

II.a. Expressió endògena de KAP, C/EBP α i C/EBP β en ratolins mascles C57BL/6 control, hipotiroïdals i castrats, a nivell transcripcional i de proteïna (C/EBP α i C/EBP β)

Es van analitzar els nivells de mRNA per RT-PCR semiquantitativa (Apartat VIII de Materials i Mètodes) i de proteïna per Western blot (Apartat XI de Materials i Mètodes) de C/EBP α i C/EBP β , en extractes de ronyó de ratolins mascles C57BL/6 control, hipotiroïdals i castrats. Aquest experiment ens permetria determinar si els factors de transcripció de la família de les C/EBPs, implicats en la regulació androgènica i tiroïdal de determinats gens durant el desenvolupament (explicació en l'apartat següent), també podien estar involucrats en la regulació gènica de KAP, en el ronyó murí en desenvolupament postnatal. Com es pot observar en la figura 4, apartats A) i B), els nivells de mRNA de C/EBP α i C/EBP β no coincideixen amb els nivells respectius de proteïna, p42C/EBP α i p35C/EBP β , que són detectades en els extractes nuclears de ronyons de ratolins control i castrats, però no apareixen en els de ronyons de ratolins hipotiroïdals. Segons la figura 4.B) també podríem dir que el doblet C/EBP α és més abundant en el control que en el castrat. Finalment, es van determinar els nivells de mRNA de KAP per RT-PCR semiquantitativa, en els mateixos extractes en els que s'havien analitzat els nivells de mRNA i proteïna de C/EBPs. En la figura 4.C) es representa un dels múltiples experiments en els que es va obtenir el següent resultat; els nivells de mRNA de KAP en castrats respecte els controls disminueixen, aproximadament, 8 vegades i els dels hipotiroïdals disminueixen, aproximadament, 30 vegades.

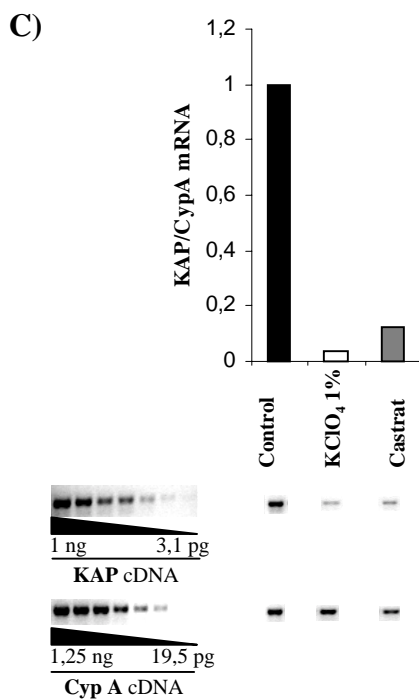
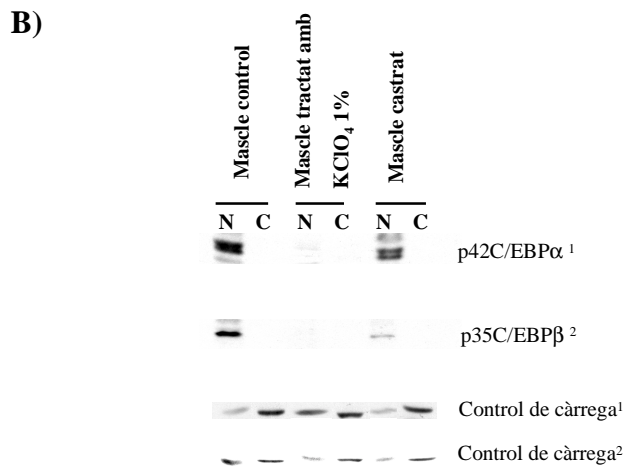
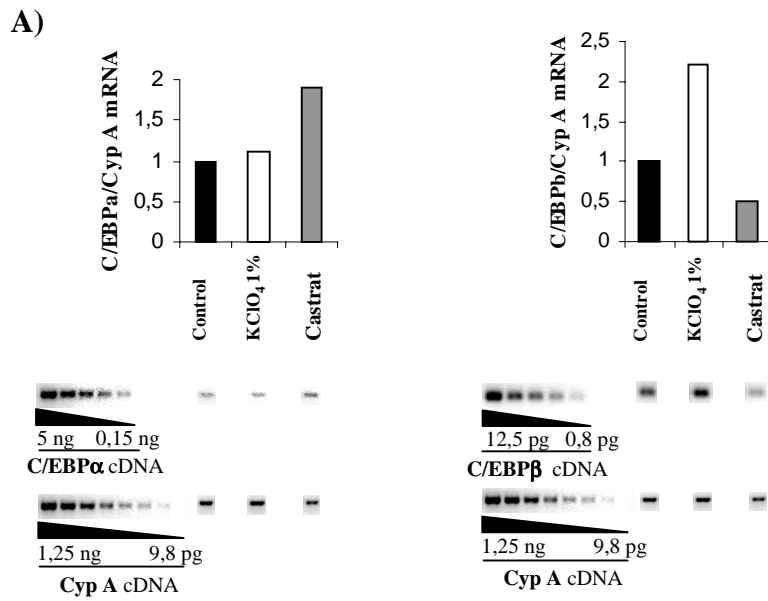


Fig.4. Efecte de l'hipotiroïdisme postnatal i de la castració en l'expressió a nivell de mRNA i proteïna de C/EBP α i C/EBP β i en l'expressió del mRNA de KAP en el ronyó de ratolins mascle C57BL/6. A) Els transcripts endògens de C/EBP α i C/EBP β , detectats per RT-PCR semiquantitativa, van ser analitzats en extractes de ronyó de ratolins mascles C57BL/6 control, hipotiroïdals i castrats. Les raons C/EBP α /Cyp A i C/EBP β /Cyp A representen l'increment de transcript respecte el nivell basal. B) Western blot de C/EBP α i C/EBP β en extractes de ronyó de ratolins mascles C57BL/6 control, hipotiroïdals i castrats. Es van carregar quantitats semblants de proteïna a cada pou, que poden ser normalitzades amb els controls de càrrega representats amb els números ¹ i ², indicadors de les membranes respectives de C/EBP α i C/EBP β ; es van separar electroforèticament, transferir a una membrana de nitrocel.lulosa; i immunodetectar amb un anticòs específic de C/EBP α (membrana p42C/EBP α) o específic de C/EBP β (membrana p35C/EBP β). N=Nucli; C=Citoplasme. C) Nivells endògens de mRNA de KAP mesurats per RT-PCR semiquantitativa en els mateixos extractes renals utilitzats en A). La relació KAP/Cyp A està expressada com l'increment respecte el nivell basal.

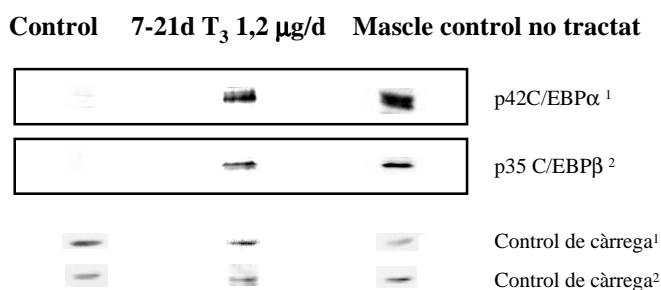
II.b. Efecte de la T₃ sobre p42C/EBP α i p35C/EBP β i la capacitat de transactivació del gen del KAP

Per confirmar que la T₃ és necessària perquè es puguin detectar proteïnes C/EBP en el ronyó, es va ampliar l'experiment de l'apartat anterior (apartat I.c.), amb l'anàlisi dels nivells de proteïna de C/EBP α i C/EBP β d'extractes nuclears renals de ratolins mascles C57BL/6 amb hipotiroïdisme postnatal, induït farmacològicament amb KClO₄ 1%, i als que se'ls havia administrat 1,2 μ g/dia T₃ entre el 7è i 21è dia postnatal. La figura 5.A) mostra l'existència de C/EBP α i C/EBP β en aquests animals i en els control però no en els hipotiroïdals. També, es pot observar com el doblet C/EBP α és més abundant en l'extracte

de ratolí control que en l'esmentat. Dels resultats presentats en l'apartat I.a. de Resultats, podem extreure les imatges d'hibridació *in situ* que es presenten en l'apartat B) de la figura 5, que corresponen a seccions de teixit d'un dels ronyons dels animals utilitzats per fer els extractes. Comparant A) i B) es pot apreciar que l'absència o presència de C/EBP α i C/EBP β està correlacionada amb l'absència o presència del mRNA de KAP.

A)

Mascles tractats amb KClO₄ 1%



B)

Mascles tractats amb KClO₄ 1%

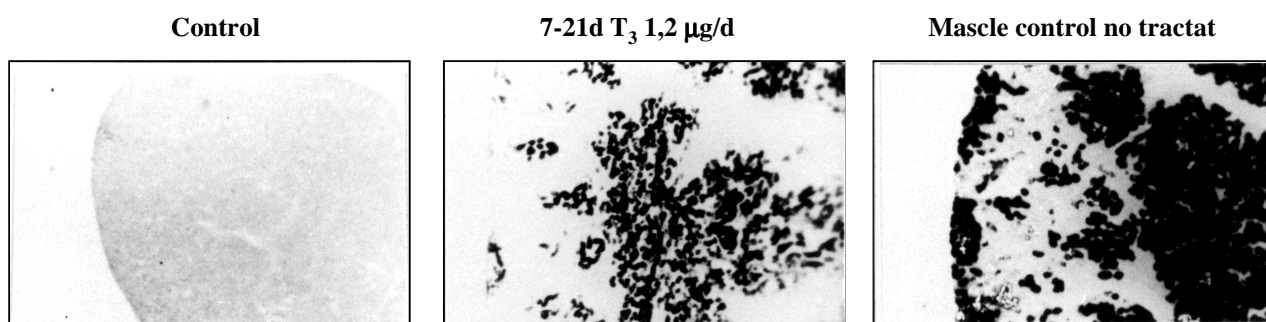


Fig.5. Efecte del tractament amb T₃ sobre els nivells de proteïna de C/EBP α i C/EBP β i l'expressió del gen del KAP en ratolins mascles C57BL/6 amb hipotiroidisme postnatal. A) Extractes nuclears de ronyons de ratolins mascles hipotiroidals, hipotiroidals amb un suplement de 1,2 μ g/dia T₃ entre el 7è i 21è dia postnatal i control, carregats en un gel d'acrilamida al 12,5% i SDS, es van separar electroforèticament, transferir a una membrana de nitrocel.lulosa, i immunodetectar amb un anticòs específic de C/EBP α (membrana p42C/EBP α)

o específic de C/EBP β (membrana p35C/EBP β). Els controls de càrrega estan representats al final de la Fig. B) Anàlisi d'hibridació *in situ* de seccions de ronyó de ratolins mascles tractats amb KClO₄ 1%, des del naixement fins al final de l'experiment, o amb injecció subcutània diària de 1,2 μ g/dia T₃ entre els dies 7è i 21è postnatal i ratolins eutiroidals mascles control.

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

El ronyó és un dels teixits diana de l'acció dels andrògens, principalment les cèl.lules epitelials del túbul proximal (145). No obstant, encara que existeix una gran quantitat d'informació sobre la inducció de l'expressió de mRNA per andrògens en el ronyó murí, no es coneixen els mecanismes moleculars a través dels que actuen. Dita desconeixença és deguda a la mancança d'un model cel.lular adequat per realitzar estudis de transfecció transitòria. Com a exemple; l'expressió endògena dels gens de l'ornitina descarboxilasa (ODC) i RP-2 no es veu afectada per testosterona en diferents línies cel.lulars altament diferenciades d'origen renal (DB.2 i MCT). Només en cultiu primari de cèl.lules de túbul proximal renal murí s'ha pogut observar la inducció per DHT d'una sèrie de gens, que inclouen el de la ODC, RP-2, β -glucuronidasa (β -gluc), isoenzim V del citocrom P450 i l'alcohol deshidrogenasa (ADH) (169). No obstant, el cultiu primari no proporciona un sistema apropiat per a la caracterització dels elements que controlen la transcripció induïble per andrògens en cèl.lules de túbul proximal renal, en assaigs de transfecció transitòria.

Cartier *et al* (87), van establir dues línies cel.lulars renals derivades tant de la part més proximal (cèl.lules PKSV-PCT (PCT)) com de la més distal (cèl.lules PKSV-PR (PR)) de túbul proximal de ratolins mascles transgènics L-PK/Tag d'un mes de vida. Es va comprovar que l'expressió de gens controlats per andrògens en el ronyó murí (KAP i β -Glucuronidasa), també era estimulada per andrògens en aquestes línies cel.lulars (89) i, per aquest motiu, es va analitzar si també permetien la transactivació transitòria de gens *reporter*.

III.a. Clonació de PKSV-PCT i PKSV-PR

Malgrat haver observat l'expressió del gen del KAP en les línies PCT i PR, aquestes es van subclonar degut a l'heterogeneïtat fenotípica que presentaven i es va determinar per RT-PCR (apartat VIII de Material i Mètodes) l'expressió de KAP en cada un dels clons obtinguts. Dels clons que es van originar a partir de les línies PCT i PR, es va escollir el clon PCT número 3 perquè era el que mostrava una expressió més elevada de KAP, i, el clon PR número 10 perquè era el que presentava el fenotip més representatiu de la línia, ja que no era detectable l'expressió de KAP en cap dels clons obtinguts (Fig.6). En aquell moment, ens va interessar treballar amb dits clons perquè ens proporcionava; a) un model cel.lular epitelial de túbul proximal cortical en el que *in vivo* coneixiem gran part dels estímuls que intervenen en la transactivació del gen del KAP i, b) un model de túbul proximal medul.lar en el que endògenament no hi havia expressió de KAP, però en el que *in vivo* sabem que si que l'expressava, encara que amb una resposta diferent als mateixos estímuls. Per aquesta raó, es disposava de dos models cel.lulars renals murins diferents: un, amb un patró d'expressió del gen del KAP concret, i l'altre, on l'expressió del gen s'havia perdut, cosa que ens permetia comparar les dues situacions per tal d'identificar els factors que intervenen

en la regulació del gen del KAP. Concretament, el model de túbul proximal medular va ser utilitzat per assajar els factors implicats en l'activació transcripcional del gen, en el model cortical renal, i poder determinar d'aquesta manera, si la presència o combinació d'algun d'aquests factors era decisiva per l'expressió del gen del KAP.

Clons PCT:

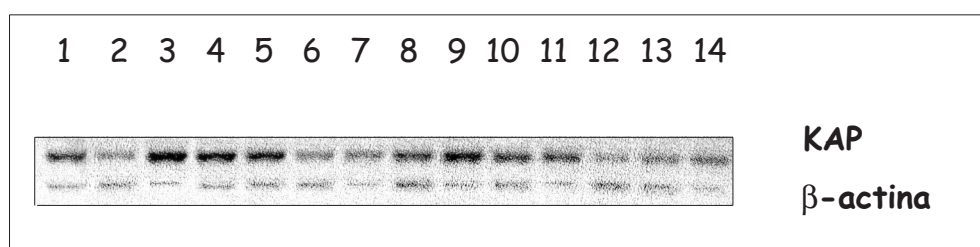


Fig. 6. Screening per RT- PCR dels clons obtinguts de PCT i PR. Amplificació de KAP i de β-actina com a control intern de la reacció.

III.b. Transactivació dependent d'andrògens del promotor del gen del KAP en PCT3 i PR10

Per tal de reproduir i estudiar, a nivell molecular, els efectes hormonals detectats *in vivo* i a nivell de l'expressió endògena del gen del KAP, en els models cel.lulars PCT3 i PR10, es van fer els primers assaigs funcionals del promotor del gen del KAP.

Amb el propòsit d'acotar la dosi de DHT òptima per a la inducció del promotor, es van utilitzar les concentracions d'hormona següents: 10^{-6} M, 10^{-9} M, i 10^{-12} M, amb o sense cotransfecció de l'hAR. Com a control del tractament i de la capacitat de resposta a