no hem pogut dur a terme aquests assaigs a partir d'extracte de teixit. Pel que fa al cultiu cel·lular, el model d'expressió optimitzat per a la immunoprecipitació (KAP-FLAG), presenta dianes per a modificacions post-traduccionals a la seqüència del FLAG i, per tant, no és un model vàlid per a aquests assaigs. Actualment, al nostre laboratori s'està utilitzant un model d'expressió alternatiu per a l'estudi de les modificacions post-traduccionals de la KAP.

### 3. KAP AL RONYÓ MURÍ

La KAP presenta una clara especificitat de tissular. En ratolí, l'expressió del mRNA queda restringida al ronyó i a l'úter (durant els tres dies previs al part) (Kasic, 1993). Catterall i col·laboradors (Catterall, 1986) varen obtenir anticossos policlonals immunitzant conills amb un fragment de la KAP murina (de l'aminoàcid 86 al 96). Aquells anticossos tenien la capacitat d'immunoprecipitar la KAP traduïda *in vitro*, i també detectaven la proteïna en assaigs de RIA (radioimmunoassaig). Així van poder detectar la KAP a ronyó, a orina i també a glàndula submaxil·lar. Els autors descarten la possibilitat que la glàndula submaxil·lar només acumuli la KAP i no la sintetitzi, donat que no detecten la KAP en sèrum.

Resultats obtinguts al nostre i a altres laboratoris (Ding 1997) utilitzant tècniques de Northern blot i RT-PCR, demostren, en canvi, l'absència del mRNA de la KAP a la glàndula submaxil·lar. Aquests resultats indiquen que la detecció de la proteïna a la glàndula submaxil·lar per part de Catterall i col·laboradors, o bé és inespecífica, o bé és conseqüència de l'acumulació de la KAP d'origen no submaxil·lar.

Pel que fa a l'orina, els nostres anticossos abKAP1 i abKAP2 no detecten per Western blot cap proteïna específica. No descartem, però, la possibilitat que la KAP sigui secretada a orina. Els nostres resultats negatius podrien atribuir-se, per una banda als anticossos utilitzats i per l'altra a la tècnica de detecció. Els anticossos abKAP1 i

abKAP2 són monoclonals obtinguts per immunització amb pèptids diferents als utilitzats per Catterall i col·laboradors. Tanmateix, el radioimmunoassaig representa, a molts nivells, una tècnica més sensible que no pas el Western blot.

Els resultats obtinguts amb els anticossos generats per Catterall i col·laboradors, s'han posat en entredit pels mateixos autors (Dr. J. F. Catterall, comunicació personal). Si més no, aquests resultats no s'han pogut reproduir amb els mateixos anticossos. Podem afirmar, doncs, que abKAP1 i abKAP2 són els únics anticossos monoclonals disponibles que, de manera consistent, reconeixen la KAP murina.

### **3.1. Abundància relativa**

El mRNA de la KAP és un dels transcrits més abundants al ronyó de ratolí mascle (Takenaka, 1998; Virlon, 1999; El-Meanawy, 200). Per altra banda s'ha descrit que l'estabilitat d'aquest mRNA és molt elevada (Watson, 1988). Hem demostrat mitjançant assaigs de marcatge metabòlic que, malgrat les prediccions de vida mitja de la proteïna i la presència de regions PEST, la KAP té una vida mitja intracel·lular de més de 8 hores. Tot això suggereix que la KAP és, molt probablement, una de les proteïnes més abundants al túbul proximal murí. Val a dir, però, que els assaigs de marcatge metabòlic s'han realitzat mitjançant transfecció transitòria de la KAP en la línia epitelial renal murina PKSV-PCT. Aquestes cèl·lules, tot i presentar les característiques pròpies de cèl·lula epitelial proximal renal, podrien manca de factors específics que condicionessin la traducció i el processament de la KAP al ronyó. Igualment, la sobre-expressió de la proteïna en el model cel·lular pot alterar significativament el processament normal de la mateixa.

### **3.2. Regulació per andrògens**

El ronyó presenta un clar dimorfisme sexual, tant a nivell morfològic (Koenig, 1980) com a nivell molecular (Catterall, 1998; Melià, 1998). L'expressió del mRNA de la KAP és un clar exemple d'aquest dimorfisme. Hem demostrat que la KAP es distribueix al ronyó murí seguint el patró ja descrit per al seu mRNA (Meseguer, 1987). Això és, a la regió juxtamedul·lar ( $S_3$ ) en femelles, mascles castrats i mascles intactes. Aquests últims, i per efecte dels andrògens, també presenten la KAP a nivell cortical ( $S_1/S_2$ ). No hem demostrat de manera directa i mitjançant PAS que les cèl·lules que



expressen la KAP siguin cèl·lules epitelials de túbul proximal, però podem afirmar que la distribució dels túbuls marcats és consistent amb la localització al túbul proximal. Els diferents nivells d'expressió relativa de la proteïna s'han pogut comparar mitjançant Western blot, evidenciant-se l'abundància de la KAP al ronyó de ratolí mascle, amb valors decreixents en femelles i castrats. Els andrògens al ronyó són responsables de l'expressió diferencial d'enzims i transportadors principalment. La regulació per andrògens de la KAP, juntament amb el fet que és una proteïna de mida petita (121 aa), va portar a alguns investigadors a suggerir que la KAP podria tenir alguna relació amb les feromones (Watson, 1984). Les MUPs (*Major Urinary Proteins*) representen el component proteic més abundant a l'orina de ratolí i s'ha demostrat que lliguen compostos químics amb activitat feromona. Tanmateix també s'ha descrit activitat feromona intrínseca per a les MUPs i altres proteïnes de la família de les lipocalines (revisat a Flower, 1996). Les MUPs es regulen per andrògens però, a diferència de la KAP, són d'origen hepàtic. Per altra banda, la KAP no presenta homologies de seqüència amb elles ni amb altres membres de la família de les lipocalines.

### **3.3. Localització cel·lular**

La localització cel·lular d'una proteïna pot ésser de gran utilitat en l'elucidació de la funció de la mateixa. Hem utilitzat tres models d'expressió, tots ells basats en la transfecció de la KAP, amb o sense *taq* i en posició amino i carboxi-terminal. El sistema més complexe, el Tet-Off, permet, mitjançant una doble transfecció estable, l'expressió controlada de la proteïna. Es tracta d'un sistema molt versàtil i potent, i ofereix com a principal avantatge la possibilitat de regular *on/off* l'expressió d'una proteïna en una mateixa línia cel·lular. S'eliminen així variables com eficiència de transfecció transitòria o efectes inespecífics provocats pels llocs d'inserció en les transfeccions estables. Tot i haver valorat els nivells d'inducció per RT-PCR i Western blot, no hem analitzat el nombre de còpies de cada plàsmid insertades en el genoma de les PKSV-PCT. Podem afirmar, però, que els nivells d'expressió en el sistema Tet-Off són inferiors als que obtenim amb els sistemes d'expressió transitòria.

Els tres models d'expressió de la KAP en cèl·lules epitelials renals PKSV-PCT coincideixen en un patró de distribució reticular citoplasmàtic, més intens al voltant del nucli però amb absència de proteïna a nucli i a membrana. La utilització de un disruptor dels microtúbuls, el Nocodazole, provoca una certa desaparició del patró reticular, quedant la proteïna distribuïda uniformement al citoplasma de manera homòloga a la

GFP. El reticle endoplàsmic depèn dels microtúbuls en el tràfic vesicular (Terasaki, 1986; Terasaki, 1994) i condiona les diferències entre les membranes basolaterals i apicals de les cèl·lules polaritzades (Parczyk, 1989; Breitfeld, 1990). L'associació al citoesquelet es fa evident també en la localització de la KAP durant la mitosi. Així la trobem formant part del fus mitòtic durant metafase, anafase i telofase. Igualment es localitza en el solc de segmentació durant les etapes més tardanes de la divisió cel·lular. Aquesta localització ja ha estat descrita per a altres proteïnes (FKBP-59 (Perrot-Appinat, 1995), E-cadherina (Bauer, 1998) o Clatrina (Okamoto, 2000)), i molt probablement és conseqüència de la reorganització del citoesquelet durant la divisió cel·lular. És poc probable que la KAP jugui un paper cabdal en la divisió cel·lular donat que aquest és un procés general i, en canvi, la KAP presenta una evident especificitat cel·lular. La possibilitat que la KAP alteri de manera significativa el curs del cicle cel·lular, s'ha descartat amb l'anàlisi per citometria de fluxe dels clons tet-off amb i sense sobre-expressió de KAP, donat que no s'observen diferències entre les mostres amb i sense tetracicina. Sí observem, en canvi, diferències entre clons; las quals són atribuïbles a l'efecte insercional. En aquest assaig s'ha de tenir en compte, per una banda, la baixa eficiència de sincronització que fa que les poblacions no siguin 100% homogènies al llarg del cicle i per altra banda el fet que hem analitzat les cèl·lules amb períodes mínims d'una hora. Així, si la sobre-expressió de la KAP afecta al cicle cel·lular amb variacions de minuts o si la població susceptible de l'acció de la KAP és petita, no ho detectarem mitjançant aquesta aproximació funcional.

#### **4. KAP: LES INTERACCIONS**

Una font important d'informació pel que fa a la funció d'una proteïna, ens ve donada per les proteïnes amb les quals interacciona. L'anàlisi d'interaccions proteïna-proteïna es pot abordar amb diferents metodologies. En el nostre cas hem utilitzat el doble híbrid en llevat com a assaig d'interaccions. Malauradament, el nombre de positius reals ha estat baix, i la qualitat de les seqüències en la llibreria ha demostrat ser deficient. Bona part dels clons seqüenciats a partir de la llibreria han resultat incomplets en l'extrem 5', fusionats amb altres cDNAs diferents, o estan en l'orientació incorrecta. Valguin com a exemple els dos primers positius: 5.6 i P5.

El clon 5.6 conté un fragment d'elevada homologia amb l'extrem 3' de la uromodulina murina, en canvi, tota la regió corresponent a 1Kb de l'extrem 5' del clon

no té homòlegs a cap de les bases de dades utilitzades. Els intents d'aïllar de la llibreria del doble híbrid un clon uromodulina sencer han estat infructuosos donada la baixa integritat en l'extrem 5' de tots els clons obtinguts.

La uromodulina o proteïna de Tamm-Horsfall és la glicoproteïna més abundant a l'orina humana (Tamm, 1950), se sintetitza exclusivament al ronyó, localitzant-se al segment ascendent de la nansa de Henle. Encara que es desconeix el paper fisiològic exacte de la proteïna, es postula que està implicada en el manteniment del balanç electrolític a la nefrona i en la protecció del ronyó en front a infeccions bacterianes (Orskov, 1980). També se l'ha implicat en patologies renals com la fallada renal aguda, infeccions del tracte urinari i nefrolitiasi (Hoyer, 1979). Tanmateix s'ha descrit que la uromodulina procedent de dones gestants inhibeix la proliferació del limfòcit T i lliga IL-1 i IL-2 (Tandai-Himura, 1999) amb característiques immunosupressores.

Donada l'abundància de la uromodulina, resulta plausible que, tot i haver superat tots els controls del doble híbrid, el clon 5.6 sigui un fals positiu. També és possible que la interacció no estigui mediada pel fragment homòleg a uromodulina, sinó pel fragment de l'extrem 5' sense homologies. Si, pel contrari, la interacció real vingués donada per la uromodulina, es plantejaria el dubte de la rellevància fisiològica de la interacció. Donat que la uromodulina és una glicoproteïna associada a la membrana apical de les cèl·lules epitelials de túbul distal, l'única possibilitat d'interacció passa per la secreció de la KAP per part de les cèl·lules epitelials proximals a la llum del túbul. Així, com ja s'ha indicat prèviament, la KAP se secretaria a orina. Donat que no hem observat per immunohistoquímica la presència de la KAP al segment ascendent de la nansa de Henle, aquesta hipotètica interacció no retindria la proteïna al túbul. La utilització de l'insert 5.6 com a sonda en Northern blot de ronyó de ratolí, revela una única banda específica de més de 2 Kb, que seria coincident amb la uromodulina, però no descartem la presència d'altres bandes de pes molecular diferent i menor intensitat.

Per la seva banda, el clon P5 també presenta un extrem 5' anòmal, on hi trobem una cua de poly-T. Aquest fet, juntament amb la presència d'una diana EcoRI interna i l'absència d'homologies en el moment de la seva seqüenciació, ens va fer pensar que es tractava de la fusió de dos clons; un d'ells en la orientació inversa. Amb l'augment de seqüències al banc de dades, han aparegut *est's* homòlegs que se solapen a nivell de la diana EcoRI, descartant la possible fusió de dos cDNAs a aquest nivell. Tot i tractar-se de *est's* sense homologies conegudes i de diferent procedència (bulb olfatori, glàndula mamària, hipotàlem i retina), la seqüència alineada comprèn gairebé tot el clon, i fins i

tot trobem un homòleg de rata. L'adquisició d'un d'aquests clons homòlegs de ratolí ens hagués permès l'estudi del clon P5, de la seva seqüència correcta i completa i de la seva funció. Malauradament aquests clons pertanyen al *Brain Molecular Anatomy Project (BMAP) NIH-University of Iowa*, i encara no s'han posat a la venda. La recerca de clons homòlegs a P5 a la llibreria de doble híbrid no va proporcionar cap seqüència homòloga, suggerint la baixa representació de P5 a la llibreria.

Malgrat la interacció KAP-P5 ens sigui poc informativa pel que fa a la funció de la KAP, el clon P5 constitueix per si mateix una possible nova línia de recerca; quedant encara per investigar la rellevància de la interacció KAP-P5.

## 5. KAP: INTERACCIÓ AMB CICLOFILINA B

L'únic positiu de doble híbrid amb seqüència completa i coneguda ha estat el clon B3. La seqüència del mateix és 100% homòloga a la ciclofilina B (CyPB) de ratolí i comprèn la regió codificant sencera i en pauta.

La interacció KAP-CyPB ha estat sistemàticament confirmada amb tots els assaigs utilitzats: doble híbrid, *GST-Pulldown*, immunoprecipitació i co-localització cel·lular, demostrant-se *in vitro* i *in vivo* la interacció.

Mitjançant doble híbrid hem identificat els dominis implicats en la interacció de cada una de les proteïnes. Pel que fa a la KAP, els primers 51 aminoàcids no són suficients per a la unió amb CyPB. La interacció es fa efectiva amb un domini més gran, que comprèn els aminoàcids del 1 al 92. No podem atribuir la interacció únicament al fragment comprès entre els aminoàcids 51 i 92, donat que part o tot el domini (1-51) pot ésser necessari. Els aminoàcids del 51 al 92 de la KAP corresponen a la regió identificada per psi-blast com a homòloga a la OL-protocadherina, però no tenim constància que s'hagi descrit cap interacció entre la ciclofilina B i algú membre de la família de les cadherines.

Pel que fa a la ciclofilina B, el domini responsable de la interacció queda restringit als últims 46 aminoàcids de la regió carboxi-terminal de la proteïna. Aquesta regió correspon a una seqüència específica de la CyPB que no es troba en altres ciclofilines. Concretament, els últims 10 aminoàcids carboxi-terminal són responsables de la retenció de la proteïna al reticle (Arber, 1992) essent els últims 5 aa especialment necessaris (Mariller, 1996). Si tenim en compte que els anticossos antiCyPB utilitzats en els assaigs de co-immunoprecipitació reconeixen específicament els últims 10

aminoàcids de la proteïna, és possible que el reconeixement de la CyPB per part d'aquests anticossos es vegi destorbat per la interacció amb KAP. Això explicaria el resultat de la immunoprecipitació, amb la qual no som capaços de detectar la KAP quan co-immunoprecipitem amb l'anticòs antiCyPB, però sí a l'inversa.

La interacció entre la KAP i la CyPB no es veu compromesa per la presència de CsA en els assaigs de GST-Pulldown. A les dosis assajades la CsA no desplaça la interacció KAP-CyPB un cop formada. S'ha descrit que, en la interacció de la ciclofilina D amb la translocasa de nucleòtid adenina (Woodfield, 1998), la CsA no és capaç de desplaçar la interacció; en canvi, la pre-incubació de la ciclofilina amb l'immunosupressor sí impedeix la unió descrita. En les nostres mans, la incubació prèvia de la CyPB amb la CsA, a dosis superiors a les utilitzades per Woodfield i col·laboradors, tampoc no impedeix la unió de la KAP. Aquests resultats confirmen la identificació del domini C-terminal de la CyPB com a regió responsable de la unió i, alhora, no implicada en la interacció amb CsA.

### **5.1. Altres dianes de la CyPB**

Donades les característiques intrínseques de les ciclofilines (activitat rotamasa i chaperona (Fischer, 1990; Schmid, 1993)) hom pot plantejar-se la possibilitat que la interacció sigui inespecífica. No es considera, però, que les ciclofilines tinguin un paper essencial en el plegament de proteïnes. Així ho demostren Dolinski i col·laboradors (Dolinski, 1997) en mutar totes i cada una de les ciclofilines conegudes en llevat, i comprovant que cap d'elles és essencial per a la viabilitat cel·lular. Els autors proposen l'existència d'un nombre reduït de proteïnes específiques substrat de les ciclofilines. A aquest respecte s'han identificat un seguit de proteïnes que interactuen de manera específica amb algunes ciclofilines.

Concretament, a la CyPB se li han descrit interaccions amb la calcineurina (Li, 1999), amb la proteïna p24 de la càpside del virus de l'immunodeficiència humana (Luban, 1993), amb la CAML (Bram, 1994), amb Hsp47, PDI, GRP78, GRP94 i procolàgen (Smith, 1995), amb eIF2- (Kainer, 2000) i amb la prolactina (Rycyzin, 2000). No s'ha descrit cap homologia de seqüència o de funció entre aquestes proteïnes, ni tampoc un patró comú d'acció de la CyPB sobre cada una d'elles.

Així, la interacció amb la calcineurina és depenent de la interacció de la ciclofilina amb la CsA a nivell del que s'ha anomenat centre actiu (Schneider, 1994), i resulta en la inhibició de l'activitat fosfatasa. Aquesta inhibició és més efectiva en el cas

de la unió de CyPB amb la CsA que no pas en CyPA amb CsA (Swanson, 1992). Tanmateix, l'afinitat de la CyPB per la CsA és 10 vegades superior que la que té la CyPA.

La interacció amb la proteïna vírica p24 es dona a través del centre actiu de la CyPB, i per tant, la presència de la CsA impedeix aquesta interacció (Luban, 1993). La CyPB humana, no només reconeix la proteïna del virus de la immunodeficiència humana (HIV) sinó també el simi (SIV) (Endrich, 1999).

La CAML es va identificar en base a la seva interacció amb la CyPB (Bram, 1994). Es desconeixen els dominis implicats en aquesta interacció així com l'efecte de la CsA. La CAML es troba al reticle, colocalitzant amb la calreticulina, i modula l'alliberament de calci intracel·lular (Holloway, 1996; Holloway, 1998). Posteriorment s'ha descrit una proteïna transmembrana que interacciona amb la CAML i s'ha anomenat TACI (*Transmembrane Activator and CAML Interactor*). La TACI està implicat en l'activació de NFAT, AP-1 i NF- $\kappa$ B (von Bulow, 1997) proporcionant un senyal coestimulador en la resposta humoral independent de cèl·lules T (von Bulow, 2001).

Per la seva banda, les interaccions descrites per Smith i col·laboradors (Smith, 1995) es donen amb proteïnes residents al reticle amb funció de chaperones. La seva interacció i localització a reticle i a vesícules intermitges pre-Golgi són indicatives del paper important que tenen a nivell de transport i secreció de procolàgen (Smith, 1995). Igualment es demostra que la presència de CsA disminueix els nivells de CyPB lligada a colàgen, reduint-se la secreció del mateix.

Més recentment s'ha identificat la interacció de la CyPB amb eIF2 $\gamma$  (Kainer, 2000) encara que no hi ha cap publicació pel que fa a la interacció (la informació apareix a l'article Kainer 2000 com a feina realitzada pels autors però sense publicar). L'eIF2 $\gamma$  és part del complex proteic eIF2. Aquest és un important regulador de la traducció de proteïnes i un component central de la resposta del reticle endoplàsmic a l'estrés (Kaufman, 1999).

La prolactina interacciona amb la CyPB via l'extrem C-terminal de la ciclofilina B, i la presència de la CsA augmenta la interacció entre les dues proteïnes. L'efecte d'aquesta interacció es tradueix en una més gran retrotranslocació nuclear de la prolactina (Kainer 2000).

Conseqüentment amb la seva interacció amb CyPB, moltes d'aquestes proteïnes, la KAP entre elles, es localitzen al reticle endoplàsmic. Alguns autors (Arber 1992; Bram, 1993) hipotetitzen que la localització reticular de la CyPB juga un paper

important en la immunosupressió, ja que en co-localitzar amb la calreticulina podria estar implicada en processos de mobilització de calci intracel·lular. Tanmateix, la presència de la CyPB al reticle està igualment associada al plegament i el transport intracel·lular (Smith, 1995). Hem pogut demostrar mitjançant immunocitoquímica que la KAP co-localitza a nivell reticular amb la CyPB i que aquesta co-localització no es veu alterada en presència de CsA.

Al contrari que la KAP, la CyPB és una proteïna ubiqüament expressada. En rata s'ha descrit la seva abundància renal i la seva distribució al llarg de la nefrona (Kainer, 2000). De tots els òrgans estudiats pels autors, els nivells de mRNA més elevats es troben a ronyó, amb més abundància al túbul proximal convolut (tot i ser present a tots els segments del túbul). El mateix estudi identifica una sobre-expressió a nivell renal en la soca de rates hipertenses espontànies SHR. Aquesta sobre-expressió es fa evident quan encara no s'ha donat un augment significatiu en la pressió sanguínia d'aquestes rates i per tant no es tracta d'un efecte secundari a la hipertensió. Tanmateix, la persistència de la sobre-expressió en línies cel·lulars proximals renals obtingudes a partir d'aquests animals, suggereix un origen genètic de la sobre-expressió. Aquests resultats associen per primer cop la CyPB amb una patologia renal.

## 6. KAP I LA CICLOSPORINA A

La interacció KAP-CypB descrita per nosaltres, la interacció CyP-CsA imprescindible per a l'acció immunosupressora del fàrmac i la relació entre la CsA i la nefrotoxicitat, fan de l'anàlisi de la relació KAP-CsA una aproximació atractiva.

Hem demostrat que els nivells de proteïna KAP disminueixen de manera evident i a nivell de les cèl·lules  $S_3$  amb 3 dies de tractament. Hem utilitzat immunohistoquímica per tal de demostrar realment aquesta disminució en  $S_3$  en mascles intactes, ja que la presència de proteïna a  $S_1/S_2$  ens emmascara aquesta davallada en els assaigs de Western blot. Per contra el tractament amb CsA augmenta el nivell de mRNA de KAP en mascles i femelles sense afectar als mascles castrats. Resulta difícil explicar l'augment de mRNA com a fenomen compensatori a la disminució de proteïna, ja que no observem aquesta compensació en mascles castrats. Donada la marcada dependència de la presència de hormones esteroidals és més factible suposar que la CsA afecta de manera específica a l'activitat d'aquestes hormones. S'ha demostrat que la CsA pot afectar a la resposta androgènica a dos nivells, per una banda activa el metabolisme

androgènic i la conversió de testosterona en el seu metabolit més actiu, la dihidrotestoterona (Boudou, 1990) per activació de l'enzim 5 $\alpha$ -reductasa. L'activació de la 5 $\alpha$ -reductasa afectara al ronyó només augmentant els nivells circulants de DHT, ja que l'activitat d'aquest enzim al ronyó és molt baixa (Anderson, 1990). Per l'altra banda, a nivell de receptors hormonals també s'ha descrit l'activació del receptor de glucocorticoids (Ning, 1993) i progesterona (Tai, 1994; Renoir, 1995; Milad, 1995) en resposta a l'immunosupressor. Els autors demostren un increment significatiu en l'activació per part d'un progestògen (R5020) d'un promotor sensible a progesterona (MMTV, *Mouse Mammary Tumor Virus*) en cèl·lules tractades amb CsA. En base a aquests resultats, hipotetitzem per a la KAP un efecte potenciador de la CsA sobre l'activació via hormones esteroidals.

Segons els assaigs de immunohistoquímica, la CsA afecta disminuint els nivells de la KAP igualment a mascles, femelles i mascles castrats, essent les cèl·lules juxtamedul·lars les dianes de l'acció de l'immunosupressor sobre els nivells de proteïna; val a dir que justament aquest segment S<sub>3</sub> també és diana de l'acció nefrotòxica (Mihatsch, 1986) caracteritzada per l'aparició de grans vacuols i l'alteració estructural del reticle endoplàsmic.

Donat que els nivells de mRNA de KAP són iguals o més elevats encara en els ratolins tractats que els control, la disminució de la proteïna provocada per la CsA a les cèl·lules S<sub>3</sub> ha d'estar mediada per esdeveniments traduccionals o post-traduccionals. La CsA ha estat implicada en processos de degradació de proteïnes a nivell renal (Olbricht, 1990; Olbricht, 1994) on s'ha descrit un augment de l'activitat catepsina, encara que restringida al segment S<sub>1</sub> del túbul proximal. A nivell traduccional, la CsA també afecta al ronyó, de manera global (Buss, 1993) i amb proteïnes específiques com la IL-6 (Garcia, 1999) o la IL-3 (Nair, 1999). Ambdues possibilitats, degradació i alteració traduccional, es poden donar de manera simultània i són compatibles amb els nostres resultats pel que fa a la secreció de la KAP. En el model cel·lular d'expressió KAP-FLAG hem analitzat per marcatge metabòlic si la CsA afecta a la secreció de la KAP, demostrant que la KAP apareix abans al medi de les cèl·lules tractades amb 1 $\mu$ M CsA. La dosi de CsA utilitzada és prou baixa com per no comprometre la integritat cel·lular durant el temps de l'assaig. Un efecte semblant ja s'havia descrit per a la CyPB, en cèl·lular de ronyó de hamster (BHK) i en les mateixes condicions que el nostre assaig (Price, 1994).



Així doncs, i sense descartar els possibles efectes traduccionals i de degradació, la CsA promou la secreció de la KAP per part de la cèl·lula epitelial proximal murina.

Finalment, hem demostrat que la sobre-expressió de la KAP en un model cel·lular renal disminueix la toxicitat provocada per la CsA i aquesta protecció es dona principalment a dosis altes de CsA. Donat que no hem avaluat altres fàrmacs nefrotòxics, no podem afirmar categòricament que la protecció sigui específica per a la CsA. És possible que la sobre-expressió de la KAP confereixi una més gran viabilitat a les cèl·lules en cultiu, independentment de l'origen del dany cel·lular. Així, la KAP conferiria protecció parcial en front a diversos nefrotòxics. És possible també que l'efecte protector de la KAP no sigui específic per a la CsA, però estigui adreçat a la compensació específica de la inhibició de la calcineurina, per tant la toxicitat per FK506 (o tacrolimus, immunosupressor que inhibeix la fosfatasa calcineurina i que és igualment nefrotòxic (revisió a de Mattos, 2000)) també disminuiria en presència de KAP. Les gràfiques de toxicitat mostren una protecció baixa o inexistent a dosis baixes-mitges de CsA. És a dosis més altes quan la protecció per la presència de la KAP es fa evident i significativa.

La ciclosporina A circula pel corrent sanguini, és metabolitzada al fetge pel citocrom P4503A (Henricsson, S. 1990), exerceix el seu efecte immunosupressor a nivell del limfòcit T (Liu, 1991) i, entre altres teixits, s'acumula al ronyó (Belitsky, 1986; Wagner, 1987). Les ciclofilines són proteïnes ubiques i abundants; s'ha descrit, però, que a concentracions elevades de CsA poden arribar a ser limitants en la interacció CsA-CyP (Kung, 2000). La ciclofilina A és la immunofilina responsable de la immunosupressió per CsA al limfòcit T, però es desconeix si en altres teixits el lligand preferent de la CsA és algun altre membre de la família de les ciclofilines. En uns primers estudis es va considerar que la CyPC era específica de ronyó i podia així estar implicada en la nefrotòxicitat provocada per l'immunosupressor. La identificació de la CyPC a altres teixits i la seva baixa afinitat per CsA comprometen aquesta hipòtesi (Friedman, 1994; Schneider, 1994).

Luban i col·laboradors han generat un ratolí transgènic per a la CyPA (Colgan, 2000), l'estudi de l'efecte nefrotòxic de la CsA en aquests ratolins no s'ha dut a terme però serà de gran utilitat per discernir la implicació d'aquesta ciclofilina en la nefrotòxicitat.

La ciclofilina B s'ha associat a mecanismes de control del calci intracel·lular (Arber, 1992; Bram, 1994) essent aquesta una segona via a través de la qual la CsA

controla l'activació de la calcineurina (Bram, 1993). Donat que el ronyó és el teixit on més s'expressa la CyPB (Kainer, 2000), que la CyPB s'uneix a la CsA amb molta afinitat (Schneider, 1994) i que, en fer-ho, inhibeix la calcineurina amb més eficiència que altres ciclofilines (Swanson, 1992), podem hipotetitzar un paper important per a la CyPB en la inhibició de la calcineurina a nivell renal; i per tant, un paper important en la nefrotoxicitat per CsA.

Hem demostrat que la KAP s'uneix a CyPB, així és possible que aquesta interacció, o bé impedeixi la unió amb la CsA, o bé, tot i permetre-la, faci que el trímer CsA-CyPB-KAP sigui inactiu (per al control de la mobilització de calci via CyPB o per a la inhibició directa de la calcineurina, o ambdues).

Així, a dosis baixes de CsA la presència de KAP no afecta a la toxicitat, donat que hi ha prou CyPB lliure. Quan va augmentant la concentració de l'immunosupressor es van ocupant tant les CyPB lliures com les lligades a KAP. En el supòsit que es formes el trímer CsA-CyPB-KAP i que aquest fos inactiu, per molt que augmentem la dosi de CsA no es produirà més toxicitat. Naturalment aquest és un model simplificat possible, però no l'únic. Amb les dades de que disposem fins ara no ens podem definir per un o altre model, a l'espera que l'evidència experimental aportï més dades.

Ens trobem, doncs, davant d'una proteïna específica de teixit, molt abundant i regulada per andrògens, estrògens i T3 (Toole, 1979; Catterall, 1986; Meseguer, 1992; Solé, 1994). De tots els gens de funció coneguda expressats a ronyó de ratolí, el percentatge més elevat correspon a aquells implicats en el metabolisme i l'obtenció d'energia (El-Meanawy 2000). Igualment abundants però en menor proporció trobem proteïnes de membrana, incloent-hi transportadors, proteïnes del citoesquelet i implicades en el transport vesicular, proteïnes d'unió a DNA i RNA així com proteïnes implicades en la transducció de senyal. Els andrògens, per la seva banda, són responsables de l'expressió diferencial a nivell renal de diversos enzims, proteïnes implicades en transport i metabolisme, així com altres de funció desconeguda (Catterall, 1998; Melià, 1998). Hem aportat dades referents a la localització de la KAP al reticle endoplàsmic, on co-localitza amb la CyPB, així com la seva dependència del citoesquelet i la seva secreció. Aquest resultat suggereixen que la KAP pot tenir un paper en la via de transport vesicular, sense descartar que participi en l'establiment de la polaritat d'aquest transport mitjançant la seva associació al citoesquelet. Altres autors han identificat la KAP en models murins de patologia renal. Així, Zhang i

col·laboradors (Zhang, 1999) troben el mRNA de la KAP sobre-expressat en ratolins nefrectomitzats en 5/6 parts. Per altra banda, Wang i col·laboradors (Wang, 2000) descriuen la disminució en els nivells de mRNA de la KAP en un model murí de nefrolitiasi. Finalment, nosaltres hem descrit la implicació de la KAP en la nefrotoxicitat mediada per CsA, possiblement via la seva interacció amb la ciclofilina B.

Tot plegat, s'obren nous horitzons per a l'estudi de la funció de la KAP, amb l'evidència de la seva implicació en fisiopatologia renal i la disponibilitat d'anticossos i models cel·lulars per dur a terme aquests estudis.

- Els anticossos monoclonals abKAP1 i abKAP2 detecten de manera específica la proteïna en assaigs de Western blot, immunohistoquímica i immunocitoquímica, però no en assaigs de immunoprecipitació.
- La Kidney Androgen-regulated Protein (KAP) es localitza a la regió juxtamedul·lar renal (S<sub>3</sub>) en ratolins femelles, mascles castrats i mascles intactes. En aquests últims la proteïna també és present a la regió cortical renal (S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>). L'abundància relativa de la KAP entre les diferents situacions hormonals segueix el mateix patró que el seu mRNA, es a dir mascles intactes >femelles >mascles castrats.
- En els models d'expressió assajats, la KAP transfectada en cèl·lules epitelials de túbul proximal renal murí es distribueix al citoplasma, seguint un patró reticular, compatible amb localització al reticle però dependent de microtúbuls. El sistema d'expressió cel·lular controlat per tetraciclina Tet-Off és un bon model per a l'anàlisi funcional de la proteïna, ja que permet una regulació fina de l'expressió estable de la KAP i, alhora, distingeix entre els efectes provocats per l'expressió de la KAP i els merament insercionals.
- Confirmant l'associació als microtúbuls, la KAP es localitza formant part del fus mitòtic, sense que la seva expressió alteri significativament la progressió del cicle cel·lular.
- En el sistema del doble híbrid en llevat, la KAP interacciona de manera específica amb una proteïna desconeguda, amb seqüències homòlogues a la base de dades *est's* que nosaltres hem anomenat P5. També hem detectat interacció específica amb una proteïna parcialment homòloga a la uromodulina.
- La KAP interacciona de manera específica amb la Ciclofilina B (CyPB). Els primers 92 aminoàcids de la KAP són suficients per a la interacció amb la CyPB, i els últims 46 aminoàcids de la CyPB són suficients per a la interacció amb la KAP. La GFP-KAP co-localitza amb la CyPB a nivell intracel·lular, però no a la membrana citoplasmàtica. La CsA no desplaça a la CyPB en la interacció GST-KAP + CyPB.
- El tractament amb CsA provoca una disminució dels nivells de proteïna (KAP) en la regió juxtamedul·lar renal, en mascles intactes, femelles i mascles castrats. La presència de CsA promou la secreció de la construcció KAP-FLAG en cèl·lules epitelials de túbul proximal renal murí.
- La sobre-expressió de la KAP disminueix la toxicitat per CsA en cèl·lules epitelials de túbul proximal renal murí. L'efecte és evident a dosis altes de l'immunosupressor.

- 
- ADLER, J.L. AND ROSTAING, L. (1998). Cyclosporin nephrotoxicity: pathophysiology and comparison with FK-506. *Curr Op Nephrol Hyper.* 7: 539-545.
  - ALLAIN F., DENYS, A. AND SPIK, G. (1994). Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line. *J Biol Chem.* 269: 16537-16542.
  - ALLAIN F., DENYS, A. AND SPIK, G. (1996). Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface. *Biochem J* 317: 565-570.
  - ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MEYERS, E.W. AND LIPMAN, D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
  - ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., AND LIPMAN, D.J. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
  - ANDERSSON, S. AND RUSSELL, D.W. (1990). Structural and biochemical properties of cloned and expressed human rat steroid 5 a reductase. *Proc Natl Acad Sci.* 76: 3640-3644.
  - ANGST, B.D., MARCOZZI, C. AND MAGEE, A.I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 114: 629-641.
  - APERIA, A., LARSON, L. AND WILTON P. (1980). The effect of normal development on compensatory renal growth. *Kidney Int* 18: 29.
  - APERIA, A, IBARRA, F., SVENSSON, L.B., KLEE, C. AND GREENGARD, P. (1992). Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase activity in renal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 7394-7397.
  - ARBER, S., KRAUSE, K.H. AND CARIONI, P. (1992). s-cyclophilin is retained intracellularly via the unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J Cell Biol.* 116: 113-125.
  
  - BARDIN, C.W., BROWN, T.R., MILLS, N.C., GUPTA, C. AND BULLOCK, L.P. (1978). The regulation of the  $\beta$ -glucuronidase gene by androgens and progestins. *Biol Reprod* 18: 74-83.
  - BAUER, A., LICKERT, H., KEMLER, R. AND STAPPERT, J. (1998). Modification of the E-cadherin-catenin complex in mitotic Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem.* 273: 28314-28321.

- BELITSKY, P., GHOSE, T., GIVNER, M., ROWDEN, G., POPE, B. (1986). Tissue distribution of cyclosporine A in the mouse: a clue to toxicity?. *Clin Nephrol.* 25: S27-29
- BERGER, F.G., GROSS, K.W. AND WATSON, G. (1981). Isolation and characterization of a DNA sequence complementary to an androgen-inducible messenger RNA from mouse kidney. *J Biochem* 256: 7006-7013.
- BLASCHUK, O.W., SULLIVAN, R., DAVID, S. AND POULIOT, Y. (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol.* 139: 227-229.
- BLISNICK, T., MORALES-BETOULLE, M.E., VUILLARD, L., RABILLOU, T. AND BRETON, C. (1998). Non-detergent sulphobetaines enhance the recovery of membrane and/or cytoskeleton-associated proteins and active proteases from erythrocytes infected by Plasmodium falciparum. *Eur J Biochem* 252: 537-541.
- BOISE, L., H., PETRYNIAK, B., MAO, X., JUNE, C.H., WANG, C.Y., LINDSTEN, T., BRAVO, R., KOVARY, K., LEIDEN, J.M. AND THOMPSON, C.B. (1993). The NFAT DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and JunB. *Mol Cell Biol.* 13: 1911-1919.
- BOREL, J.F., FEURER, C., GUBLER, H.V. AND STAHELIN, H. (1976). Biological effect of cyclosporin A: a new anti-lymphocytic agent. *Agents Actions.* 6: 468-475.
- BOUDOU, P., FIET, J., VEXIAU, P., VILLETTE, J.M. HARDY, N. AND DREUX, C. (1990). Greater conversion of testosterone to 5 alpha-dihydrotestosterone, reflecting increased peripheral 5 alpha-reductase activity in nude mice treated with high doses of cyclosporine A. *J Steroid Biochem.* 36: 597-601.
- BRAATEN, D., ANSARI, H. AND LUBAN, J. (1997). The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein. *J virol.* 71: 2107-2113.
- BRAM, R.J. AND CRABTREE, G.R. (1994). Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* 371: 355-358.
- BRANDTS, JF. (1975). Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues.. *Biochemistry* 14: 4953-4963.
- BREITFELD, P.P., MCKINNON, W.C. AND MOSTOV, K.E. (1990). Effect of nocodazole on vesicular traffic to the apical and basolateral surfaces of polarized MDCK cells. *J Cell Biol.* 111: 2365-2373.

- 
- BRENNER, B.M., BOHRER, M.P., BAYLIS, C. AND DEEN, W.M. (1977). Determinants of glomerular permselectivity: Insights derived from observations in vivo. *Kidney Int.* 12: 229-237.
  - BRENNER AND RECTOR'S. (1996) The Kidney, fifth edition. Editat per Barry M. Brenner. *W.B Saunders Company, Pennsylvania*. Volumes I i II.
  - BUBECK-WARDENBURG, J., WONG, J., FUTTERER, K., PAPPUR., FU, C., WAKSMAN, G., AND CHAN, A.C. (1999). Regulation on antigen receptor function by protein tyrosine kinases. *Prog Biphys Mol Biol.* 71: 373-392.
  - VON BULOW GU, BRAM RJ. (1997). NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science.* 278: 138-141.
  - VON BULOW GU, VAN DEURSEN JM, BRAM RJ. (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity.* 14: 573-582.
  - BUSS WC, STEPANEK J. (1993). Characterization of the inhibition of renal translation in the Sprague-Dawley rat following in vivo cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol.* 15(1):63-76
  
  - CARTIER, N., LACAVER, R., VALLET, V., HAGEGE, J., HELLIO, R., ROBINE, S., PRINGAULT, E., CLUZEAUD, F., BRIAND, P., KAHN, A. AND VANDEWALLE, A. (1993). Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci.* 104: 695-704.
  - CATTERALL, J.F., KONTULA, K.K., WATSON, C.S., SEPPANEN, P.J., FUNKENSTEIN, B., MELANITOU, E., HICKOK, N.J., BARDIN, C.W., JANNE, O.A. (1986). Regulation of gene expression by androgens in murine kidney. *Recent Prog Horm Res.* 42:71-109.
  - CATTERALL, J.F. AND MESEGUER, A. The effects of sex steroids on renal gene expression (1989). *Sem Urol.* 4: 252-257.
  - CEBRIAN C, ARESTE C, NICOLAS A, OLIVE P, CARCELLER A, PIULATS J, MESEGUER A. (2001). Kidney Androgen-regulated Protein interacts with CyPB and reduces CsA-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J Biol Chem.* epub ahead of print.
  - CHEN, L., OAKLEY, G.M., GLOVER, J.N.M., JAIN, J., DERVAN, P.B., HOGAN, P.G., RAO, A. AND VERDINE, G.L. (1995). Only one of the two DNA-bound orientations of AP1 found in solution cooperates with NATAp. *Curr Biol.* 5: 1-8.

- CHOMCZYNSKI, P. AND SACCHI, N. (1987). Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159
- CIECHANOVER, A. AND SCHWARTZ, A.L. (1989). *Trends Biochem. Sci.* 14: 483-488.
- CLEMENTS, J.L., AND KORETZKY, G.A. (1999). Recent developments in lymphocyte activation: Linking kinases to downstream signaling events. *J Clin Invest.* 103: 925-929.
- CLIPSTONE, N. A. AND CRABTREE, G.R. (1993). Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Ann NY Acad Sci* 696: 20-30.
- COLLEY, N.J., BAKER, E.K., STAMNES, M.A. AND ZUKER, C.S. (1991). The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway. *Cell.* 67: 255-263.
- CRABTREE, G.R. AND CLIPSTONE, N.A. (1994). Signal transduction between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 63: 1045-1083.
  
- DENYS, A., ALLAIN, F., CARPENTIER, M. AND GENEVIEVE, S. (1998a) Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes. *Biochem J.* 336: 689-697.
- DENYS, A., ALLAIN, F., MASY, E., DESSAINT, J.P. AND SPIK G. (1998b). Enhancing the effect of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of cyclosporine. *Transplantation.* 65: 1076-1084.
- DING, Y., DAVIDSSON, R.L., HARDY, D.O., ZHU, L.J., MERRILL, D.C., CATTERALL, J.F. AND SIGMUND, C.D. (1997). The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 272 (44): 28142-28148.
- DING, Y., AND SIGMUND, C.D. (2001). Androgen-dependent regulation of human angiotensinogen expression in KAP-hAGT transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280: F54-F60.
- DESCHEPPER, C.F., MELLON, S.H. CUMIN, F., BAXTER J.D., GANONG W.F. (1986). Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA



- in kidney, testis, adrenal and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7552-7556.
- DOLINSKI, K., MUIR, S., CARDENAS, M. AND HEITMAN, J. (1997). All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 13093-13098.
  - EBINU, J.O., STANG, S.L., TEIXEIRA, C., BOTTORFF, D.A., HOOTON, J., BLUMBERG, P.M., BARRY, M., BLEAKLEY, R.C., OSTERGAARD, H.L. AND STONE, J.C. (2000). RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood*. 95: 3199-3203.
  - EDER, A.M., DOMINGUEZ, L., FRANKE, T.F. AND ASHWELL, J.D. (1998). Phosphoinositide 3-kinase regulation of T cell receptor-mediated interleukin-2 gene expression in normal T cells. *J Biol Chem*. 273: 28025-28031.
  - EL-MEANAWY, M., SCHELLING, J.R., POZUELO, F., CHURPEK, M.M., FICKER, E.K., IYENGAR, S. AND SEDOR, J.R. (2000). Use of serial analysis of gene expression to generate kidney expression libraries. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279: F383-F392.
  - ENDRICH, M.M., GEHRIG, P. AND GEHRING, H. (1999). Maturation-induced conformational changes of HIV-1 capsid protein and identification of two high affinity sites for cyclophilins in the c-terminal domain. *J Biol Chem*. 274: 5326-5332.
  - EVAN, A.P. (1993). Postnatal development of the kidney. Holliday, M.A., Barrat, T.M. and Avner, E.D. (eds): *Pediatric Nephrology*, 3rd ed. Williams & Williams, Baltimore.
  - FERREIRA, A., KINCAID, R. AND KOSIK, K. S. (1993). Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity. *Mol Biol Cell*. 4: 1225-1238.
  - FIELDS, S. AND SONG, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-247.
  - FISCHER, G., BANG, H. AND MECH, H. (1984). Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans isomerization of peptide binding in proline containing peptides. *Biomed Biochim Acta* 43:1101-1111.

- FISCHER, G. SCHMID. (1990). The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*. 29: 2205.
- FLOWER D.R. (1996). The lipocalin protein family : structure and function. *Biochem J*. 318:1-14.
- FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I., FRIEDMAN, J. AND ALPERT, S. (1994). An analysis of the expression of cyclophilin C reveals tissue restriction and an intriguing pattern in the mouse kidney. *Am J Pathol*. 144: 1247-1256.
- GALAT A, RIOUX V. (1997) Convergence of amino acid compositions of certain groups of protein aids in their identification on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis*. 18(3-4):443-51
- GARCIA JE, LOPEZ AM, DE CABO MR, RODRIGUEZ FM, LOSADA JP, SARMIENTO RG, LOPEZ AJ, ARELLANO JL. (1999) Cyclosporin A decreases human macrophage interleukin-6 synthesis at post-transcriptional level. *Mediators Inflamm* 8(4-5):253-9.
- GILLILAND, L.K., SCHIEVEN, G.L., NORRIS, N.A., KANNER, S.B., ARUFFO, A. AND LEDBETTER, J.A. (1992). Lymphocyte lineage-restricted tyrosine-phosphorylated proteins tha bind PLC-g1 SH2 domains. *J Biol Chem*. 267: 13610-13616.
- GOLDBERG, M.E., EXPERT-BEZANCON, N., VUILLARD, L. AND RABILLOUD, T. (1996). Non-detergent sufphobetaines: a new class of molecules that facilitate in vitro protein renaturation. *Fold Des*. 1 (1):21-27.
- GORDJANI, N., EPTING, T., FISCHER-RIEPE, P., GREGER, R.F., BRANDIS, M., LEIPZIGER, J. AND NITSCHKE, R. (2000). Cyclosporin-A-induced effects on the free Ca<sup>2+</sup> concentration in LLC-PK1-cells and their mechanisms. *Eur J Physiol*. 439: 627-633.
- GÖTHEL, S. F., M. HERRLER & M. MARAHIEL. (1996) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of *Bacillus subtilis*: identification of residues involved in cyclosporin A affinity and catalytic efficiency. *Biochemistry* 35, 3636-3640.
- GÖTHEL, S.F. AND MARAHIEL M.A. (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55: 423-436.
- GOTO, S. AND USHIO, Y. (1985). Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, t factor, and tubulin by calcineurin. *J Neurochem*. 45: 276-283.

- 
- GURUPRASAD, K. REDDY, B.V.B. AND PANDIT, M.W. (1990). *Protein Engineering*. 4: 155-161.
  - HANDSCHUMACHER, R.E., HARDING, M.W., RICER, J. AND DRUGGE, R.J. (1984). Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547.
  - HARDING, M.W., HANDSCHUMACHER, R.E. AND SPEICHER, D.W. (1986). Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J Biol Chem* 261: 8547-8555.
  - HAYANO, T., N.TAKAHASHI, S. KATO, N. MAKI & M. SUZUKI. (1991). Two distinct forms of peptidylprolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry* 30, 3041-3048.
  - HEALY, E., DEMPSEY, M., LALLY, C. AND RYAN, M. (1998). Apoptosis and necrosis: Mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Int.* 54: 1955-1966.
  - HELEKAR, S.A. AND PATRICK, J. (1997) Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:5432-5437.
  - HENRICSSON, L., LINDHOLM, A. AND ARAVOGLOU, M. (1990). Cyclosporin metabolism in human liver microsomes and its inhibition by other drugs. *Pharmacol Toxicol.* 66: 49-52.
  - HERZLINGER, D., KOSEKI, C. I AL-AWQATI, Q. (1992). Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development.* 114; 565-572.
  - HIRANO, S., YAN, Q. AND SUZUKI, S.T. (1999). Expression of a novel protocadherin, OL-protocadherin, in a subset of functional systems of the developing mouse brain. *J Neurosci.* 19 (3):995-1005.
  - HOBOTHM U, SANDER C. (1995). A sequence property approach to searching protein databases. *J Mol Biol.* 251(3):390-9.
  - HOEY, T., SUN, Y.L., WILLIAMSON, K. AND XU, X. (1995). Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 2: 461-472.

- HOLLOWAY, M.P. AND BRAM R. (1996). A hydrophobic domain of Ca<sup>2+</sup> modulating cyclophilin ligand modulates calcium influx signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 271: 8549-8552.
- HOLLOWAY, M.P. AND BRAM R. (1998). Co-localization of Calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. *J Biol Chem.* 273: 16346-16350.
- HOYER, J.R. AND SEILER, M.W. (1979). Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int.* 16: 279-289.
  
- JAIN, J., MCCAFFREY, P.G., KERPPOLA, T.K., LAMBERT, J.L., VERDINE, G.L., CURRAN, T. AND RAO, A. (1992a). The T cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature (London).* 365: 352-355.
- JAIN, J., MCCAFFREY, P.G., VALGE-ARCHER, V.E. AND RAO, A. (1992). Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature (London).* 365: 801-804.
- JAIN, J., LOH, C. AND RAO, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 333-342.
- JEAN-FAUCHER, CH., BERGER, M., GALLON, CH., DE TURCKHEIM, M., VEYSSIÈRE, G. AND JEAN, CL. (1987). Sex-related differences in renal size in mice: ontogeny and influence of neonatal androgens. *J.Endocr* 115: 241-246.
  
- KAHAN, B.D. (1993). Cyclosporin: The base for immunosuppressive therapy-present and future. *Transplant Proc* 25: 508-510.
- KAINER, D.B. AND DORIS, P.A. (2000). Cyclophilin B expression in renal proximal tubules of hypertensive rats. *Hypertension.* 35:958-964.
- KASIK, J.W. AND RICE, E.J. (1993). Kidney androgen-regulated protein gene is expressed in the uterus during late pregnancy. *Mol Cell Biol.* 90:239-242.
- KAUFMAN, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13: 1211-1233.
- KAYYALI, U.S., ZHANG, W., YEE, A.G., SEIDMAN, J.G. AND POTTER, H. (1997). Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin. *Am J Neurochemistry.* 68: 1668-1678.

- 
- KE, H., ZYDOWSKY, L.D., LIU, J. AND WALSH, C.T. (1991). Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9483-9487.
  - KERJASCHKI, D., SHARKEY, D.J. AND FARQUHAR, M.G. (1984). Identification and characterization of podocalyxin-the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J. Cell Biol.* 98: 1591.
  - KIEFFER, L.J., SENG, T.W., LI, W., OSTERMAN, D.G., HANDSCHUMACHER, R.E. AND BAYNEY, R.M. (1993). Cyclophilin-40, a protein with homology to the p59 component of the steroid receptor complex. *J Biol Chem.* 268: 12303-12310.
  - KOENIG, H., GOLDSTONE, A., BLUME, G. AND LU, C.Y. (1980). Testosterone-mediated sexual dimorphism of mitochondria and lysosomes in mouse kidney proximal tubules. *Science.* 209:1023-1026.
  - KOSEKI, C., HERZLINGER, D. AND AL-AWQATI, Q. (1991). Integration of embryonic nephrogenic cells carrying a reporter gene into functioning nephrons. *Am J Physiol* 261: C550-C554.
  - KRIZ, W., ELGER, M., LEMLEY, K. AND SAKAI, T. (1990). Structure of the glomerular mesangium: A biochemical interpretation. *Kidney Int* 38 (suppl: 30): S2.
  - KUNG, L. HALLORAN, P.F. (2000). Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations. *Transplantation* 70: 327-335.
  - KURTZ, A. AND WAGNER, C. (1999). Cellular control of renin secretion. *J exp biol* 202:219-225.
  
  - LACAVE, R., BENS, M., CARTIER, N., VALLET, V., ROBINE, S., PRINGAULT, E., KAHN, A. AND VANDEWALLE, A. (1993). Functional properties of proximal tubule cell lines derived from transgenic mice harboring L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci.* 104: 705-712.
  - LALLY, C., HEALY, E. AND RYAN, M. (1999). Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int.* 56: 1254-1257.
  - LEA, J.P., SANDS, J.M., MCMAHON, S.J. AND TUMLIN J.A. (1994). Evidence that the inhibition of Na/K-ATPase activity by FK-506 involves calcineurin. *Kidney Int* 46: 647-652.

- LEE, D.B.N. (1997). Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int.* 52: 248-260.
- LIU, J., FARMER, J.D., LANE, W.S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I. AND SCHREIBER, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 66: 807-815.
- LIAO, D.F., JING, S.G., BAAS, A.S., DAUM, G., GYGI, S.P., AEBERSOLD, R. AND BERK, B.C. (2000). Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 275(1):189-96.
- LUBAN, J., BOSSOLT, K.L., FRANKE, E.K., KALPANA, G.V. AND GOFF, S.P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell.* 73: 1067-1078.
- LUBAN, J. (1996). Absconding with the chaperone: Essential cyclophilin-gag interaction in HIV-1 virions. *Cell.* 87: 1157-1159.
- MARILLER, C., ALLAIN, F., KOUACH, M. AND SPIK, G. (1996). Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochim Biophys Acta.* 1293: 31-38.
- DE MATTOS AM, OLYAEI AJ, BENNETT WM. (2000). Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis.* 35(2):333-46
- MELANITOU, E., COHN, D.A., BARDIN, C.W., JANNE, O.A. (1987). Genetic variation in androgen regulation of ornithine decarboxylase gene expression in inbred strains of mice. *Mol Endocrinol.* Mar;1(3):266-73.
- MELANITOU, E., SIMON-CHAZOTTES, D., GUENET, J.L. AND ROUGEON, F. (1991). The gene coding for the kidney androgen-regulated protein (KAP), maps between the Gapd and Kras-2 genes on mouse chromosome 6. *Mamm Genome* 1(3): 191-192.
- MELANITOU, E., TRONIK, D. AND ROUGEON, F. (1992). Two isoforms of the kidney androgen-regulated protein are encoded by two alleles of a single gene in OF1 mice. *Genet Res.* 59 (2): 117-124.
- MELIÀ, M.J., BOFILL, N., HUBANK, M. AND MESEGUER, A. (1998). Identification of androgen-regulated genes in mouse kidney by representational difference analysis and random arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Endocrinol* 139 (2): 688-695.

- MESEGUER, A. AND CATTERALL J.F. (1987). Mouse kidney androgen-regulated protein messenger ribonucleic acid is expressed in the proximal convoluted tubules. *Mol Endocrinol.* 1: 535-541.
- MESEGUER, A., WATSON, C.S. AND CATTERALL, J.F. (1989). Nucleotide sequence of kidney androgen-regulated protein mRNA and its cell-specific expression in Tfm/Y mice. *Mol Endocrinol.* 3: 962-967.
- MESEGUER, A. AND CATTERALL, J.F. (1990). Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control. *Mol Endocrinol.* 4: 1240-1248.
- MESEGUER, A. AND CATTERALL, J.F. (1992). Effects of pituitary hormones on the cell-specific expression of the KAP gene. *Mol Cell Endocrinol* 89: 153-162.
- MICHAEL, A.F., KEANE, W.F., RAIJ, L., F (1980). The glomerular mesangium. *Kidney Int* 17: 141.
- MIDDLETON, J.P., KHAN, W.A., COLLINSWORTH, B., HANNUN, Y.A. AND MEDFORD, R.M. (1993). Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/k-ATPase in kidney epithelial cells. *J Biol Chem.* 268: 15958-15964.
- MIHATSCH, M.J., RYFFEL, B., HERMLE, M., BRUNNER, F.P. AND THIEL, G. (1986). Morphology of cyclosporin nephrotoxicity in the rat. *Clin Nephrol.* 25(Suppl 1): S2-S8.
- MIKOL, V., KALLEN, J., PFLUGL, G. AND WALKINSHAW, M.D. (1993). X-ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol.* 234:1119-1130.
- MILAD, M., SULLIVAN, W., DIEHL, E., ALTMANN, M., NORDEEN, S., EDWARDS, D.P. AND TOFT, D.O. (1995) Interaction of the progesterone receptor with binding proteins for FK506 and cyclosporin A. *Molecular endocrinology.* 9: 838-847.
- MOLKENTIN, J.D., LU, J.R., ANTOS, C.L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S.R. AND OLSON, E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 93: 215-228.
- MONTAGUE, J.W., GAIDO, M., FRYE, C. AND CIDLOWSKI, J.A. (1994). A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *J Biol Chem* 269, 18877-18880.

- MONTAGUE, J.W., HUGHES, F. M. AND CIDLOWSKI, J.A. (1997). Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans isomerase activity. *J Biol Chem* 272: 6677-6684.
- MORRIS, S.M., KEPKA-LENHART, D., MCGILL, R.L., CURTHOYS, N.P. AND ADLER, S. (1992). Specific Disruption of renal function and gene transcription by cyclosporin A. *J Biol Chem.* 267: 13768-13771.
- MYERS, B.D., ROSS, J., NEWTON, L., LEUTSCHER, J. AND PERLOTH, M. (1984). Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med.* 331: 699-705.
- NAGAFUCHI, A., TSUKITA, S. AND TAKEICHI, M. (1993). Transmembrane control of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Semin Cell Biol.* 4: 175-181.
- NAIR AP, HIRSCH HH, COLOMBI M, MORONI C. (1999) Cyclosporin A promotes translational silencing of autocrine interleukin-3 via ribosome-associated deadenylation. *Mol Cell Biol.* 19(1):889-98
- NATHKE, I.S., HINCK, L.E. AND NELSON, W.J. (1993). Epithelial cell adhesion and development of cell surface polarity: possible mechanisms for modulation of cadherin function, organization and distribution. *J Cell Sci.* 17: 139-145.
- NING, Y.M. AND SANCHEZ, E.R. (1993). Potentiation of glucocorticoid receptor-mediated gene expression by the immunophilin ligands FK506 and rapamycin. *J Biol Chem* 268: 6073-6076.
- NIU, E., MESEGUER, A. AND CATTERALL, J.F. (1991). Genomi organization and DNA sequence of the mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene. *DNA Cell Biol* 10 (1): 41-48.
- NIU, E.M., CROZAT, A. AND CATTERALL, J.F. (1996). Cell-specific and hormonal regulation of the rat kidney androgen-regulated protein (KAP) gene. *Endocrine* 4 (1): 1-10.
- NOLLET, F., KOOLS, P. AND VAN ROY, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* 299: 551-572.
- OHNO, S. (1970). Evolution by gene duplication. New York Springer Verlag.



- 
- OKAMOTO, C.T., MCKINNEY, J. AND JENG, Y.Y. (2000). Clathrin in mitotic spindles. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: C369-C374.
  - OLBRICHT CJ, GRONE HJ, BOSSALLER C, GUTJAHR E, HERTEL RF. (1990) Alterations in proteolytic enzymes of the proximal tubule in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation.* 378-381.
  - OLBRICHT CJ, STEINKER M, AUCH-SCHWELK W, BOSSALLER C, HAAS J, KOCH KM. (1994). Effect of cyclosporin on kidney proteolytic enzymes in men and rats. *Nephrol Dial Transplant.* 9(1):22-6
  - ORSKOV, I. FERENCZ, A. AND ORSKOV, F. Tamm-Horsfall protein or uromucoid is the normal urinary slime that traps type 1 fimbriated Escherichia coli. (1980). *Lancet* 1: 887.
  - OTSUKA, M., TERADA, Y., YANG, T., NONOGUCHI, H., TOMITA, K. AND MARUMO, F. (1994). Localization of cyclophilin A and cyclophilin C mRNA in murine kidney using RT-PCR. *Kidney Int.* 45: 1340-1345.
  - PAGES, F., RAGUENEAU, M., ROTTAPPEL, R., TRUNEH, A., NUNES, J., IMBERT, J. AND OLIVE, D. (1994). Binding of phosphatidylinositol 3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature.* 369:327-329.
  - PAJUNEN, A.E.I, ISOMAA, V.V., JÄNE, O.A. AND BARDIN, C.W. (1982). Androgenic regulation of ornithine decarboxylase activity in mouse kidney and its relationship to changes in cytosol and nuclear androgen receptor concentrations. *J Biol Chem* 257: 8190-8198.
  - PARCZYK, L., HAASE, W. AND KONDOR-KOCH, C. (1989). Microtubules are involved in the secretion of proteins at the apical cell surface of the polarized epithelial cell, Madin-Darby canine kidney. *J Biol Chem.* 264: 16837-16846.
  - PELHAM, H.R.B. AND JACKSON, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem.* 67: 247.
  - PERROT-APPLANAT M, CIBERT C, GERAUD G, RENOIR JM, BAULIEU EE. (1995). The 59 kDa FK506-binding protein, a 90 kDa heat shock protein binding immunophilin (FKBP59-HBI), is associated with the nucleus, the cytoskeleton and mitotic apparatus. *J Cell Sci.* 108: 2037-2051.
  - PRICE, E.R., ZYDOWSKI, L.D., JIN, M.J., BAKER, C.H., MCKEON, F.D., AND WALSH, C.T. (1991). Human cyclophilin B. A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 1903-1907.

- PRICE, E.R., JIN, M., LIM, D., PATI, S., WALSH, C.T. AND MCKEON, F.D. (1994). Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 3931-3935.
- RAHFELD, J.U., K.P. RUCKNAGEL, B. SCHELBERT, B. LUDWIG, J. HACKER, K. MANN & G. FISCHER. (1994). Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett*. 352,180-184.
- RAMACHANDRAN, G.N., AND SASISEKHARAN, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Prot Chem*. 23: 283.
- RENKE, H.G., AND VENKATACHALAM, M.A. (1977). Glomerular permeability: In vivo tracer studies with polyanionic and polycationic ferritins. *Kidney Int*. 11: 44.
- RENKE, H.G., PATEL, Y. AND VENKATACHALAM, M.A. (1978). Glomerular filtration of proteins: Clearance of anionic, neutral and cationic horseradish peroxidase in the rat. *Kidney Int*. 13: 324.
- RENOIR, J.M., MERCIER-BODARD, C., HOFFMANN, K., LE BIHAN, S., NING, Y.M., SANCHEZ, E.R., HANDSCHUMACHER, R.E. AND BAULIEU, E.E. (1995). Cyclosporin A potentiates the dexamethasone-induced mouse mammary tumor virus-chloramphenicol acetyltransferase activity in LMCAT cells: a possible role for different heat shock protein-binding immunophilins in glucocorticosteroid receptor-mediated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 4977-4981.
- RHEE, S.G. AND BAE, Y.S. (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 272: 15045-15048.
- RUSIC, R., ZHU, L.J., CROZAT, A., BAGCHI, M.K., CATTERALL, J.F. AND BAGCHI, I.C. (1996). Estrogen regulates the stage-specific expression of kidney androgen regulated protein in rat uterus during reproductive cycle and pregnancy. *Endocrinol* 137: 729-737.
- RUSNAK, F. AND MERTZ, P. (2000). Calcineurin: Form and function. *Physiol Review*. 80: 1483-1521.
- RYCYZYN, M.A., REILLY, S.C., O'MALLEY, K. AND CLEVINGER, C.V. (2000). Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Endocrinology*. 14 (8): 1175-1186.

- 
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H. ET AL (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491.
  - SANGER, F., NICKLEN, S. AND COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 74: 5463-5467.
  - SANO, K., TANIHARA, H., HEIMARK, R.L., OBATA, S., DAVIDSON, M., ST. JOHN, T., TAKETANI, S. AND SUZUKI, S. (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J*. 12: 2249-2256.
  - SAXÉN, L. (1987). Organogenesis of the kidney. Cambridge University Press. Cambridge. UK.
  - SCHMID, F.X. AND BALDWIN (1978) Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization *Proc Nat Acad Sci USA* 75: 4764.
  - SCHMID, F.X. (1993) Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 22: 123.
  - SCHLONDORFF, D. (1987). The glomerular mesangial cell: An expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* 1: 272.
  - SCHNEIDER, H., CHARARA, N., XCHMITZ, R., WEHRILI, S., MIKOL, V., ZURINI, M.G.M., QUESTIAUX, V.F.J. AND MOVVA, N.R. (1994). Human cyclophilin C: primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins. *Biochemistry*. 33: 8218-8224.
  - SCHREIBER, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251:283-287.
  - SHIBASAKI, F., PRICE, E.R., MILAN, D. AND MCKEON, F. (1996). Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature*. 382: 370-373.
  - SHIHAB, F.S., ANDOH, T.F., TANNER, A.M., YI, H. AND BENNETT, W.M. (1999). Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int*. 56: 2147-2159.
  - SIDOW, A. (1996). Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*. 6: 715-722.
  - SIGAL, N.H., DUMONT, F., DURETTE, P., SIEKIERKA, J.J., PETERSON, L., RICH, D.H., DUNLAP, B.E., STARUCH, M.J., MELINO, M.R., DOPRAK, S.L., WILLIAMS, D., WITZEL, B. AND PISANO, J.M. (1991). Is cyclophilin involved in the

- immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A?. *J Exp Med* 173: 619-628.
- SMITH, T., FERREIRA, L.R., HEBERT, C., NORRIS, K. AND SAUK, J.J.(1995). Hsp47 and Cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate Vesicles. *J Biol Chem.* 270: 18323-18328.
  - SOLÉ, E. CALVO, R., OBREGÓN, M.J. AND MESEGUER, A. (1994). Thyroid hormone controls the cell-specific expression of the kidney androgen-regulated protein gene in S3 mouse kidney cells. *Endocrinology* 135: 2120-2129.
  - SOLÉ, E. CALVO, R., OBREGÓN, M.J. AND MESEGUER, A. (1996). Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney. *Mol Cell Endocrinol.* 119: 147-159.
  - SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517.
  - SPIK, G., HAENDLER, B., DELMAS, O., ET AL. (1991). A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J Biol Chem.* 266: 10735-10740.
  - STAMNES, M.A., SHIEH, B.H., CHUMAN, L., HARRIS, G.L. AND ZUKER, C.S. (1991). The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of Drosophila rhodopsins. *Cell.* 65: 219-227.
  - STEWART, A.A., INGBRITSEN, T.S., MANALAN, A., KLEE, C.B. AND COHEN, P. (1982). Discovery of a Ca<sup>2+</sup>-and calomodulin- dependent protein phosphatase: Probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Lett* 137: 80-84.
  - SUZUKI, S.T. (1996). Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway?. *J Cell Biochem.* 61: 531-542.
  - SWANSON, S.K.H., BORN, T., ZIDOWSKI, L.D., CHO, H., CHANG, H.Y., WALSH, C.T. AND RUSNAK, F. (1992). Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc Natl Acad. Sci USA.* 89:3741-3745.
  - TAI, P.K.K., ALBERS, M.W., MCDONNELL, D.P., CHANG, H., SCHREIBER, S.L. AND FABER, L.E. (1994). Potentiation of progesterone receptor-mediated transcription by the immunosuppressant FK5506. *Biochemistry.* 33: 10666-10671.

- 
- TAKEICHI, M.; HATTA, K., NOSE, A. AND NAGAFUCHI, A. (1988). Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules. *Cell Differ Dev.* 25: 91-94.
  - TAKENAKA, M, IMAI, E., KANEKO, T., ITO, T., MORIYAMA, T., YAMAUCHI, A., HORI, M., KAWAMOTO, S. AND OKUBO, K. (1998). Isolation of genes identified in mouse renal proximal tubule by comparing different gene expression profiles. *Kidney Int.* 53: 562-572.
  - TAMM, I. AND HORSFALL, F.L. (1950). Characterisation and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 74: 108-114.
  - TANDAI-HIRUMA, M., ENDO, T. AND KOBATA, A. (1999). Detection of novel carbohydrate binding activity of interleukin-1. *J Biol Chem.* 274: 4459-4466.
  - TERASAKI, M., CHEN, L.B. AND FUJIWARA, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 103: 1557-1568.
  - TERASAKI, M. AND REESE, T.S. (1994). Interactions among endoplasmic reticulum, microtubules and retrograde movement of the cell surface. *Cell Motil Cytoskel* 29: 291-300.
  - THOMAS, P. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77: 5201-5205.
  - TOOLE, J.J., HASTIE, N.D. AND HELD, W.A. (1979). An abundant androgen-regulated mRNA in the mouse kidney. *Cell* 17: 441-448.
  - TUMLIN, J.A. AND SANDS, J.M. (1993). Nephron segment-specific inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase activity by cyclosporin A. *Kidney Int* 43: 246-251.
  - TUMLIN, J.A., SOMEREN, J.T., SWANSON, C.E. AND LEA, J.P. (1995). Expression of calcineurin activity and alpha subunit isoforms in specific segments of the rat nephron. *Am J Physiol.* 269: F558-F563.
  - TUMLIN, J.A. (1997). Expression and function of calcineurin in mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am J Kidney Dis.* 30:884-895.
  
  - VIRLON, B., CHEVAL, L., BUHLER, J.M., BILLON, E., DOUCET, A. AND ELALOUF, J.M. (1999). Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96 (26): 15286-15291.

- VIZE, P.D., SEUFERT, D.W., CARROLL, T.J. AND WALLINGFORD, J.B. (1997). Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev. Biol.* 188: 189-204.
- VON HEIJNE, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* 14: 4683.
- VUILLARD, L., RABILLOUD, T., GOLDBERG, M.E. (1998). Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate in vitro protein renaturation. *Eur J Biochem.* 256 (1): 128-135.
- WAGNER, O., SCHREIER, E. , HEITZ, F. AND MAURER, G. (1987). Tissue distribution, disposition, and metabolism of cyclosporine in rats. *Drug Metab Dispos.* 15: 377-383.
- WALTER, P. AND BLOBEL, G. (1983). Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Meth Enzymol.* 96: 84.
- WANG, L., RAIKWAR, N., DENG, L., YANG, M., LIANG, L., SHAO, C., EVAN, A.P., STAMBROOK, P.J., SAHOTA, A. AND TISHFIELD, J.A. (2000). Altered gene expression in kidneys of mice with 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Kidney Int.* 58: 528-536.
- WATSON, C.S. SALOMON, D. AND CATTERALL, J.F. (1984). Structure and expression of androgen-regulated genes in mouse kidney. *Ann New York Acad Sci.* 438: 101-114.
- WATSON, G. AND PAIGEN, K. (1988). mRNA synthesis rates in vivo for androgen-inducible sequences in mouse kidney. *Mol Cell Biol.* 8 (5): 2117-24.
- WEBER, J.R., BELL, G.M., HAN, M.Y., PAWSON, T. AND IMBODEN, J.B. (1992). Association of the tyrosine kinase LCK with phospholipase C-g1 after stimulation of the T cell antigen receptor. *J Exp Med.* 176: 373-379.
- WILLENBRINK, W., HALASCHEK, J., SCHUFFENHAUER, S., KUNZ, J. AND STEINKASSERER, A. (1995). Cyclophilin A, the major intracellular receptor for the immunosuppressant cyclosporin A, maps to chromosome 7p11.2-p13: four pseudogenes map to chromosomes 3, 10, 14 and 18. *Genomics.* 28(1): 101-4.
- WOLF, G., THAISS, F. AND STAHL, R.A. (1995). Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells: Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects. *Transplantation.* 60: 237-241.

- YABUKI, A., SUZUKI, S., MATSUMOTO, M. AND NISHINAKAGAWA, H. (1999). Morphometrical analysis of sex and strain differences in the mouse nephron. *J Vet Med Sci* 61 (8): 891-6.
- ZHANG, H., WADA, J., KANWAR, Y.S., TSUCHIYAMA, Y., HIRAGUSHI, K., HIDA, K., SHIKATA, K. AND MAKINO, H. (1999). Screening for genes up-regulated in 5/6 nephrectomized mouse kidney. *Kidney Int* 56: 549-558.