

UNA NUEVA APROXIMACIÓN A LA DIABETES INSÍPIDA NEFROGÉNICA DURANTE EL DAÑO RENAL CRÓNICO: LA KINASA LIGADA A INTEGRINAS MODIFICA LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINA 2 MEDIANTE NFATc



Marco Hatem-Vaquero¹, Mercedes Griera¹, Wieslawa Giermakowska², José Luis Cano-Peñalver¹, Laura V. Gonzalez Bosc², Diego Rodríguez-Puyol³, Manuel Rodríguez Puyol¹, Sergio de Frutos García¹.



¹Department of Systems Biology, Physiology Unit, Universidad de Alcalá and ³Biomedical Research Foundation and Nephrology Department, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares., Instituto Reina Sofía de Investigación Renal and REDinREN from Instituto de Salud Carlos III, Madrid; Spain.

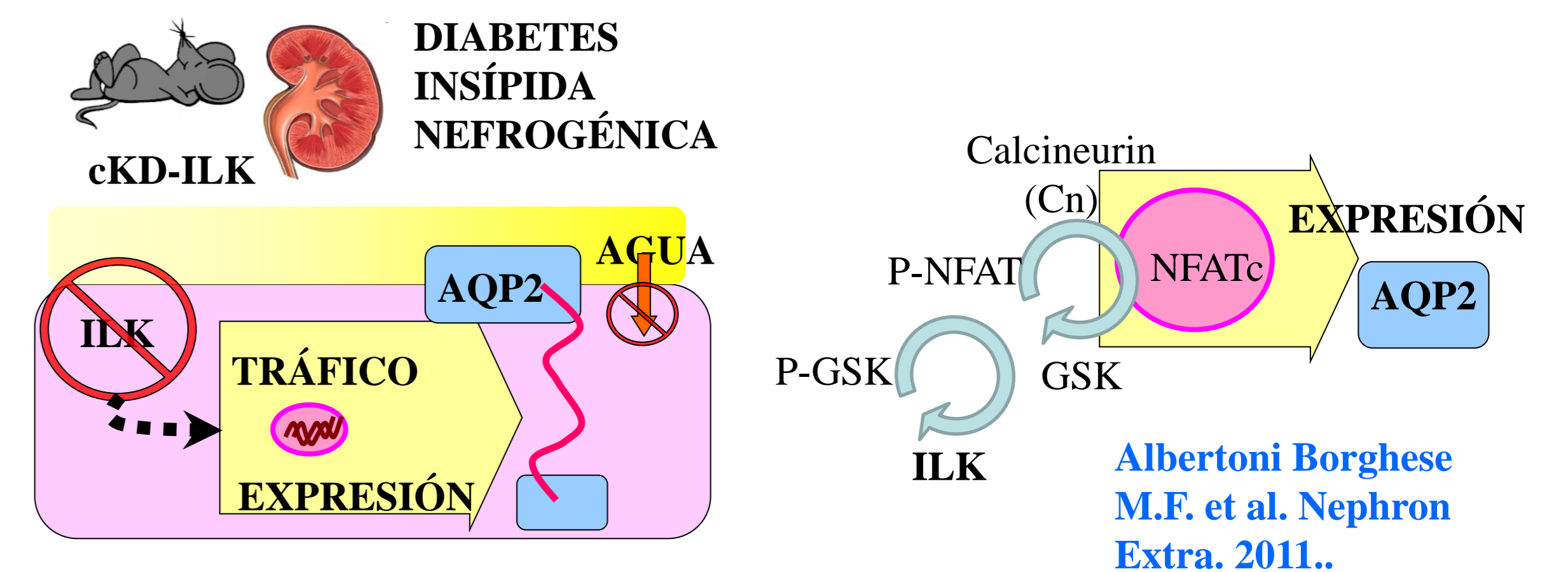


²Vascular Physiology Group, Department of Cell Biology and Physiology, University of New Mexico Health, Albuquerque, New Mexico; USA



INTRODUCCIÓN

Recientemente hemos publicado (Cano-Peñalver et al. FASEB J 2014) que la delección transgénica de la kinasa ligada a integrinas (ILK) en ratones adultos (cKD-ILK) supone un cuadro compatible con la Diabetes Insípida Nefrogénica (DIN), debido a una disminución en la expresión y la presencia en membrana apical del canal de agua tubular Acuaporina 2 (AQP2). La DIN aparece como un síntoma temprano de la enfermedad renal crónica (ERC), una de cuyas principales consecuencias es la fibrosis intersticial tubular, que supone un cambio cualitativo y cuantitativo de los elementos de la matriz extracelular y de la señalización intracelular mediante proteínas que acompañan a las integrinas, como ILK. La AQP2 es regulada transcripcionalmente entre otros por la familia de factores nucleares NFATc (Albertoni-Borghese et al. Nephron extra 2011). La internalización al núcleo de NFATc ocurre tras su defosforilación por calcineurina (Cn). Su salida la lleva a cabo la kinasa glicógeno sintasa 3 beta (GSK), la cual es inactivada por ILK.



Cano-Peñalver JL et al. FASEB J. 2014;

Albertoni Borghese M.F. et al. Nephron Extra. 2011..

MÉTODOS

Modelo Animal de delección de ILK: Animales de experimentación y manipulación de muestras: Animales con 3 meses cKD-ILK y control (WT) se les indujo ERC durante 6 semanas mediante la administración de una dieta suplementada al 0.2% de adenina (A-cKD-ILK y A-WT) o basales con dieta control. Se determinaron en extractos medulares los niveles de AQP2 total, Calcineurina A beta (Cn), GSK total y su isoforma inactiva (fosforilada en serina 9) y GAPDH mediante inmunoblot. En otros extractos medulares se activó la Cn con Ionomicina (Io) durante 24 horas.

Modelo In Vitro en células del túbulo colector (mIMCD3): Ensayo de la actividad del promotor de AQP2 y la actividad transcripcional de NFATc3: mIMCD3 sin ILK mediante silenciamiento con RNAs interferentes (siRNA-ILK) o control (CT) fueron transfectadas 24 horas después con plásmidos reporteros de la actividad del promotor de AQP2 (AQP2-Luc) o la actividad transcripcional de NFAT (NFAT-luc). se activó Cn con Io o se inhibió con Ciclosporina A (CsA) durante 24h.

Modelo animal de delección de factor de transcripción NFATc3. animales adultos KO para la isoforma de NFATc3 (NFATc3-KO) y sus correspondientes controles, medimos los volúmenes de orina durante 24 h y su osmolalidad en condiciones basales.

RESULTADOS

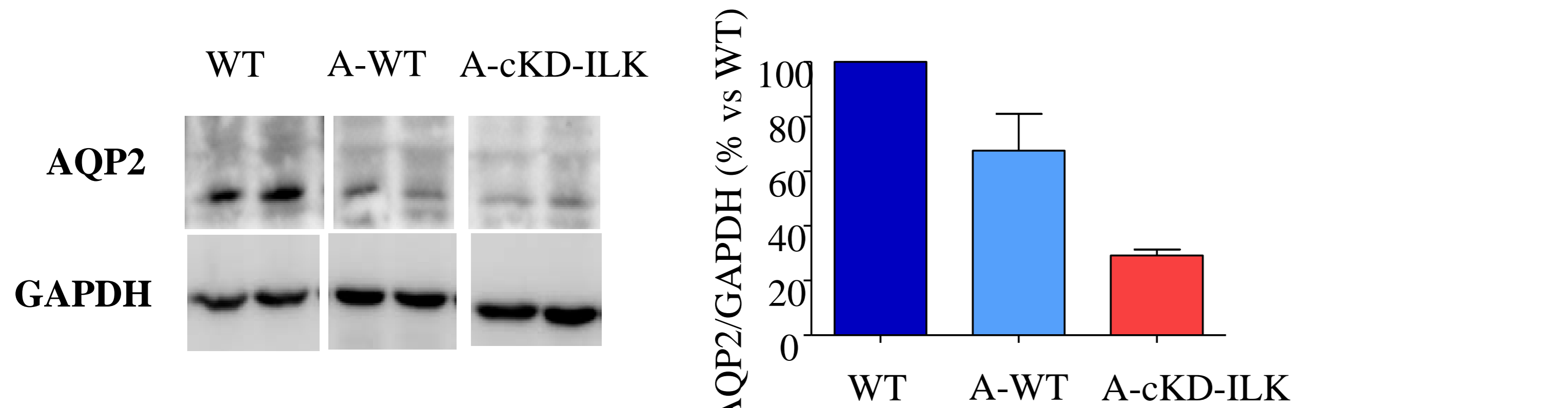


FIGURA 1: DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE AQP2 CON ERC (A-WT). EFECTO ACUMULATIVO AL DELECCIONAR ILK (A-cKD-ILK).

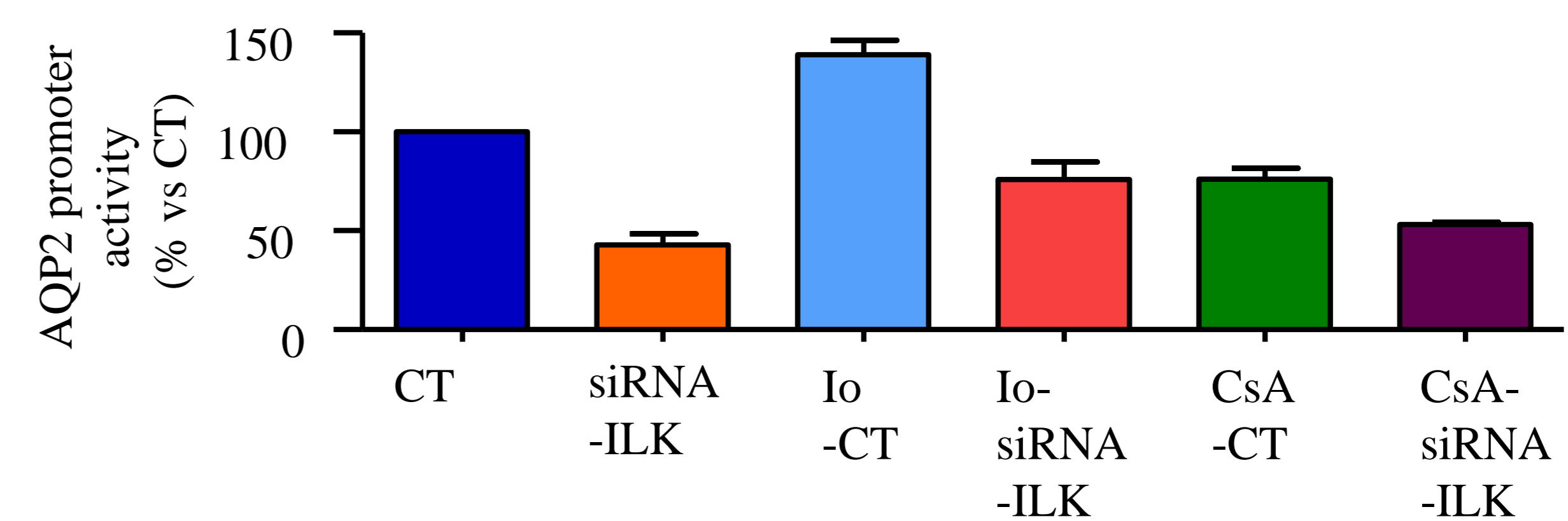


FIGURA 4: ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE AQP2 EN MIMCD3. En mIMCD3 transfectadas con AQP2-LUC, la delección de ILK (SIRNA-ILK) disminuyó basalmente la actividad luciferasa (relativa a cantidad de proteína total) con respecto a CT. La activación de Cn (Io) aumentó la actividad en células CT (Albertoni Borghese et al. 2011. Nephron Extra.), pero solo parcialmente en siRNA-ILK. La inhibición de Cn (CsA) disminuyó la actividad en CT y solo parcialmente en siRNA-ILK.

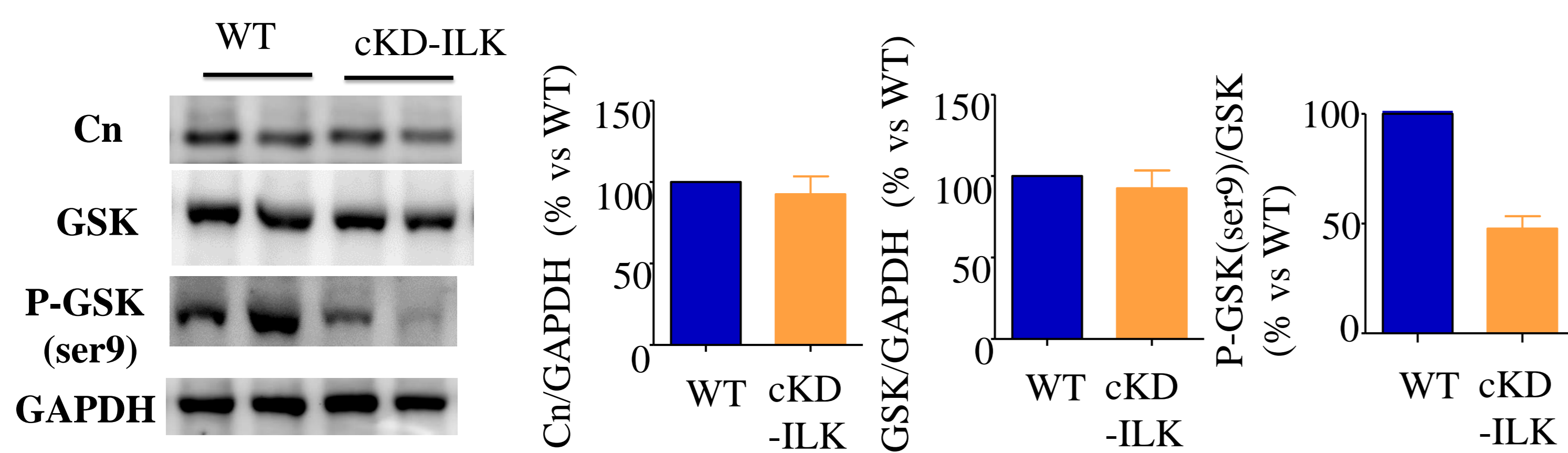


FIGURA 2: EXPRESION BASAL EN cKD-ILK Y WT DE CN Y GSK Y NIVELES DE FOSFORILACION EN SER 9 DE GSK

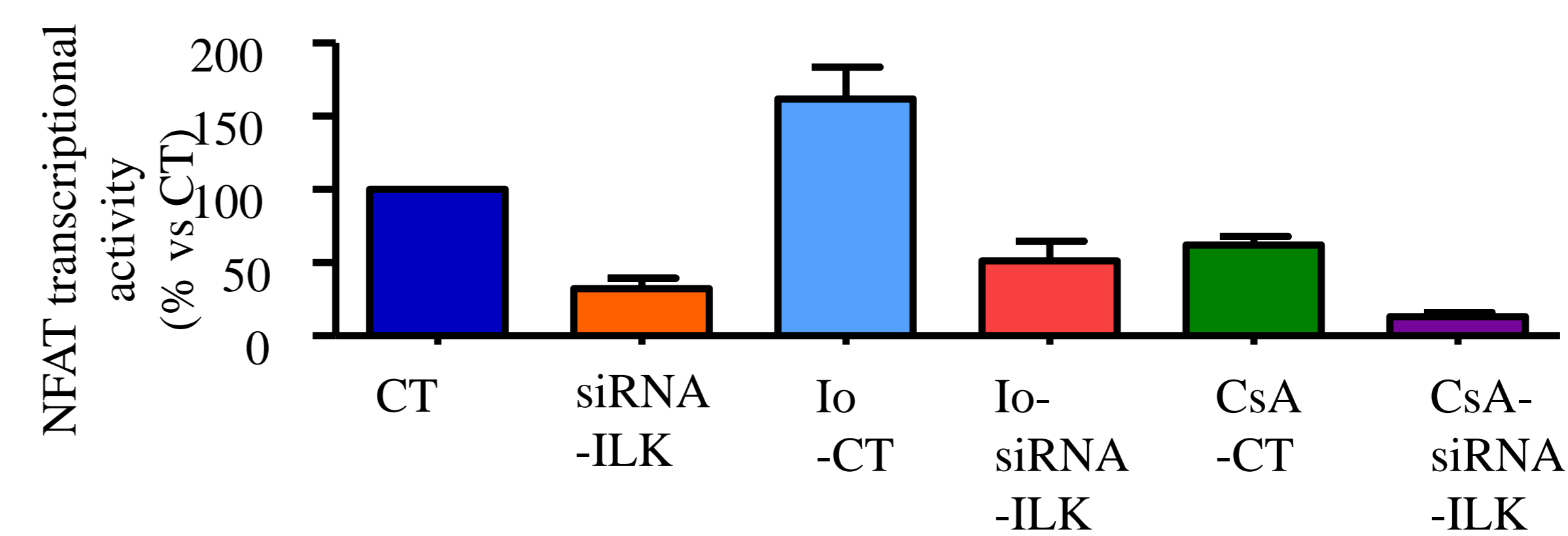


FIGURA 5: ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NFAT EN MIMCD3. En mIMCD3 transfectadas con NFAT-LUC, la delección de ILK (SIRNA-ILK) disminuyó basalmente la actividad luciferasa (relativa a cantidad de proteína total) con respecto a CT. La activación de Cn (Io) aumentó la actividad en células CT, pero solo parcialmente en siRNA-ILK. La inhibición de Cn (CsA) disminuyó la actividad en CT y acumulativamente en siRNA-ILK.

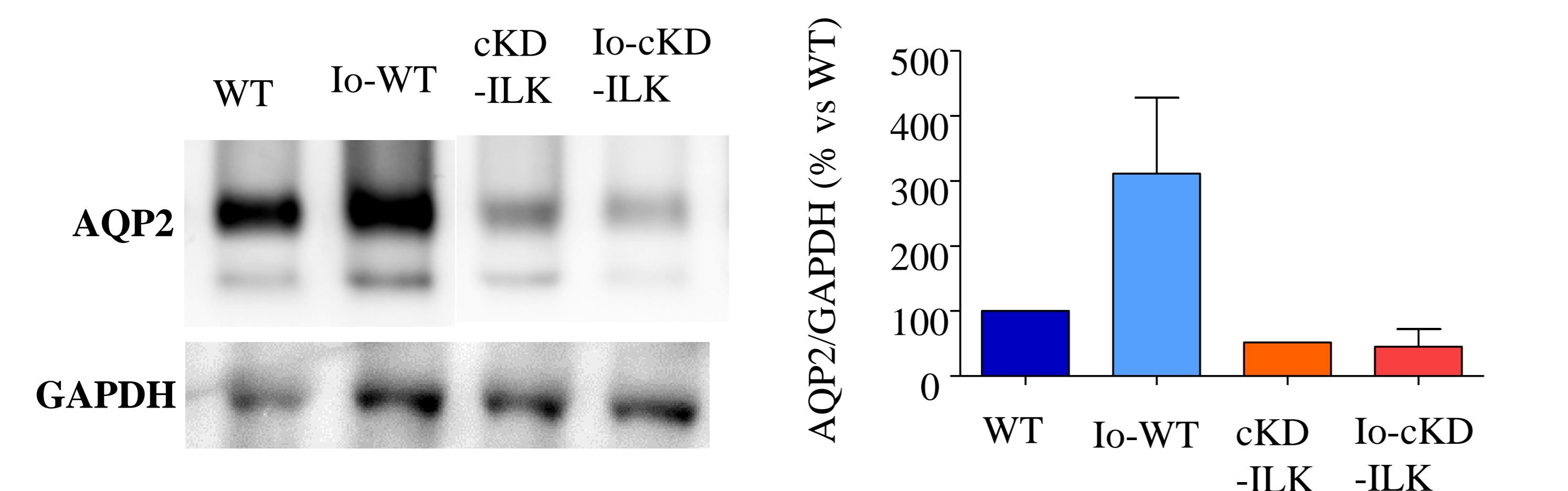


FIGURA 3: EXPRESION DE AQP2 EN CKDILK Y WT BASALMENTE Y TRAS 24 HORAS DE ACTIVACIÓN DE CN CON IO.

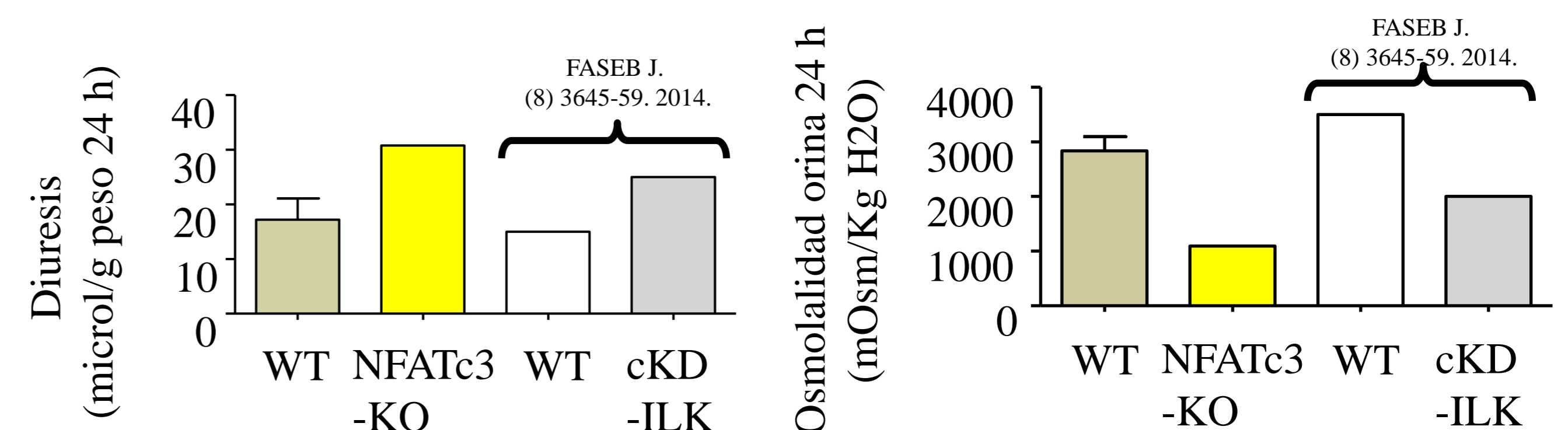


FIGURA 6: DIURESIS Y OSMOLALIDAD BASAL EN ANIMALES EN NFATC3-KO Y SUS CONTROLES. Comparativa con la media de valores basales en cKD-ILK y WT publicado en Cano-Peñalver et al. FASEB J. (8)3645-59. 2014.

CONCLUSIONES

Usando varios modelos animales e in vitro de delección de ILK o NFATc3, basalmente o en un modelo modelo de ERC, hemos visto la importancia del eje ILK-NFATc en la regulación transcripcional de AQP2. La delección de ILK disminuye la actividad transcripcional de NFATc en el túbulo, reduciendo la expresión de AQP2, posiblemente por un aumento en la actividad de GSK.

REFERENCIAS

Albertoni Borghese M.F. et al. 2011. Nephron Extra. (1):124-38.
Cano-Peñalver J.L. Et al. 2014. FASEB J. (8)3645-59..