

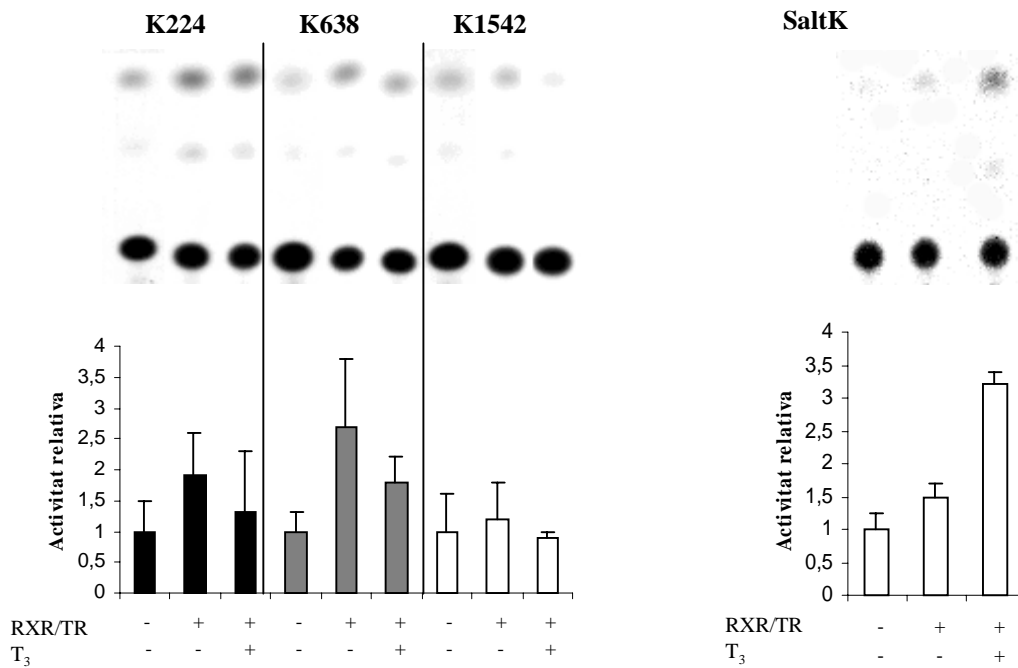
## **IV. Correlació de la regulació multihormonal del gen del KAP observada en el ronyó de ratolí amb el comportament del promotor de KAP en les línies cel.lulars renals PKSV-PCT i PKSV-PR**

### **IV.a. La $T_3$ i el promotor del gen del KAP en PCT3**

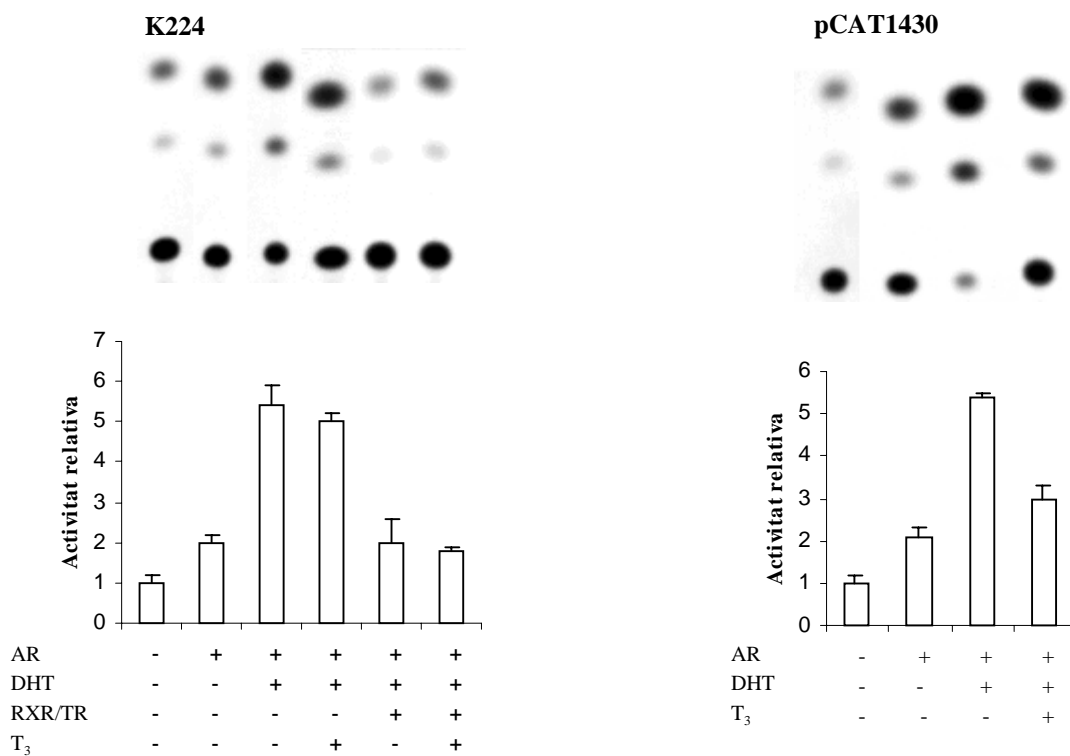
Per experiments *in vivo* s'ha demostrat que la  $T_3$  controla l'expressió del gen del KAP en el segment S3 renal i coopera amb els andrògens en la inducció cortical de l'expressió del gen del KAP (111). A més a més, també es coneix que les seqüències reguladores implicades en la transactivació dependent de  $T_3$  en S3, aparentment no es troben en el fragment del promotor de 1542 bp (146). Per tot això, no es va estudiar l'efecte de  $T_3$  sobre les construccions de KAP en PR10, sinó que, primerament, ens va interessar determinar la capacitat d'inducció dels tres fragments del promotor del KAP, en presència dels receptors de  $T_3$  i de  $T_3$   $10^{-6}$  M en medi de cultiu depleccionat d'hormones tiroïdals. Com es mostra en la figura.11.A), cap dels tres fragments del promotor de KAP va ser induït per l'hormona. El plàsmid utilitzat com a control del tractament amb  $T_3$  va ser el SaltK (134), que és un plàsmid induïble per  $T_3$ . Un cop demostrat que la  $T_3$  no tenia un efecte directe sobre la regulació transcripcional de KAP en el còrtex renal, ens interesava determinar si la  $T_3$  era capaç de modificar la resposta androgènica observada *in vivo*. Dels experiments de transfecció transitòria es pot comprovar que la  $T_3$  té un efecte inhitori indirecte sobre la resposta androgènica de K224, en PCT3, ja que tant la cotransfecció sola dels receptors de  $T_3$  com la seva posterior inducció per l'hormona, aboleix la inducció produïda per hAR i DHT, en K224. No obstant, en el mateix tipus cel.lular, la  $T_3$  produeix la disminució de gairebé

la meitat de la inducció androgènica del plàsmid control pCAT1430, però no modifica la de K224. (Fig. 11.B)). Finalment, es pot observar com es perd l'activitat transcripcional en resposta a andrògens i T<sub>3</sub> de K638 (Fig. 11.B)).

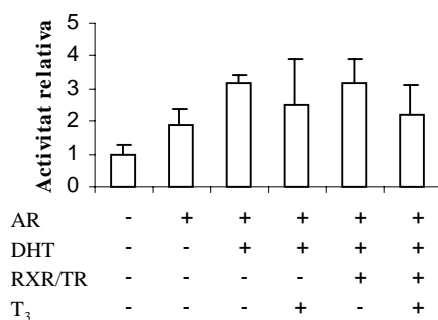
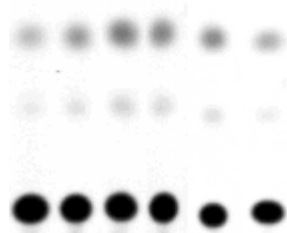
A)



B)



### K638



*Fig. 11. Capacitat de resposta dels fragments del promotor de KAP a T<sub>3</sub>. A) Es van cotransfectar 2 µg de K224, K638 i K1542 amb o sense 0,5 µg de TRβ i 0,5 µg de RXRα, en PCT3, crescudes durant 48 h en absència o presència de T<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup> M. A la dreta, el resultat de cultius paral·lels transfectats amb el plàsmid control positiu del tractament amb T<sub>3</sub> (SaltK). L'activitat CAT, normalitzada per β-galactosidasa, s'expressa com la inducció respecte el nivell basal. B) Les cèl·lules PCT3 van ser cotransfectades amb 2 µg de K224 o pCAT1430 o K638 en absència o presència de 0,5 µg de TRβ i 0,5 µg de RXRα, T<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup> M i/o DHT 10<sup>-6</sup> M. L'activitat CAT s'obté de la mateixa manera que s'ha descrit anteriorment.*

### IV.b. Expressió endògena del gen del KAP en PCT3 i PR10

Degut a que els resultats obtinguts en els experiments de transfecció transitòria no es correlacionaven amb els obtinguts en el ronyó, es va comprovar si el promotor de KAP endogen presentava el mateix patró de regulació per andrògens i T<sub>3</sub> que el que s'obtenia

dels assaigs de transfecció, en els models cel.lulars PCT3 i PR10. Per aquesta raó, es van determinar els nivells endògens de mRNA de KAP a través de RT-PCR semiquantitativa (apartat VIII de Material i Mètodes), en diferents tractaments hormonal. No obstant, no s'observava inducció hormonal si, previament, les cèl.lules no havien estat transfectades transitòriament amb els seus respectius receptors hormonal. En aquestes condicions, en PCT3 s'obté el següent resultat, representat en la figura 12.

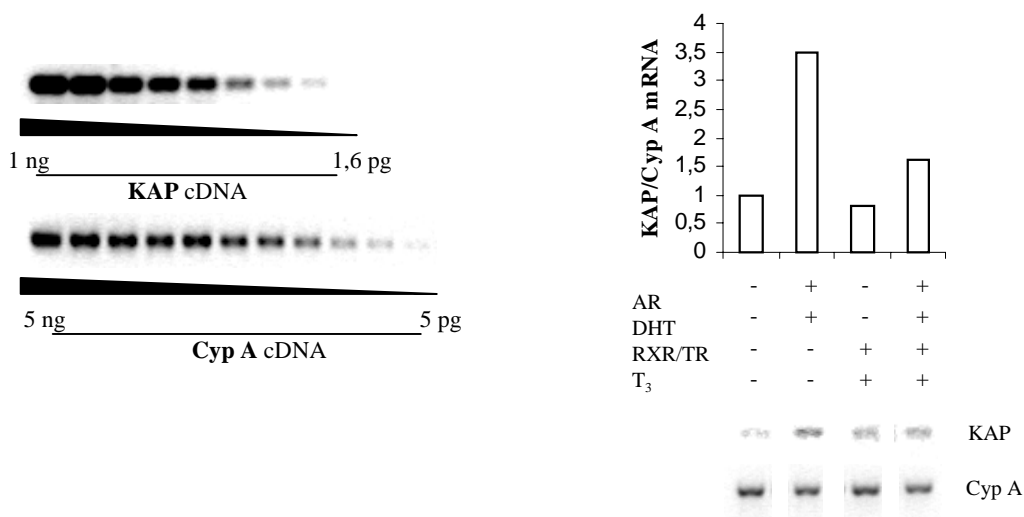


Fig 12. Nivells endògens d'expressió de KAP. Els nivells endògens del mRNA de KAP van ser mesurats per RT-PCR semiquantitativa en cèl.lules transfectades amb diferents combinacions dels vectors d'expressió del hAR, RXR $\alpha$  i TR $\beta$ , en presència o absència d'hormones. La relació KAP/Cyp representa la inducció respecte el nivell basal.

De la gràfica representativa dels diferents experiments realitzats es dedueix que, en aquest tipus cel.lular, la transfecció de l'hAR i la inducció amb DHT 10<sup>-6</sup> M augmenten 3,5 vegades els nivells basals endògens del mRNA de KAP, mentre que la combinació d'hAR

i receptors tiroïdals induïts amb els seus respectius lligands, disminueix aquesta inducció, aproximadament, fins a la meitat.

En PR10, no s'aconsegueix induir l'expressió del gen del KAP ni amb andrògens ni amb hormona tiroïdal, amb o sense transfecció dels respectius receptors hormonals.

#### **IV.c. L'IGF-I i el vanadat sòdic modifiquen la capacitat de transactivació dependent d'andrògens del promotor del gen del KAP en PCT3 i PR10**

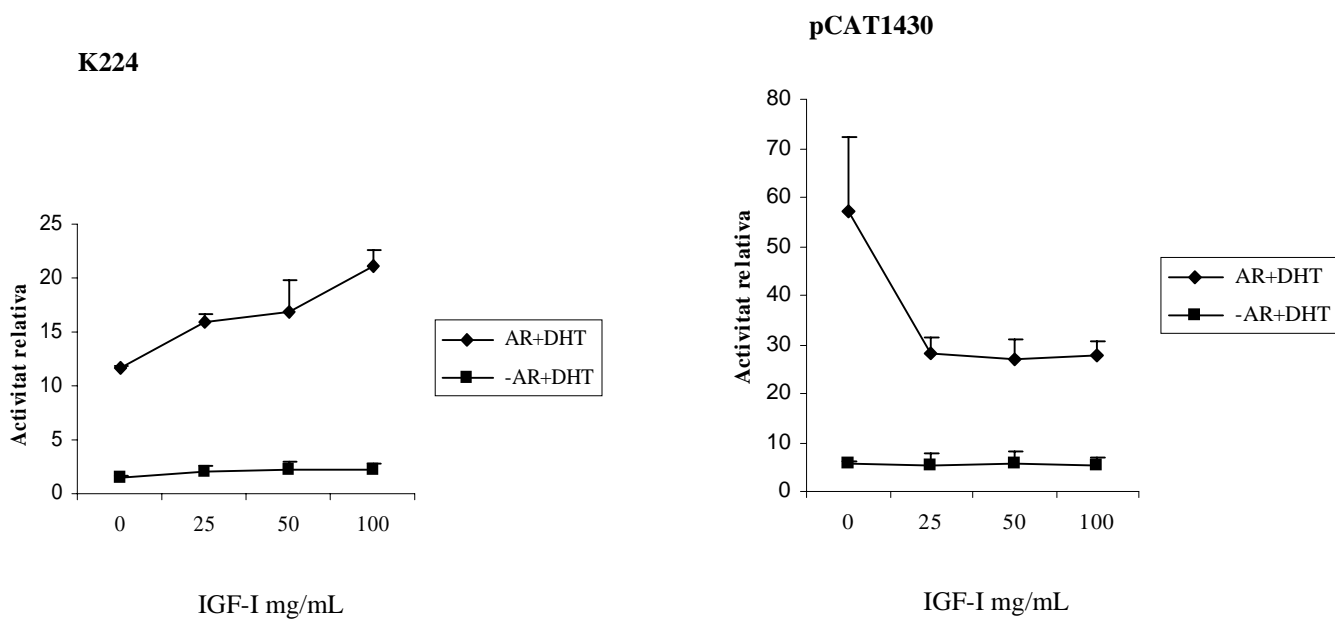
S'ha demostrat que els factors de creixement i específicament IGF-I modifiquen la resposta androgènica en el ronyó murí (147, 148). Per aquesta raó, en PCT3, es va transfectar transitòriament la construcció K224 i es va tractar amb concentracions creixents d'IGF-I (25, 50, 100 ng/mL). Cap de les concentracions d'IGF-I esmentades potenciaven l'activitat del *reporter* en absència d'AR, però IGF-I 100 ng/mL incrementava en, aproximadament, 2,3 vegades, la inducció dependent d'andrògens del *reporter*, mentre que a partir d'una concentració d'IGF-I 25 ng/mL s'inhibia la transactivació dependent d'andrògens de pCAT1430 (Fig.17.A)). La cotransfecció del receptor d'IGF-I (IGF-I R) impedia l'efecte d'IGF-I sobre la resposta androgènica de K224 (Fig.17B)) i, també, de pCAT1430 (resultats no mostrats).

Com que l'IGF-I és efector de la via de senyalització de les MAPKs, ens va interessar analitzar l'efecte que tindria l'ortovanadat sòdic 100  $\mu$ M, que és un inhibidor de fosfatases, sobre la resposta androgènica de K224, en PCT3, i el resultat va ser idèntic a l'obtingut amb IGF-I (2,1 vegades d'inducció) (Fig.17.C)).

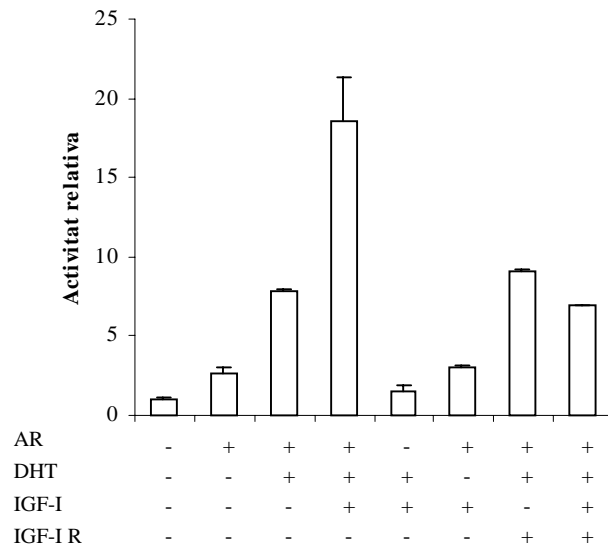
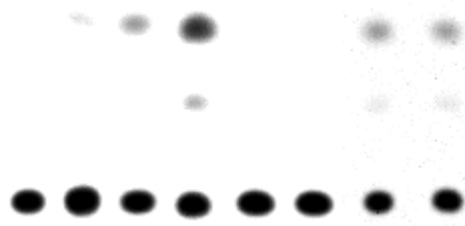
En PR10, l'IGF-I produeix un lleuger augment de l'activitat transcripcional dependent d'andrògens del fragment de K224, però l'adició d'ortovanadat sòdic en el medi de cultiu sí que produeix un augment clar de l'expressió androgènica de dit fragment del promotor (Fig.17.D)).

Aquests resultats suggereixen que, almenys en part, l'efecte produït per la T<sub>3</sub> sobre l'expressió de KAP, en el ronyó murí, podria produir-se sobre el control de l'eix de GH/IGF-I.

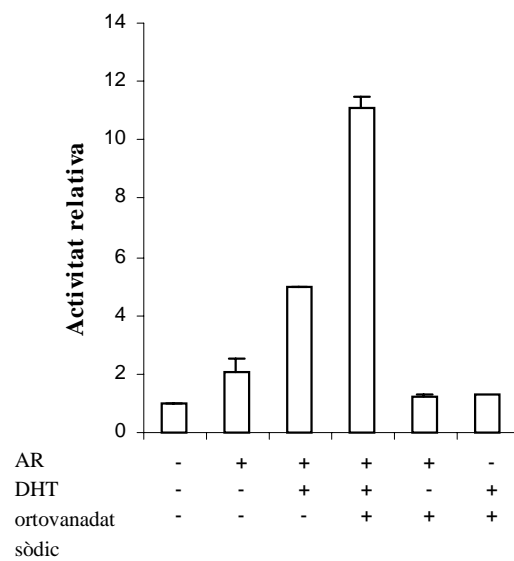
A)



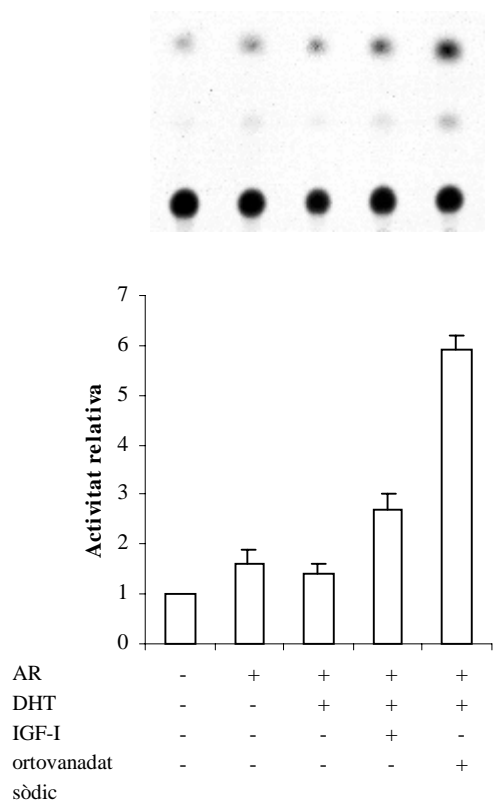
B)



C)



D)



*Fig.17. Modulació de la resposta androgènica de K224 per IGF-I i ortovanadat sòdic.* A) Les cèl.lules PCT3 van ser transfectades amb 2 µg de K224 o pCAT1430 i 0,5 µg de hAR (en les situacions indicades), i tractades amb les dosis d'IGF-I indicades o vehicle, durant 48 h. B) 2 µg de K224 +/- 0,5 µg de hAR +/- 0,5 µg d'IGF-I R, van ser transfectats transitòriament en PCT3, en absència o presència de DHT 10<sup>-6</sup> M i IGF-I 100 ng/mL. C) Cèl.lules PCT3 transfectades amb 2 µg de K224 i 0,5 µg d'hAR, tractades amb ortovanadat sòdic 100 µM. D) Cèl.lules PR10 transfectades amb 2 µg de K224 i 0,5 µg d'hAR i induïdes amb DHT 10<sup>-6</sup> M, tractades amb IGF-I 100 ng/mL i ortovanadat sòdic 100 µM.



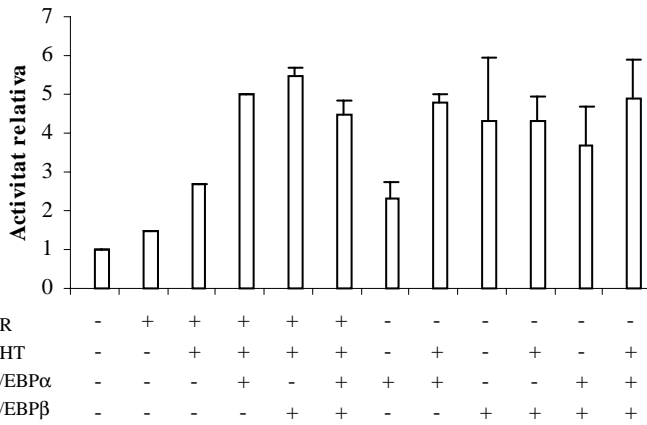
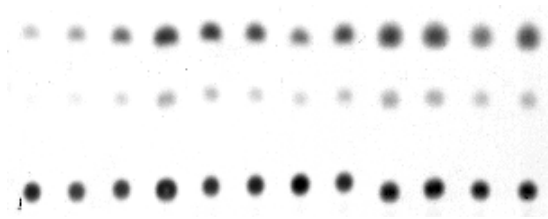
#### **IV.d. Assaig funcional de la capacitat transactivadora de C/EBP $\alpha$ i C/EBP $\beta$ sobre el promotor de KAP**

Ja que del model *in vivo* s'havia observat una clara relació entre la presència de T<sub>3</sub>, els factors de transcripció C/EBP i l'expressió endògena de KAP, es va estudiar la capacitat transactivadora de C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$  sobre el promotor de KAP. D'aquesta manera, per tal de determinar si dites proteïnes estan implicades en la regulació transcripcional dependent d'andrògens del gen del KAP, es van realitzar els assaigs funcionals del promotor de KAP amb la cotransfecció de diferents combinacions d'hAR, C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$ . A tal efecte, es va utilitzar el fragment de K638, en el que s'havien identificat mitjançant computació, 4 seqüències putatives per C/EBP (Fig.14.a.1)). Com a control es va utilitzar el pCAT1430, plàsmid induïble per andrògens però en el que no s'hi han identificat llocs de resposta a C/EBP (Fig.14.a.2)). En l'apartat a1, es pot destacar que, tant C/EBP $\alpha$  com C/EBP $\beta$  o la combinació C/EBP $\alpha$ -C/EBP $\beta$ , incrementen en 2 vegades, l'efecte d'hAR i DHT 10<sup>-6</sup> M sobre K638. Per altra banda, s'obté, clarament, la mateixa inducció amb la cotransfecció de C/EBPs i hAR i DHT 10<sup>-6</sup> M que C/EBP $\alpha$  i DHT 10<sup>-6</sup> M, de manera que aquest resultat podria ser la primera evidència que indicaria una possible interrelació entre dos mecanismes que intervindrien en la inducció transcripcional del gen del KAP, en PCT3. En l'apartat a2, la manca d'efecte de C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$  sobre pCAT1430, implica que l'efecte vist per K638 és específic de promotor. Aquests resultats, ens varen induir a analitzar la capacitat de resposta de KAP a la combinació C/EBP $\alpha$  i DHT 10<sup>-6</sup> M, en diferents tipus cel.lulars, per tal de determinar si el possible mecanisme d'activació del gen del KAP per andrògens i, possiblement també, per C/EBP, era específic de cèl.lula. Per tot això es van utilitzar les cèl.lules PR10 i CV-1. Com es pot apreciar en l'apartat b1 de la figura 15, C/EBP $\alpha$  inhibeix la capacitat transactivadora del fragment de K638, en PR10, mentre que produeix l'efecte

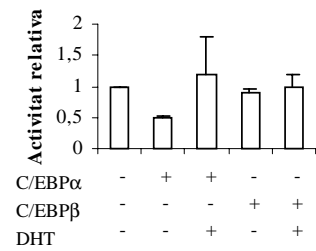
contrari en PCT3. Per últim, C/EBP $\alpha$  no té cap efecte sobre el mateix fragment de K638, en CV-1 (Fig.14.b.2)).

**A) PCT 3**

*a1)*

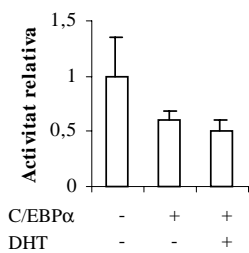
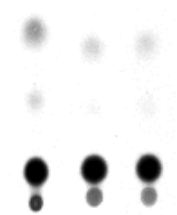


*a2)*

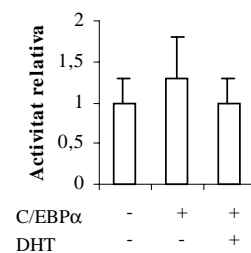


**B)**

*b1) PR 10*



*b2) CV-1*



*Fig.14. Efecte de C/EBP $\alpha$  en la capacitat de transactivació dependent d'andrògens de la construcció del promotor del KAP K637 en PCT3, PR10 i CV-1. Les activitats CAT van ser normalitzades per l'activitat  $\beta$ -galactosidasa produïda per 2  $\mu$ g de pCH110 transfectats en la mateixa mostra i estan expressades com l'increment respecte el nivell basal. A) a1) Cèl.lules PCT3 transfectades amb 2  $\mu$ g de K638 en absència o presència de 0,5  $\mu$ g de hAR, 0,5  $\mu$ g de C/EBP $\alpha$  i 0,5  $\mu$ g de C/EBP $\beta$ . Les cèl.lules van créixer durant 48 h amb o sense DHT 10<sup>-6</sup> M. a2) Cèl.lules PCT3 transfectades amb 2  $\mu$ g de pCAT1430 en absència o presència de 0,5  $\mu$ g de C/EBP $\alpha$  i 0,5  $\mu$ g de C/EBP $\beta$ . Les cèl.lules van créixer durant 48 h amb o sense DHT 10<sup>-6</sup> M. B) b1) Cèl.lules PR10 transfectades amb 2  $\mu$ g de K638 amb o sense 0,5  $\mu$ g de C/EBP $\alpha$  i DHT 10<sup>-6</sup> M (48 h). b2) Cèl.lules CV-1 transfectades amb 2  $\mu$ g de K638 amb o sense 0,5  $\mu$ g de C/EBP $\alpha$  i DHT 10<sup>-6</sup> M.*

#### **IV.e. Expressió endògena de C/EBP $\alpha$ i C/EBP $\beta$ en PCT3 i PR10**

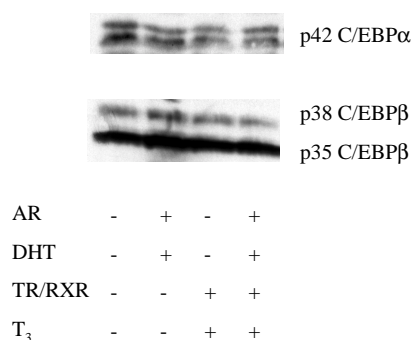
Degut a la participació de les C/EBPs en la transactivació del promotor del gen del KAP, en les cèl.lules PCT3 i PR10, i que en el ronyó de ratolí ja s'havia demostrat que la T<sub>3</sub> modulava els nivells proteics de C/EBPs, ens varem preguntar si, en el sistema cel.lular (PCT/PR), la presència de T<sub>3</sub> era capaç de regular els nivells endògens de C/EBPs. Per aquesta raó, es van mesurar els nivells endògens de mRNA de C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$ , en cèl.lules PCT3 i PR10 transfectades amb hAR, TR $\beta$  i RXR $\alpha$ , en presència o absència dels seus respectius lligands, tal com es va fer per determinar la capacitat de resposta de KAP a aquests estímuls.

En la figura 13.A) es pot constatar que els nivells de mRNA de C/EBP $\alpha$ , en PCT3, augmenten, aproximadament, 2,3 vegades respecte el nivell basal, amb hAR i DHT 10<sup>-6</sup> M, mentre que disminueixen a la meitat amb la cotransfecció conjunta d'hAR, TR $\beta$  i RXR $\alpha$ ,

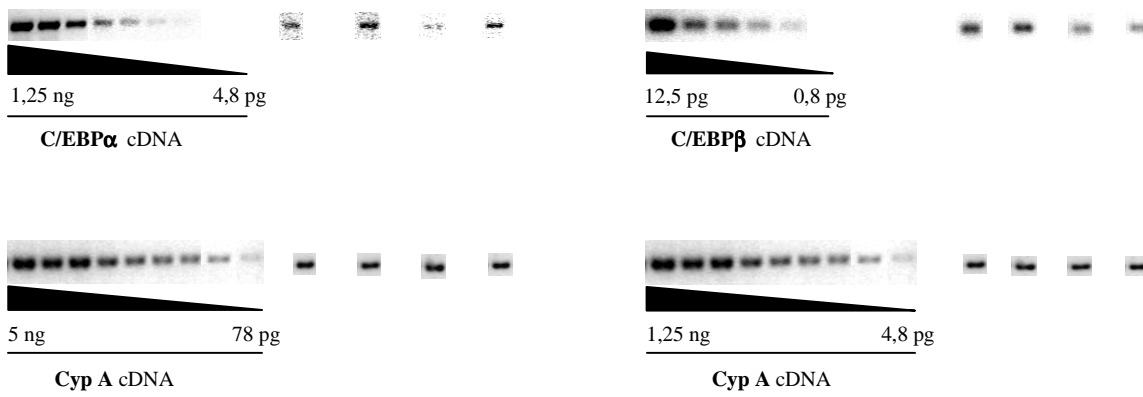
induïts amb DHT  $10^{-6}$  M i  $T_3$ ,  $10^{-6}$  M. No hi ha canvis significatius en l'expressió endògena de C/EBP $\beta$ . Cal remarcar que, com ja s'ha vist anteriorment, els nivells de mRNA no es correlacionen amb els nivells de proteïna, els quals no varien ni per C/EBP $\alpha$  ni per C/EBP $\beta$ . Aquest resultat suggereix que la manca d'efecte de  $T_3$  sobre l'expressió de KAP, *in vitro*, pugui produir-se per un desajust de la via de senyalització en el model cel.lular. També observem una nova isoforma de C/EBP $\beta$  que no apareixia en els extractes de ronyó, aquesta és p38C/EBP $\beta$ . En l'apartat B) es presenten els mateixos experiments realitzats en PR10. En aquest tipus cel.lular, els nivells endògens de mRNA de C/EBP $\alpha$  augmenten, aproximadament, 7 vegades, amb la cotransfecció dels receptors de  $T_3$  i  $T_3$ ,  $10^{-6}$  M respecte el nivell basal, aquests, també potencien l'efecte androgènic 3 vegades, però, en aquestes mateixes condicions, els nivells de mRNA de C/EBP $\beta$  disminueixen, aproximadament, 3 vegades i l'efecte dels andrògens disminueix, aproximadament, 7,5 vegades. No obstant, els nivells de proteïna de C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$  no varien en cap de les situacions assajades.

## A) PCT3

### a1)

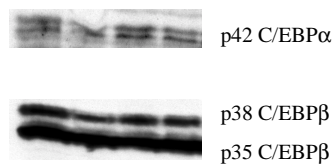


a2)



**B) PR10**

*b1)*



AR	-	+	-	+
DHT	-	+	-	+
TR/RXR	-	-	+	+
T <sub>3</sub>	-	-	+	+

b2)

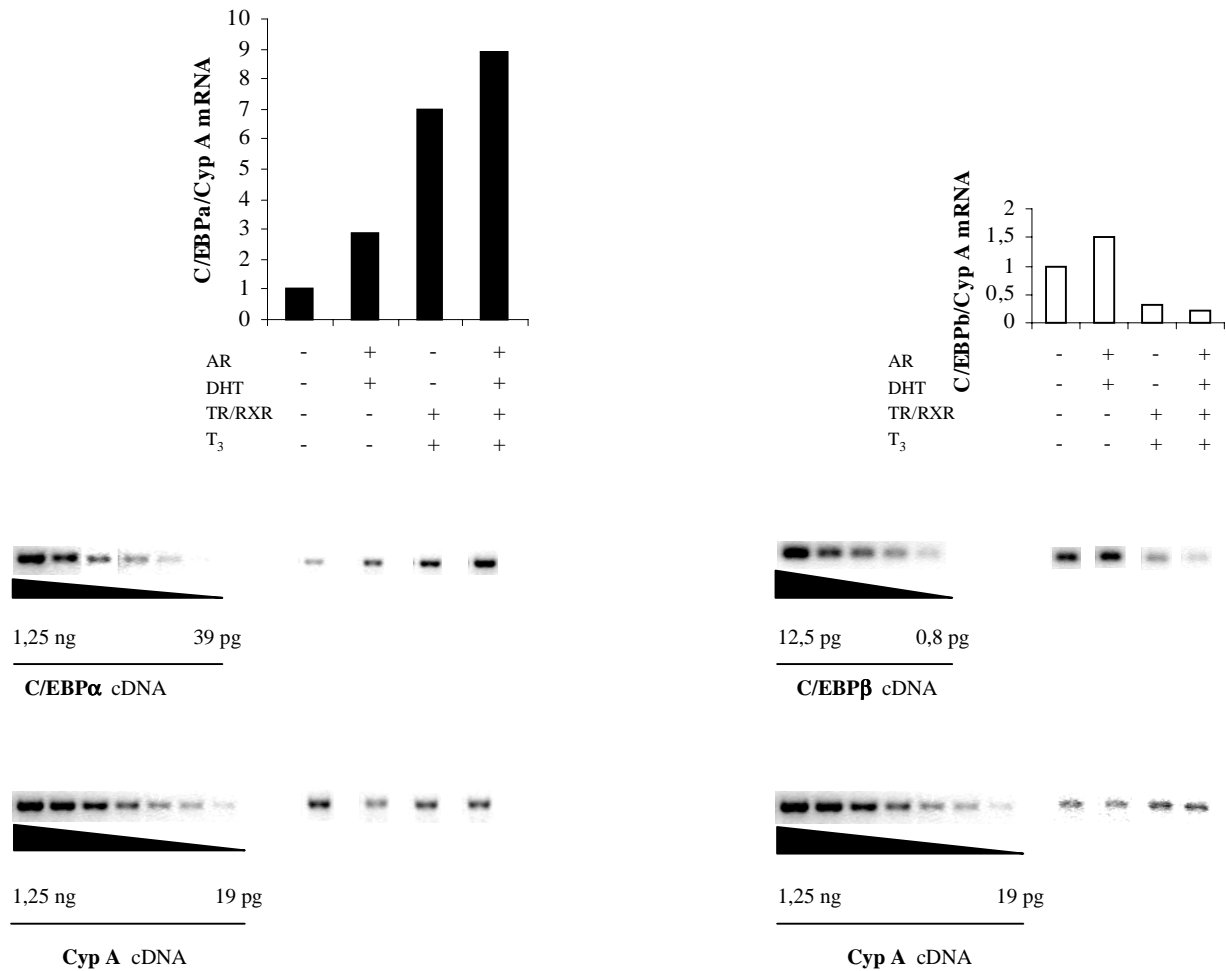


Fig.13. Nivells endògens de mRNA i proteïna de C/EBPα i C/EBPβ en cèl.lules PCT3 i PR10 transfectades. A) a1) Es presenten els resultats obtinguts d'extractes nuclears preparats a partir de cèl.lules PCT3 transfectades amb les mateixes condicions de receptors i hormones utilitzades pels extractes de RNA. Quantitats semblants de proteïna es van separar electroforèticament, transferir a una membrana de nitrocel.lulosa, i immunodetectar amb un anticòs específic de C/EBPα (membrana p42C/EBPα) o específic de C/EBPβ (membrana p38C/EBPβ i p35 C/EBPβ). a2) Es representen els nivells de mRNA endògens de C/EBPα i C/EBPβ mesurats per RT-PCR semiquantitativa en cèl.lules PCT3 transfectades amb diferents combinacions dels vectors d'expressió de hAR, TRβ i RXRα, en presència o absència dels seus lligands. Les relacions C/EBPα/Cyp A i C/EBPβ/Cyp A representen la inducció o inhibició respecte el nivell basal.

B) *b1*) Primerament, es mostra el Western blot de C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$  d'extractes nuclears de cèl.lules PR10 transfectades segons PCT3, *b2*) Segonament, es mostren els nivells de mRNA endògens de C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$  mesurats per RT-PCR semiquantitativa en cèl.lules PR10 transfectades de la mateixa manera que PCT3.

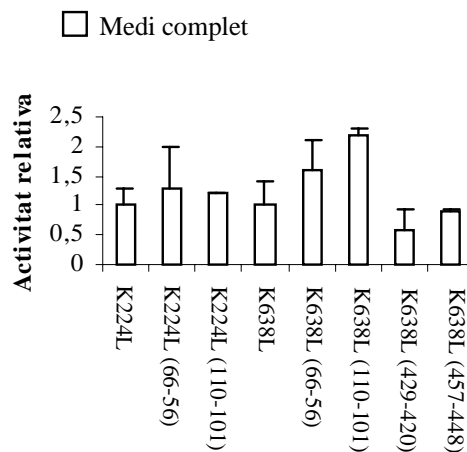
#### **IV.f. Identificació de dos putatius elements de resposta a proteïnes de la família de factors de transcripció C/EBP**

Mitjançant la metodologia de la mutagènesi dirigida, es va fer un primer abordatge per a la identificació de les seqüències a través de les que C/EBP participava en la regulació de l'expressió del gen del KAP. Per aquesta raó es van fer diferents construccions en les que s'havia deletat una, dues o tres seqüències de 10 nucleòtids, putatives de ser caixes reconegudes per C/EBP. Seguidament, dites construccions van ser transfectades en PCT3, per tal de determinar si la mancança de les seqüències deletades repercutia en el nivell basal de transcripció del gen del KAP. La seqüència consens C/EBP és: A/gTTGCGT/acAAT/c (149) i les seqüències deletades del promotor de KAP van ser les següents: 66-56, ACTGTGGAAA; 101-110, CTTCCCAAAC; 429-420, CTCCAGCAAT; 457-448, CTTTTGCAAT. Els números que precedeixen a les seqüències indiquen la posició en la que es troben dites seqüències en el promotor del gen del KAP.

En la figura 15.A) es representen les activitats luciferasa relatives respecte el nivell basal, de totes les construccions que presenten només la mutació d'una putativa seqüència C/EBP, tant en K224 com en K638, transfectades en cèl.lules PCT3 crescudes en medi complet. En l'apartat B) de la mateixa figura, es mostra l'efecte de la mutació conjunta de les dues putatives seqüències C/EBP identificades en K637 (429-420 i 457-448) i de dues

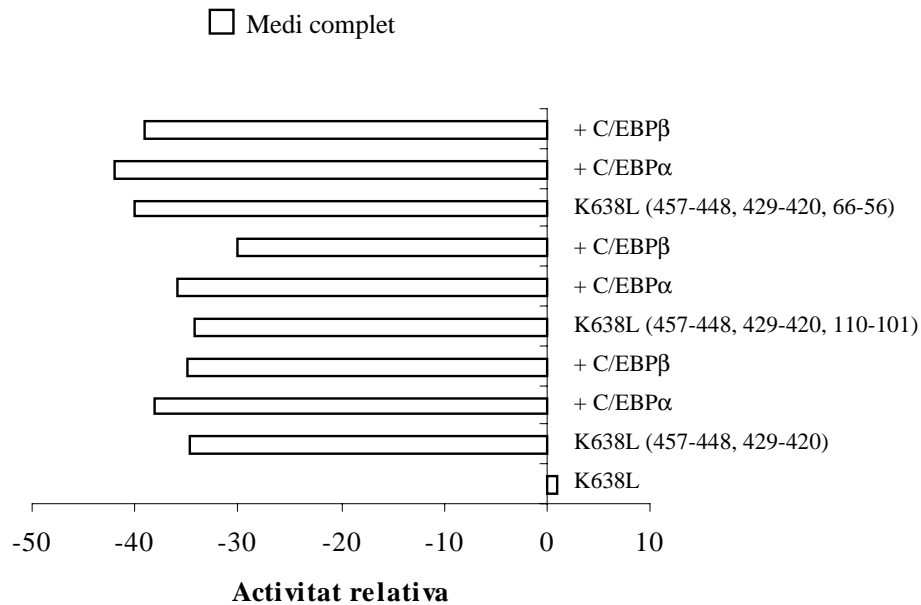
triples mutacions que consisteixen en la mutació d'ambdues seqüències nombrades i d'una de les dues putatives caixes que es troben localitzades en el fragment K224. A diferència del resultat obtingut en l'apartat A), el qual indicaria que cap de les seqüències analitzades és important en la regulació transcripcional de KAP, l'apartat B) ens diu que la deleció de les seqüències 429-420 i 457-448, és extramadament perjudicial per l'activació del gen, ja que inhibeix el nivell basal de transcripció, aproximadament, 40 vegades. De la mateixa manera, si cèl.lules transfectades amb aquestes mateixes construccions que contenen les caixes 429-420 i 457-448 mutades, es cotransfecten amb vectors d'expressió per a C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$ , no s'aconsegueix restituir la capacitat de transactivació del promotor, indicant que l'efecte d'aquests factors de transcripció és a través de la unió a les caixes esmentades (Fig. 15.B)).

A)





**B)**



*Fig.15. Assaig funcional de la mutació de quatre putatives seqüències C/EBP del promotor del gen del KAP. La seqüència C/EBP consens és: A/gTTGCGT/acAAT/c i els nucleòtids delecionats de la seqüència nativa del promotor de KAP són els següents: 66-56, ACTGTGGAAA; 101-110, CTTCCCAAAC; 429-420, CTCCAGCAAT; i 457-448, CTTTTGCAAT. Les activitats luciferasa estan normalitzades per l'activitat *renilla* luciferasa produïda per 20 ng de pRL-TK transfectats en la mateixa mostra i estan expressades com l'increment respecte el nivell basal (construccions natives de KAP). A) Cèl.lules PCT3 transfectades amb 1 µg de les construccions de KAP mutades (K224L (66-56), K224L (110-101), K638L (66-56), K638L (110-101), K638L (429-420) o K638L (457-448)) o amb 1 µg de les construccions de KAP natives (K224L i K638L) i crescudes en medi complet. B) 1 µg de les construccions de K638L mutades en dues o tres posicions (K638L (457-448, 429-420), K638L (457-448, 429-420, 110-101), K638L (457-448, 429-420, 66-56)) o 1 µg de K638L natiu van ser cotransfectats en cèl.lules PCT3, en absència o presència de 0,5 µg de C/EBPα o 0,5 µg de C/EBPβ.*

#### **IV.g. Andrògens i C/EBPs en la transactivació del promotor del gen del KAP**

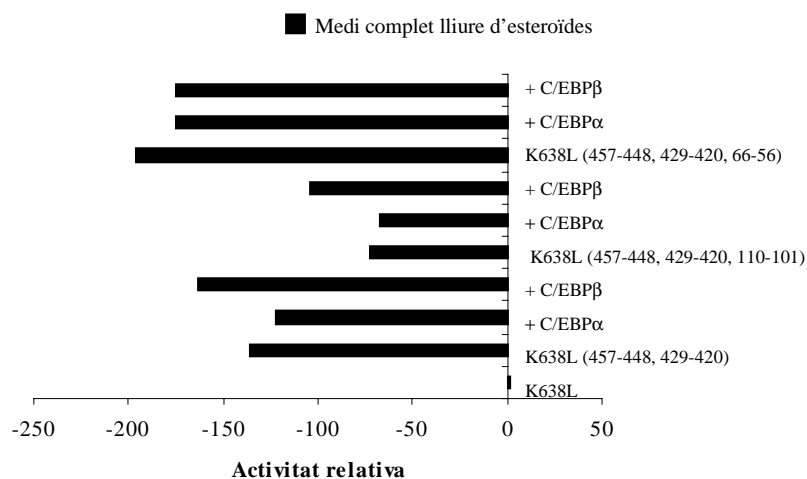
Com s'ha demostrat en l'apartat anterior, la deleció simultània de les seqüències 429-420 (CTCCAGCAAT) i 457-448 (CTTTTGCAAT) del promotor del gen del KAP, disminueix significativament el nivell basal d'expressió del gen *reporter*, sent aquesta disminució encara més significativa si els mateixos experiments es realitzen en medi complet lliure d'andrògens (Fig.16.A). La deplecció androgènica inhibeix la capacitat transactivadora de la construcció del promotor del KAP amb la doble mutació 429-420 i 457-448, a 150 vegades, indicant la col.laboració entre els andrògens i les proteïnes C/EBPs en la transactivació del gen del KAP (Fig.16.A). Aquest experiment demostra que els andrògens i la T<sub>3</sub> a través del control de C/EBPs sinergitzen en l'activació transcripcional de KAP. Per confirmar aquest resultat, es va assajar una construcció en la que apareixien mutades les seqüències descrites conjuntament amb l'ARE (l'estratègia de mutació del ARE està detallada en l'apartat III.e de Resultats). D'aquesta manera, també, es podria analitzar la implicació conjunta o separada dels andrògens i C/EBPs.

Concretament, per tal de demostrar la relació entre la inducció mitjanaçada per C/EBPs i la inducció androgènica, en PCT3, es van assajar dos tipus de construccions: una, contenia exclusivament, les mutacions dels llocs putatius d'unió a C/EBPs (K638L (457-448, 429-420)) i altra, presentava a més a més, la mutació de l'ARE (K638L (457-448, 429-420, ARE 39-25)). Els resultats de la figura 16.B) mostren que en presència de medi complet i, per tant, en presència d'andrògens, hi ha una diferència significativa entre ambdues situacions. Concretament, els nivells d'expressió del gen *reporter* disminueixen 58 vegades, en la construcció K638L (457-448, 429-420) respecte al fragment natural de 638

bp del promotor del KAP, i de 123 vegades si la construcció assajada té l'ARE mutat a més a més dels dos llocs putatius d'unió a C/EBPs (K638L (457-448, 429-420, ARE 39-25)). Per altra banda, si aquest experiment es realitza en medi complet depleccionat d'andrògens, no existeixen diferències entre K638L (457-448, 429-420) i K638L (457-448, 429-420, ARE 39-25). Per tant, en medi complet, la construcció que no té l'ARE mutat està menys inhibida que la que té l'ARE mutat, doncs, encara que s'ha eliminat una possible via d'actuació de C/EBPs sobre el promotor de KAP, es manté el lloc a través del que els andrògens hi intervenen de forma directa.

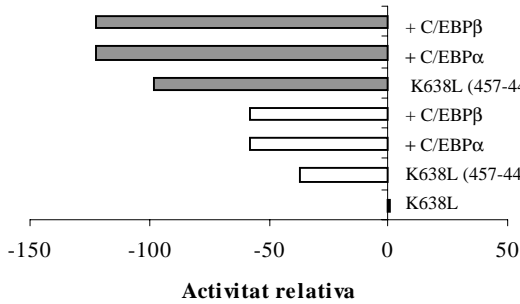
En els apartats c1 i c2, es presenten els controls negatius, fets per a tots els experiments de transfecció però no mostrats, que consisteixen en la cotransfecció del vector *reporter* (pGL3-Basic vector pels experiments en els que s'ha utilitzat la luciferasa com a *reporter*) sense el promotor de KAP. Com es pot veure, el nivell basal de transcripció no varia amb la cotransfecció de C/EBP $\alpha$  o C/EBP $\beta$  amb medi complet o medi complet lliure d'andrògens. És a dir, l'efecte obtingut depèn del promotor del gen del KAP.

A)

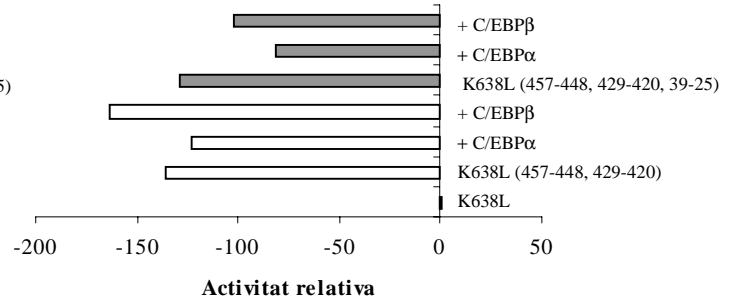
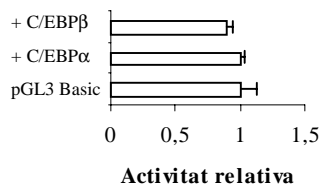
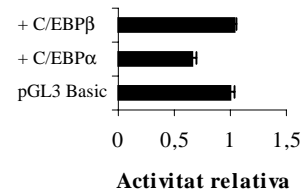


**B)****b1) Medi complet**

- K638L (457-448,429-420, ARE 39-25)
- K638L (457-448, 429-420)

**b2) Medi complet lliure d'esteroides**

- K638L (457-448,429-420, ARE 39-25)
- K638L (457-448, 429-420)

**C)****c1) □ Medi complet****c2) ■ Medi complet lliure d'esteroides**

*Fig.16. Assaig funcional.* A) 1 µg de la construcció K638L (457-448, 429-420) o 1 µg de K638L (457-448, 429-420, 110-101) o 1 µg de K638L (457-448, 429-420, 66-56) o 1 µg de k638L natiu van ser cotransfectats en presència o absència de C/EBPα o C/EBPβ en cèl.lules PCT3, que van ser crescudes en medi complet depleccionat d'andrògens durant 72 h. B) 1 µg del *reporter* K638L (457-448, 429-420) i 1 µg de K638L (457-448, 429-420, ARE 39-25) amb o sense la cotransfecció de C/EBPα o C/EBPβ van ser assajats b1) en medi complet i b2) en medi lliure d'andrògens, en cèl.lules PCT3. C) Com a control negatiu de la capacitat de transactivació del plàsmid *reporter* independentment del promotor (pGL3 Basic vector), es van cotransfectar cèl.lules PCT3 amb 1 µg de pGL3 Basic i 0,5 µg C/EBPα o 0,5 µg C/EBPβ i van ser crescudes c1) en medi complet i c2) en medi lliure d'andrògens.

#### **IV.h. Expressió endògena d'AP-2 en PCT3, PR10 i ronyó murí**

Els dos tipus cel·lulars renals de túbul proximal emprats, són funcionalment diferents pel què fa a la seva capacitat de transactivació del gen del KAP. Per aquesta raó, ens vam plantejar si podia existir algun factor present en només un d'ells que, prèviament, hagués estat descrit com a mediador de l'especificitat de la resposta gènica en cèl·lules epitelials del túbul proximal renal. La proteïna activadora de la transcripció AP-2, juntament amb els factors de la família C/EBP, compleixen aquest requisit (150, 151, 152).

Degut al paper funcional d'AP-2 en ronyó, es van analitzar els nivells de mRNA d'AP-2 en cèl·lules PCT3 i PR10 transfectades amb diferents combinacions d'hAR, TR $\beta$  i RXR $\alpha$  induïts amb els seus respectius lligands, i en extractes de ronyó de ratolins mascles C57BL/6 control, hipotiroïdals i castrats. De la figura 18, es pot resaltar que encara que no s'hagi fet una RT-PCR semiquantitativa, i, que en conseqüència, no es pugui parlar de nivells relatius d'inducció respecte el nivell basal, es pot dir que a nivell transcripcional, AP-2 s'expressa en PCT3 i en els extractes de ronyó esmentats, però no en PR10, en cap de les condicions hormonals assajades (que són les analitzades per KAP, C/EBP $\alpha$  i C/EBP $\beta$ ).

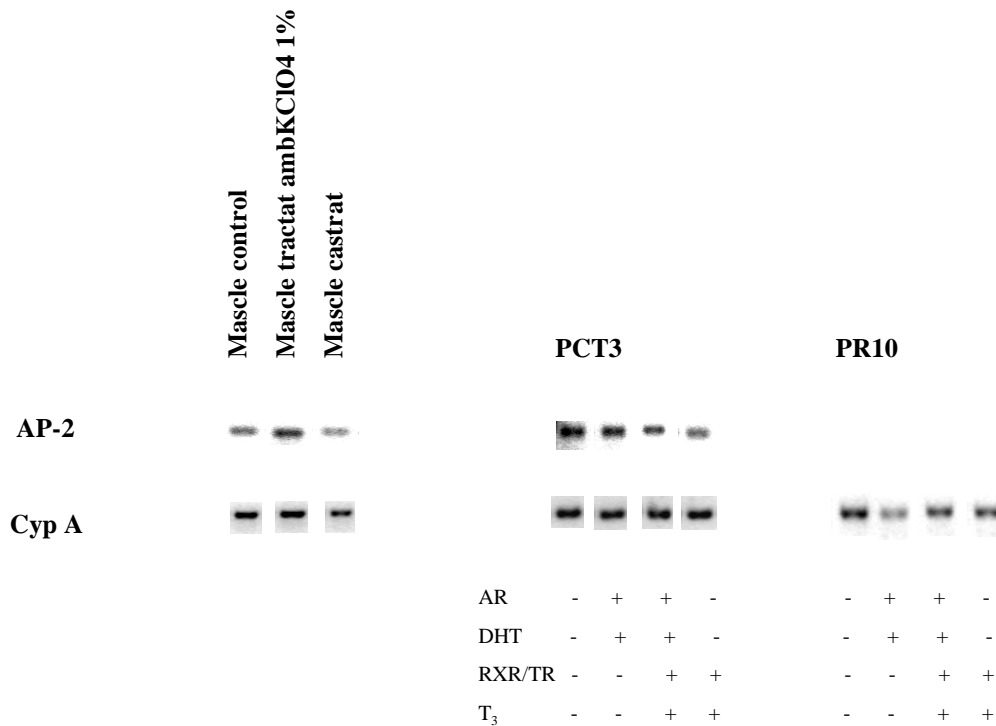


Fig.18. Expressió endògena d'AP-2 en PCT3, PR10 i ronyó murí. RT-PCR d'AP-2 en cèl.lules PCT3 i PR10 i en extractes de ronyó de ratolins mascles C57BL/6 control, hipotiroïdals i castrats. RT-PCR de Cyp A utilitzada com a control de la integritat del RNA de cada mosta amplificada.

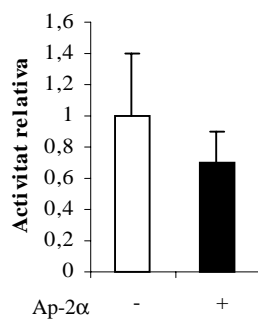
### VI.i. Assaig funcional d'AP-2 $\alpha$ amb el promotor de KAP

Dels resultats obtinguts en l'apartat anterior, ens va interessar assajar l'efecte d'AP-2 $\alpha$  (153) sobre el fragment de 637 bp respecte l'origen de transcripció del promotor de KAP, ja que en la posició -261 s'hi havia identificat la seqüència CCCCTGGC, candidata a ser reconeguda per AP-2.

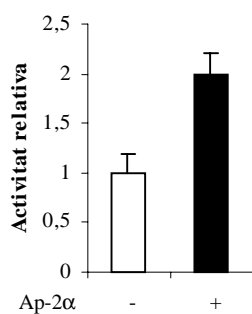
En la figura 19.A) es pot observar com AP-2 $\alpha$  no té efecte sobre el fragment K638 del promotor de KAP, en PCT3, mentre que incrementa en, aproximadament, 2 vegades, el nivell

basal de transcripció del promotor, en PR10 (Fig.19.B)). Per altra banda, també en PR10, es pot constatar com la presència d'AP-2 $\alpha$  provoca que l'activació androgènica independent de lligand del fragment K638, es converteixi en dependent de lligand (Fig.19.C)).

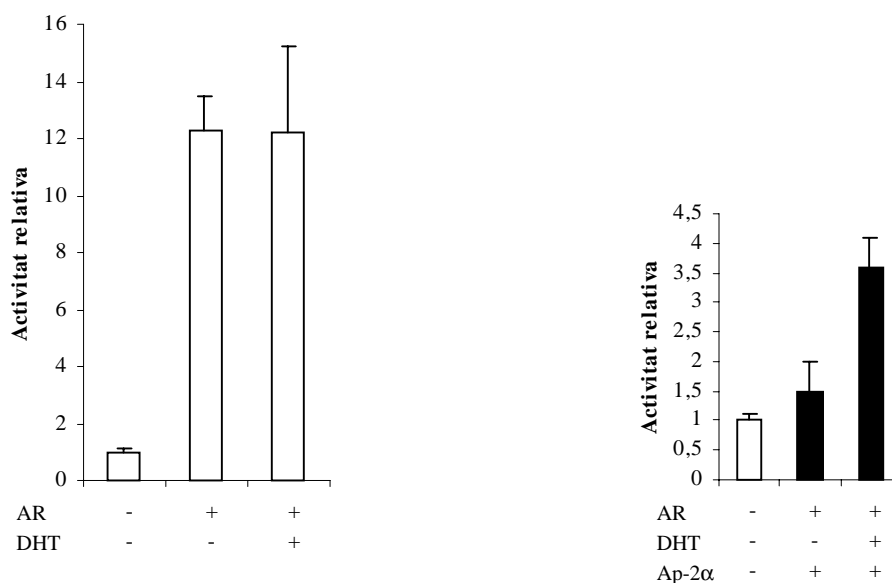
**A)**



**B)**



**C)**



*Fig.19. Assaig funcional d'AP-2 $\alpha$ . A) Cèl.lules PCT3 cotransfectades amb 1  $\mu$ g del reporter K638L i amb o sense 0,5  $\mu$ g d'AP-2 $\alpha$ . B) Cèl.lules PR10 cotransfectades amb 1  $\mu$ g de K638L i amb o sense 0,5  $\mu$ g d'AP-2 $\alpha$ . C) Cèl.lules PR10 cotransfectades amb diferents combinacions de hAR i AP-2 $\alpha$  i induïdes amb DHT 10<sup>-6</sup> M quan s'indica. Les activitats luciferasa estan normalitzades per l'activitat de pRL-TK i estan representades com la inducció respecte el nivell basal.*

#### **IV. Model proposat**

Alguns dels resultats presentats han de ser complementats per altres experiments, tals com els assaigs de retardament en gel, que ja s'estan fent en el laboratori, i que indicaran si les seqüències 429-420 (CTCCAGCAAT) i 457-448 (CTTTTGCAAT) són caixes d'unió a C/EBP. Els assaigs de mutagènesi i transfecció indiquen la importància funcional de dites seqüències del promotor del gen del KAP, però cal demostrar que queden retardades quan són incubades amb els extractes nuclears d'animals mascles i castrats o amb els de les cèl.lules PCT3 i PR10, però no amb els de ratolins mascles hipotiroïdals. D'aquesta manera es tornaria a corroborar el fet que on no s'hi ha detectat ni proteïna C/EBP $\alpha$  ni proteïna C/EBP $\beta$ , els nivells de mRNA de KAP no són detectables per hibridació *in situ*. No obstant, s'ha proposat un primer model per la transactivació dependent d'andrògens del promotor del gen del KAP, en PCT3 (Fig.20) i en el còrtex renal (Fig.21).



## Transactivació dependent d'andrògens del gen del KAP en PCT3

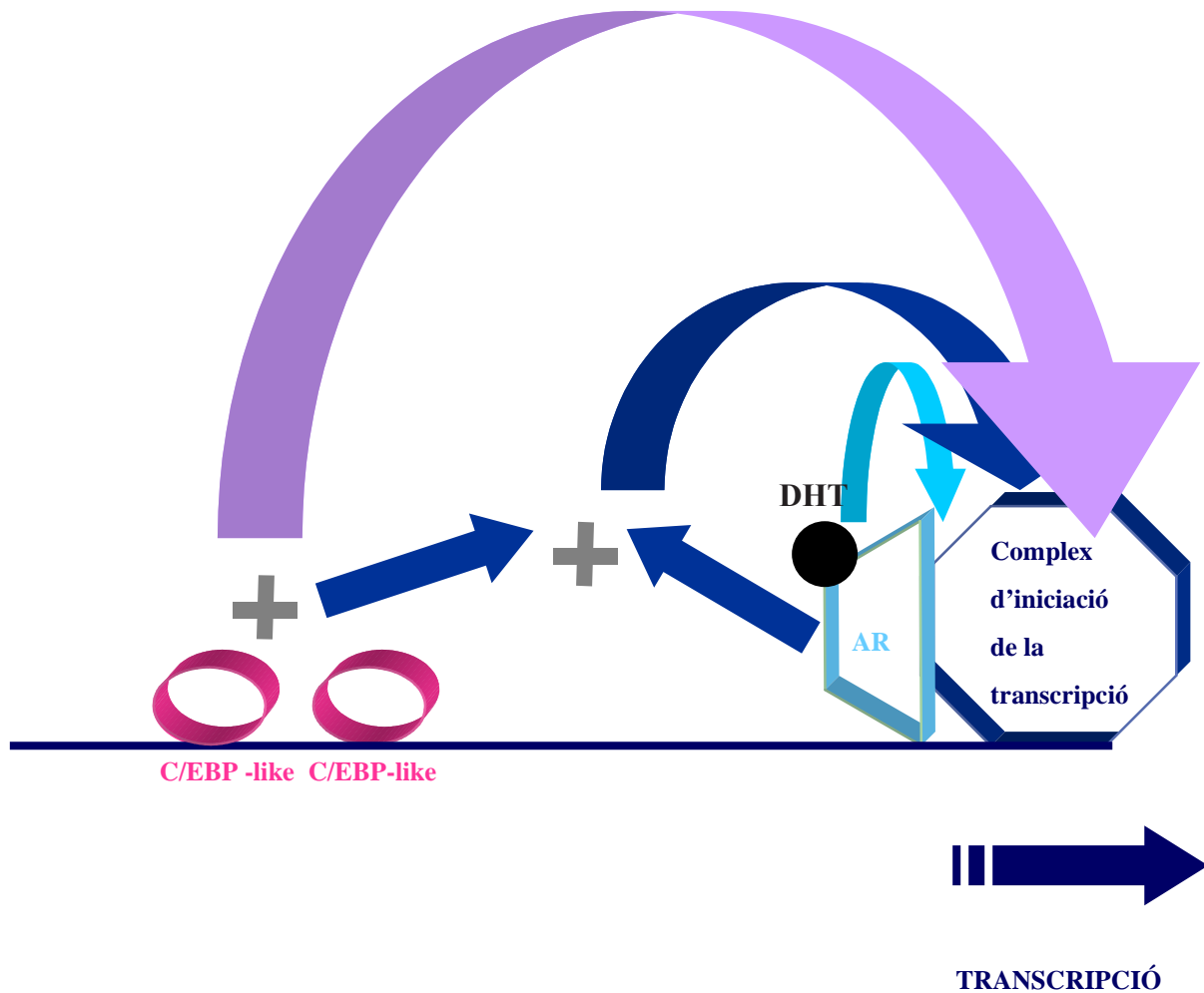


Fig. 20. Model hipotètic de la transactivació dependent d'andrògens del promotor del gen del KAP, en PCT3. El signe + significa activació o efecte conjunt. Tant l'AR induït pel seu lligand com les proteïnes C/EBP-like poden actuar independentment de l'altre o conjuntament, potenciant els seus efectes.

## Transactivació dependent d'andrògens del gen del KAP en el còrtex renal

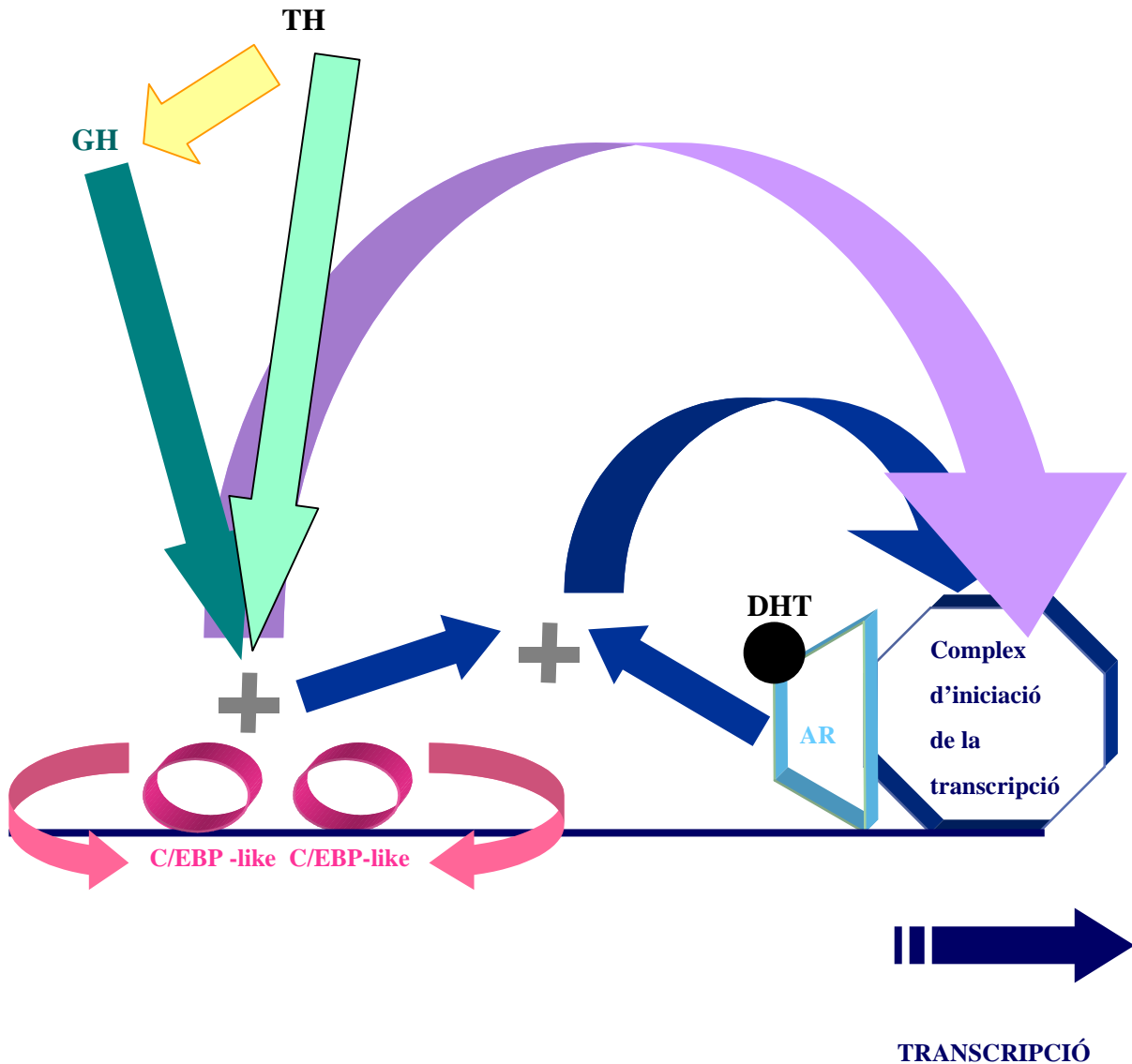


Fig.21. Model hipotètic de la transactivació dependent d'andrògens del promotor del gen del KAP, en el còrtex renal. El signe + significa; activació; efecte conjunt; efecte traduccional o postraduccional sobre una proteïna, com pot ser l'efecte putatiu de  $T_3$  sobre C/EBP-like; o d'autoregulació, per l'indicat per C/EBP-like.  $T_3$  potenciarà l'efecte androgènic a través de proteïnes C/EBP-like, amb capacitat d'autoregulació.