





## **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.**

### **Programa de doctorado:**

Bioquímica clínico-médica e Inmunología.

### **Directores:**

Dr. Juan Saus Mas y Dr. Fernando Revert Ros.

Jesús Macías Campos, Valencia 2014.

### **GPBP CIRCULANTE, UN NUEVO FACTOR PATOGENICO EN LAS GLOMERULONEFRITIS MEDIADAS POR INMUNOCOMPLEJOS.**

La realización de esta Tesis Doctoral, ha sido posible gracias al programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC): SAF2001-0453; BES-2002-1015; al programa PROMETEO 2009 de la Conselleria d'Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana; y a las instituciones: Centro de Investigación Príncipe Felipe; Universidad de Valencia; y FRIBROSTATIN S.L.



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACION



**GPBP CIRCULANTE, UN NUEVO FACTOR  
PATOGÉNICO EN LAS  
GLOMERULONEFRITIS MEDIADAS POR  
INMUNOCOMPLEJOS.**

Memoria de Tesis Doctoral, presentada para optar al  
grado de Doctor por la Universidad de Valencia, por:

Jesús Macías Campos  
Valencia, 7 de mayo de 2014

“Siempre me siento feliz, ¿sabes por qué? Porque no espero nada de nadie, esperar siempre duele. Los problemas no son eternos, siempre tienen solución.....”

William Shakespeare.

“To do research in Spain is to cry”.

Santiago Ramón y Cajal.

“Más allá del mar habrá un lugar donde el sol cada mañana brille más”.

Nino Bravo.

---

1. INTRODUCCIÓN.	9
1.1. INMUNIDAD. ....	11
1.1.1. El sistema inmunitario. ....	11
1.1.2. La enfermedad autoinmune. ....	17
1.1.3. Tipos de enfermedades autoinmunes. ....	19
1.1.4. Las enfermedades autoinmunes y el riñón. ....	21
1.2. LA NEFROPATÍA IgA. ....	26
1.2.1. Una glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos. ....	26
1.2.2. La inmunoglobulina A en la patogénesis de la nefropatía IgA. ..	27
1.3. LA NEFRITIS LÚPICA. ....	29
1.3.1. La afectación renal de un lupus. ....	29
1.3.2. Bases moleculares e inmunológicas del LES. ....	30
1.3.2.1. Autoanticuerpos. ....	31
1.3.2.2. Células B y T. ....	33
1.3.2.3. Citocinas. ....	33
1.3.2.4. Apoptosis. ....	34
1.3.2.5. Sistema del complemento. ....	35
1.4. LA ENFERMEDAD DE GOODPASTURE. ....	36
1.4.1. La enfermedad de Goodpasture como modelo de enfermedad autoinmune. ....	36
1.4.2. El antígeno Goodpasture: Estructura terciaria y cuaternaria. ....	37
1.4.3. Bases moleculares de la producción de autoanticuerpos. ....	40
1.5. GPBP ( <i>Goodpasture-antigen binding protein</i> ). ....	42
1.5.1. Una proteína implicada en autoinmunidad. ....	45
1.5.2. Otras funciones biológicas de GPBP. ....	48

---

1.6. EL MODELO ANIMAL.....	52
1.6.1. Los ratones <i>New Zealand White</i> .....	52
1.6.1.1. Una cepa que desarrolla glomerulonefritis.....	52
1.6.1.2. Los ratones NZW de edad avanzada sobrepresan GPBP-1 en el glomérulo. ....	54
1.6.2. Organismos modificados genéticamente.....	57
1.6.2.1. El ratón transgénico.....	57
1.6.2.2. Principales problemas en la obtención del ratón transgénico. ....	58
2. OBJETIVOS.	61
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	65
3.1. Vectores y construcciones. ....	67
3.2. Hibridación de colonias de bacterias con sondas de ácidos nucleicos. ....	68
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	69
3.4. Mutagénesis dirigida.....	69
3.5. Cultivos celulares.....	70
3.6. Expresión de proteínas en células de mamífero. ....	70
3.7. Tratamientos celulares.....	70
3.8. <i>Western blot</i> .....	71
3.9. Obtención del ratón transgénico. ....	72
3.9.1. Microinyección de la construcción en el pronúcleo zigótico de ratón. ....	72
3.9.2. Análisis de la integración del transgén en la progenie. ....	73
3.9.3. Transmisión a la descendencia y establecimiento de familias transgénicas.....	74

---

3.10. Experimentación animal. ....	75
3.11. Análisis histológico. ....	76
3.12. Microscopía electrónica. ....	76
3.13. Anticuerpos y conjugados. ....	77
3.14. Inmunoprecipitación. ....	80
3.15. Inmunofluorescencia. ....	80
3.16. Inmunopurificación de cGPBP-1. ....	81
3.17. Purificación de poly-His-GPBP-1. ....	81
3.18. Ensayos ELISA. ....	82
3.19. Análisis estadísticos. ....	83
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>85</b>
4.1. EL RATÓN TRANSGÉNICO DE GPBP. ....	87
4.1.1. La construcción transgénica expresa FLAG-GPBP-1 humano en células HEK 293. ....	87
4.1.2. Obtención de líneas de ratones transgénicos. ....	89
4.1.3. El ratón transgénico expresa FLAG-GPBP-1 humano. ....	90
4.2. GPBP Y LA NEFROPATÍA IgA. ....	92
4.2.1. Los ratones transgénicos presentan una glomerulonefritis similar a la de los ratones NZW de edad avanzada. ....	92
4.2.2. La sobreexpresión de hGPBP-1 en los ratones transgénicos induce la desorganización del colágeno tipo IV. ....	94
4.2.3. Los ratones transgénicos desarrollan una glomerulonefritis mediada por IgA similar a la nefropatía IgA. ....	96
4.2.4. Los ratones Tg-hGPBP-1 presentan patrones de IgA similares a los ratones NZW de edad avanzada. ....	96

---

4.3. GPBP Y LA NEFRITIS LÚPICA. ....	99
4.3.1. Identificación de cGPBP-1. ....	99
4.3.2. cGPBP-1 es un nuevo mediador en la nefritis lúpica. ....	100
4.3.3. Caracterización de los anticuerpos que bloquean GPBP-1. ....	105
4.3.4. Los anticuerpos anti-GPBP-1 reducen los niveles de GPBP-1 circulante. ....	107
4.3.5. El tratamiento con anticuerpos anti-GPBP-1 mejora la NL de ratones NZW de edad avanzada mantenidos en SPF. ....	108
4.3.6. Los macrófagos son una fuente de cGPBP-1 y los inmunocomplejos estimulan su secreción. ....	109
4.3.7. Los anticuerpos anti-GPBP-1 reducen los niveles de pro-IL-1 $\beta$ en células RAW 264.7. ....	112
5. DISCUSIÓN.	115
6. CONCLUSIONES.	121
7. BIBLIOGRAFÍA.	125
8. ABREVIATURAS.	143
9. AGRADECIMIENTOS.	149

## **1. INTRODUCCIÓN.**



## **1.1. INMUNIDAD.**

### **1.1.1. El sistema inmunitario.**

El sistema inmunitario de un organismo está compuesto por un conjunto de células y tejidos cuya función es mantener la integridad del mismo frente a elementos perjudiciales. Por lo tanto el sistema inmunitario debe discernir entre lo propio y lo ajeno, así como entre lo propio y lo propio que ha degenerado. La principal función del sistema inmunitario es defensiva, y tiene una elevada especificidad en el reconocimiento de moléculas ajenas acoplada a mecanismos potentes para la eliminación de los microorganismos que las portan (Paul, 2012). Las respuestas del ser humano contra infecciones provocadas por agentes patógenos potenciales se conocen como respuestas inmunitarias. Hay dos tipos de respuestas inmunitarias claramente diferenciadas:

#### **1. Respuesta inmunitaria innata.**

Es una respuesta simple, aunque muy sofisticada y rápida, presente en todos los animales, y considerada la primera línea de defensa contra los patógenos. Los sistemas de respuesta inmunitaria innata varían desde las barreras externas como la piel, mucosas, cilios, secreciones y líquidos tisulares que contienen sustancias antimicrobianas, hasta células especializadas en reconocer diferentes clases de microorganismos, como los monocitos/macrófagos, los granulocitos polimorfonucleares, las células dendríticas, los mastocitos o células cebadas, los linfocitos citolíticos naturales o NK (*Natural killers*), y las plaquetas, o proteínas específicas como el sistema del complemento o las citocinas (Male *et al.*, 2007).

##### **A. Monocitos/macrófagos.**

Leucocitos denominados fagocitos mononucleares que tienen como función principal absorber, ingerir y destruir, tanto las partículas ajenas (p. ej. microbios) como propias (p. ej. eritrocitos viejos). Los monocitos migran

desde la sangre hasta los tejidos, donde se diferencian a macrófagos, y se determina su morfología y características funcionales (p. ej. macrófagos alveolares en los pulmones, y células de Kupffer en el hígado).

### **B. Granulocitos polimorfonucleares.**

Son un grupo de leucocitos que tienen un núcleo irregular y lobulado (polimórfico), y están implicados principalmente en la relación con los microbios extracelulares. El grupo está formado por tres tipos celulares, neutrófilos, basófilos, y eosinófilos:

**a. Neutrófilos:** Fagocitos de núcleo multilobulado que contienen un gran número de proteínas antibióticas (defensinas, seprocidinas, catelicidinas) almacenadas en sus gránulos. Su función predominante es la fagocitosis aunque también pueden liberar gránulos y sustancias citotóxicas extracelularmente y participar en la destrucción de los patógenos. Representan la mayoría de leucocitos de la sangre (60-70% en adultos).

**b. Basófilos:** Su función protectora es principalmente la defensa contra parásitos (demasiado grandes para macrófagos y neutrófilos) aunque su verdadera importancia médica reside en su participación en reacciones inflamatorias alérgicas. Los basófilos maduros presentan gránulos ricos en proteoglicanos ácidos (captan colorantes básicos) recubiertos por membranas que contienen heparina e histamina entre otras sustancias. Representan menos del 0,2% del conjunto total de leucocitos.

**c. Eosinófilos:** Son células citotóxicas que se encargan de eliminar las células infectadas del organismo liberando el contenido de sus gránulos intracelulares, proteínas básicas ricas en arginina (se tiñen con colorantes ácidos como la eosina). Estos leucocitos también tienen la capacidad de atraer y atacar a los parásitos extracelulares grandes (p. ej. esquistosomas). Aunque se encuentran pequeñas cantidades en circulación, la mayor parte están presentes en los tejidos, principalmente en el tejido

conectivo que subyace bajo el epitelio respiratorio, intestinal y urogenital, lo que implica su participación en la defensa frente a microorganismos invasores.

#### **C. Células dendríticas.**

Son la tercera clase de células fagocíticas del sistema inmunitario. Tienen prolongaciones digitiformes largas, como las dendritas de las células nerviosas, que les dan su nombre. Aunque captan partículas por medio de fagocitosis y son capaces de ingerir grandes cantidades de líquido extracelular y todo su contenido mediante un proceso conocido como macropinocitosis, su principal función es presentar los agentes patógenos e iniciar las respuestas inmunitarias adaptativas.

#### **D. Mastocitos o células cebadas.**

Células grandes que se encuentran en el tejido conectivo. Revisten las superficies corporales y sirven para alertar al sistema inmunitario con respecto a la infección local. Inducen reacciones inflamatorias secretando mediadores químicos almacenados en gránulos preformados, como la histamina. Al igual que los basófilos, presentan gránulos ricos en proteoglicanos ácidos.

#### **E. Linfocitos citolíticos naturales.**

Linfocitos granulares de gran tamaño capaces de eliminar células infectadas por virus, y algunas células tumorales, al liberar gránulos citotóxicos que contienen proteínas efectoras que penetran en la membrana celular e inducen muerte celular programada.

#### **F. Plaquetas.**

Las plaquetas de la sangre no son células, sino fragmentos derivados de los megacariocitos en la medula ósea. Contienen gránulos, microtúbulos y filamentos de actina/miosina, e intervienen en la contracción del coágulo.

También están implicadas en las respuestas inmunitarias, especialmente en la inflamación.

### **G. Sistema del complemento.**

El sistema del complemento (C) consta de un gran número de proteínas plasmáticas que interactúan entre sí tanto para opsonizar patógenos como para inducir la serie de respuestas inflamatorias que ayudan a combatir una infección. Estas proteínas son C1, C2, C3, hasta C9, capaces de dividirse en moléculas menores (componentes) como C1q, C1r y C1s, o C3a, C3b y C3c, que a su vez se unen para formar complejos como p. ej. C4b2a3b. Existen tres vías mediante las cuales puede activarse el complemento, la vía clásica, la vía de la lectina, y la vía alternativa, que se diferencian entre sí en el tipo de molécula iniciadora, pero que convergen para generar el mismo grupo de proteínas del complemento efectoras.

### **H. Citocinas.**

Las citocinas son pequeñas proteínas solubles secretadas por una célula, capaces de modificar el comportamiento de ésta u otra célula (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , etc.). La mayor parte de las citocinas secretadas por las células T reciben el nombre de interleucinas (IL; IL-2, IL-5, IL-10, etc.). Cuando las citocinas tienen propiedades quimioatrayentes, es decir, estimulan la migración y la activación de las células, se denominan quimiocinas (MCP-1, BCA-1, GRO- $\beta$ , etc.)

## **2. Respuesta inmunitaria adaptativa.**

La respuesta inmunitaria específica frente a un patógeno particular, se conoce como respuesta inmunitaria adaptativa porque ocurre durante la vida de un individuo como una adaptación frente al patógeno. Este tipo de respuesta además aumenta en intensidad a medida que aumenta el número de exposiciones al mismo agente patógeno, es decir, el sistema inmunitario

adaptativo “recuerda” al agente infeccioso, y es capaz de impedir que provoque de nuevo la enfermedad. Este fenómeno se conoce como memoria inmunológica, y establece inmunidad protectora para toda la vida del individuo. El agente patógeno particular, o en un sentido más amplio, cualquier molécula capaz de ser reconocida por el sistema inmunitario adaptativo, recibe el nombre de antígeno. Las únicas células capaces de reconocer específicamente a los antígenos, y por tanto, iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa, son los linfocitos. Existen dos tipos de linfocitos que desarrollan esta función:

#### **A. Linfocitos B.**

Células programadas genéticamente para codificar receptores de superficie específicos de un antígeno determinado. La célula B, una vez reconoce a un antígeno específico, se multiplica y se diferencia a célula plasmática. Estas células son capaces de producir grandes cantidades del receptor específico en forma soluble que será secretado al medio extracelular. Estas moléculas solubles del receptor se denominan anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), y son glicoproteínas circulantes de la sangre o de los líquidos tisulares, idénticas al receptor original, que son capaces de unirse al antígeno que activó inicialmente a los linfocitos B.

La estructura básica de las moléculas de Ig está formada por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) idénticas y dos cadenas polipeptídicas ligeras (L) idénticas, unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. Hay cinco tipos de cadena pesada: alpha ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gamma ( $\gamma$ ), y mu ( $\mu$ ), que son los que determinan las cinco clases principales de Ig: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Cada clase, puede tener varias subclases, p. ej. IgG1 e IgG3. La cadena ligera presenta dos tipos diferente de cadena: lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ), y uno u otro tipo, nunca una de cada, pueden encontrarse en cualquiera de las cinco clases de Ig.

Las secuencias de aminoácidos de los extremos amino-terminal (N-terminal) de las cadenas pesadas y ligeras varían mucho entre diferentes anticuerpos. Estos dominios variables (dominios V) conforman la región variable (región V) del anticuerpo. Esta región,  $V_H$  y  $V_L$ , según sea el tipo de cadena, le confiere al anticuerpo la variabilidad suficiente para unirse a un antígeno específico diferente, y asegurarse prácticamente el reconocimiento de casi cualquier estructura. Hacia el otro extremo de las cadenas pesadas y ligeras, se encuentran los dominios C,  $C_H$  y  $C_L$  respectivamente, que conforman la región C. Esta región C permite a la Ig reclutar otras células y moléculas, y eliminar así el antígeno unido al propio anticuerpo.

### **B. Linfocitos T.**

Células que tras el encuentro con un antígeno, proliferan y se diferencian hacia uno de los dos tipos funcionales de linfocitos T efectores:

**a. Linfocitos T colaboradores ( $T_H$ , *T-helper*)**, que a su vez se dividen en: **Linfocitos T auxiliares**, células que proporcionan señales adicionales esenciales para activar, a células B estimuladas por un antígeno para que se diferencien y produzcan anticuerpos, o a macrófagos para que sean más eficientes en la eliminación de patógenos fagocitados; **Linfocitos T reguladores**, células que se encargan de suprimir la actividad de otros linfocitos, y ayudar a controlar respuestas inmunitarias.

**b. Linfocitos T citotóxicos ( $T_C$ )**. Células cuya función es eliminar las células infectadas por virus u otros microorganismos patógenos intracelulares.

Los dos tipos de respuesta están perfectamente coordinadas para así proteger al organismo frente a cualquier agente extraño. Los leucocitos y las células accesorias que nos protegen están distribuidas por todo el cuerpo aunque preferentemente en los órganos linfoides (médula ósea, timo, bazo, nódulos linfáticos y mucosa asociada al tejido linfoide). Los órganos linfoides

se localizan estratégicamente en diferentes áreas para proteger al organismo frente a una posible infección. Las células linfoides migran entre estas localizaciones a través del torrente sanguíneo y del sistema linfático para interactuar y generar respuestas inmunitarias coordinadas que ayudan a la eliminación de patógenos y a minimizar el daño que éstos ocasionan (Male *et al.*, 2007). La capacidad que tiene el sistema inmunitario para discriminar entre los determinantes antigénicos foráneos y los expresados por el propio organismo se denomina tolerancia inmunológica (Paul, 2012).

Todas las células del sistema inmunitario proceden de unas células primordiales de la médula ósea, las células madre hematopoyéticas pluripotenciales. Estas células a su vez, dan lugar a unas células primordiales más limitadas, que son las progenitoras inmediatas de las dos categorías principales de leucocitos, la línea linfoide, y la línea mieloide, e incluso de los eritrocitos y las plaquetas. La línea mieloide comprende casi todas las células del sistema inmunitario innato. El progenitor mieloide común es el precursor de los macrófagos, de los granulocitos, de las células cebadas y de las células dendríticas del sistema inmunitario innato, e incluso de megacariocitos y eritrocitos. La línea linfoide comprende los linfocitos del sistema inmunitario adaptativo y los linfocitos citolíticos naturales de la inmunidad innata.

### **1.1.2. La enfermedad autoinmune.**

La autoinmunidad debe entenderse como un fenómeno inmunitario frente a componentes propios (autoantígenos) y, por lo tanto, como un fracaso en la tolerancia inmunológica y el establecimiento de una respuesta inmunitaria adaptativa específica contra antígenos propios (Shlomchik *et al.*, 1987). Cuando el fenómeno autoinmune se asocia a una enfermedad ésta se denomina enfermedad autoinmune (Ermann y Fathman, 2001; Lipsky, 2001). Una enfermedad se considera autoinmune cuando somos capaces de

demostrar la existencia de una respuesta autoinmune, es decir, autoanticuerpos y/o linfocitos autorreactivos asociados al establecimiento o mantenimiento de una patología independientemente de que el agente inmunológico autorreactivo desempeñe o no el papel patogénico principal (Ermann y Fathman, 2001; Lipsky, 2001). Las enfermedades autoinmunes tienen una amplia prevalencia en la población (3-8%), pueden ser fatales, a menudo ocurren en edad temprana y afectan más a las mujeres que a los hombres. La consecuencia normal de una respuesta inmunitaria adaptativa contra un antígeno foráneo es su eliminación. Sin embargo, cuando una respuesta inmunitaria se desarrolla contra antígenos propios, generalmente es imposible eliminarlos completamente. La consecuencia es que las vías inmunitarias efectoras, causan inflamaciones crónicas dañinas para los tejidos, que pueden resultar mortales (Murphy *et al.*, 2009). En otros casos autoanticuerpos dirigidos contra receptores funcionales de la superficie celular estimulan o inhiben funciones celulares específicas y median enfermedades en las que la destrucción celular no es un hallazgo patológico relevante (Bona y Theofilopoulos, 2002).

Aunque está ampliamente aceptado que las enfermedades autoinmunes se producen por un fracaso en la tolerancia inmunológica no se conoce el mecanismo íntimo por el que un número limitado y específico de componentes propios pueden escapar a los mecanismos de tolerancia y desencadenar una respuesta autoinmune. Una dificultad principal en el conocimiento de la patogenia autoinmune ha sido la escasez de información sobre la naturaleza de los autoantígenos que inician y perpetúan las respuestas autoinmunes. Además, estas enfermedades parecen ser multifactoriales y en su patogénesis se requiere de la acción concertada de factores ambientales, genéticos y, en algunos casos, también de una disfunción del sistema inmunitario (Ermann y Fathman, 2001; Lipsky, 2001).

También se ha propuesto que ciertos fenómenos autoinmunes podrían no estar estrictamente causados por un fracaso en la tolerancia sino más bien estarían desencadenados por la aparición de determinantes propios creados

de novo para los que la tolerancia no había sido previamente establecida (Saus, 1998; Bona y Theofilopoulos, 2002).

### 1.1.3. Tipos de enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes se clasifican clásicamente en sistémicas o específicas de órgano. Otras clasificaciones distinguen entre enfermedades en las cuales hay una alteración general en la selección, regulación o muerte de células T o B y enfermedades en las cuales hay una respuesta aberrante hacia antígenos particulares que causan la autoinmunidad (Davidson y Diamond, 2001).

Las **enfermedades autoinmunes sistémicas** afectan a un gran número de órganos y se asocian a menudo a la hiperactividad de linfocitos B y a un número amplio y variado de autoanticuerpos. Una de las características de este tipo de enfermedades, es la presencia de autoanticuerpos frente a antígenos de localización intracelular que no son ni órgano ni especie específicos, que suelen denominarse anticuerpos anti-antígenos nucleares (ANA, *antinuclear antigens*). Los antígenos diana suelen ser moléculas muy conservadas a lo largo de la evolución, como el ADN, las histonas y ciertas enzimas intranucleares. Las enfermedades más destacadas que cursan con ANA serían el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide, la esclerodermia o la polimiositis. Tal vez la más estudiada y que sin duda presenta más alteraciones inmunológicas es el LES.

En las **enfermedades autoinmunes específicas de órgano**, los autoanticuerpos se dirigen específicamente contra un órgano o un tipo celular concreto de un órgano determinado, y los autoanticuerpos o son especie específicos o reaccionan con más alta afinidad con antígenos de la propia especie. Las enfermedades más conocidas son la miastenia gravis, el pénfigo vulgar o la tiroiditis de Hashimoto.

Existe un grupo de enfermedades autoinmunes que por compartir características de ambos grupos, como afectar a un órgano sólo o preferentemente, pero tener autoanticuerpos contra estructuras antigénicas diversas sobre todo nucleares, son difíciles de incluir en las dos anteriores clasificaciones. Como son la cirrosis biliar primaria, la hepatitis autoinmune, y el síndrome de Sjögren (**Tabla I**).

**Tabla I: Enfermedades autoinmunes más comunes y sus autoanticuerpos característicos.**

<b>Enfermedad</b>	<b>Autoanticuerpos</b> (abreviaturas en inglés)
Lupus eritematoso sistémico	Anti-antígenos nucleares y anti-antígenos nucleares extraíbles (ANA y ENA).
Esclerodermia	Anti-antígenos nucleares, anti-topoisomerasas y anti-centrómeros (ANA, ATA y ACA).
Polimiositis	Específicos de la miositis y asociados a la miositis (MSA y MAA).
Diabetes tipo I	Anti-islotos pancreáticos y anti-insulina (ICA y IAA).
Enfermedad de Goodpasture	Anti-colágeno IV (anti-COL4).
Enfermedad celíaca	Anti-endomiso (EMA).
Pénfigo vulgar	Anti-desmogleina 3 (anti-Dsg3) de células epidérmicas.
Miastenia gravis	Anti-receptor de la acetilcolina (anti-AChR).
Tiroiditis de Hashimoto	Anti-peroxidasa tiroidea y anti-tiroglobulina (anti-TPO y anti-TG).
Cirrosis biliar primaria	Antimitocondriales (AMA).
Hepatitis autoinmune tipo 1	Anti-antígenos nucleares y anti-musculo liso (ANA y SMA).
Hepatitis autoinmune tipo 2	Anti-microsomas del hígado-riñón tipo 1 (anti-LKM-1).
Síndrome de Sjögren	Anti-antígenos nucleares (ANA).

#### 1.1.4. Las enfermedades autoinmunes y el riñón.

El riñón es un órgano del aparato urinario situado en la pared posterior del abdomen y que se extiende entre la última vértebra torácica y la tercera lumbar. Cuando se secciona longitudinalmente (**Figura 1A**), se observan en él dos porciones de una estructura diferente: la corteza, de un color rojo burdeos, y la médula, de una tonalidad rosácea. El borde medial del riñón está excavado formando el seno renal.

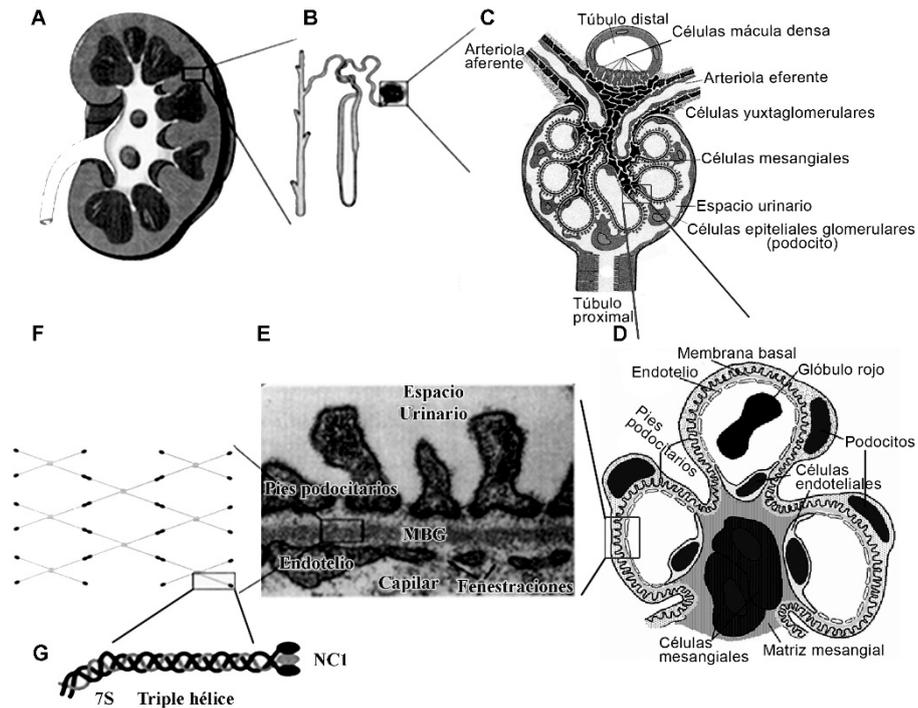
El riñón está compuesto por multitud de nefronas (**Figura 1B**), la unidad funcional del riñón encargada de filtrar la sangre y reabsorber las sustancias útiles del filtrado. La orina se filtra en los glomérulos (**Figura 1C**), y es vertida a los conductos colectores que desembocan en los cálices menores de la pelvis renal. El glomérulo renal está formado por una red de capilares, células mesangiales y la cápsula de Bowman. La barrera de filtración glomerular está compuesta por células endoteliales que presentan fenestraciones (endotelio fenestrado), una membrana basal, y por células epiteliales denominadas podocitos (**Figura 1D**).

Las membranas basales son estructuras laminares especializadas de la matriz extracelular que separan las células de un tejido del tejido conectivo, y están formadas por una trama de fibras reticulares y sustancia intercelular con mucopolisacáridos. Entre las múltiples funciones en las que se hallan implicadas las membranas basales se han establecido varias principales tales como la ultrafiltración (Rennke *et al.*, 1975), servir de soporte físico (Timpl *et al.*, 1981), y actuar como substrato para procesos de adhesión (McCarthy y Furcht, 1984) y migración celular (Haberern y Kupchik, 1985).

La membrana basal glomerular (MBG) procede de la fusión embrionaria de dos membranas basales, una sintetizada por el endotelio fenestrado y otra por los podocitos (**Figura 1E**). La MBG tiene un grosor de 240 a 340 nm y está hecha de una gran malla reticular de colágeno tipo IV,

glicoproteínas y proteoglicanos como p. ej. el heparán sulfato y una proteína denominada laminina. Durante los últimos veinte años se creía que la función fisiológica más relevante de la MBG era la ultrafiltración de la sangre para producir la orina primaria (Rennke *et al.*, 1975), donde la MBG actuaría como un tamiz que retiene las proteínas en la sangre, evitando que pasen a la orina (proteinuria, signo indicativo de fallo renal). Recientemente este concepto ha cambiado: ratones con bajos niveles de proteoglicanos heparán sulfato, en los que la carga negativa de la MBG se pierde, no desarrollan proteinuria. Por otro lado, ratones con mutaciones en el colágeno tipo IV con hematuria, tienen una proteinuria leve. Estos resultados ponen de manifiesto que el papel de la MBG como barrera de filtración macromolecular no es tan relevante como se creía, y su principal función sería la de servir como estructura de soporte para los podocitos y las células endoteliales de los capilares (Chiang e Inagi, 2010).

El colágeno IV es el principal componente estructural de las membranas basales sobre el que se ensamblan el resto de los componentes (**Figura 1F**). La molécula de colágeno IV o protómero, está compuesta por tres cadenas  $\alpha$  que se superenrollan y generan una estructura característica denominada triple hélice (**Figura 1G**). En mamíferos existen seis genes que codifican cadenas  $\alpha$ , desde  $\alpha 1$  hasta  $\alpha 6$ , según se fueron descubriendo (Borza *et al.*, 2002). La molécula de colágeno IV posee tres dominios principales, un dominio central en triple hélice con una secuencia característica G-X-Y necesaria para que las tres cadenas se puedan enrollar, un dominio amino-terminal (N-terminal) también triple helicoidal denominado 7S, y un dominio carboxi-terminal globular (C-terminal) no colagenoso, denominado NC1 (Hudson *et al.*, 2003). Estudios de microscopía electrónica muestran que los dominios 7S y NC1, son los dominios de la molécula que más interaccionan (Timpl *et al.*, 1981).



**Figura 1. Estructura de la red de colágeno en la membrana basal glomerular.** Se representa: **A.** Corte sagital de riñón humano; **B.** Nefrona renal; **C.** Glomérulo renal; **D.** Capilares glomerulares; **E.** Micrografía electrónica de una sección de la membrana basal glomerular (MBG); **F.** Estructura supramolecular del colágeno IV en forma de red poligonal tridimensional sobre la que se ensamblan el resto de los componentes de la membrana basal; **G.** Molécula de colágeno (protómero) en la que se distinguen tres dominios estructurales: dominio 7S, triple hélice y dominio NC1.

Cuatro moléculas interactúan a través de sus dominios 7S, y los dominios NC1 de dos moléculas interactúan dando lugar a una estructura hexamérica o "hexámero". Los dominios NC1 individuales están estabilizados por puentes disulfuro intramoleculares y puentes disulfuro intermoleculares que estabilizan parcialmente el hexámero (Timpl *et al.*, 1981). Entrecruzamientos a través de los dominios 7S y NC1 y otros laterales, estabilizan el entramado denso e irregular de la red de colágeno IV (Tsilibary

y Charonis, 1986). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de enlace que estabiliza el colágeno IV, los enlaces sulfilimina (-S=N-) que se forman por la unión de un residuo hidroxilisina con una metionina de protómeros adyacentes (Vanacore *et al.*, 2009). Los dominios NC1 dirigen el trenzado del protómero, y a través de motivos -RGD- también actúan como ligandos para los receptores tipo integrina situados en la superficie celular, mediando la adhesión, la migración, el crecimiento y la diferenciación celular (Vanacore *et al.*, 2009).

Muchas de las enfermedades renales con origen inmunológico son probablemente de naturaleza autoinmune, aunque no todas las enfermedades renales que tienen un componente inmunopatológico significativo son necesariamente autoinmunes. Sea cual sea el origen de la enfermedad, si esta se mantiene en el tiempo durante meses o años, la enfermedad renal se convierte en crónica, enfermedad renal crónica (ERC), cuyo estadio final, el estadio 5 o enfermedad renal crónica terminal (ERCT; *End-Stage Renal Disease*, ESRD) lleva al fallo renal que supone que el paciente empieza a someterse a diálisis y a un posible trasplante de riñón.

De las numerosas enfermedades autoinmunes que afectan al riñón, vamos a profundizar en las tres que son objeto de estudio para este trabajo y que tienen en común que cursan con depósitos de inmunocomplejos (IC) en los glomérulos: nefropatía IgA (NIgA); nefritis lúpica (NL); y enfermedad de Goodpasture (EGP). La incidencia de estas enfermedades autoinmunes en pacientes con ERCT en los Estados Unidos de América es relativamente baja, como muestra la **Tabla II**.

Tabla II. Incidencia de las diferentes enfermedades renales en pacientes con ERCT de los Estados Unidos de América durante el periodo 2000-2004.

	Pacientes totales	% incidencia
<b>ERCT total</b>	<b>497,934</b>	<b>100.0</b>
<b>Diabetes</b>	<b>220,929</b>	<b>44.9</b>
Tipo 1	19,136	3.9
Tipo 2	201,793	41.0
<b>Glomerulonefritis (GN)</b>	<b>40,588</b>	<b>8.2</b>
Glomeruloscler. focal/GN focal	11,202	2.3
Nefropatía membranosa	2,178	0.4
GN membranoproliferativa	1,673	0.3
<b>Nefropatía IgA (Berger)</b>	<b>3,798</b>	<b>0.8</b>
Nefropatía IgM	453	0.1
<b>Síndrome Goodpasture</b>	<b>589</b>	<b>0.1</b>
GN rápidamente progresiva	1,584	0.3
GN post-infecciosa	448	0.1
GN	17,362	3.5
Otras GN proliferativas	1,301	0.3
<b>Glomerulonefritis secundaria/vasculitis</b>	<b>10,536</b>	<b>2.1</b>
Poliarteritis	259	0.1
<b>Lupus eritematoso</b>	<b>5,408</b>	<b>1.1</b>
Granulomatosis de Wegener	1,327	0.3
Síndrome de Henoch-Schonlein	145	0.0
Vasculitis y sus derivados	1,082	0.2
Esclerodermia	820	0.2
Síndrome urémico hemolítico	747	0.2
Nefropatía: heroína/rel. abuso	198	0.0
Otras GN secundarias	550	0.1

Datos obtenidos del informe anual de 2006 sobre la población de los Estados Unidos de América (*United States Renal Data System,USRDS*).

## **1.2. LA NEFROPATÍA IgA.**

### **1.2.1. Una glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos.**

La nefropatía IgA es una patología con afectación renal caracterizada inmunohistológicamente por la presencia de depósitos de inmunoglobulinas tipo A (IgA) en el glomérulo, y acompañada de una variedad de lesiones presentes en ausencia de una enfermedad sistémica. Se trata pues de una GN mediada por IC, y es considerada la enfermedad glomerular primaria más común en el mundo (Donadio y Grande, 2002).

En 1801, William Heberden fue el primero en describir esta enfermedad en un niño de 5 años de edad con dolor abdominal, hematoquecia (sangrado rectal), hematuria, y púrpura en las piernas. En 1837, Johann Schönlein describió un síndrome purpúrico asociado con dolor en las articulaciones y precipitados en la orina de niños, y más tarde, Eduard Henoch, un estudiante de Schönlein, asoció el dolor abdominal con el trastorno renal en un síndrome. Finalmente, en 1968, Jean Berger y Nicole Hinglais descubrieron por primera vez el depósito de IgA en esta forma de GN, de ahí el nombre de enfermedad de Berger que se utilizaba en el pasado (Haas, 2007).

La NIgA no es la única enfermedad que cursa con depósitos de IgA, hay otras enfermedades entre las cuales destaca la enfermedad púrpura o Síndrome de Schönlein-Henoch, considerada una forma sistémica de la nefropatía por IgA. La NIgA y el Síndrome Schönlein-Henoch se consideran las dos causas primarias asociadas al depósito de IgA en el glomérulo, mientras que como causas secundarias aparecen enfermedades relacionadas con el hígado, la piel o el intestino, infecciones víricas, nefropatías diabéticas, o enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren, o la enfermedad de Goodpasture (Donadio y Grande, 2002).

### 1.2.2. La inmunoglobulina A en la patogénesis de la nefropatía IgA.

La IgA es el principal anticuerpo de las secreciones mucosas del organismo. La mayor parte se produce en las propias mucosas y el resto en la médula ósea y en algunos órganos linfoides periféricos, de ahí que también esté presente en la circulación sistémica. En humanos la IgA se presenta en dos subclases, IgA1 e IgA2, y ambas pueden existir como monómeros o polímeros, principalmente dímeros. La IgA1 es la más abundante (90%) y es la IgA predominante en el suero.

La principal diferencia estructural entre estas subclases es la presencia de una “región bisagra” de 18 aminoácidos situada entre los segmentos C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub> de la cadena pesada en la IgA1. Si el anticuerpo tiene que ser secretado, los monómeros de una u otra subclase se asocian entre sí mediante una secuencia de unión (*joining chain*) para formar los polímeros, generalmente de dos unidades (dímeros) aunque pueden unirse hasta cuatro. Los polímeros necesitan de otro polipéptido, el “componente de secreción”, para poder ser exportado al medio extracelular y realizar así su función en las secreciones de las mucosas (Donadio y Grande, 2002; Barratt *et al.*, 2004).

La acumulación de complejos de polímeros de IgA1 en áreas del mesangio glomerular tras 20 años con la enfermedad, puede culminar en un 30-40% de los casos con enfermedad renal crónica terminal (ERCT) (Tanaka *et al.*, 2011). Esta evolución se produce en tres pasos (Monteiro, 2005):

**1. Generación aberrante de IgA1 glicosilada, y formación de complejos IgA1.** Dado que el depósito mesangial de IgA es exclusivamente de la subclase IgA1, se considera que la única estructura que puede estar involucrada es la región bisagra. Esta región contiene residuos de serina o treonina susceptibles de una O-glicosilación que genera IgA1 deficiente en galactosa (Suzuki *et al.*, 2008). La formación de los complejos IgA1 depende a su vez de tres factores:

**a. La autoagregación de la IgA1 anormalmente glicosilada.**

**b. La formación de complejos a través de la unión al receptor I del Fc de la IgA (Fc $\alpha$ RI).** Este receptor, que es soluble y se expresa en las células mieloides sanguíneas, se ha encontrado únicamente en el suero de pacientes con NIgA. Diferentes estudios han demostrado que la interacción de la IgA aberrante con el Fc $\alpha$ RI provoca una escisión del dominio extracelular del receptor, liberando así el complejo IgA/Fc $\alpha$ RI a la circulación. La detección de este complejo circulante solamente en pacientes sugiere que existe una relación directa de la glicosilación defectuosa de la IgA y su unión al Fc $\alpha$ RI con la patogénesis de la enfermedad.

**c. El aumento del tamaño de los complejos por unión de la IgA a otros componentes.** La IgA1 anormalmente glicosilada puede interaccionar con otras proteínas, como fibronectina y colágeno. Además, se ha demostrado que la hipogalactosilación genera determinantes antigénicos en las IgA1 que pueden ser reconocidos por anticuerpos IgG y otras IgA1, generando así IC circulantes.

**2. Lesiones mesangiales por la interacción de los complejos IgA1 con los receptores para IgA del mesangio.** Varias proteínas pueden actuar como receptores para IgA. Una de ellas es el receptor para transferrina (TfR), que se expresa en las células mesangiales. Se ha observado que este receptor que une únicamente la IgA1 que es polimérica está sobrepresado en pacientes con NIgA, pudiendo participar en la deposición selectiva de IC de IgA1 en el mesangio. Otro de los receptores presente en las células mesangiales es el Fc $\alpha$ / $\mu$ R, un receptor para IgA e IgM expresado en algunos casos de NIgA con depósitos de IgA e IgM.

**3. Progresión de las lesiones mesangiales hacia la insuficiencia renal.**

### **1.3. LA NEFRITIS LÚPICA.**

#### **1.3.1. La afectación renal de un lupus.**

La nefritis lúpica (NL) es la manifestación en el riñón del lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad de carácter autoinmune, crónica, inflamatoria, sistémica, y con una gran heterogeneidad epidemiológica, clínica e inmunológica.

El LES es una enfermedad conocida desde hace mucho tiempo. El término lupus, lobo en latín, fue acuñado por Rogerio en el siglo XIII, y posteriormente Paracelso en el siglo XVI, para describir el eritema malar clásico, aunque ciertas características de la enfermedad fueron ya descritas por Hipócrates en el siglo IV a.C. A principios del siglo XIX el LES se representaba como la típica erupción en forma de mariposa bilateral en las mejillas y el puente de la nariz. Sería a finales del siglo XIX cuando generalmente se aprecian las manifestaciones viscerales del LES, y a principios del siglo XX cuando se considera un desorden autoinmune.

La etiología del LES es desconocida, no se conocen las causas exactas que provocan la enfermedad pudiendo influir tanto factores genéticos, infecciosos, hormonales, como factores medioambientales. Al tratarse de una enfermedad sistémica, el lupus puede afectar cualquier parte del organismo, aunque las zonas más frecuentes son la piel, el aparato reproductor, los pulmones, las articulaciones, el hígado, los riñones, los vasos sanguíneos, y el sistema nervioso. La patogénesis del LES no está completamente dilucidada, aunque el elemento principal de la enfermedad es una respuesta inmunitaria hiperactiva que ataca a las células y tejidos propios desencadenada por múltiples factores (D'Agati, 2007).

La NL es una de las principales causas patológicas y de mortalidad del LES, y se define como una enfermedad autoinmune caracterizada por una producción de autoanticuerpos acompañada del desarrollo de una GN con depósitos de IC. La progresión del LES en una NL se cree que depende de la pérdida de la propia tolerancia y la formación de autoanticuerpos que se

depositan en el riñón induciendo la nefritis (Tang *et al.*, 2005). Las diferentes clases de la NL fueron establecidas inicialmente (1974) por la Organización Mundial de la Salud, y posteriormente actualizadas (2003) por la Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad de Patología Renal (**Tabla III**).

**Tabla III. Clasificación de la NL según la Sociedad Internacional de Nefrología y la Sociedad de Patología Renal con sus características más destacadas.**

Clase	Tipo		Características
I	Mesangial mínima		Normal por MO. Inmunodepósitos mesangiales por MF.
II	Mesangial proliferativa		Hiperplasia celular mesangial, expansión de la matriz mesangial, y depósitos subepiteliales o subendoteliales por MF o ME.
III	Focal	A: Lesiones activas. A/C: Lesiones activas y crónicas. C: Crónica inactiva con esclerosis.	GN focal activa o inactiva, segmentaria, y/o endocapilar global y/o extracapilar, que afecta a <50% de los glomérulos. Inmunodepósitos subendoteliales focales con o sin alteraciones mesangiales.
IV	Difusa	S: Lesiones segmentarias G: Lesiones globales A: Lesiones activas. A/C: Lesiones activas y crónicas. C: Crónica inactiva con esclerosis.	GN difusa activa o inactiva, segmentaria, y/o endocapilar global y/o extracapilar, que afecta a ≥50% de los glomérulos. Inmunodepósitos subendoteliales difusos con o sin alteraciones mesangiales.
V	Membranosa		Inmunodepósitos subepiteliales globales o segmentarios, o sus secuelas morfológicas, con o sin alteraciones mesangiales.
VI	Esclerosa avanzada		El 90% o más de los glomérulos esclerosados sin actividad residual.

MO: Microscopía óptica; MF: Microscopía de fluorescencia; ME: Microscopía electrónica (D'Agati, 2007).

### 1.3.2. Bases moleculares e inmunológicas del LES.

Aunque entender la patogénesis del LES siempre ha sido complicado debido a la tremenda heterogeneidad en el repertorio de autoanticuerpos, poco a poco se van conociendo los mecanismos por los cuales se rompe la

tolerancia inmunológica, qué moléculas están implicadas y porqué los autoanticuerpos se depositan en las estructuras renales.

La existencia de diversas cepas de ratones de laboratorio (NZBxNZW, BXSB, SWRxSjL), que de forma espontánea presentan un cuadro clínico y patrones inmunológicos muy similares a los del lupus humano, ha permitido conocer más a fondo diversos aspectos inmunológicos y genéticos de dicha enfermedad.

### 1.3.2.1. Autoanticuerpos.

Se han identificado tres principales mecanismos que explican la presencia de inmunodepositos en el riñón:

**1. Unión de los autoanticuerpos a autoantígenos glomerulares intrínsecos.** Autoanticuerpos frente a constituyentes nucleares (anti-ADNdc, ADNsc, histonas, ribonucleoproteínas, y nucleosomas), constituyentes citoplasmáticos (anti-Sm), y constituyentes de la membrana celular (anticuerpos anti-fosfolípidos y anti-endoteliales). Los anticuerpos anti-nucleares (ANA) son los más característicos y estudiados ya que más del 95% de los pacientes presentan títulos elevados, y dentro de este grupo los anticuerpos anti-ADNdc. Estos anticuerpos son altamente específicos, presentes en el 70% de los pacientes (Ioannou e Isenberg, 2002), no todos son patogénicos, presentan una fuerte reactividad cruzada hacia componentes normales del glomérulo como polinucleótidos, fosfolípidos y proteínas, y en modelos experimentales, administrados a individuos sanos, provocaban síntomas parecidos a los de la NL. Se han propuesto dos mecanismos de acción para los anticuerpos específicos contra el ADNdc:

**a. Unión a los nucleosomas.** El ADNdc extracelular aparece principalmente en forma de nucleosomas, fragmentos de cromatina liberados por las células tras la apoptosis. Los autoanticuerpos patogénicos se unen a los nucleosomas circulantes formando complejos anticuerpo-nucleosoma que

se establecen en la membrana basal de los glomérulos (Berden *et al.*, 1999). Estos IC, capaces de activar el complemento, acabarían desencadenando una respuesta inmune y provocando una GN.

**b. Reacción cruzada.** Los anticuerpos anti-ADNdc, anti-nucleosomas, o ambos, presentan una reacción cruzada con proteínas presentes en el riñón, como p. ej. la  $\alpha$ -actinina, lo que provoca un efecto patogénico directo sobre las células del organismo (Deocharan *et al.*, 2002).

**2. Unión de los autoanticuerpos a autoantígenos no glomerulares presentes en el glomérulo.** Estos autoantígenos no glomerulares se unen a las estructuras renales al tener cierta afinidad, mediante interacciones físicas o eléctricas, hacia componentes del propio glomérulo. Uno de ellos es el ADNdc, que tiene afinidad por componentes de la matriz glomerular como el colágeno, la fibronectina, y la laminina (Izui *et al.*, 1976; Gay *et al.*, 1985; Lake *et al.*, 1985). Además suele estar unido a histonas, lo que le confiere una elevada carga positiva que le hace muy afín hacia los constituyentes negativos del glomérulo como el heparán sulfato (Termaat *et al.*, 1990 y 1992).

**3. Depósito de IC circulantes previamente constituidos.** Hay evidencias experimentales que demuestran que la existencia de IC circulantes puede predisponer al paciente a presentar ciertos patrones de NL. Una de las causas es que los inmunodepósitos en el mesangio se ven favorecidos por el depósito de pequeñas cantidades de complejos de tamaño intermedio y elevada avidéz que escapan a los mecanismos de aclaramiento del mesangio, ya que grandes cantidades de complejos de tamaño intermedio o grandes complejos pueden saturar el mesangio y afectar a la zona subendotelial (Wener *et al.*, 1987).

### 1.3.2.2. Células B y T.

**Células B.** La implicación de las células B en el desarrollo de la enfermedad se observó en modelos experimentales predispuestos a desarrollar un LES y deficientes en células B, que no desarrollaban ninguna GN (Shlomchik *et al.*, 1994). En pacientes, se observa una sobreactivación de las células B, lo que provoca una serie de anormalidades en la activación, señalización y migración de las células B, un aumento constitutivo en la expresión de moléculas coestimuladoras, un aumento en la producción de citocinas que estimulan a su vez a células B, un marcado aumento de la actividad mutacional, y anormalidades en la selección positiva y negativa de las células B (Grammer y Lipsky, 2003). Este incremento en la reactividad de las células B afecta además a la regulación de las funciones de otros tipos celulares implicados en la respuesta inmunitaria, como las células T o las células dendríticas.

**Células T.** Existe una disminución en el número de linfocitos T en pacientes con LES. Además hay una alteración en el balance entre linfocitos T citotóxicos (Tc) y linfocitos T colaboradores (Th), con una marcada reducción de los linfocitos Tc, lo que produce una reducción en la actividad supresora de las células T (Morimoto *et al.*, 1980). Estos linfocitos Tc a menudo son incapaces de regular la disminución de la producción de inmunoglobulinas policlonales y la síntesis de autoanticuerpos (Linker-Israeli *et al.*, 1990). Esta deficiencia relativa en la función supresora se debe a una deficiente fosforilación por parte de las proteínas cinasas implicadas en la transducción de la señal desde la membrana plasmática de las células T hasta la transcripción de los genes (Kammer *et al.*, 1994).

### 1.3.2.3. Citocinas.

Las citocinas son las proteínas encargadas de regular la comunicación entre células. Según su acción pueden dividirse en proinflamatorias, como el

interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o la interleucina-2 (IL-2) que son producidas por las células T colaboradoras 2 (Th2) e implicadas en la respuesta inmunitaria celular; o antiinflamatorias, como la IL-4, IL-5 e IL-10 que son producidas por las células Th1 e implicadas en la respuesta inmunitaria humoral. En muchos desordenes autoinmunes, como en el caso del LES, se ha demostrado que hay una alteración en el balance entre la producción de citocinas Th1 y Th2, y que éste juega un papel clave en la inducción y el desarrollo de la enfermedad (Akahoshi *et al.*, 1999). Históricamente el LES fue considerada una enfermedad tipo Th2, ya que los pacientes tenían mayores niveles en suero de citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-6 e IL-10 (Llorente *et al.*, 1993) y menores niveles de citocinas proinflamatorias como IL-2 (Klinman y Steinberg, 1995), hasta que se demostró un aumento significativo en los niveles de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  (Al-Janadi *et al.*, 1993).

#### **1.3.2.4. Apoptosis.**

La apoptosis es uno de los mecanismos capaces de explicar cómo el sistema inmunitario reconoce preferentemente los antígenos intracelulares propios. Las células que mueren presentan en su interior multitud de antígenos propios. En condiciones fisiológicas la eliminación de estas células apoptóticas está finamente regulada por un sistema de receptores en las células fagocíticas y moléculas puente, que detectan moléculas específicas de la superficie de las células que mueren. Algunos pacientes con LES tienen alterada la capacidad para eliminar el material apoptótico, dando lugar a una elevada producción de macrófagos, que presentarían los antígenos intracelulares a las células T y B, provocando así la ruptura de los mecanismos centrales y periféricos de la tolerancia frente a antígenos propios (Munoz *et al.*, 2005).

### 1.3.2.5. Sistema del complemento.

Los individuos que presentan anomalías en la vía clásica del complemento tienen mayor riesgo de presentar LES. Algunas de estas anomalías están relacionadas con deficiencias hereditarias en los componentes del complemento, y otras están relacionadas con deficiencias adquiridas durante los periodos de actividad de la enfermedad (Atkinson, 1988; Sturfelt y Truedsson, 2005).

Las deficiencias heredadas de los componentes del complemento en el LES afectan mayoritariamente al componente C2 y C4. Las deficiencias pueden ser homocigóticas, llevando a la completa ausencia de ese componente del complemento, o heterocigóticas, causando aproximadamente el 50% de reducción en los niveles séricos. En algunos individuos, la deficiencia en el complemento es causada por un alelo nulo, lo que significa que el gen está presente, pero la proteína no. El alelo nulo C4A es la deficiencia hereditaria del complemento más común identificada en pacientes con LES. La deficiencia en el complemento C2 la segunda (Fielder *et al.*, 1983; Agnello, 1986). También se han identificado deficiencias en C1 y CR1, C3, C5, C6, C7, C8 y C9 en algunos pacientes con LES. Las deficiencias del complemento están implicadas en la patogenia del LES a través de sus efectos reguladores sobre la función de las células B, de las citocinas, y de los restos celulares necróticos y la apoptosis (Sturfelt y Truedsson, 2005).

#### **1.4. LA ENFERMEDAD DE GOODPASTURE.**

##### **1.4.1. La enfermedad de Goodpasture como modelo de enfermedad autoinmune.**

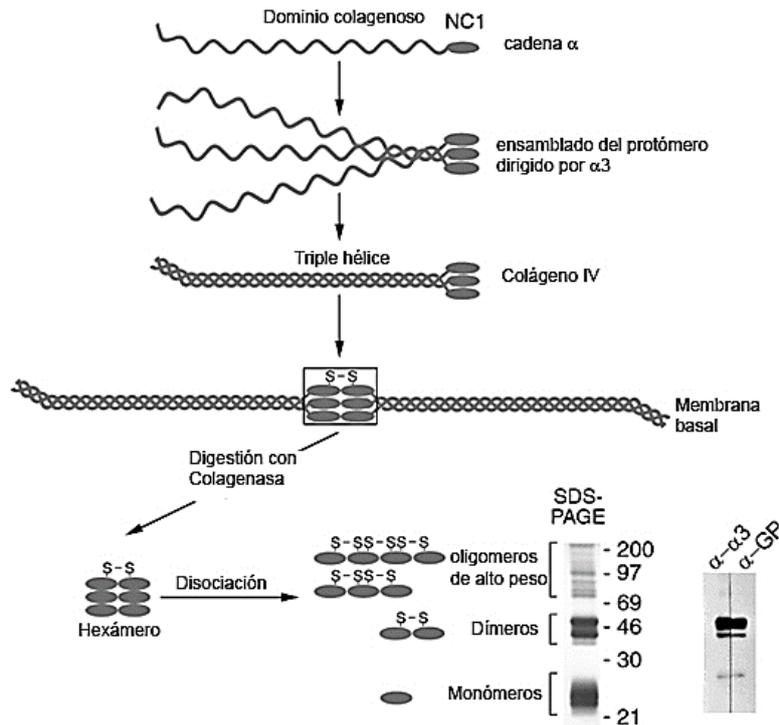
En 1919, Ernest Goodpasture describió la coexistencia de una hemorragia pulmonar y una GN rápidamente progresiva en un hombre joven que había sido víctima de una gripe pandémica (Goodpasture, 1919). Posteriormente, el término síndrome de Goodpasture fue acuñado para describir la coexistencia de estas manifestaciones (Stanton y Tange, 1958) y más tarde, se ha utilizado para designar un desorden autoinmune que cursa con una GN rápidamente progresiva, presencia de autoanticuerpos circulantes y depósitos de los mismos a lo largo de la membrana basal glomerular con la asociación frecuente de hemoptisis.

La implicación de los autoanticuerpos en la patogénesis de GN humanas fue inicialmente propuesta por Scheer y Grossman al observar la presencia de depósitos lineares de anticuerpos a lo largo de la membrana basal glomerular en pacientes con síndrome Goodpasture (Scheer y Grossman, 1964). Posteriormente, el papel patogénico de los anticuerpos en este síndrome se demostró al inducir en primates una GN similar mediante la inyección de los anticuerpos humanos extraídos a partir de riñones de pacientes Goodpasture (Lerner *et al.*, 1967).

Finalmente, la identificación del dominio carboxi-terminal no colagenoso, NC1, de la cadena  $\alpha 3$  del colágeno IV como único autoantígeno y la existencia de un epítipo principal común en todos los pacientes Goodpasture (Hudson *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 1994; Kalluri *et al.*, 1994; Saus *et al.*, 1988; Butkowski *et al.*, 1987; Wieslander *et al.*, 1984a; Wieslander *et al.*, 1984b) ha permitido acuñar el término enfermedad de Goodpasture para designar a la entidad nosológica causada por una respuesta autoinmune contra el epítipo de este dominio.

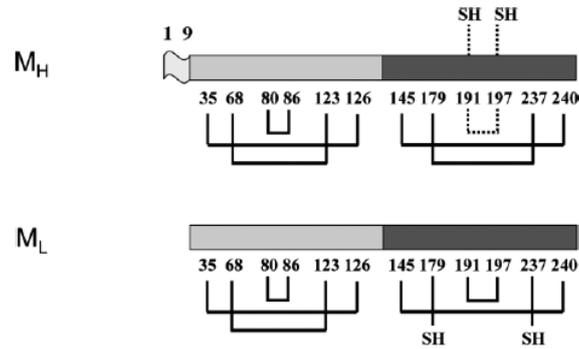
### 1.4.2. El antígeno Goodpasture: Estructura terciaria y cuaternaria.

La baja solubilidad y la alta interactividad del colágeno IV ha dificultado mucho su aislamiento obligando a que los estudios sobre su composición se hayan realizado con productos proteolíticos más manejables. En este sentido la colagenasa bacteriana ha sido una herramienta muy útil ya que solubiliza el dominio NC1 en su forma hexamérica (**Figura 2**).

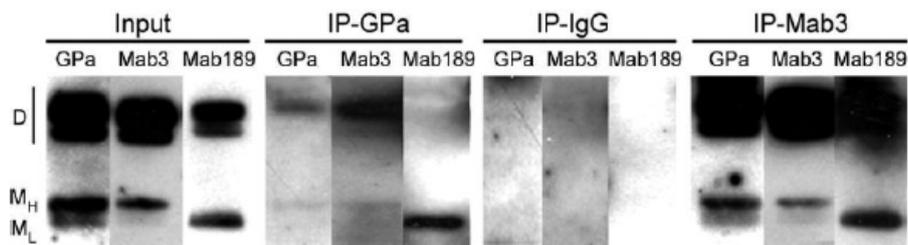


**Figura 2. Representación esquemática de la formación del hexámero de colágeno y su solubilización mediante colagenasa bacteriana.** La digestión mediante colagenasa bacteriana de la red de colágeno IV libera el hexámero formado por los seis dominios NC1 de dos moléculas de colágeno, que se disocia en monómeros y dímeros en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Mediante *Western blot* se confirma la localización del antígeno GP en el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ , oculto dentro del hexámero aislado, al incubar la misma muestra, una parte con mAb que reconocen la región N-terminal del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  humano (**izquierda**), y otra con suero que contiene autoanticuerpos GP (**derecha**).

En condiciones desnaturalizantes, el hexámero se disocia en polipéptidos sencillos, monómeros y en dímeros u oligómeros relacionados, que resultan de la unión mediante puentes disulfuro de dos o más cadenas  $\alpha$  pertenecientes a moléculas distintas. El hexámero aislado con colagenasa a partir de testículo bovino (abundante en colágeno IV), proporciona dos polipéptidos del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ , designados como  $M_H$  (monómero de alto peso molecular) y  $M_L$  (monómero de bajo peso molecular) (Calvete *et al.*, 2006). Mientras  $M_H$  contiene cuatro tripletes Gly-X-Y en el extremo amino-terminal,  $M_L$  contiene un solo triplete Gly-X-Y (Gunwar *et al.*, 1990). Estudios proteómicos dirigidos a caracterizar su estructura terciaria revelan que  $M_H$  y  $M_L$  tienen una organización intramolecular de puentes disulfuro diferente (**Figura 3**) (Calvete *et al.*, 2006). Los resultados indican que se trata de estructuras terciarias diferentes procedentes de una misma estructura primaria, por lo que las hemos denominado “confórmers”. Además, y mediante inmunoprecipitación con anticuerpos de paciente GP, se observa que  $M_L$  se ensambla en hexámeros (estructuras cuaternarias) donde el epítipo es accesible a los autoanticuerpos, mientras que  $M_H$  se ensambla en hexámeros donde el epítipo no es accesible a los mismos autoanticuerpos (**Figura 4**). Esto indica que los confórmers  $M_H$  y  $M_L$ , en condiciones nativas, se ensamblan de forma diferente en la estructura cuaternaria, presentando una exposición diferente del epítipo GP, luego la estructura terciaria condiciona en gran medida la exposición del epítipo en la estructura cuaternaria. Este hallazgo sugiere que la estructura terciaria del antígeno tiene relevancia en la patogenia de la enfermedad, y que son los anticuerpos de paciente los que discriminan las estructuras terciarias y cuaternarias.



**Figura 3. Organización intramolecular de los enlaces disulfuro en los conformémeros  $\alpha 3(IV)NC1$ .** Las barras representan los dos conformémeros principales ( $M_H$  y  $M_L$ ) con los números de las posiciones de las cisteínas (Cys) que estabilizan los dos subdominios homólogos (**negro** y **gris**) unidas por una línea. La continuidad o discontinuidad de las líneas hace referencia a la invariabilidad o variabilidad del estado redox, respectivamente. Las Cys en estado reducido se indican con SH. La secuencia amino-terminal que se proteoliza en  $M_L$  se representa en  $M_H$  con una barra ondulada.



**Figura 4. Exposición diferencial de los epítomos patogénicos.** En la figura se muestran diferentes análisis mediante *Western blot* de inmunoprecipitaciones (IP) de hexámero procedente de testículo bovino, utilizando anticuerpos: inmunopurificados de un paciente Goodpasture (GPa); IgG humana (IgG) como control negativo; o un anticuerpo monoclonal (mAb3) cuyo epítipo solapa con el epítipo de los anticuerpos de paciente (GPa) y cuya reactividad depende de la correcta formación de un puente disulfuro (David *et al.*, 2001). Se indica la movilidad de los dímeros con la letra **D**, y de los monómeros de alto peso y de bajo peso molecular  **$M_H$**  y  **$M_L$**  respectivamente. Los anticuerpos GPa extraen del hexámero preferentemente el monómero  $M_L$  (IP-GPa), que es reconocido por mAb189, un anticuerpo monoclonal que preferentemente reconoce el monómero  $M_L$ . En cambio, mAb3 no discrimina entre monómeros (IP-mAb3).

### 1.4.3. Bases moleculares de la producción de autoanticuerpos.

El colágeno IV está compuesto por seis cadenas  $\alpha$  emparentadas,  $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$ , pero sólo el dominio NC1 de la cadena  $\alpha 3$  en humanos es capaz de desencadenar una respuesta autoinmune natural. Este hecho y el alto grado de homología estructural entre cadenas y entre especies ha permitido llevar a cabo estudios comparativos encaminados a identificar rasgos biológicos de relevancia en la patogenia de esta enfermedad.

El clonado molecular de las distintas cadenas  $\alpha$  ha permitido identificar una región altamente divergente en el extremo N-terminal del dominio NC1 de la cadena  $\alpha 3$  humana que contiene un gran número de residuos fosforilables y también un motivo de reconocimiento para integrinas que forma parte de un consenso para múltiples proteínas cinasa -KRGDS9- (Quinones *et al.*, 1992). Estudios posteriores han demostrado que esta región y específicamente la Ser9 es un sitio principal de fosforilación para proteínas cinasa endógenas y que este proceso de fosforilación es característico del dominio  $\alpha 3(IV)$ NC1 humano (antígeno Goodpasture) cuando se compara con otros dominios relacionados no antigénicos (Revert *et al.*, 1995).

Otro rasgo biológico característico del antígeno Goodpasture implica la diversificación estructural que se genera mediante 'procesamiento alternativo' (*alternative exon splicing*) del correspondiente pre-ARNm. Un proceso de diversificación que es único entre las cadenas de colágeno IV y que no se observa en otros mamíferos superiores. El fenómeno de reordenamiento exónico sólo implica los exones de la región génica que codifica el dominio NC1 o antígeno Goodpasture y se han descrito hasta seis ARNm a partir del pre-ARNm de  $\alpha 3(IV)$  humano (Bernal *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994; Penadés *et al.*, 1995). En todos los tejidos estudiados el ARNm que codifica el producto primario (antígeno Goodpasture) es el más abundante y los niveles relativos de expresión de cada ARNm alternativo varían según el tejido (Bernal *et al.*, 1993). Los productos alternativos (GP $\Delta$ III, GP $\Delta$ V, GP $\Delta$ III/IV/V) divergen entre sí a través de su región C-terminal y comparten la región N-terminal

fosforilable (Penadés *et al.*, 1995). Los riñones de pacientes Goodpasture tienen niveles de expresión elevados de productos alternativos (GPΔIII) (Bernal *et al.*, 1993; Saus, 2002).

El dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  se purifica a partir de fuentes naturales como un conjunto de isómeros conformacionales (confórmeros) que muestran un contenido desigual en pSer. El confórmero más abundante, que probablemente representa la conformación nativa, es el menos fosforilado mientras que los confórmeros menos abundantes, probablemente representando conformaciones alternativas a la nativa, presentan un alto grado de fosforilación. Esto sugiere que en el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  la fosforilación puede regular el plegamiento y que la fosforilación diferencial es la estrategia que utiliza la célula para desviar el plegamiento hacia conformaciones no nativas (Saus, 2002).

El hecho de que el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  humano haya adquirido sitios de fosforilación adicionales en el extremo N-terminal y haya desarrollado un sistema de procesamiento alternativo del pre-ARNm que promueve su fosforilación, hace que sea comparativamente más fosforilable pero también con una notable susceptibilidad a sufrir un ataque autoinmune. De acuerdo con esta idea, los riñones de pacientes Goodpasture expresan niveles elevados de productos alternativos (GPΔIII) (Bernal *et al.*, 1993; Saus, 2002) y el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  aislado a partir de los mismos presenta alteraciones en su conformación que son reconocidas por los anticuerpos Goodpasture. Esto indica que en estos pacientes existe una alteración en la estructura terciaria del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  y que la enfermedad de Goodpasture está causada por una respuesta legítima del sistema inmunitario contra especies aberrantes del autoantígeno (Saus, 2002).

### 1.5. GPBP (*Goodpasture-antigen binding protein*).

Con el propósito de identificar proteínas que interaccionan con la región divergente N-terminal del antígeno Goodpasture humano, se utilizaron de forma combinada un péptido sintético de 21 residuos que representa esta región y anticuerpos monoclonales contra el mismo para rastrear bibliotecas de expresión de ADNc humanas. Mediante esta estrategia se llevó a cabo el clonado molecular de una proteína de 624 residuos que *in vitro*, y en su versión recombinante, une y fosforila específicamente tanto el péptido sintético como el antígeno Goodpasture humano y que hemos denominado GPBP (*Goodpasture-antigen binding protein*) (Raya *et al.*, 1999).

GPBP es una proteína única desde un punto de vista estructural y no han podido ser identificados genes que codifiquen proteínas semejantes en el genoma humano. Las homologías estructurales con otras especies moleculares se limitan a dominios individuales o marcas estructurales sugiriendo que se trata de una nueva enzima molecular con capacidad para transferir fosfatos y catalizar la agregación supramolecular de proteínas sustrato.

El gen que codifica a GPBP, COL4A3BP, es un gen situado junto al gen POLK, en orientación cabeza con cabeza. Este hecho hace que compartan un promotor bidireccional, modulable por el factor de necrosis tumoral TNF, una citocina proinflamatoria implicada en patogénesis autoinmunes que es capaz de potenciar la transcripción en dirección hacia GPBP, aumentando los niveles del ARNm a través del incremento en los niveles del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Granero *et al.*, 2005).

COL4A3BP expresa dos isoformas principales, GPBP-1 (previamente GPBP); y GPBP-2 (previamente GPBP $\Delta$ 26), una isoforma que se genera mediante procesamiento alternativo (*alternative exon splicing*) del

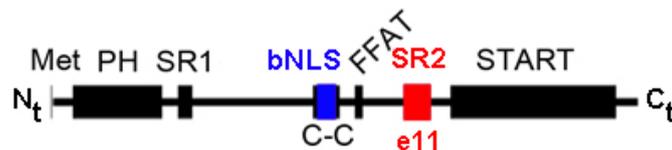
correspondiente pre-ARNm con la exclusión del exón 11 de 78 pb que codifica una región rica en serinas de 26 residuos. A su vez, el ARNm de GPBP puede sufrir una traducción tanto desde un inicio canónico (AUG) como no canónico (ACG) para generar dos polipéptidos de diferente tamaño, uno de 77 kDa, GPBP-1, y otro de 91 kDa, GPBP-3 (previamente GPBP-91 kDa). GPBP-3 es el producto primario de la traducción no canónica que además es capaz de sufrir modificaciones covalentes postraduccionales para generar un polipéptido de 120 kDa (Revert *et al.*, 2008).

Las diferentes isoformas presentan distintas localizaciones celulares: GPBP-1 aparece en el compartimento extracelular y existe como una forma soluble e inmunoprecipitable; GPBP-2 representa una forma soluble localizada en el citosol; y GPBP-3 y su variante de 120 kDa permanecen principalmente insolubles y asociadas a membranas celulares (Revert *et al.*, 2008). La multicompartmentación debida al procesamiento alternativo del exón 11 y al inicio alternativo de traducción podría ser una estrategia de la célula para coordinar diferentes funciones de GPBP.

GPBP, es decir, tanto GPBP-1 como GPBP-2, está ampliamente distribuido en los tejidos humanos. El músculo estriado es el tejido donde más se expresa GPBP. En riñón la mayor expresión de GPBP se observa en las células epiteliales de los túbulos y en células mesangiales y podocitos del glomérulo. En los alvéolos pulmonares presenta una distribución lineal que sugiere una localización en la membrana basal, además de expresarse en los neumocitos. En tejido hepático presenta baja expresión en parénquima pero alta en conductos biliares. En testículo existe alta expresión en espermatogónias contrastando con la ausencia de expresión en células de Sertoli. En páncreas GPBP se expresa principalmente en los islotes de Langerhans. En el sistema nervioso central se distribuye uniformemente por todo el cerebro, pero presenta altos niveles en las neuronas del córtex cerebral, los ganglios basales, el bulbo olfatorio, el núcleo del tálamo, en el

hipotálamo y en el área septal. También puede encontrarse en las células epiteliales del tracto intestinal (Raya *et al.*, 1999; Raya *et al.*, 2000; Mencarelli *et al.*, 2009; Revert-Ros *et al.*, 2011).

GPBP-1 presenta un alto número de aminoácidos fosforilables (17.9%) y ácidos (16%), siendo la serina el residuo más abundante (9.3%). En la región N-terminal la proteína presenta un dominio homólogo a pleckstrina (PH, *pleckstrin homology*), también contiene una región Ser-Xaa-Yaa, una señal bipartita de localización nuclear, un dominio o región que predice la formación de estructuras superhelicoidales (*coiled-coil*), un motivo FFAT (*two phenylalanine in an acidic tract*), y en la región C-terminal un dominio START (*steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer*) (Figura 5).



**Figura 5. Representación esquemática de los principales dominios y motivos estructurales de GPBP-1.** De izquierda a derecha: dominio homólogo a pleckstrina (PH), próximo a la metionina de inicio (Met); dominios ricos en serinas (SR1 y SR2), el segundo de ellos, en rojo, corresponde con el exón 11 que no está presente en GPBP-2; secuencia de localización nuclear bipartita (bNLS) en azul, situada en medio de una secuencia *coiled-coil* (C-C); motivo FFAT; y dominio START. La localización y extensión de los elementos estructurales está representada a escala.

Los dominios PH están implicados en la localización de proteínas en la membrana plasmática en respuesta a señales mediante la interacción con fosfoinosítidos (Lemmon y Ferguson, 2001; Lemmon *et al.*, 2002). Los motivos FFAT dirigen a la proteína hacia el retículo endoplasmático mediante la interacción con el dominio citosólico de las proteínas de transmembrana

VAP (*vesicle associated membrane protein-associated protein*) (Loewen *et al.*, 2003). Los dominios START están implicados en el transporte de lípidos incluyendo ceramida, fosfolípidos y esteroides (Soccio y Breslow, 2003; Alpy y Tomasetto, 2005).

La contrapartida recombinante de GPBP-1 (rGPBP-1) presenta un tamaño estimado de 89 kDa, frente a los 77 kDa que se esperan a partir de su estructura primaria principalmente por la presencia de fosforesiduos (pSer, pThr y pTyr) (Raya *et al.*, 1999).

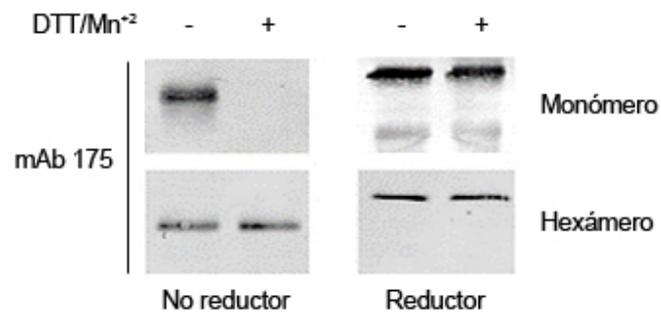
### 1.5.1. Una proteína implicada en autoinmunidad.

GPBP es una proteína capaz de transferir fosfatos a residuos serina y/o treonina presentes en su propia molécula (autofosforilación) o en proteínas sustrato (transfosforilación) a pesar de que no posee los requerimientos estructurales que definen el dominio catalítico de una proteína cinasa convencional (Raya *et al.*, 1999).

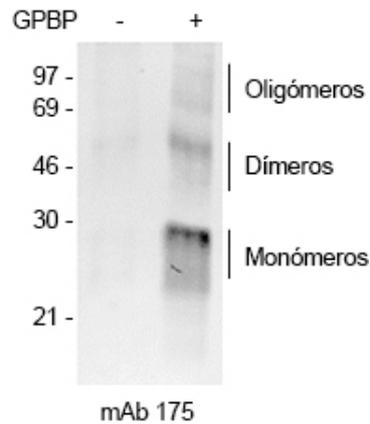
Otra actividad destacable es su capacidad para unir el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  bovino y su incapacidad manifiesta para fosforilarlo (Raya *et al.*, 1999 y 2000), revelando que su capacidad para transferir fosfatos forma parte de una catálisis enzimática más compleja.

Los confómeros del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  aislados son estructuras metaestables que promueven la formación de oligómeros mediante un proceso de reconocimiento molecular en el que la participación de los grupos fosfato es esencial. La participación de fosforesiduos en el reconocimiento molecular que media el proceso de agregación se puso de manifiesto al demostrar que la desfosforilación, tanto del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  nativo como de su contrapartida recombinante, reduce de forma muy significativa su capacidad para agregarse y también para mantener la conformación (Saus, 2002).

Cuando se ensaya *in vitro* la agregación del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  se generan agregados de muy alto peso molecular estabilizados por puentes disulfuro que no entran en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (**Figura 6**). Sin embargo, cuando estos ensayos se realizan en presencia de GPBP la formación de agregados de muy alto peso molecular se inhibe de forma muy eficiente y se originan un gran número de confómeros como paso intermediario en la formación de oligómeros que entran en el gel y presentan tamaños similares a los oligómeros nativos (**Figura 7**), sugiriendo que GPBP es capaz de catalizar la agregación supramolecular del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  *in vitro* y que probablemente forma parte de la maquinaria que cataliza la formación de la red de colágeno *in vivo* (Saus, 2002).



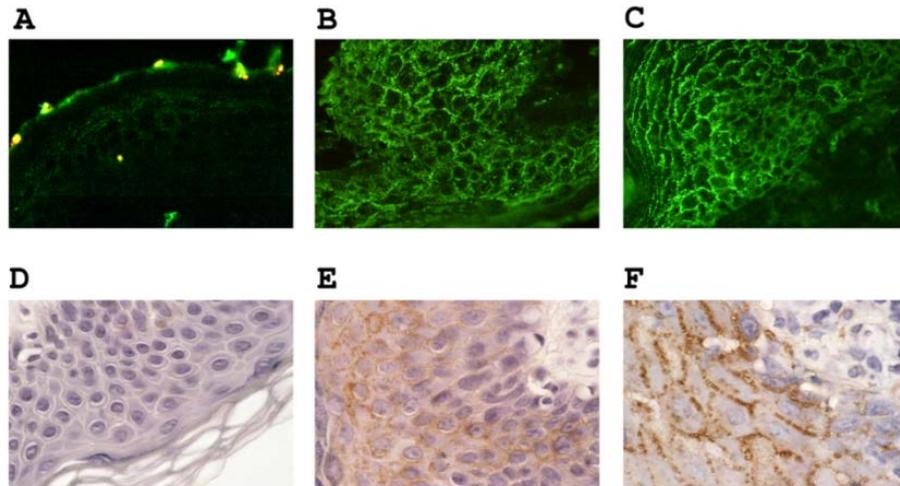
**Figura 6. Los monómeros de  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  son estructuras metaestables que se estabilizan cuando se ensamblan en el hexámero.** En presencia de un par redox (DTT/Mn<sup>2+</sup>) el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  aislado (monómero) pero no el ensamblado (hexámero) forma agregados de muy alto peso estabilizados por puentes disulfuro que no entran en el gel cuando el análisis de SDS-PAGE se realiza en condiciones no reductoras. Se muestra la región entre 20 y 30 kDa de los correspondientes estudios de inmunotransferencia utilizando anticuerpos contra el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ .



**Figura 7. GPBP cataliza la organización supramolecular del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ .** Inmunotransferencia en condiciones no reductoras del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  aislado e incubado con un par redox (DTT/ $\text{Mn}^{2+}$ ) en ausencia (-) o en presencia (+) de GPBP. Los números y barras indican el tamaño en kDa y posición de los estándar de peso molecular utilizados (*Rainbow MW Markers*, GE Healthcare).

Las dos isoformas principales de la proteína presentan diferencias tanto en su estructura como en su actividad. Así GPBP-1 forma agregados de alto peso molecular 220 kDa (trímero) y de muy alto peso molecular (superior a  $10^6$  Da) y se muestra como una cinasa más interactiva y activa que GPBP-2 que forma agregados de 310 kDa (tetrámeros) (Raya *et al.*, 2000).

GPBP presenta una sobreexpresión relativa en los tejidos y células que son diana de respuestas autoinmunes comunes, incluyendo la membrana basal alveolar y glomerular (**Figura 8**) (Raya *et al.*, 2000).



**Figura 8. GPBP se sobrexprea en respuestas autoinmunes.** Inmunoreactividad de GPBP en preparaciones de piel de individuos: control (**A**, afectado por una dermatitis inespecífica, y **D**, piel sin patología); con lupus eritematoso sistémico (**B y E**); y con un líquen plano (**C y F**). La parte **superior** muestra imágenes obtenidas por inmunofluorescencia, mientras que las imágenes de la parte **inferior** fueron obtenidas por técnicas inmunohistoquímicas.

### 1.5.2. Otras funciones biológicas de GPBP.

#### A. Transporte intracelular.

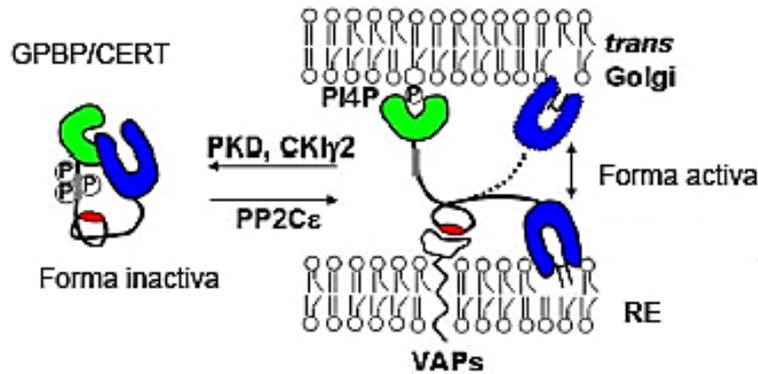
En 2003 se publica que GPBP-2 interviene en el transporte no vesicular de ceramida entre el retículo endoplasmático (RE) y el trans-Golgi, el último compartimento del aparato de Golgi que alcanzan las proteínas que se exportan. Por este motivo a GPBP-2 se la denominó CERT (*ceramide transporter*; Hanada *et al.*, 2003). La ceramida del RE es transportada por GPBP-2/CERT al trans-Golgi, donde se usa para la síntesis de esfingomielina (Hanada *et al.*, 2003) y ceramida-1-fosfato (Lamour *et al.*, 2007). Un primer modelo propuesto para realizar esta actividad comprendía cuatro fases: **1.** GPBP-2 se une a través del motivo FFAT a VAP en el RE y extrae ceramida de su membrana; **2.** Se suelta de su unión a VAP y se traslada al trans-Golgi; **3.** El dominio PH se une a fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) en el trans-Golgi

y deposita la ceramida en la membrana; y 4. GPBP-2 pierde afinidad por el PI4P y retorna al RE.

Esta actividad está regulada por el estado de fosforilación del motivo rico en serinas N-terminal (SR1) de GPBP-2/CERT. Cuando GPBP-2/CERT se fosforila en este motivo por la cinasa PKD (Fugmann *et al.*, 2007) o la CKI $\gamma$ 2, se reduce el paso de la ceramida del RE al trans-Golgi, por lo que se considera que GPBP-2 fosforilado es una forma inactiva para el transporte de ceramida (Kumagai *et al.*, 2007).

Posteriormente se observó que la interacción de GPBP-2 con VAP en la membrana del RE a través del motivo FFAT facilita la desfosforilación de la región SR1. Esta desfosforilación la lleva a cabo la proteína fosfatasa 2C $\epsilon$  (Saito *et al.*, 2008), un polipéptido transmembrana que se asocia a VAP en el RE. La consecuencia de la desfosforilación de GPBP-2 es un aumento de su afinidad por VAP, pero también por PI4P. Este hallazgo contradice el primer modelo de transporte de ceramida mediado por GPBP-2/CERT, lo que llevó a proponer un segundo modelo, que considera el hecho de que GPBP-2 desfosforilado en la región SR1 tiene mayor afinidad por VAP (RE) y por el PI4P (trans-Golgi) al mismo tiempo: la forma desfosforilada de GPBP-2 se une a la vez a ambos orgánulos, y el domino START quedaría como un brazo móvil que extraería ceramida del RE y la depositaría en el trans-Golgi (**Figura 9**).

Según este modelo, GPBP-2 desfosforilado se localizaría en los sitios de contacto RE-Golgi, que son sitios donde las membranas de ambos orgánulos se sitúan a una distancia mínima que permite que una molécula se una a ambos compartimentos a la vez. Esta localización aún no está bien definida, al no haber marcadores o proteínas que se localicen específicamente en los supuestos sitios de contacto RE-Golgi.



**Figura 9. Transporte de ceramida no vesicular mediado por GBP2/CERT.** La fosforilación del motivo SR1 por la proteína cinasa D (PKD) o la caseína cinasa I $\gamma$ 2 (CKI $\gamma$ 2), inactiva GBP2 para el transporte de ceramida, mientras que la proteína fosfatasa 2C $\epsilon$  (PP2C $\epsilon$ ) que se asocia a VAP en el RE desfosforila el motivo SR1 y activa el transporte de ceramida entre el RE y el trans-Golgi. La forma activa de GBP2 se une a la vez al RE y al trans-Golgi a través del dominio PH y el motivo FFAT respectivamente. El dominio START actúa como un brazo articulado que extrae ceramida del RE y la deposita en el trans-Golgi (Hanada *et al.*, 2009).

También se ha relacionado el estado de fosforilación de la región SR1 con la exportación de proteínas desde el trans-Golgi. La fosforilación del motivo SR1 por la PKD disminuye la secreción de proteínas. La Ser<sup>132</sup> condiciona la fosforilación del resto de serinas de SR1 y cuando se introduce una mutación que cambia la Ser<sup>132</sup> por una alanina, la proteína no es fosforilable en el motivo SR1 y se promueve la exportación de proteínas al medio extracelular (Fugmann *et al.*, 2007). Finalmente, otro trabajo muestra que la ceramida transportada por GBP2 es fosforilada por la ceramida cinasa produciendo ceramida-1-fosfato, que promueve la síntesis de ácido araquidónico y prostaglandina E<sub>2</sub>, moléculas de un marcado carácter pro-inflamatorio. También se muestra que niveles bajos de GBP2 dificultan la activación de esta ruta inflamatoria en respuesta a IL-1 $\beta$ , lo que sugiere que GBP2 es una nueva diana para tratamientos anti-inflamatorios (Lamour *et al.*, 2007).

**B. Desarrollo.**

GPBP-1, y no tanto GPBP-2, tiene una función relevante en la embriogénesis del pez cebra. Mientras la supresión de la expresión específica de GPBP-1 impide un correcto desarrollo del músculo esquelético y del cerebro en el pez cebra, la falta de expresión específica de GPBP-2 no impide su desarrollo. La falta de GPBP-1 provoca una apoptosis generalizada y una pérdida de tejido cerebral y muscular que impiden un correcto desarrollo del organismo (Granero-Moltó *et al.*, 2008). En este sentido se ha observado que la completa inactivación del gen de GPBP (COL4A3BP) en ratones provoca la letalidad de los embriones (Wang *et al.*, 2009).

La participación en el desarrollo cerebral y su implicación en el sistema nervioso central también está apoyada por los altos niveles de inmunoreactividad detectada en las áreas más significativas del cerebro de la rata (Mencarelli *et al.*, 2009).

Finalmente, otro estudio muestra la implicación de GPBP en el desarrollo del músculo esquelético, concretamente en el proceso de formación de las miofibrillas musculares. Mioblastos procedentes de ratones deficientes (*Knock out*) en la proteína GPBP-1 son incapaces de organizar eficientemente el material miofibrilar, mientras que mioblastos procedentes de ratones transgénicos que sobrepresan GPBP-1 muestran una miofibrillogénesis acelerada (Revert-Ros *et al.*, 2011).

## 1.6. EL MODELO ANIMAL.

### 1.6.1. Los ratones *New Zealand White*.

La endogamia de la línea de ratones *New Zealand* se inició en 1948 en los laboratorios del Dr. Bielschowsky de la Escuela Médica de la Universidad de Otago en Nueva Zelanda, quien consideraba la necesidad de obtener animales genética y nutricionalmente uniformes para la investigación del cáncer. El desarrollo de esta línea partió de una colonia de ratones importada desde los Laboratorios de Investigación sobre el Cáncer en Londres por el Dr. Hall en 1930. En 1960, el propio Hall a partir de esta colonia obtuvo de forma independiente la cepa *New Zealand White* (NZW). Aunque las líneas *New Zealand*, que incluyen *New Zealand Black* y *New Zealand Obese* entre otras, no están relacionadas directamente con la línea NZW, el hecho de provenir del mismo origen, hace que ambas líneas contengan un repertorio genético común (Bielschowsky y Goodall, 1970; Hall y Simpson, 1975).

#### 1.6.1.1. Una cepa que desarrolla glomerulonefritis.

Los ratones NZW están considerados ratones sanos pero presentan una predisposición genética a padecer una NL (Theofilopoulos y Dixon, 1985). Los datos históricos revelan que la senescencia en estos ratones está asociada con la producción de autoanticuerpos e IC mediados por una GN clínicamente silenciosa (Braverman, 1968; Hahn y Shulman, 1969; Kelley y Winkelstein, 1980). Estudios recientes determinan en estos ratones una GN con predominio de depósitos glomerulares de IgA e IgM (Marquina *et al.*, 2004), y relacionan el envejecimiento con una desorganización de la MBG, una ruptura de la MBG asociada con depósitos de IgA, y una expansión de la matriz (**Figura 10**) en el contexto de una respuesta autoinmune propensa al lupus (Revert *et al.*, 2007). Así pues, en estos ratones hay una predisposición a la aparición de los tres tipos de depósitos glomerulares más comunes, IgA,

IgG e IgM, en enfermedades humanas como la NIgA y la NL (Donadio y Grande, 2002; Balow *et al.*, 1999).

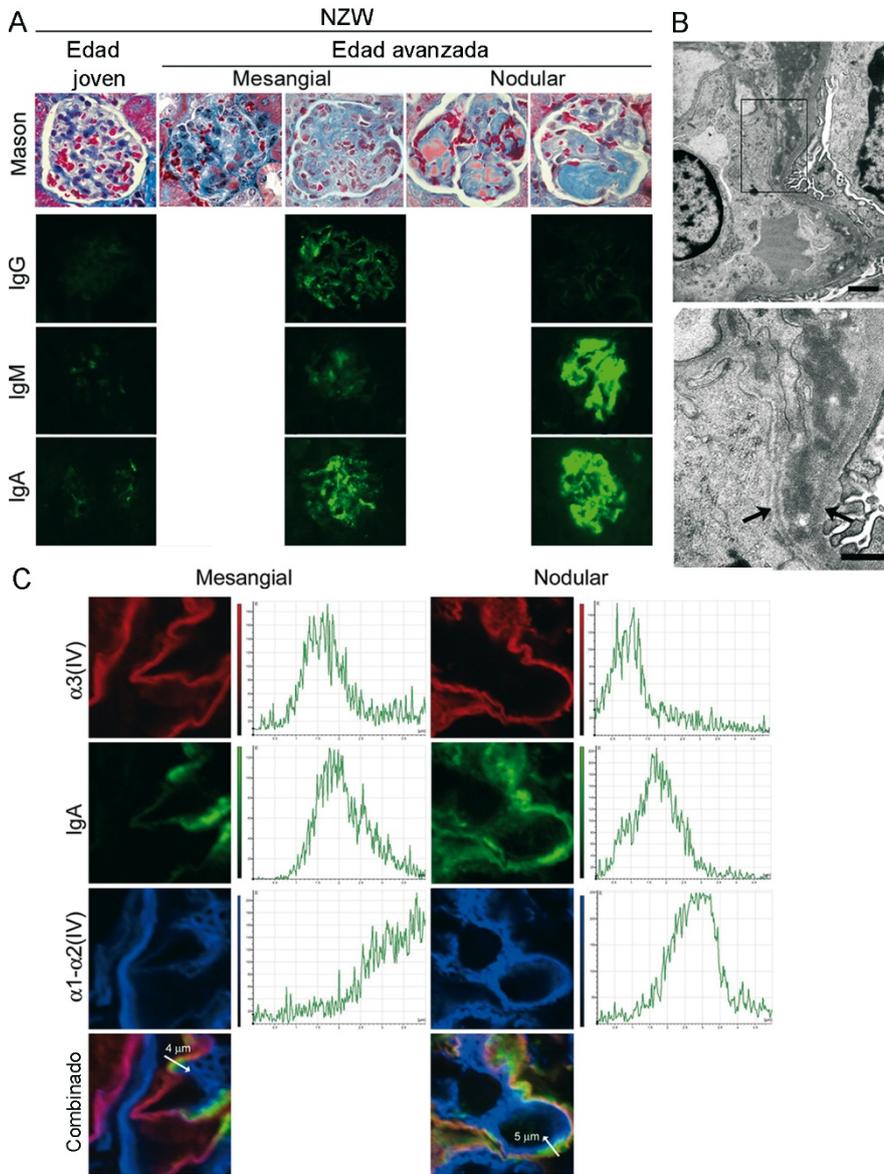


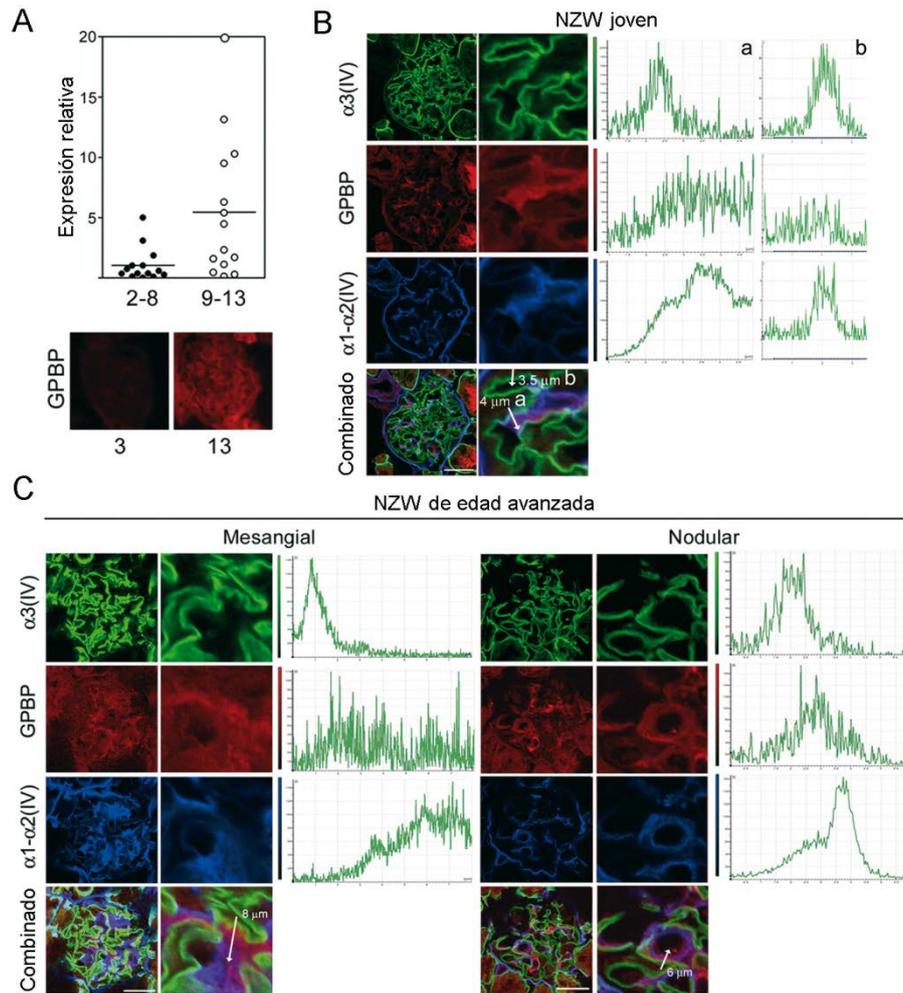
Figura 10. Los ratones NZW de edad avanzada desarrollan una GN con disociación de la MBG capilar y depósitos de IC. A: Estudio de secciones glomerulares de los ratones indicados

y la GN indicada mediante: tinción tricrómica de Mason (n= 60) en la parte **superior**; e inmunofluorescencia directa (n= 12) en la parte **inferior**. **B**: Análisis de ME que muestra la disociación de la MBG capilar en ratones NZW de edad avanzada (n= 5). El área señalada en el panel **superior** aparece ampliada en el panel **inferior**. Las **flechas** indican los componentes endoteliales (**izquierda**) y epiteliales (**derecha**) de la MBG capilar. **C**: Análisis de microscopía confocal de las lesiones glomerulares de ratones de edad avanzada que desarrollan la GN indicada (n= 8). Los gráficos representan las distribuciones de intensidad de fluorescencia de las regiones indicadas por las **flechas** en las imágenes combinadas. Las imágenes seleccionadas corresponden a ratones NZW de: 5, 10, 13, 9, 9, 5,5, 9, 8, 5,5, 10, 8, 5,5, 13, y 13 meses (de **izquierda a derecha** y de **arriba a abajo**) en **A**; 8,5 meses en **B**; y 13 y 9 meses (de **izquierda a derecha**) en **C**. Barras de escala= 1  $\mu\text{m}$  (**arriba**); 0,5  $\mu\text{m}$  (**abajo**). Aumento original x400 (**A**).

#### 1.6.1.2. Los ratones NZW de edad avanzada sobreexpresan GPBP-1 en el glomérulo.

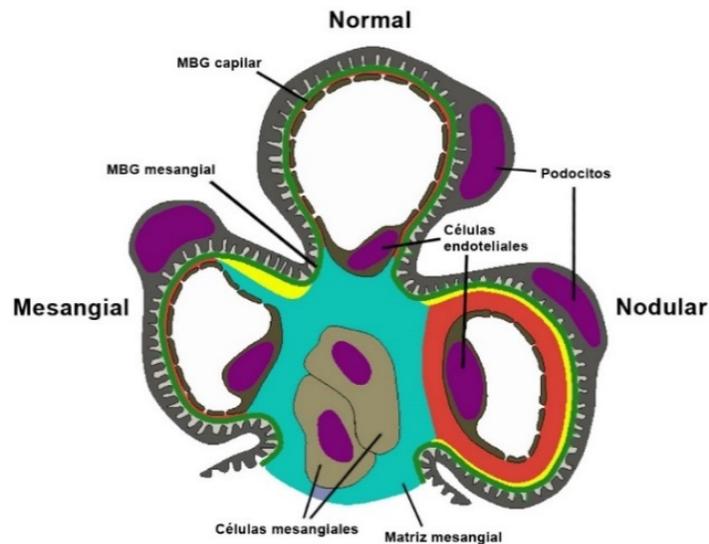
El estudio de la expresión de los niveles de GPBP-1 en los glomérulos de ratones NZW, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, reveló un aumento de dichos niveles en los ratones de edad avanzada (**Figura 11**). Esta evidencia, sugiere que los elevados niveles de expresión de GPBP en el glomérulo están relacionados con la GN propia de los ratones NZW de edad avanzada ya que ambos fenómenos coinciden en el tiempo (8 meses de edad).

En definitiva, el envejecimiento en estos ratones se asocia a un aumento de la expresión glomerular de GPBP-1 y a alteraciones glomerulares que incluyen una fusión defectuosa de los componentes epiteliales y endoteliales de la MBG capilar, expansión de la matriz y depósito de IC (**Figura 12**) (Revert *et al.*, 2007).



**Figura 11. GPBP está sobrepresado en los ratones NZW de edad avanzada.** **A:** Los niveles glomerulares del ARNm de GPBP en ratones NZW individuales en el rango indicado de edad (meses) se determinaron por RT-qPCR de microsecciones glomerulares diseccionadas por laser. La expresión relativa de GPBP en los animales individuales está representada por **puntos** o **círculos**, y se calculó utilizando ratones de 5 meses de edad como referencia ( $GPBP_{\text{expresión}} = 1$ ). Las barras indican el valor medio dentro de una serie ( $p = 0,0143$ ). También se muestra análisis comparativo de inmunofluorescencia de secciones glomerulares representativas de ratones NZW de la edad indicada (meses) ( $n = 7$ ). **B** y **C:** Análisis de microscopía confocal de las secciones glomerulares (**izquierda**) o las partes ampliadas de los mismos (**derecha**) representando a los ratones indicados y la GN ( $n = 9$ ). Los gráficos representan las distribuciones de intensidad de

fluorescencia de las regiones indicadas por las **flechas** en las imágenes combinadas. Las imágenes seleccionadas corresponden a ratones NZW de 5,5 meses (**B**) y de 9 y 8,5 meses (de **izquierda a derecha**) (**C**). Barra de escala= 25  $\mu\text{m}$ . Aumento original x400 (**A**).



**Figura 12. Modelo ilustrativo de la distribución del colágeno tipo IV en un glomérulo normal y en un glomérulo que presenta una GN mediada por GPBP.** La imagen representa una sección de un glomérulo renal en la que se muestra los dos tipos de alteraciones observadas en la GN inducida por la sobreexpresión de GPBP (mesangial y nodular), comparadas con la estructura normal. Se muestra el **componente epitelial** de la membrana basal glomerular ( $\alpha 3\text{-}\alpha 4\text{-}\alpha 5(\text{IV})$ ) en color verde, el **componente mesangial** ( $\alpha 1\text{-}\alpha 1\text{-}\alpha 2(\text{IV})$ ) en azul, y el **componente endotelial** ( $\alpha 1\text{-}\alpha 1\text{-}\alpha 2(\text{IV})$ ) en rojo. El espacio de separación entre los componentes mesangial o endotelial y el componente epitelial de la membrana basal glomerular, aparece en amarillo. En las lesiones nodulares el componente endotelial de la membrana basal glomerular crece y se separa del epitelial. Mientras que en las lesiones mesangiales, el mesangio se separa de la membrana epitelial y sustituye la membrana de origen endotelial ocupando la luz capilar.

Una hipótesis sugerida al respecto sería que los niveles elevados en la expresión de GPBP inducirían una alteración en las estructuras de la red de colágeno tipo IV del glomérulo, exponiendo así sitios de unión para IC tipo

IgA a través de la membrana basal glomerular y la matriz mesangial (Revert *et al.*, 2007).

### **1.6.2. Organismos modificados genéticamente.**

Los organismos modificados genéticamente (OMGs), comúnmente llamados organismos transgénicos, son aquellos cuyo material genético ha sido manipulado mediante técnicas de Ingeniería Genética para otorgarle alguna característica de interés. El procedimiento por el cual se introduce un gen foráneo (transgén) en el genoma de un ser vivo, se denomina transgénesis. En la transgénesis se busca que el transgén se integre en la línea germinal (gametos) de una manera estable, asegurando así que ese nuevo gen incorporado pueda ser heredado por la descendencia (Melo *et al.*, 2007).

El objetivo es introducir, eliminar o modificar de forma específica un gen, o determinados tipos de genes, en el genoma del organismo y producir así seres vivos (animales, plantas y microorganismos) transgénicos con nuevas y mejores características. Cuando el organismo en cuestión es el ratón, y el objetivo es introducir un gen nuevo en el genoma, se acuña erróneamente el término de ratón transgénico, cuando es eliminar un gen en concreto se habla de ratón *knock out*, mientras que cuando se desea reemplazar un gen por otro se habla de ratón *knock in*.

#### **1.6.2.1. El ratón transgénico.**

En teoría, todos los organismos son susceptibles de ser manipulados genéticamente. Existen trabajos realizados en plantas y en un gran número de animales, como la oveja, la cabra, el cerdo, el conejo, la rata, y muchos más. Sin embargo, la especie más utilizada y más exitosa ha sido el ratón. Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales son, el tamaño

ya que se trata de un animal pequeño, es manejable, está bien caracterizado, tiene un ciclo reproductivo muy corto y los tamaños de las camadas son muy grandes. La obtención de animales es relativamente económica en comparación con otros animales experimentales, y su mantenimiento aún en condiciones de alta seguridad es relativamente sencillo. Por otro lado, el ratón es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes. También existen un gran número de anticuerpos, sondas de ADNc, y se han construido bibliotecas genómicas y de ADNc para cada cepa de ratón. Además, el conocimiento de la biología del ratón es grande, su genoma está secuenciado, y tiene la capacidad de manipular la información genética nueva, dentro de la célula y de transmitirla a la línea germinal. Esto, junto a la disponibilidad de obtener numerosos huevos fertilizados, su tamaño, y resistencia, hacen del ratón un animal muy conveniente para la obtención de animales transgénicos mediante la técnica de la microinyección pronuclear (Gardiner y Teboul, 2009).

#### **1.6.2.2. Principales problemas en la obtención del ratón transgénico.**

La introducción de una nueva información genética, el transgén, dentro del genoma de un organismo mediante la técnica de la microinyección pronuclear, puede presentar algunos problemas en relación a dónde y cuándo se expresa el transgén (Gama Sosa *et al.*, 2010):

**1. Lugar de integración indeterminado:** El transgén se introduce en el genoma receptor de forma aleatoria, tan sólo un pequeño porcentaje se sitúa en un lugar propicio para obtener una buena expresión.

**2. Integración múltiple (tándem), metilación y falta de expresión:** El gen exógeno puede insertarse en forma de inserción de múltiples copias del gen dispuestas en tándem, bien en una zona codificante o bien no codificante del genoma receptor. En las zonas codificantes podría interrumpir

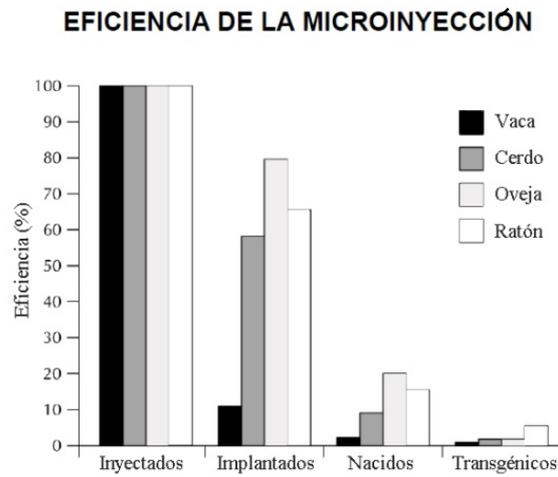
alguna secuencia génica vital, y alterar o evitar así el desarrollo del animal. También, podría ocurrir que la disposición en tándem fuera detectada como anómala por los sistemas de metilación, y provocar así un silenciamiento génico. Mientras, la integración en zonas no codificantes, impediría por completo su expresión.

**3. Mosaicismo (germinal y somático):** Cuando la integración del transgén en el genoma receptor se produce después de la primera división del embrión, el organismo resultante será un animal mosaico (10-20%). Si además, su integración no se produce en la línea germinal, el transgén no se heredará.

**4. Homocigosis:** Como cada sitio de integración es único, no pueden haber dos animales transgénicos fundadores (primeros animales obtenidos tras la microinyección) con el transgén insertado en el mismo lugar, por lo que, para conseguir animales homocigóticos habría que cruzar la progenie transgénica de un único fundador entre sí, y la resultante con individuos no transgénicos (cepa salvaje) para determinar por cruzamiento la presencia de individuos homocigotos. Es un proceso lento, p. ej. 5 años en el caso de la vaca.

**5. Expresión variable dentro y entre líneas transgénicas (variegación):** La variegación es la diferente expresión de un gen por efecto de su posición (*Position Effect Variegation*, PEV). Entre líneas transgénicas esto ocurre porque el sitio de integración es único y aleatorio, pero dentro de una misma línea transgénica se produce por recombinaciones, inversiones o desplazamientos génicos de secuencias altamente repetitivas en los cromosomas.

Estas situaciones hacen que la obtención de un ratón transgénico sea eficientemente baja (< 5%) (**Figura 13**).



**Figura 13. Eficiencia global del proceso de transgénesis.** Todos los huevos fertilizados (100%) de ganado vacuno, cerdos, ovejas, y ratones, se inoculan con un transgén, pero el éxito de la implantación y obtener descendencia es mucho menor, y sólo el 5% o menos de los huevos tratados se convierten en la progenie transgénica (Glick *et al.*, 2010).

## **2. OBJETIVOS.**



GPBP-1 es una proteína cinasa no convencional que participa en la organización supramolecular de proteínas estructurales tanto de compartimentos intracelulares (miosina) como extracelulares (colágeno tipo IV).

La sobreexpresión de GPBP-1 se asocia a la desorganización de la MBG asociada a depósitos de IgA y a una expansión de la matriz en ratones NZW de edad avanzada. Estos ratones se consideran sanos pero presentan una predisposición genética a desarrollar una NL asociada con la edad, manifestando una GN mediada por IC.

El conocimiento de estos datos nos permite plantear varias preguntas:

1. Si la sobreexpresión de GPBP está relacionada con el transcurso de una GN en ratones predispuestos a desarrollar esta patología, podríamos demostrar el carácter patogénico de GPBP si aumentamos su expresión en ratones que no tengan esta predisposición.

2. Si GPBP es un factor patogénico en la glomerulonefritis de NZW y sigue la ruta secretora que le permita alcanzar la matriz extracelular, podría llegar al torrente sanguíneo y ser un constituyente del plasma. ¿Dónde realiza GPBP la actividad biológica que contribuye a la progresión de la enfermedad?

3. Si los ratones NZW desarrollan una NL asociada a la edad, ¿podríamos atenuar el desarrollo de esta patología mediante una terapia basada en anticuerpos anti-GPBP?

Intentar resolver estas cuestiones nos va a permitir profundizar en el conocimiento de la biología de GPBP y en su implicación en patologías autoinmunes. Por tanto los objetivos planteados para el desarrollo de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Obtener un ratón transgénico que sobreexpresa GPBP-1 en una cepa que no tenga predisposición a padecer GN mediada por IC y estudiar si padecen algún tipo de enfermedad glomerular semejante a la GN de NZW.

2. Determinar la presencia de GPBP en el torrente circulatorio. Desarrollar la metodología necesaria para su cuantificación.

3. Utilizar anticuerpos monoclonales anti-GPBP como terapia biológica para tratar modelos animales que desarrollen una GN mediada por IC.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**



### 3.1. Vectores y construcciones.

La obtención del ratón transgénico para GPBP-1 comienza generando una construcción adecuada para la microinyección en los oocitos, que contiene, de 5' a 3': el intensificador del promotor de CMV, el promotor  $\beta$ -actina de pollo, el ADNc, y la señal de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo.

Al vector de expresión del que partimos, pCAGGS, incorporamos el ADNc en el sitio de corte EcoRI. La pauta abierta de lectura (ORF, *Open reading frame*) del ADNc viene precedida por la secuencia consenso Kozak, la secuencia codificante del epítipo FLAG y un sitio EcoRI que en conjunto codifican el polipéptido MAPLADYKDDDDDEF, al que sigue inmediatamente la secuencia proteica de GPBP-1 humano.

La construcción obtenida fue reclonada en un nuevo vector, pVAX1, en los sitios SnaBI y HindIII, para disponer de sitios únicos de restricción, que nos permitieran obtener el fragmento lineal requerido para la microinyección en los oocitos de ratón.

El vector de expresión resultante pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1, fue caracterizado por secuenciación nucleotídica, y digestión con enzimas de restricción. La fidelidad de la proteína expresada fue determinada mediante técnicas inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos específicos contra la proteína o el *tag* que porta fusionado (FLAG).

Finalmente el vector de expresión se digiere con NruI y PmeI, enzimas que liberan un fragmento lineal de 4,2 Kb que contiene los elementos necesarios para la expresión de nuestro ADN de interés o transgén.

La obtención del transgén a partir de los diferentes componentes iniciales se llevó a cabo mediante algunos procedimientos de ADN recombinante como: PCR, digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de fragmentos generados en digestiones por cromatografía, ligación de fragmentos de ADN a los vectores oportunos, transformación de bacterias competentes, purificación de las construcciones obtenidas por técnicas cromatográficas (miniprep, midiprep)

o por ultracentrifugación en gradiente de concentración de cloruro de cesio (maxiprep), e hibridación de colonias de bacteria con sondas de oligonucleótidos o de ADNc cuando fue necesario.

### **3.2. Hibridación de colonias de bacterias con sondas de ácidos nucleicos.**

Para localizar las colonias bacterianas portadoras del ADN de interés, estas se transferían por presión a filtros de nitrocelulosa (Millipore) debidamente orientados. Los filtros se colocaban sobre placas nuevas durante 3 h para que crecieran nuevamente las réplicas de las colonias, para después transferirlos secuencialmente a tres soluciones de: a) 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH; b) 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; y c) 300 mM NaCl, 30 mM citrato de sodio pH 7, durante 5 min en cada una de ellas. Finalmente los filtros eran irradiados con radiación ultravioleta en un horno Stratlinker (Stratagen) para unir covalentemente las cadenas desnaturalizadas de ADN a la nitrocelulosa de los filtros.

Posteriormente, los filtros se incubaban con sondas de oligonucleótidos, para lo que era necesario antes una prehibridación durante 1 h a 37 °C con una solución de 0,9 M NaCl, 90 mM citrato de sodio, 10 mM tampón fosfato pH 6,8, 1 mM EDTA, 0,1% leche desnatada en polvo, 0,5% SDS y 100 µg/mL de ADN de salmón sonificado y desnaturalizado. Tras la prehibridación se incubaban con 5 pmoles de oligonucleótido marcado diluido en solución de prehibridación nueva. El marcaje del oligonucleótido se hacía con la T4 polinucleótido cinasa y  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP. La enzima transfiere el fosfato en posición  $\gamma$  del ATP al extremo 5' del oligonucleótido. Los filtros se incubaban durante 12 h con la sonda, y después se lavaban a temperatura ambiente (3 lavados cada 5 min) con una solución de 0,3 M NaCl, 30 mM citrato de sodio y 0,1% SDS, y se mantenían a -70 °C durante 2 h para revelar la autorradiografía e identificar las colonias que poseen el ADN de interés. Por

último, superponemos la autorradiografía con la placa bacteriana original para seleccionar las colonias de bacterias que poseen el ADN que nos interesa.

### 3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las PCR se efectuaron con la ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) (Stratagen), con la Amplitaq Gold ADN polimerasa (Life technologies) o con la Expand Long Template PCR System (Roche), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para las RT-qPCR se utilizaron polimerasa y sondas comerciales TaqMan (Life technologies) según las recomendaciones del fabricante.

### 3.4. Mutagénesis dirigida.

Modificamos un sitio de corte del enzima de restricción EcoRI presente en el sitio de multiclonación del vector pCAGGS, que resultaría problemático para la actuación de dicho enzima en el futuro, mutando una de las bases de la secuencia que reconoce la restrictasa. Para ello utilizamos la pareja de oligonucleótidos mutCAGGS-F (5'AAGAATTCCTCGAGGTATTCACCTCCT-3') (marcada la base mutada) y mutCAGGS-R (5'CGGTTTTTAATACCCCTGTAGT-3'), ambos de Roche.

Realizamos una reacción de PCR con la ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) que amplifica 131 pb de ADN conteniendo la base ya mutada, y en cuyos extremos se encuentran los sitios de restricción EcoRI aguas arriba, y BglII aguas abajo. El fragmento liberado por estas restrictasas es clonado en el vector original, sustituyendo así el fragmento mutado por el original.

Finalmente, secuenciamos la zona implicada (AbiPrism 310 Genetic Analyzer) para seleccionar los clones que porten la mutación.

### 3.5. Cultivos celulares.

Las células HEK 293 y RAW 264.7 se cultivaban en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Lonza) y 1% penicilina/estreptomicina (Lonza).

### 3.6. Expresión de proteínas en células de mamífero.

Se analiza la expresión del ADNc mediante transfección transitoria en células de mamífero. La expresión de FLAG-hGPBP-1 en células HEK 293 se realizó transfectando  $1 \times 10^6$  células mediante procedimientos con fosfato cálcico estándar (Promega). El medio de transfección era retirado a las 24 h y el cultivo continuado con medio fresco durante 24 h adicionales. Las células transfectadas eran lisadas a las 48 h con 300  $\mu$ l de 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5% Tritón X-100, 1 mM PMSF y 10  $\mu$ g/mL leupeptina. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford utilizando el reactivo *Protein assay* (Bio-Rad).

Finalmente se confirmó la expresión de la proteína mediante *Western blot* con anticuerpos específicos.

### 3.7. Tratamientos celulares.

Las células RAW 264.7 se sembraban en placas de cultivo de 6 pocillos ( $2 \times 10^6$  células/pocillo) y se inducían con 1  $\mu$ g/mL de lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich, *E. coli* serotipo 026:B6).

Para la estimulación con IC, las células SRBC (*Sheep Red Blood Cells*, Sigma Aldrich) se resuspendían en solución salina equilibrada HBSS (*Hanks balanced salt solution*, Sigma Aldrich) con 0,1 M EDTA pH 7,4 (1:1), y se opsonizaban con Ig de conejo anti-SRBC (Sigma Aldrich) durante 30 min a 37 °C. Las SRBC opsonizadas (IC) se lavaban con HBSS, se precipitaban, y

resuspendían en medio de cultivo. Los IC resultantes se añadían a las células RAW 264.7 (10:1) inducidas durante toda la noche con LPS. Finalmente, se determinaban los niveles de cGPBP-1 del medio de cultivo mediante ELISA sándwich directo.

Para analizar la expresión de pro-IL-1 $\beta$  (*Il1b*), las células RAW 264.7 inducidas con LPS (8 h) se incubaban durante 2 h en presencia o no (Control) de 10  $\mu$ g/mL de IgG de ratón, y 0,5  $\mu$ g/mL de N26 en el correspondiente caso. Finalmente, obteníamos el ARN total de las células por medio de columnas comerciales *RNAspin* (GE Healthcare) para su posterior análisis por RT-qPCR.

### 3.8. Western blot.

La transferencia de proteínas a membrana se realiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Las muestras se mezclan con tampón de carga 6x (Tris 187,5 mM pH 6,8, glicerol al 30% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 15% (v/v), SDS al 6% y azul de bromofenol 600 mg/L) y se hierven a 100 °C durante 3 min. Se carga la misma cantidad de proteína en cada carril sobre el sistema *Mini Protean* (BioRad) en tampón Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se transfieren a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *Polyvinylidene difluoride*; Immobilon-P, Millipore) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v) a pH 8,3) durante 1 h a 100 V. Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante al menos 1 h con leche desnatada 5% (p/v) en tampón de lavado TBST (*Tris-Buffered Saline Tween-20*) (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 Mm, 0,05% Tween-20 (v/v)) para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario y, tras varios lavados en TBST (3x5 min), con el anticuerpo secundario, ambos anticuerpos diluidos en TBST. La reactividad de los anticuerpos se visualizó mediante

quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando distintos tiempos de exposición sobre películas autorradiográficas (T-Mat, Kodak).

### **3.9. Obtención del ratón transgénico.**

#### **3.9.1. Microinyección de la construcción en el pronúcleo zigótico de ratón.**

El transgén linearizado, una vez purificado, se inyecta en el pronúcleo masculino de huevos fecundados obtenidos del cruce de ratones B6D2F1 (Hogan *et al.*, 1994).

El proceso comienza con la extracción de los óvulos fertilizados de una hembra que previamente ha sido sometida a un tratamiento hormonal para provocar una superovulación. Los huevos fertilizados que aún no han fusionado los pronucleos masculino y femenino se manipulan en el microinyector donde se les inyecta el transgén deseado en el pronúcleo masculino. Los cigotos supervivientes se transfieren al oviducto de hembras pseudogestantes de raza no consanguinea (NMRI) que previamente han sido apareadas con machos estériles. La descendencia obtenida son ratones transgénicos fundadores que pueden o no llevar integrado el transgén. La presencia de dicha secuencia se comprueba mediante el análisis del ADN genómico de los ratones en un termociclador utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ratones que porten el transgén deberán ser retrocruzados para comprobar si la integración se ha producido en la línea germinal (**Figura 14**). Una vez se averigua que el transgén se ha transmitido a la descendencia, el ratón transgénico fundador podrá establecer una línea transgénica (Lodish *et al.*, 1995).

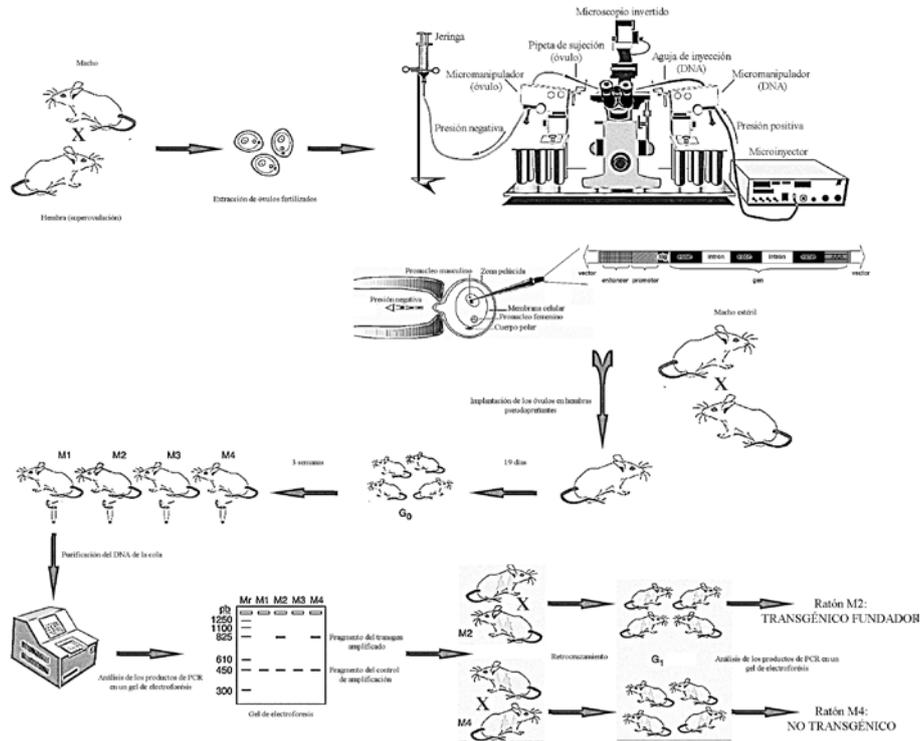


Figura 14. Técnica de obtención de ratones transgénicos mediante microinyección de ADN en el pronúcleo masculino de un cigoto obtenido por fecundación *in vitro* (Lodish *et al.*, 1995).

### 3.9.2. Análisis de la integración del transgén en la progenie.

Los primeros ratones obtenidos tras la microinyección se denominan fundadores ya que, si son portadores del transgén, son ratones únicos como consecuencia de que el sitio de integración del transgén es irrepetible en los diferentes ratones. La posible integración se analiza mediante PCR a partir de ADN genómico. La extracción del material genético se realiza cortando entre 0,2-0,5 cm de la cola del ratón, de acuerdo con el protocolo de *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche).

El material genético se cuantifica por absorbancia a 260 nm y se determina el grado de pureza con el ratio 260 nm/280 nm, mediante el espectrofotómetro Ultrospec 2100 Pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia).

Para la PCR se emplea la enzima Amplitaq Gold ADN polimerasa utilizando los oligonucleótidos transGPBPm (5'CTGGCGTGTGACCGGC-3') y ON-hGPBP-1c (5'CCTCTGCAGCCATACTC-3'). Hacemos una PCR paralela con oligonucleótidos específicos del exón 1 del mGPBP propio del genoma de ratón, para confirmar la presencia de material genético: RAT-5m (5'TAGTATCGGACCCGGCAGGA-3') y RAT-7c (5'AGCGGACCGGGGAAGGAGGA-3').

### 3.9.3. Transmisión a la descendencia y establecimiento de familias transgénicas.

Los fundadores portadores del transgén, ratones B6D2F1, se cruzan con ratones híbridos B6D2F1, para obtener un buen número de descendientes a analizar, que nos permita determinar el grado de mosaicismo que presentan los parentales. Los machos fundadores se cruzan con dos hembras vírgenes, mientras que las hembras fundadoras con un sólo macho virgen. Tras los 21 días de periodo de gestación, se analiza la progenie aproximadamente a los 10 días después del parto, tal y como hemos comentado para el análisis de los fundadores.

La progenie positiva, se retrocruza con ratones C57BL/6J durante 6 generaciones, para recuperar el repertorio genético (*background*) inicial.

El genotipado de los nuevos descendientes transgénicos se realizará mediante PCR en tiempo real para optimizar los resultados. Los oligonucleótidos utilizados son pCAGGSm (5'CATCGCTATTACCATGGGTCG-3') y pCAGGSc (5'GGAGAGTGAAGCAGAACGTGG-3').

### 3.10. Experimentación animal.

Todos los procesos fueron realizados de acuerdo con las directrices institucionales y con la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) para el uso de animales de experimentación.

En los experimentos con los ratones transgénicos, las muestras de los ratones representan cada generación individual y fueron analizadas por microscopía convencional y microscopía confocal. Los ratones entre las generaciones F3 y F5 fueron caracterizados mediante RT-qPCR, inmunoprecipitación, histoquímica, microscopía electrónica y ELISA.

Normalmente los ratones se sacrificaban mensualmente a partir del cuarto mes de edad, hasta que las lesiones en la MBG del colágeno tipo IV eran evidentes a través de la microscopía confocal, y la progresión de la GN era seguida durante 1 o 2 meses más.

Los ratones no Tg-hGPBP-1 crecían en paralelo y fueron usados como controles. Un total de 36 Tg-hGPBP-1 y 22 no Tg-hGPBP-1 se caracterizaron mediante microscopía confocal, mientras que 16 Tg y 6 no Tg fueron analizados por microscopía electrónica. La GN clínica se determinaba por la proteinuria provocada por la presencia de albumina en la orina.

En los experimentos con ratones NZW y B6 se utilizaron individuos generados y mantenidos en un ambiente libre de patógenos.

Para estudiar la farmacocinética de los anticuerpos monoclonales N12 (n= 3) y N26 (n= 3), utilizamos ratones NZW de 8-10 meses de edad que recibieron una única inyección intraperitoneal de 10  $\mu$ g/g de peso corporal, y se recogieron muestras de suero a diferentes tiempos.

Para los ensayos terapéuticos, utilizamos ratones NZW de 8-10 meses de edad que recibieron una inyección intraperitoneal semanal de 1  $\mu$ g/g de peso corporal de N12 (n= 5), N26 (n= 5), IgG de suero murino (n= 3) o PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (n= 3). Los tratamientos se mantuvieron durante 8 semanas y se recogieron muestras de suero, obtenidas de la sangre de la cola del ratón, inmediatamente antes de cada inyección. No encontramos

diferencias entre los grupos tratados con IgG y PBS, por lo que ambos grupos fueron considerados como controles para los análisis estadísticos. Al final del tratamiento, todos los ratones fueron sacrificados y los riñones fueron analizados por técnicas histológicas. El suero de los ratones NZW de 3 meses y el de los ratones B6 de 8-10 meses fueron usados como controles en los estudios analíticos.

### 3.11. Análisis histológico.

Los riñones se fijaron en 10% formol y fueron embebidos en parafina. Mediante un micrótopo electrónico (Microm) obtuvimos secciones de 2  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron tratadas para las diferentes técnicas histológicas, HE (Hematoxilina/Eosina), tinción de Mason y PAS (*Periodic Acid-Schiff*).

### 3.12. Microscopía electrónica.

Para los experimentos con ratones transgénicos, los riñones se cortaron, y las rodajas resultantes se fijaron en 2% glutaraldehído y 0,1 M cacodilato pH 7,5 durante toda la noche a 4 °C, y se lavaron con 0,1 M cacodilato y 0,1 M sacarosa pH 7,5. Una vez lavados, se incubaron con tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón durante 1 h. Tras la deshidratación mediante series de lavados graduales de acetona, los fragmentos se embebieron en resina Epon 812. Las muestras se cortaron en secciones semifinas, fueron teñidas con azul de toluidina y se evaluaron en el microscopio óptico. Se obtuvieron secciones ultrafinas que fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato *lead* (solución Reynolds) para analizar mediante el microscopio electrónico (Jeol 1010) a 60 kV.

Para los experimentos con ratones NZW, los riñones fueron cortados, fijados por inmersión en paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5% en fosfato sódico 0,1 M pH 7,4 (PB, *Phosphate Buffered*) durante 24 h a 4 °C, y

lavados con PB. Mediante un vibratomo (Leica VT-1000) se obtuvieron secciones de 200  $\mu\text{m}$  que fueron fijadas en tetraóxido de osmio al 2% en PB durante 1,5 h, lavadas con agua fría (3x5 min), deshidratadas mediante lavados secuenciales de etanol frío en soluciones de concentraciones crecientes (5 min con 30%, 5 min con 50%, y 10 min con 70%), lavadas con acetato de uranilo al 2% en etanol al 70% durante 2,5 h a 4 °C, deshidratadas nuevamente con lavados de: 2x5 min de etanol al 70%, 2x5 min y 10 min de etanol al 96%, 2x7 min de etanol al 100%, y 1x10 min de etanol 100% deshidratado, y finalmente lavadas 2x10 min con óxido de propileno y embebidas en araldita (Durcupan, Sigma-Aldrich). Mediante una cuchilla de diamante obtuvimos secciones semifinas de 1,5  $\mu\text{m}$  y ultrafinas de 0,08  $\mu\text{m}$ , que fueron teñidas con azul de toluidina al 1% y citrato *lead* respectivamente. Las secciones ultrafinas fueron estudiadas con el microscopio electrónico de transmisión (FEI Tecnai G2 Spirit).

### 3.13. Anticuerpos y conjugados.

La detección de la proteína recombinante gracias al *tag* que porta fusionado se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), pero mientras que para los ensayos de inmunoprecipitación estaba unido a bolas de agarosa, para ensayos ELISA/*Western blot*, el anticuerpo estaba unido a la enzima peroxidasa (HRP). Para detectar  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2(IV) utilizamos el anticuerpo policlonal de cabra anti-colágeno tipo IV (Millipore Corporation) marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 647 (Life Technologies). Para detectar  $\alpha$ 3(IV) usamos el anticuerpo monoclonal Mab3 marcado con biotina (Wieslab AB). La detección de GPBP-1 se realizó mediante: el anticuerpo policlonal de pollo GPBP<sub>pep1</sub>, específico de los 26 residuos presentes en GPBP-1 y no en GPBP-2, purificado de una columna de sefarosa con GPBP<sub>pep1</sub> (Raya *et al.*, 2000; Revert *et al.*, 2007); el anticuerpo policlonal de pollo ch- $\alpha$ GPBP (Abcam); el anticuerpo monoclonal

mab14 (Raya *et al.*, 1999); y los anticuerpos monoclonales N12, N26, y N27, que fueron obtenidos utilizando GPBP-1 humano recombinante de *Pichia pastoris* (Raya *et al.*, 1999 y 2000). En los ensayos *in vivo* utilizamos los anticuerpos monoclonales N12 y N26 biotinilados con Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific) para facilitar su detección, y para los estudios de inmunofluorescencia y ELISA/*Western blot* marcamos el anticuerpo monoclonal N27 con AlexaFluor 546 (Life Technologies) y peroxidasa HRP (EZ-LINK Plus Activated Peroxidase, Thermo Fisher Scientific), respectivamente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: el anticuerpo policlonal de conejo anti-chicken-TRITC (Sigma-Aldrich); el anticuerpo policlonal anti-mouse-HRP (Promega); y el anticuerpo policlonal de conejo anti-chicken-HRP (Sigma-Aldrich). Para detectar los depósitos de inmunoglobulinas específicas de ratón, utilizamos anticuerpos de cabra anti-IgA, -IgG e -IgM marcados con FITC (Sigma-Aldrich), y para los depósitos del componente c del complemento C3, el anticuerpo policlonal de conejo anti-C3c unido a FITC (Abcam). La biotina la detectamos mediante Extravidin marcada con TRITC (Sigma-Aldrich), Avidin unida a FITC (Vector Laboratories), Streptavidin-AF488 (Life Technologies) y NeutrAvidin-HRP (Thermo Fisher Scientific), según el tipo de estudio (**Tabla IV**).

**Tabla IV. Anticuerpos y conjugados utilizados en las diferentes técnicas y ensayos de este trabajo.** Se indica la figura en la que aparecen y la casa comercial que los distribuye.

Anticuerpo/conjugado	Casa comercial	Técnica o Ensayo	Figura
$\alpha$ FLAG M2-Agarosa	Sigma-Aldrich	Inmunoprecipitación	19
$\alpha$ FLAG M2-HRP	Sigma-Aldrich	ELISA/ <i>Western blot</i>	16,19,29
$\alpha$ ColIV-AF647	Millipore/Life Tech.	M. Confocal	21,22,23,26,28
mAb3 biotina	Wieslab	M. Confocal	21,22,23,26,32
$\alpha$ GPBPpep1		M. Confocal	21
mAb14		<i>Western blot</i>	16,19
mAbN12		ELISA	29
mAbN26		ELISA	24,25,29,31,33,34
mAbN12 biotina	/Thermo Fisher	<i>In vivo</i>	30,31
mAbN26 biotina	/Thermo Fisher	<i>In vivo</i>	30,31
mAbN27-HRP	/Thermo Fisher	ELISA/ <i>Western blot</i>	24,25,31,33
mAbN26-Sefarosa	/Sigma-Aldrich	Inmunopurificación	24
mAbN27-AF546	/Life Tech.	M. Confocal	26,32
$\alpha$ GPBP	Abcam	<i>Western blot</i>	24
$\alpha$ Chicken-TRITC	Sigma-Aldrich	M. Confocal	21
$\alpha$ Chicken-HRP	Sigma-Aldrich	<i>Western blot</i>	24
$\alpha$ Mouse-HRP	Promega	<i>Western blot</i>	16,19
$\alpha$ IgA-FITC	Sigma-Aldrich	M. Fluor./Confocal	22,23,27
$\alpha$ IgG-FITC	Sigma-Aldrich	M. Fluor./Confocal	22,27,28,32
$\alpha$ IgM-FITC	Sigma-Aldrich	M. Fluorescencia	22,27,32
$\alpha$ C3c-FITC	Abcam	M. Fluor./Confocal	27,28,32
Extravidin-TRITC	Sigma-Aldrich	M. Confocal	22,23
Avidin-FITC	Vector Lab.	M. Confocal	21,26
Streptavidin-AF488	Life Tech.	M. Confocal	32
NeutrAvidin-HRP	Thermo Fisher	ELISA	30

### 3.14. Inmunoprecipitación.

Los riñones obtenidos de los ratones a estudiar, se congelaban inmediatamente en nitrógeno líquido y se molían en el mortero. El polvo de riñón resultante (50 mg) se homogenizaba en 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% desoxicolato sódico, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF y 10 µg/mL de leupeptina mediante un homogeneizador (Omni International). Los homogenados se centrifugaron (20.000 x g, 15 min a 4 °C) y los sobrenadantes se diluyeron con 2,5 volúmenes de 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl (TBS, *Tris-Buffered Saline*), 1 mM PMSF, y se incubaron con 30 µl de bolas de agarosa anti-FLAG M2 durante 3 h a 4 °C en agitación. Las bolas se lavaron tres veces con TBS frío, y las muestras se eluyeron dos veces con 0,1 mg/ml de péptido FLAG en TBS. Finalmente, el material eluído se analizó por *Western blot* utilizando anti-FLAG M2-HRP y mAb 14.

### 3.15. Inmunofluorescencia.

Los riñones fueron embebidos en OCT (Sakura) y congelados para mediante un criostato (Microm) obtener secciones de 6 µm de grosor que bloqueamos con avidina/biotina (Vector Laboratories) y líquido ascítico irrelevante diluido 1:10 o suero de caballo al 20% en PBS según el caso, e incubamos con los anticuerpos primarios. Después de lavar con PBS, añadimos los anticuerpos secundarios y finalmente lavamos de nuevo para una correcta visualización. Todos los pasos se realizaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Las imágenes de microscopía convencional se obtuvieron con un microscopio Axioskop 2 plus (Carl Zeiss) combinado con cámara Spot y software v2.2 (Diagnostic Instruments). Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas mediante un microscopio confocal espectral de escaneo laser TCS-SP2 (Leica Microsystems) combinado con un microscopio

invertido (Leica DM1RB), y analizadas mediante el software de Leica (Leica Lite v2.61).

### 3.16. Inmunopurificación de cGPBP-1.

Aislamos cGPBP-1 a partir de muestras de plasma humano mediante cromatografía de afinidad. Primero, las muestras (200 mL) fueron aclaradas por centrifugación, filtradas (0,45  $\mu\text{m}$ ) y diluidas 1:5 (v/v) con 25 mM de Tris pH 7,4, 150 mM de NaCl (TBS) suplementado con 0,05% de Tween 20 (TBST), para poder cargar así columnas de 1 mL de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma-Aldrich) que previamente contenían 1 mg de mAb N26 inmovilizado. El material unido a la columna se lavó con 10 mL de TBST, eluyó con ImmunoPure Gentle Ag/Ab Elution Buffer (Thermo Fisher Scientific) y dializó frente a TBS.

### 3.17. Purificación de poly-His-GPBP-1.

Clonamos inicialmente el ADNc de GPBP-1 en el sitio de multiclonación del vector de expresión pET-15b (Merck), el cual aporta un *tag* de seis residuos de histidina necesarios para su posterior purificación. Una vez obtenido el vector, transformamos células de *E. coli* y purificamos poly-His-GPBP-1 mediante columnas de agarosa queladas con níquel (Clontech Laboratories) siguiendo el correspondiente protocolo. La pureza e integridad de poly-His-GPBP-1 se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie y *Western blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-GPBP-1.

### 3.18. Ensayos ELISA.

Para comprobar la interacción de GPBP-1 con la cadena  $\alpha 3$  del dominio no colagenoso-1 del colágeno tipo IV, incubamos las placas con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de poly-His-GPBP-1 en PBS. Después del bloqueo, incubamos con FLAG- $\alpha 3$ , en ausencia o presencia de los anticuerpos monoclonales N12 o N26 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La unión a FLAG- $\alpha 3$  la detectamos mediante ANTI-FLAG M2-Peroxidasa a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Cuantificamos los niveles de cGPBP-1 mediante un ELISA sándwich directo. Las placas fueron incubadas con el anticuerpo N26 a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (anticuerpo de captura) en PBS, bloqueadas, e incubadas seguidamente con diluciones 1:10-1:20 de muestras de suero o plasma y el anticuerpo N27-HRP (anticuerpo de detección) a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como estándares se utilizaron diluciones seriadas de poly-His-GPBP-1 en un rango que va desde los 400 ng/mL hasta los 0,4 ng/mL, en la misma placa (en paralelo).

Determinamos los niveles de anticuerpo monoclonal en el suero mediante un ELISA sándwich directo. Las placas fueron incubadas con poly-His-GPBP-1 a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS, bloqueadas, e incubadas con diluciones 1:10-1:20 de muestras de suero. Detectamos los anticuerpos monoclonales biotinilados unidos mediante NeutrAvidina conjugada a HRP (Thermo Fisher Scientific) de alta sensibilidad. Para generar la curva estándar incluimos diluciones seriadas de anticuerpos monoclonales en un rango entre 500 y 1 ng/mL.

Los títulos de IgG anti-ADNsc se midieron mediante ELISA sándwich indirecto utilizando un *kit* comercial (Alpha Diagnostic Intl.) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En todos los casos, las placas fueron incubadas durante 16 h a 4 °C y bloqueadas con albumina sérica bovina al 3% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Las incubaciones se realizaban a temperatura ambiente durante 1-2 h en agitación. Las placas se lavaban vigorosamente entre los diferentes pasos con TBST y se revelaron con Quanta Blue, un

sustrato fluorescente de HRP (Thermo Fisher Scientific). La intensidad fluorescente se midió con un lector de fluorescencia de microplacas SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices) y los datos adquiridos fueron analizados con el software correspondiente (Molecular Devices). Todas las diluciones se realizaron en TBST.

### **3.19. Análisis estadísticos.**

Utilizamos el software Prism 4.0 (GraphPad Software). Para determinar las diferencias entre series utilizamos el test-t de Student o el de Mann-Whitney. Para determinar la significación estadística entre series utilizamos el test de Kruskal-Wallis o de ANOVA de dos vías, mientras que para la correlación entre cGPBP-1 y los autoanticuerpos anti-ADNsc utilizamos el test de Spearman. Un  $p < 0,05$  se consideró significativo.



## **4. RESULTADOS.**



4.1. EL RATÓN TRANSGÉNICO DE GPBP.

4.1.1. La construcción transgénica expresa FLAG-GPBP-1 humano en células HEK 293.

Para obtener ratones transgénicos es necesario que el ADNc de interés esté clonado en un plásmido que permita aislar un fragmento de ADN lineal que incluya todos los elementos necesarios para la expresión del transgén (*cassette* de expresión): promotor, ADNc y secuencia de poliadenilación. En este caso recurrimos a 2 vectores, pCAGGS y pVAX1. En pCAGGS se clonó el ADNc que codifica FLAG-hGPBP-1, para lo que fue necesario eliminar mediante mutagénesis dirigida un sitio EcoRI, lo que permitió clonar el ADNc de forma orientada en el sitio EcoRI restante. El segundo vector, pVAX1, aportaba sitios de restricción únicos necesarios para poder extraer el *cassette* de expresión (Figura 15).

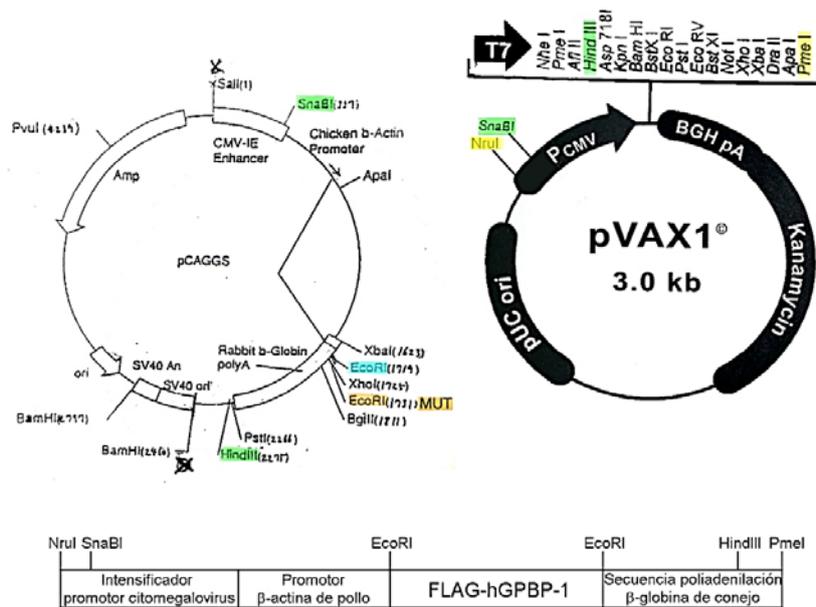
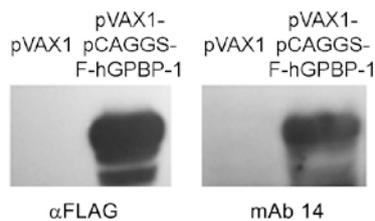


Figura 15. Vectores utilizados para la construcción del *cassette* de expresión. En la parte superior se representan los vectores utilizados, pCAGGS y pVAX1, en los que se indican los

elementos y sitios de restricción más relevantes. Se destacan con colores los sitios de restricción empleados para la inserción del ADNc en el vector pCAGGS (**azul**); para insertar la práctica totalidad del *cassette* de expresión de pCAGGS en pVAX1 (**verde**); y para la extracción del *cassette* de expresión (**amarillo**). En **marrón** se destaca un sitio EcoRI que se eliminó mediante mutagénesis dirigida para poder clonar el ADNc de hGPBP-1 en pCAGGS. En la parte **inferior** se muestra un esquema del transgén extraído del plásmido definitivo utilizado para microinyectar oocitos de ratón, en el que se indica los sitios de restricción más relevantes y los elementos necesarios para que se exprese.

Para clonar el *cassette* de expresión de pCAGGS-FLAG-hGPBP-1 en pVAX1 se utilizaron los sitios de restricción SnaBI y HindIII. El nuevo plásmido (pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1) contiene todo el *cassette* de expresión flanqueado por los sitios de restricción únicos NruI y PmeI.

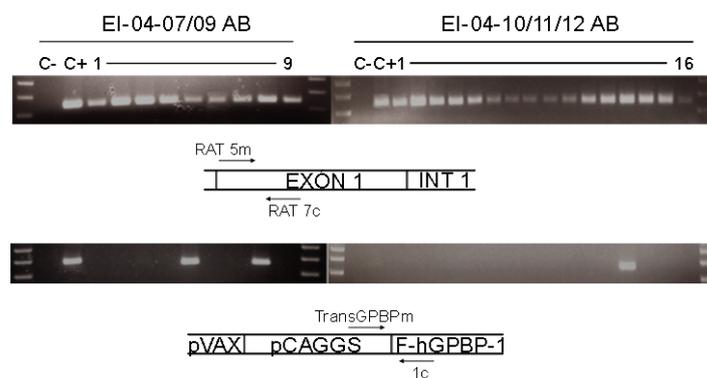
Mediante SDS-PAGE y *Western blot* de lisados de células HEK-293 transfectadas con pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1 comprobamos que FLAG-hGPBP-1 se expresaba correctamente (**Figura 16**), lo que indicaba que el *cassette* de expresión se podía utilizar para obtener ratones transgénicos.



**Figura 16. Expresión de FLAG-GPBP-1 humano en células HEK 293 transfectadas con pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1.** Diez microgramos de homogenados de células transfectadas con los vectores pVAX1 y pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1 se analizaron mediante SDS-PAGE y *Western blot* con los anticuerpos indicados. El tamaño aproximado del polipéptido es de 77 kDa.

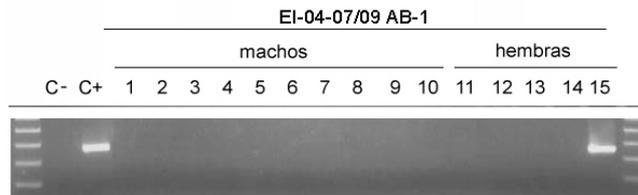
#### 4.1.2. Obtención de líneas de ratones transgénicos.

El *cassette* de expresión de FLAG-hGPBP-1 se aísla a partir de una digestión de pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1 con las enzimas NruI y PmeI y se microinyecta en oocitos en cultivo. Los oocitos se implantan en una hembra grávida y se obtienen crías. La integración del transgén en la progenie se determina mediante PCR a partir de ADN genómico que se extrae de secciones de las colas de los ratones. Los ratones que han integrado el transgén en su genoma son los “fundadores transgénicos” (Figura 17).



**Figura 17. Amplificación del ADN genómico de ratones procedentes de oocitos microinyectados con el transgén.** Análisis mediante PCR del ADN genómico de dos camadas de ratones obtenidas tras la microinyección del transgén. En la imagen **superior** se muestran los fragmentos amplificados de COL4A3BP mediante los oligonucleótidos indicados en el esquema de justo debajo. La imagen **inferior** muestra los fragmentos amplificados de pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1. Los oligonucleótidos utilizados se indican en el esquema de debajo de la imagen. En los controles negativos (C-) la muestra de ADN genómico se sustituyó por agua, y en los controles positivos (C+) por una muestra de ADN genómico de ratón C57BL/6 (**arriba**) o 10 pg de pVAX1-pCAGGS-FLAG-hGPBP-1 (**abajo**). En la primera y última calle de cada gel de agarosa se incluyó un estándar de peso molecular. Los tamaños que se muestran son, de arriba abajo, 400, 300 y 200 pares de bases.

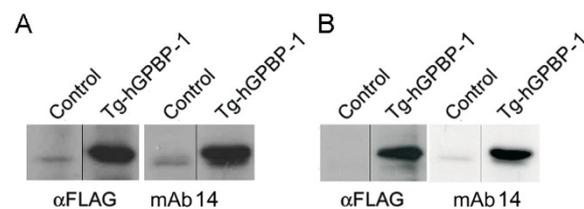
Una vez identificados los fundadores transgénicos, se cruzan con ratones híbridos B6D2F1 (C57BL/6 x DBA/2) que se utilizan por su facilidad para reproducirse estabulados. Identificamos qué ratones han integrado el transgén en la línea germinal (Tg-hGPBP-1) mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa (**Figura 18**).



**Figura 18. Identificación de ratones fundadores que han integrado el transgén en la línea germinal.** Se analiza la presencia del transgén en muestras de ADN genómico de los ratones indicados. Se muestra sólo la PCR correspondiente al transgén, como en la **Figura 17**.

#### 4.1.3. El ratón transgénico expresa FLAG-GPBP-1 humano.

El análisis mediante RT-qPCR de muestras de ARN extraídas de hígado indica que los niveles de ARNm transgénico son aproximadamente 10 veces superiores a los niveles de ARNm endógeno (no se muestra). El análisis mediante SDS-PAGE y *Western blot* de homogenados de distintos órganos de ratones transgénicos muestran que en todos ellos se expresa la proteína recombinante y que tiene el tamaño esperado (**Figura 19**).



**Figura 19. Expresión de hGPBP-1 en ratones transgénicos.** **A:** Análisis mediante *Western blot* de 25  $\mu$ g de homogenado de hígado de un ratón transgénico (Tg-hGPBP-1) y un no-transgénico de la misma camada (Control) con los anticuerpos indicados. **B:** Análisis similar a **A** del material eluído de una inmunoprecipitación con agarosa anti-FLAG de homogenados de riñón de un ratón control y un ratón Tg-hGPBP-1.

Con esta línea de ratones tratamos de establecer si la expresión recombinante (aumentada) de hGPBP-1 es un factor relevante en la GN mediada por IC, como sugiere el modelo murino NZW. Para conseguir este objetivo la línea transgénica se “retrocruza” con ratones C57BL/6 que no desarrollan una GN de forma espontánea y estudiamos si presenta un fenotipo similar a NZW.

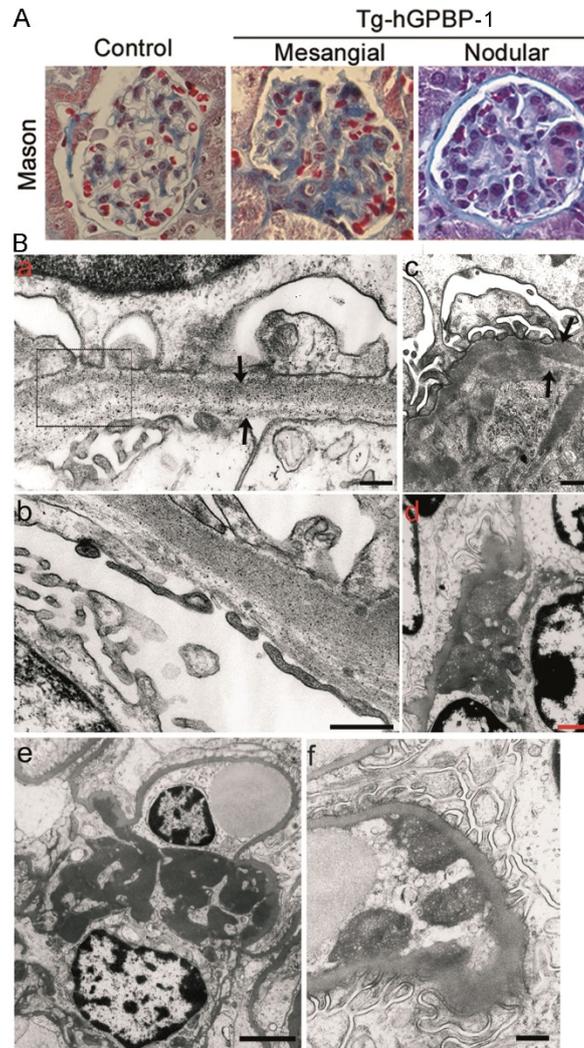
## 4.2. GPBP Y LA NEFROPATÍA IgA.

### 4.2.1. Los ratones transgénicos presentan una glomerulonefritis similar a la de los ratones NZW de edad avanzada.

La GN de los ratones NZW está asociada, como ya vimos, con el aumento en la expresión de GPBP-1, la ruptura de la MBG y el depósito de IgA sobre la MBG dañada (**Figura 11**).

Para estudiar el papel de GPBP-1 en la patogénesis de las GN mediadas por IC, utilizamos un ratón transgénico con un fondo genético no propenso al lupus. De modo similar a lo observado en ratones NZW de edad avanzada, el análisis de los riñones mediante histoquímica y microscopía óptica convencional mostraba una relación entre la expresión transgénica y la GN, al comprobarse que los ratones transgénicos presentaban patrones morfológicos nodulares y mesangiales (**Figura 20A**) que afectaban del 15 al 75% del glomérulo, sin proteinuria. Unos pocos ratones Tg-hGPBP-1 (aprox. 15%) mostraban proliferación de células mesangiales en un 15-50% de sus glomérulos. Los análisis de microscopía electrónica revelaron multitud de anomalías ultraestructurales en los ratones Tg-hGPBP-1 (**Figura 20B**). Observamos manifestaciones fenotípicas tempranas que afectaban principalmente a la MBG capilar, como componentes endoteliales y epiteliales separados unos de otros, rupturas en forma de botones huecos en el componente epitelial disociado (**Figura 20Ba**), ondulaciones de la lámina densa en forma de cola de caballo (**Figura 20Bb**), y depósitos electrodensos entre componentes de la MBG disociada (**Figura 20Bc**). Además, manifestaciones fenotípicas tardías como depósitos mesangiales asociados a la MBG paramesangial que contenían materiales vacuolados electrodensos homogéneos o no (**Figura 20Bd**) que, como en los ratones NZW, ocupaban progresivamente el mesangio y el paramesangio (**Figura 20Be**) o las paredes capilares (**Figura 20Bf**). En general, la GN era menos severa en los Tg-hGPBP-1 que en los NZW de edad avanzada. En cambio, en los ratones control (no transgénicos de la misma camada) no apreciamos patología

glomerular significativa ni mediante microscopía óptica convencional (**Figura 20A**) ni microscopía electrónica (no se muestra).

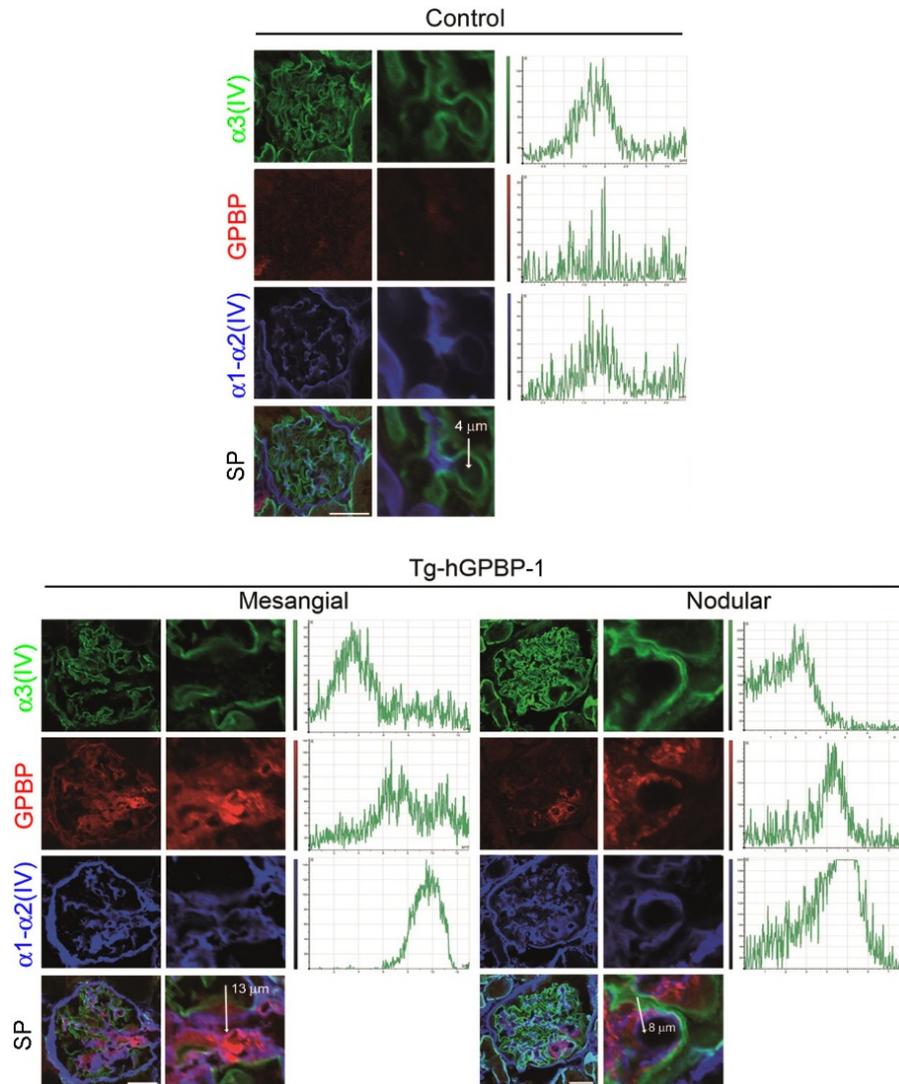


**Figura 20.** La expresión transgénica de hGPBP-1 induce una GN en ratones no predispuestos genéticamente. **A:** Tinción con tricrómico de Mason de secciones glomerulares de los ratones indicados (n= 38). **B:** Alteraciones patológicas ultraestructurales de ratones Tg-hGPBP-1 (n= 16): **a:** Disociación de los componentes endotelial (delgado) y epitelial (grosso) de

la MBG (**flechas**). El **rectángulo** muestra una ruptura en forma de botón hueco en el componente epitelial; **b**: Ondulaciones de la lámina densa en forma de cola de caballo en la MBG capilar; **c**: Material electrodenso depositado en la lámina densa disociada. Las **flechas** muestran los componentes de la MBG disociada; **d**: Material electrodenso homogéneo o vacuolado alineado en la lámina densa de la MBG paramesangial; **e**: Material electrodenso relleno del mesangio y paramesangio; **f**: Material vacuolado sobresaliendo en la pared capilar. Se muestran imágenes seleccionadas de ratones F4 de 8 meses (control y mesangial) y F3 de 12 meses (nodular) en **A**; y F3 de 8 (**a-c**) y 12 meses (**d-f**) en **B**. Barra de escala= 0,2  $\mu\text{m}$  (**a**); 0,5  $\mu\text{m}$  (**b, c y f**); 1  $\mu\text{m}$  (**d**); y 2  $\mu\text{m}$  (**e**). Ampliación original x400 (**A**).

#### 4.2.2. La sobreexpresión de hGPBP-1 en los ratones transgénicos induce la desorganización del colágeno tipo IV.

Una de las características de la GN de NZW es que las redes de colágeno IV de la MBG y del mesangio han perdido su estructura natural, hasta el extremo de que las redes  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  pueden presentarse completamente disociadas y con depósitos de GPBP-1 (**Introducción, 1.6.1.**). De modo similar, en ratones Tg-hGPBP-1 observamos una expansión de la red de colágeno  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  (**Figura 21, Nodular**), una separación en los componentes epitelial y endotelial de la MBG (**Figura 21, Mesangial**), y una acumulación de GPBP-1 entre el colágeno  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  expandido y la red de colágeno  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$ . Mientras, en los ratones control se observa una correcta organización del colágeno IV de la MBG. En conjunto, los datos sugieren que existen semejanzas entre los ratones Tg-hGPBP-1 y NZW de edad avanzada, indicando que una expresión elevada de GPBP-1 induce una desorganización del colágeno IV de la MBG independientemente del fondo genético del ratón.



**Figura 21. Desorganización del colágeno IV en ratones Tg que sobreexpresan hGPBP-1.** Análisis comparativo mediante microscopía confocal de secciones glomerulares (**izquierda**) o porciones amplificadas (**derecha**) de los ratones, tipo de GN, y anticuerpos contra los antígenos, indicados/as. Los ratones Tg pueden presentar tanto glomérulos en los que es más evidente una expansión del colágeno IV del mesangio (**mesangial**), como glomérulos en los que predomina una expansión de la MBG (**nodular**). Los gráficos representan la distribución de la intensidad de fluorescencia de las regiones delimitadas por **flechas** en las imágenes superpuestas (SP). Las

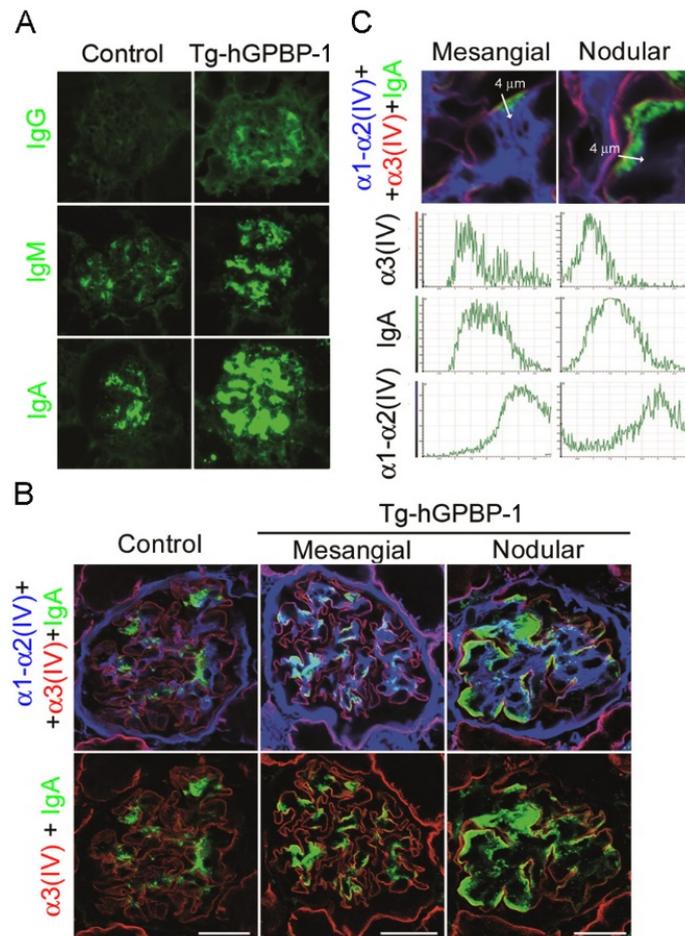
imágenes mostradas corresponden a ratones F4 de 8 meses (control y nodular) y F3 de 12 meses (mesangial). n= 38. Barras de escala= 25  $\mu$ m.

#### **4.2.3. Los ratones transgénicos desarrollan una glomerulonefritis mediada por IgA similar a la nefropatía IgA.**

Los ratones NZW sufren una NIgA secundaria a un lupus y presentan autoanticuerpos circulantes del tipo anti-ADNsc. En cambio los ratones transgénicos no presentan autoanticuerpos anti-ADNsc, anti-ADNdc o anti-nucleosoma circulantes (no se muestra). Además los niveles de IgG o IgA en el suero de ratones transgénicos y control son similares. En cambio, el análisis de los glomérulos mediante inmunofluorescencia reveló que los ratones Tg-hGPBP-1 presentaban depósitos de IgA e IgM, y en menor medida de IgG (**Figura 22A**). Mediante microscopía confocal (**Figura 22B y C**) se observó que los ratones control presentaban depósitos de IgA dispersos sobre una red normal de  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2$ (IV). Sin embargo, los ratones transgénicos mostraban depósitos de IgA en las lesiones histológicas observadas, alineados sobre el componente epitelial de la MBG en la interfase con un mesangio expandido (lesión mesangial) o con el componente endotelial de la MBG engrosado (lesión nodular), en los lugares donde las redes  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5$ . y  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2$  del colágeno IV aparecían separadas. Los depósitos de IgA predominando en el mesangio glomerular son la característica histopatológica principal de la NIgA.

#### **4.2.4. Los ratones Tg-hGPBP-1 presentan patrones de IgA similares a los ratones NZW de edad avanzada.**

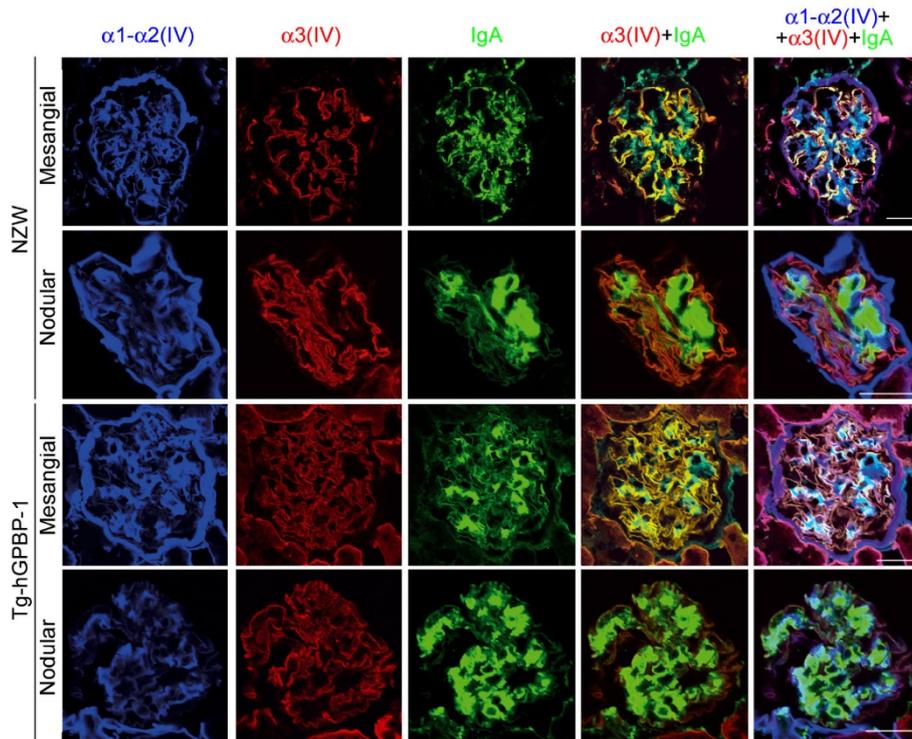
Los ratones transgénicos que sobreexpresan GPBP-1 humano presentan depósitos de IgA distribuidos a lo largo de la MBG y también



**Figura 22. Los ratones Tg presentan una GN mediada por IC. A:** Depósitos de IC observados mediante inmunofluorescencia directa convencional de secciones glomerulares representativas de los ratones indicados. **B:** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de secciones glomerulares de los ratones y tipos de GN indicados/as. **C:** Imágenes ampliadas de depósitos de IgA en las lesiones indicadas de ratones Tg-hGPBP-1. Los gráficos representan la distribución de la IF de las regiones delimitadas por **flechas** en las imágenes superpuestas (n= 38). Las imágenes mostradas corresponden a ratones F5 de 8 meses en **A**; F4 de 10 meses, F3 de 14 meses, F5 de 7 meses (control, mesangial, y nodular respectivamente) en **B**; y F5 de 7 meses en **C**. Barras de escala= 25  $\mu\text{m}$ . Ampliación original x400 (**A**).

formando grandes agregados que ocupan, bien el mesangio que se ha expandido, lo que se denomina GN mesangial, o bien los nódulos, lo que se denomina GN nodular. Este patrón es similar al observado en los ratones NZW de edad avanzada (**Figura 10**).

Realizamos un estudio comparativo entre ambos modelos mediante un análisis por microscopía confocal. Se observa cierta similitud en la distribución de los depósitos de IgA (**Figura 23**).

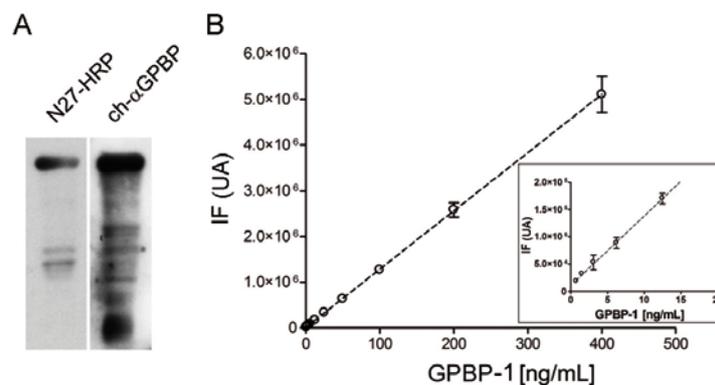


**Figura 23. Distribución de la IgA en ratones Tg-hGPBP-1 y NZW con GN avanzada.** Secciones glomerulares de los ratones y tipo de GN indicada analizadas mediante microscopía confocal sobre las proteínas mencionadas. Barras de escala= 25  $\mu$ m.

### 4.3. GPBP Y LA NEFRITIS LÚPICA.

#### 4.3.1. Identificación de cGPBP-1.

La estructura primaria de GPBP tiene motivos y dominios que le permiten alcanzar la práctica totalidad de compartimentos celulares (Revert *et al.*, 2008). GPBP-1 se exporta, por lo que podría alcanzar el torrente circulatorio. Para estudiar esta posibilidad tratamos de aislar GPBP-1 de suero de donantes sanos mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de mAb N26, un anticuerpo monoclonal anti-GPBP, unido a sefarosa. El análisis del material eluído mediante *Western blot* con anticuerpos policlonales o con un segundo anticuerpo monoclonal (N27) revela la presencia de un polipéptido de unos 75 kDa, lo que indica que GPBP-1 circulante (cGPBP-1) es un constituyente normal del plasma humano (**Figura 24A**). Para cuantificar los niveles de cGPBP-1 en suero o plasma desarrollamos un ELISA sándwich utilizando N26 como anticuerpo de captura y N27 marcado con peroxidasa como anticuerpo de detección. Los anticuerpos son compatibles ya que reconocen epítomos diferentes (**Figura 24B**).



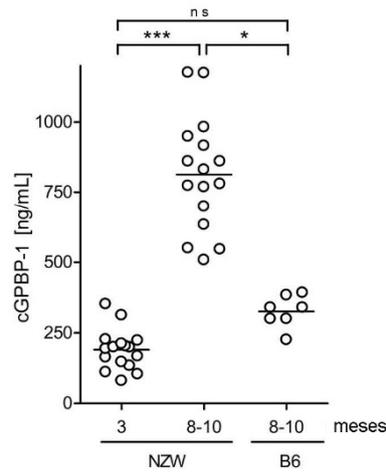
**Figura 24. Identificación de cGPBP-1 y método de cuantificación.** A: Análisis mediante *Western blot* del material obtenido a partir de suero humano por medio de una columna

de anti-GPBP (N26) unido a sefarosa, utilizando un anticuerpo monoclonal (N27) y anticuerpos policlonales de pollo comerciales (ch- $\alpha$ GPBP) para su detección. **B:** Representación gráfica del análisis mediante ELISA sándwich de concentraciones crecientes de poly-His-GPBP-1. Los **círculos** indican la intensidad de fluorescencia (IF) media expresada en unidades arbitrarias (UA). La **línea discontinua** representa la función lineal que mejor ajusta. En el **rectángulo** se muestra una ampliación de los valores menores de la gráfica. La desviación estándar se indica con barras de error (n= 3).

#### 4.3.2. cGPBP-1 es un nuevo mediador en la nefritis lúpica.

Los ratones NZW desarrollaban una GN secundaria a un lupus acompañada con un aumento de la expresión glomerular de GPBP-1 (**Figura 11A**). Aunque se observa un aumento de la expresión local del ARNm, la acumulación glomerular de GPBP-1 también podría deberse, al menos en parte, a que cGPBP-1 hubiera quedado atrapado en las estructuras glomerulares. Para estudiar esta posibilidad determinamos los niveles de cGPBP-1 de ratones NZW jóvenes (sanos) y adultos (enfermos), y de ratones C57BL/6 utilizados como controles adicionales sanos. Los resultados obtenidos mostraron unos niveles plasmáticos de cGPBP-1 más elevados en los ratones NZW de edad avanzada (**Figura 25**). En conjunto los resultados sugerían que el aumento de los niveles de cGPBP-1 podría ser patogénico y que el aumento de GPBP-1 en la matriz extracelular glomerular puede proceder de cGPBP-1.

**Figura 25. Los niveles de cGPBP-1 aumentan en los ratones NZW de edad avanzada.** Los niveles de cGPBP-1 en el suero de cada uno de los ratones de los grupos indicados se determinaron mediante ELISA sándwich directo. Las diferencias de significación estadística de acuerdo con el test de Kruskal Wallis/Dunn están indicadas con \* ( $p < 0,05$ ) o \*\*\* ( $p < 0,001$ ). ns= no significativo.



Además, comprobamos nuevamente mediante microscopía confocal que las redes de colágeno de la MBG aparecían desorganizadas y que GPBP-1 se acumulaba abundantemente entre el componente epitelial de la MBG y el mesangio ensanchado o el componente endotelial de la MBG (Figura 26).

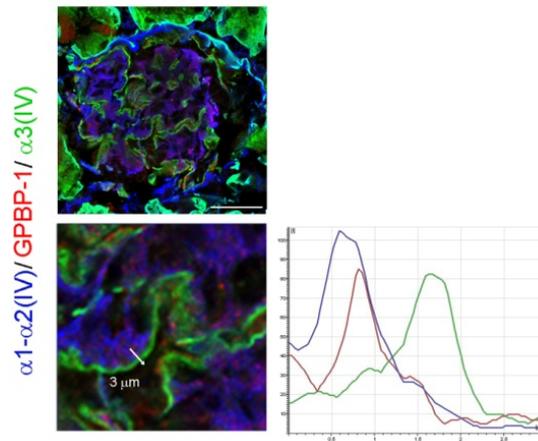


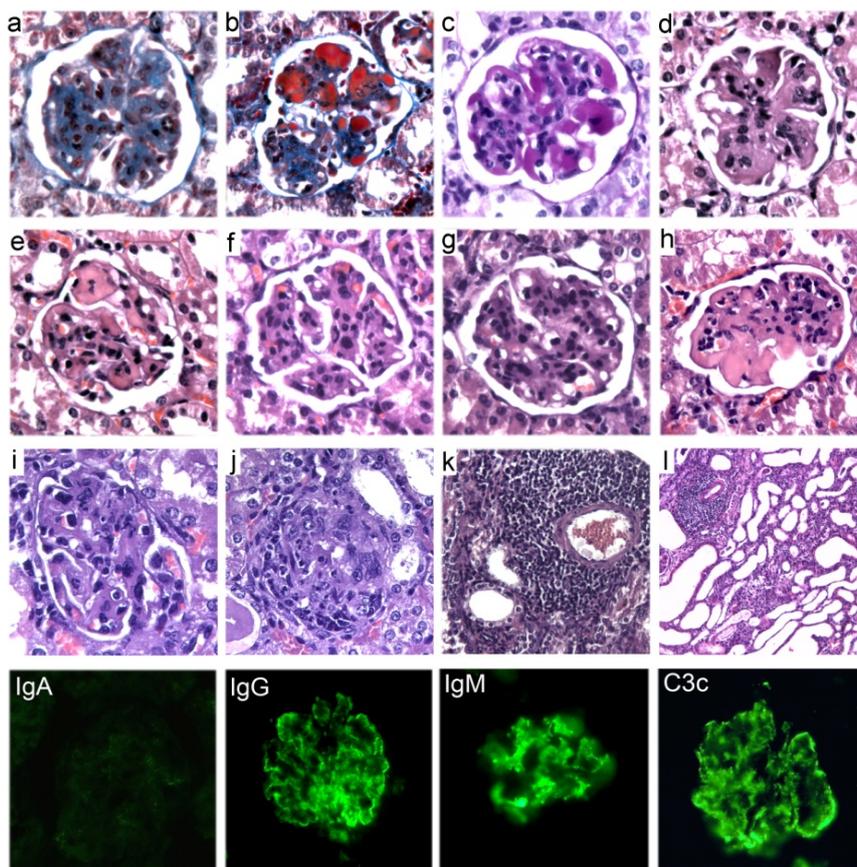
Figura 26. Localización de GPBP-1 entre las redes de colágeno desorganizadas de la MBG de ratones NZW de edad avanzada. Análisis mediante microscopía confocal de secciones

glomerulares de los ratones mencionados. La distribución de GPBP-1 y las cadenas de colágeno IV indicadas se muestran con los colores de sus correspondientes letras. La imagen **inferior** representa una ampliación de la imagen **superior**, y el gráfico representa la distribución de la intensidad de fluorescencia determinada por la zona indicada con la **flecha**. Barra de escala= 35  $\mu\text{m}$ .

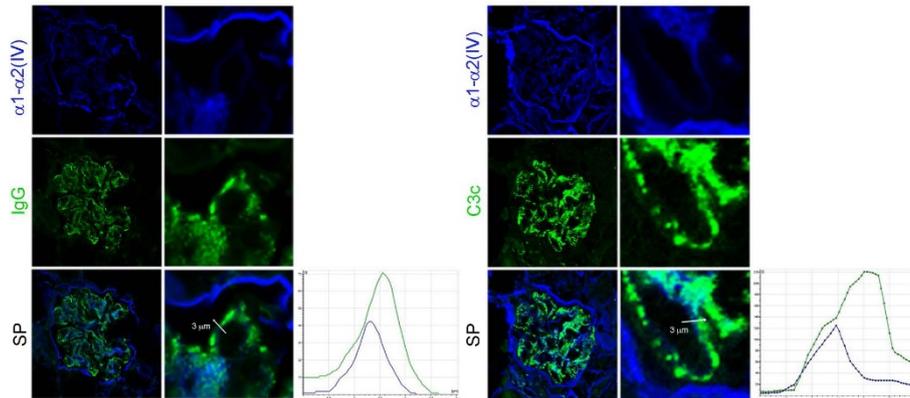
Para caracterizar la GN en los ratones NZW analizamos los riñones de ratones de edad avanzada (8 meses o más) mediante técnicas histoquímicas (**Figura 27a-l**) observándose alteraciones propias de una NL: proliferación mesangial (a), trombo hialino (b), depósitos subendoteliales (c), expansión de la matriz (d), depósitos en forma de alambre (e), lobularidad glomerular (f), proliferación endocapilar (g), infiltrados inflamatorios glomerulares (h), necrosis, cariorrexis y picnosis (i), creciente epitelial (j), infiltrados inflamatorios tubulointersticiales (k) y atrofia tubular (l).

Mediante inmunofluorescencia observamos que los ratones NZW presentaban depósitos glomerulares de IgG y C3c distribuidos principalmente en la periferia del glomérulo, y depósitos de IgM preferentemente ocupando el mesangio, y no de IgA (**Figura 27**).

**Figura 27. Caracterización de la GN mediada por IC basados en IgG de ratones NZW de edad avanzada.** Análisis de secciones glomerulares pertenecientes a ratones NZW de edad avanzada mediante: Técnicas histoquímicas (a-l) utilizando tinción tricrómica de Mason (a, b), PAS (c) y Hematoxilina/Eosina (d-l); Inmunofluorescencia directa para detectar las inmunoglobulinas y el componente del complemento indicadas/o. Ampliación original x400; x200 (k y l).



Y por microscopía confocal observamos la localización de los depósitos de IgG y C3c a lo largo del componente epitelial de la membrana basal glomerular (**Figura 28**).



**Figura 28. Localización de los depósitos de IgG y complemento (C3c) en el glomérulo de ratones NZW.** Se muestran imágenes del análisis mediante microscopía confocal de secciones glomerulares de ratones de edad avanzada en las que se observan depósitos de IgG (composición **izquierda**) y C3c (composición **derecha**) en la red  $\alpha 1-\alpha 2(IV)$ . En cada composición la parte **derecha** representa una zona ampliada de la imagen original, parte **izquierda**. Los gráficos representan la distribución de la intensidad de fluorescencia de la región representada por **flechas** en las imágenes superpuestas (SP). Barras de escala= 37  $\mu m$  (composición **izquierda**) y 54  $\mu m$  (composición **derecha**). Todas las imágenes son representativas y provienen de ratones NZW de 8-10 meses de edad (n= 6).

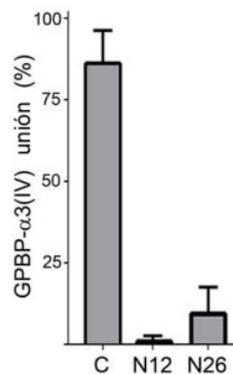
Estos resultados contrastan con lo observado en ratones NZW (**Introducción, 1.6.1.**) que desarrollaban una respuesta autoinmune con predominio de depósitos de IC IgA en el glomérulo similar a una NIgA. Esta diferencia podría deberse a las diferentes condiciones de estabulación de los ratones, pues en este caso los ratones NZW estaban mantenidos en un estabulario libre de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*) mientras que anteriormente estuvieron en un estabulario convencional. Para estudiar esta hipótesis mantuvimos un grupo de ratones jóvenes NZW en un ambiente libre de patógenos y otro grupo de la misma edad en un ambiente sin restricciones, y pudimos confirmar que los ratones NZW mantenidos en un ambiente SPF depositaban preferentemente IgG y que los ratones NZW mantenidos en un ambiente no SPF depositaban preferentemente IgA (no se

muestra). Las diferencias que observamos en la clínica de los ratones NZW en función de su estabulación sugieren que la presencia de patógenos puede condicionar el curso de la enfermedad. Estas diferencias sustentan en parte la “teoría higienista” que propone que un ambiente libre de patógenos favorece y/o agrava las enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Liu y Murphy, 2003; Yazdanbakhsh *et al.*, 2002).

El conjunto de evidencias patológicas observadas en los ratones NZW estabulados en SPF son características de la NL focal o clase III, como vimos en la clasificación anterior (**Tabla III**).

#### 4.3.3. Caracterización de los anticuerpos que bloquean GPBP-1.

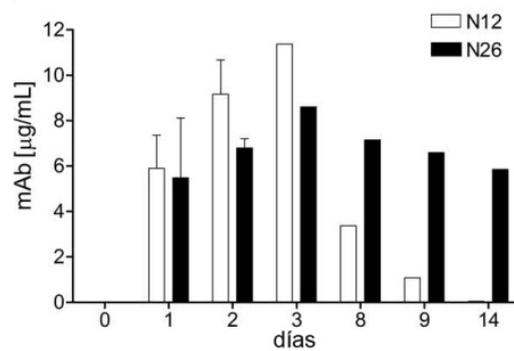
Si cGPBP-1 es un factor patogénico en la NL de NZW la utilización de anticuerpos es una opción terapéutica plausible. Los anticuerpos monoclonales anti-GPBP N12 y N26 se pueden considerar inhibidores de GPBP ya que bloquean la unión entre GPBP-1 recombinante (rGPBP-1) y su sustrato  $\alpha 3(IV)$  *in vitro* (**Figura 29**).



**Figura 29.** Los anticuerpos monoclonales contra GPBP-1 bloquean eficientemente la interacción entre rGPBP-1 y  $\alpha 3$ . La interacción entre GPBP-1 recombinante y  $\alpha 3(IV)$ NC1 en ausencia (Control) o presencia de los anticuerpos indicados se determina mediante un ELISA

según el protocolo descrito en **Materiales y Métodos**. Los valores están representados como porcentaje de unión respecto al control (100%). Se muestra un experimento representativo realizado por triplicado.

Para determinar las propiedades farmacocinéticas de ambos anticuerpos, inyectamos una única dosis intraperitoneal de 250  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{g/g}$  de ratón), y monitorizamos los niveles circulantes de cada anticuerpo (**Figura 30**). Ambos anticuerpos alcanzan la concentración máxima en plasma 3 días después de la inyección, y mientras los niveles de N12 descendían a la mitad el día 8 y fueron casi indetectables el día 14, los niveles de N26 descendían muy lentamente llegando a 6  $\mu\text{g/mL}$  el día 14, lo que indica que el aclaramiento de N26 era menor que el de N12.



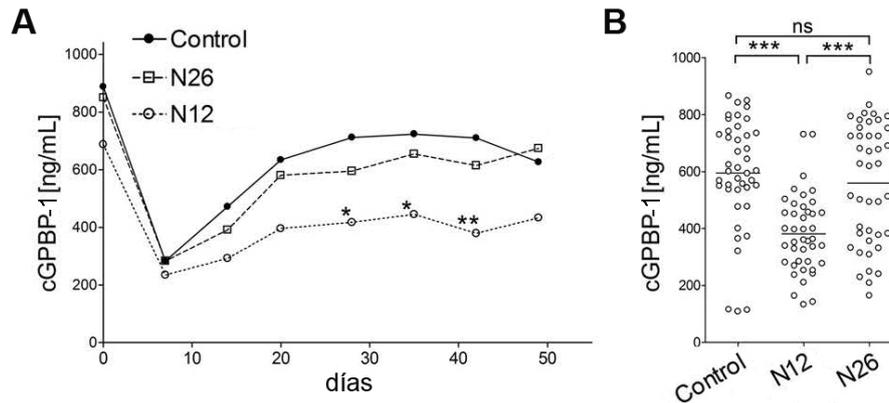
**Figura 30. Aclaramiento de los anticuerpos monoclonales N12 y N26 en el suero de ratones NZW de edad avanzada mantenidos en SPF.** Los ratones recibieron una única inyección intraperitoneal (10  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal) de los anticuerpos indicados. Las muestras de sangre eran recogidas en los días indicados, y los títulos de los anticuerpos en el suero medidos por ELISA. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ).

También observamos que la administración de los anticuerpos podía producir en algún caso aumento de los niveles de cGPBP-1 con el tiempo (ver más abajo), sugiriendo que en ese caso los anticuerpos se unían a cGPBP-1 provocando un efecto rebote en los niveles plasmáticos. En la literatura hay descritos efectos rebote en los niveles plasmáticos asociados a otros tratamientos biológicos (Chung *et al*, 2003).

#### **4.3.4. Los anticuerpos anti-GPBP-1 reducen los niveles de GPBP-1 circulante.**

Para estudiar el papel patogénico de cGPBP-1 en la nefritis lúpica tratamos ratones NZW con los anticuerpos monoclonales anti-GPBP N12 y N26.

Comprobamos la eficacia de estos anticuerpos en el tratamiento de la GN, inyectando intraperitonealmente en ratones NZW de 8-10 meses de edad, aproximadamente 1  $\mu$ g/g de peso corporal (dosis para evitar el efecto rebote) de IgG murina o PBS (Control), y N12 o N26. El tratamiento se administró una vez por semana durante 8 semanas, y para monitorizar los niveles de cGPBP-1, se obtenían muestras de suero justo antes de cada inyección. Después de la primera inyección los niveles de cGPBP-1 descendían independientemente del tratamiento, pudiendo deberse al estrés generado por la manipulación de los ratones. Además, tras la primera semana, los niveles de cGPBP-1 aumentaron y retornaron casi hasta los niveles originales entorno a la tercera semana, excepto para los ratones tratados con N12 que mantenían reducidos sus niveles a lo largo del tratamiento, llegando a ser estadísticamente significativo entre la cuarta y la quinta semana (**Figura 31A**). Si representamos los niveles de cGPBP-1 individualizados para cada ratón (**Figura 31B**) podemos concluir que el tratamiento con N12 fue más efectivo que el realizado con N26.



**Figura 31. Reducción de los niveles de cGPBP-1 en ratones NZW de edad avanzada criados en SPF tratados con anticuerpos específicos anti-GPBP-1. A:** Representación de los valores medios de cGPBP-1 del ensayo terapéutico con los anticuerpos indicados. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control y el grupo tratado con N12 aparecen la 4ª, 5ª y 6ª semana utilizando el test ANOVA de dos vías ( $* p < 0,05$  y  $** p < 0,01$ ). **B:** Representación de los valores de cGPBP-1 en suero de cada muestra individual (círculo) recogida en **A**, y del valor medio de cada serie (línea). Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con N12 y cualquiera de los otros dos grupos según el test Kruskal Wallis/Dunn ( $*** p < 0,001$ ).

#### 4.3.5. El tratamiento con anticuerpos anti-GPBP-1 mejora la NL de ratones NZW de edad avanzada mantenidos en SPF.

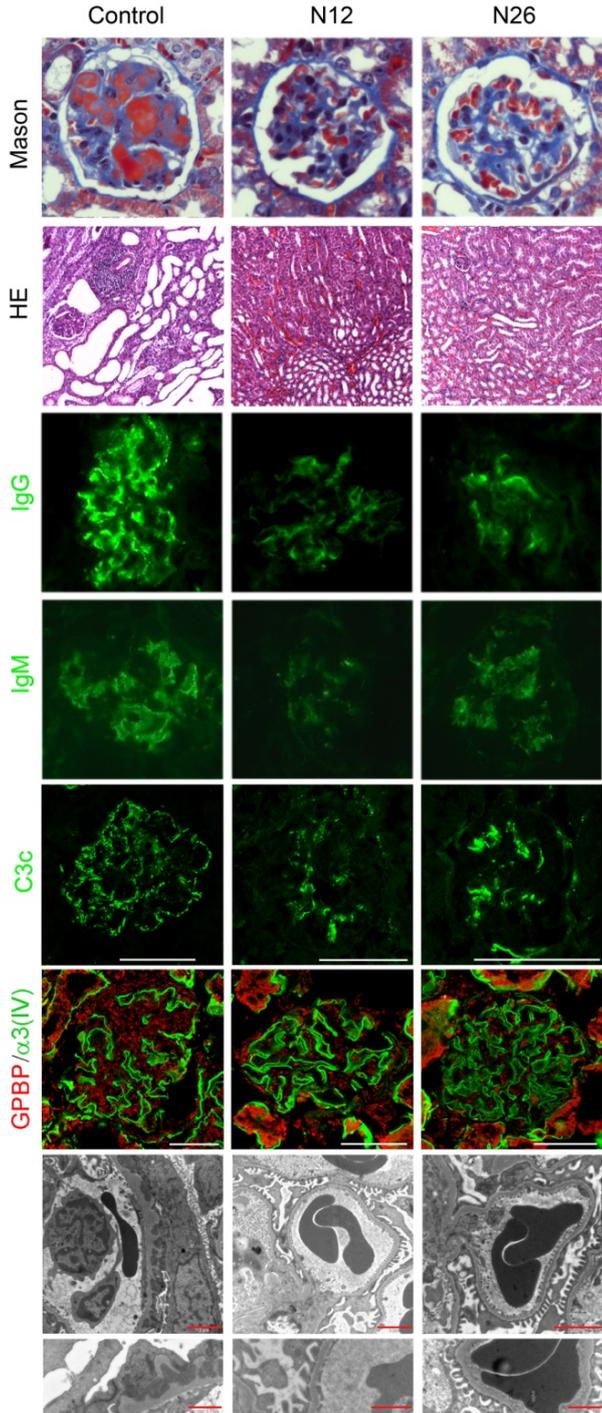
Al final del tratamiento todos los ratones fueron sacrificados y los riñones fueron examinados histológicamente. Los riñones de los ratones tratados con IgG control (mostrado) o PBS (no mostrado) presentaban anomalías características de la GN mediada por IC (NL) de los ratones NZW; sin embargo, los ratones tratados con anticuerpos específicos para GPBP-1 redujeron fuertemente los infiltrados inflamatorios tubulointersticiales, y no presentaron otras lesiones glomerulares o tubulares relevantes (Tinción de Mason y HE). El tratamiento biológico redujo los depósitos glomerulares de GPBP-1 y de IC (IgG, IgM, y C3c), pero no los niveles intracelulares de GPBP-1 en los túbulos. Además provocó la ausencia

virtual de depósitos electrodensos, comúnmente presentes en la cara epitelial de la MBG capilar de los ratones control (**Figura 32**).

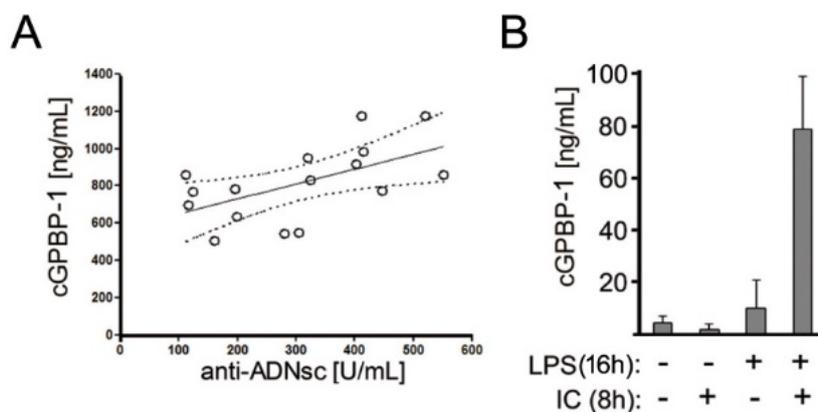
#### **4.3.6. Los macrófagos son una fuente de cGPBP-1 y los inmunocomplejos estimulan su secreción.**

Los ratones NZW de edad avanzada presentan títulos altos de autoanticuerpos anti-ADN característicos del lupus (Revert *et al.*, 2007). Aunque existe cierta controversia sobre el significado clínico de los autoanticuerpos, analizamos los títulos de los ratones incluidos en el ensayo. Los ratones tratados no presentaban diferencias significativas respecto a los ratones no tratados (no se muestra). En cambio, sí observamos una relación directa entre los títulos de autoanticuerpos (IgG anti-ADNsc) y los niveles de cGPBP-1 (**Figura 33A**), lo que sugiere que los IC pueden ser uno de los estímulos que induzca la secreción de cGPBP-1 *in vivo*.

Los macrófagos son uno de los tipos celulares que presenta una mayor expresión de GPBP, no sólo en relación a otras células del sistema inmune, también comparado con células de otros tejidos (esta información se puede obtener en bases de datos de *arrays* de expresión como [www.nextbio.com](http://www.nextbio.com)). Para estudiar si los macrófagos son una fuente de cGPBP y si los IC un estímulo que promueve su secreción, recurrimos a una línea celular de macrófagos murinos, RAW 264.7. Los macrófagos estimulados con LPS aumentan la expresión de GPBP-1 (no se muestra) y la adición posterior de IC aumenta la secreción de cGPBP-1 (**Figura 33B**), lo que sugiere que este estímulo es responsable del aumento de los niveles de cGPBP-1 *in vivo* y que los macrófagos son una de las estirpes celulares que lo producen.



**Figura 32. La administración de anticuerpos anti-GPBP-1 atenúa la progresión de la GN de los ratones NZW.** Análisis histoquímico, por inmunofluorescencia y microscopía electrónica de secciones glomerulares que representan los grupos Control (n= 6), N12 (n= 5) y N26 (n= 5). La tinción de Mason (Mason) y de Hematoxilina/Eosina (HE) nos permitió identificar la arquitectura glomerular, la atrofia tubular y los infiltrados inflamatorios. La inmunofluorescencia indirecta convencional para visualizar los depósitos de IgG e IgM con microscopio convencional, y la distribución de C3c, GPBP-1 y  $\alpha 3(IV)$  con microscopio confocal. La microscopía electrónica nos muestra el material electrodenso de la cara epitelial de la MBG capilar ensanchada de los ratones control pero no en los tratados. Barras de escala= 35  $\mu\text{m}$  y 54  $\mu\text{m}$  (imágenes **superior** e **inferior** de microscopía confocal); y 2  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$  (imágenes **superior** e **inferior** de microscopía electrónica). Ampliación original x400.

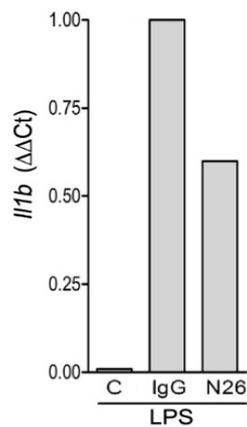


**Figura 33. La respuesta inmune mediada por autoanticuerpos aumenta los niveles de cGPBP-1.** **A:** Representación gráfica de los títulos de cGPBP-1 e IgG anti-ADNsc del suero de ratones NZW. La **línea continúa** representa la función lineal que mejor ajusta, y las **líneas discontinuas** el intervalo de confianza al 95%. El análisis estadístico de los datos mediante el coeficiente de correlación de Spearman sugiere que hay una relación directa entre los títulos de cGPBP-1 y los de autoanticuerpos en los sueros con  $p < 0,01$ . **B:** Representación gráfica de los niveles de cGPBP-1 en el medio de cultivo de células RAW 264.7 tratadas (+) o no (-) de forma consecutiva con LPS e inmunocomplejos (IC) durante los periodos de tiempo indicados.

#### 4.3.7. Los anticuerpos anti-GPBP-1 reducen los niveles de pro-IL-1 $\beta$ en células RAW 264.7.

El hecho de que los macrófagos estimulados con IC aumentaran los niveles de cGPBP-1, y que el bloqueo de cGPBP-1 por medio de anticuerpos específicos redujera los infiltrados inflamatorios tubulointersticiales de los ratones NZW, hizo que nos planteáramos si cGPBP-1 podría ser un posible factor pro-inflamatorio. Existen varios estímulos que inducen la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos RAW 264.7. Una de las citocinas pro-inflamatorias con especial relevancia en la respuesta inmune es IL-1 $\beta$  (Sandberg *et al.*, 2012).

Para estudiar el papel de cGPBP-1 en la respuesta de macrófagos a estímulos pro-inflamatorios, analizamos la expresión de *Il1b* mediante RT-qPCR en células RAW 264.7 tratadas con LPS en presencia o no de N26 (**Figura 34**). El anticuerpo monoclonal limita los niveles de *Il1b* a la mitad, lo que sugiere que cGPBP-1 es relevante en la respuesta inflamatoria que median los macrófagos y que los anticuerpos monoclonales podrían modificar la respuesta inmune *in vivo*.



**Figura 34. El bloqueo de GPBP-1 reduce la expresión del gen que codifica para IL-1 $\beta$ .** Representación gráfica de los niveles de ARNm de *Il1b* analizados mediante RT-qPCR

(utilizando *Hprt1* como control interno) a partir del ARN de células RAW 264.7. Las células RAW 264.7 se cultivaron en presencia o no, de los anticuerpos indicados, antes de ser inducidas con LPS (8 h). Las células tratadas con IgG control se utilizaron como referencia. El tratamiento se realizó sin cambiar el medio de cultivo entre los diferentes pasos. Se muestra un experimento representativo realizado por triplicado.



## **5. DISCUSIÓN.**



Las GN mediadas por IC, incluyendo la NIgA y la NL, son enfermedades que aún no se comprenden bien, con mecanismos patogénicos no esclarecidos. El repertorio terapéutico para tratarlas es limitado y no totalmente efectivo.

La NIgA se trata con inmunosupresores y terapia de apoyo, esta última procura mejorar los síntomas y hacer que el paciente adquiera hábitos de vida saludables sin atender a las causas de la enfermedad. Los tratamientos tienen una eficacia limitada e incluso existen serias dudas sobre la conveniencia de usar inmunosupresores a largo plazo (> 6 meses), especialmente en pacientes con una enfermedad poco avanzada, sin síndrome nefrótico, ya que el tratamiento de apoyo podría conseguir resultados similares en muchos casos.

La NL también se trata con inmunosupresores, y como en el caso anterior, de eficacia limitada: ciclofosfamida, micofenolato mofetilo, azatioprina, corticoesteroides (p. ej. prednisona) o hidroxicloroquina, este último un fármaco usado para tratar la malaria con mecanismo de acción poco conocido. También se administran tratamientos sintomáticos con fármacos anti-proteinúricos bloqueantes del sistema renina-angiotensina-aldosterona y se prescriben hábitos de vida saludables que todos deberíamos seguir (ejercicio, dietas bajas en sal, evitar bebidas alcohólicas, etc). Recientemente se ha propuesto el uso de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 supresor de linfocitos B, Rituximab, que abre la puerta al uso de terapia “biológica” que complemente o sustituya los tratamientos con otros inmunosupresores.

En este escenario, el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción patogénicos, y de biomarcadores y dianas que permitan terapias más eficaces y con menos efectos colaterales y secundarios, siguen siendo objetivos sanitarios de primer orden.

El uso de modelos animales es un paso imprescindible en la búsqueda de nuevas terapias. Ante la necesidad de obtener resultados significativos en periodos de tiempo limitados se suele recurrir a modelos animales de enfermedad con una evolución corta, y con síntomas y signos que sean

fácilmente medibles, objetivos y cuantificables (p. ej. glucemia en diabetes). Pero no siempre estos modelos son los más adecuados ya que no mimetizan la evolución natural de la enfermedad humana. En este sentido, la utilización de los ratones NZW como modelo de nefropatía tiene la ventaja de tratarse de una enfermedad natural, no inducida, que muestra una progresión lenta, más parecida a la enfermedad humana, aunque sin una proteinuria evidente, lo que dificulta una valoración más objetiva y cuantitativa de los resultados. La plasticidad de este modelo se pone de manifiesto cuando observamos que ratones NZW con una misma procedencia pueden desarrollar una NIgA o una NL en función de las condiciones de estabulación. Este resultado sugiere que ambas enfermedades comparten mecanismos patogénicos y que sólo factores ambientales cambian el curso de la enfermedad haciendo que predomine un cuadro más inflamatorio (NL) o uno menos inflamatorio (NIgA). Es probable que las diferencias sean consecuencia de la exposición a agentes patógenos, lo que estaría de acuerdo con la “teoría higienista” que propone que los ambientes asépticos favorecen el fenómeno autoinmune, y que “distraer” el sistema inmune con patógenos u otros microorganismos es una forma de atenuar o incluso curar las enfermedades de este tipo.

Un aumento de la expresión de GPBP-1 provocaba una GN con depósito de IC tipo IgA en ratones no predispuestos, caracterizada por una desestructuración de las redes de colágeno IV de la MBG y por una expansión del mesangio, de modo similar a lo que se observa en ratones NZW. Esto pone de manifiesto que una expresión glomerular aumentada de GPBP-1 en ratones NZW puede tener carácter patogénico. El aumento de expresión se acompaña de un aumento de los niveles de GPBP-1 en la matriz extracelular, especialmente en los sitios en los que las redes de colágeno IV se desestructuran, lo que pone en evidencia que GPBP-1 tiene un papel crítico en la organización supramolecular de las redes de colágeno IV. La presencia de GPBP-1 en la MBG indicaba que sigue la ruta secretora. La identificación de formas de GPBP-1 en el plasma confirmaba esta observación y sugería que cGPBP-1 (GPBP-1 circulante) podría tener un papel patogénico

relevante, e incluso que podía ser un biomarcador de la progresión de la enfermedad o una diana terapéutica. Una de las ventajas de “dianizar” una molécula soluble que circula en el plasma es la facilidad para alcanzar el compartimento (farmacocinético) en el que ejerce su función. Además abre la posibilidad al uso de terapias biológicas que, como en el caso de los anticuerpos monoclonales, pueden ser de una alta afinidad y especificidad.

Con la administración de anticuerpos monoclonales contra GPBP conseguimos reducir los signos de la GN de NZW. Este hecho demuestra que la función biológica de cGPBP-1 es relevante en la patogénia de la enfermedad de NZW. Los anticuerpos monoclonales han podido modificar dos mecanismos diferentes. Por un lado los ratones tratados presentan una MBG mejor estructurada, confirmando el papel que tiene GPBP en la organización supramolecular del colágeno IV. Por otro lado, se observa que el tratamiento reduce los infiltrados inflamatorios intersticiales y el depósito de IC y complemento, sugiriendo que cGPBP-1 influye o determina la respuesta inmune que causa o agrava la GN. La relevancia de cGPBP-1 en la respuesta inmune la sugiere el hecho de que los macrófagos son una fuente de cGPBP-1 y responden a la presencia de IC aumentando significativamente su secreción. Además, la expresión de *I1b* en macrófagos estimulados con LPS se reduce en presencia de anticuerpos bloqueantes de GPBP-1 en el medio de cultivo.

Es probable que ambas funciones estén relacionadas precisamente a través de cGPBP-1, y que un aumento de los niveles de cGPBP-1 facilite el infiltrado de células del sistema inmune para lo que sería necesaria una modificación de la estructura de la matriz extracelular. En este caso, las alteraciones que observamos en la MBG cuando aumentamos los niveles de GPBP-1 sería un reflejo de esa actividad aunque los glomérulos no suelen presentar infiltrados inflamatorios, pero sí depósitos de IC que se facilitarían por los cambios estructurales de la MBG que media GPBP-1. En definitiva, cGPBP-1 formaría parte de un sistema biológico que activa la respuesta inmune y facilita que esta alcance la biofase en la que ejerce su acción.

Cuando la actividad del sistema inmune se vuelve contra el propio organismo (autoinmunidad) interferir la activación que media cGPBP-1 debe ser un mecanismo farmacológico que trascienda la enfermedad de NZW. En este sentido, recientemente hemos comprobado que pacientes con GN mediadas por IC (NL y NlgA) presentan niveles de cGPBP-1 significativamente aumentados respecto la población sana, lo que sugiere que cGPBP-1 puede ser una diana en enfermedades humanas similares a la GN de NZW, y que anticuerpos como N26 pueden ser una terapia eficaz alternativa a los tratamientos con inmunosupresores.

## **6. CONCLUSIONES.**



1. La expresión transgénica de GPBP-1 humano en ratones no predispuestos a padecer glomerulonefritis induce la desorganización del colágeno tipo IV de la MBG.
2. Los ratones transgénicos de GPBP-1 humano desarrollan una glomerulonefritis similar a la nefropatía IgA.
3. Los ratones Tg presentan patrones de IgA similares a los que se observan en ratones NZW de edad avanzada.
4. GPBP-1 en su versión circulante (cGPBP-1) es un constituyente normal del plasma humano.
5. Los niveles de cGPBP-1 aumentan en los ratones NZW de edad avanzada.
6. cGPBP-1 es un nuevo factor patogénico en la nefritis lúpica de ratones NZW criados en una zona libre de patógenos.
7. GPBP-1 se localiza entre las redes de colágeno desorganizadas de la MBG de ratones NZW de edad avanzada.
8. La administración de anticuerpos monoclonales anti-GPBP-1 atenúa la progresión de la glomerulonefritis de ratones NZW.
9. Macrófagos estimulados con LPS e inmunocomplejos secretan cGPBP-1 al medio extracelular.
10. El bloqueo específico de GPBP-1 mediante anticuerpos monoclonales, reduce la expresión del gen que codifica la citocina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  en células RAW 264.7.



## **7. BIBLIOGRAFÍA.**



Agnello, V. *Lupus diseases associated with hereditary and acquired deficiencies of complement*. Springer Semin. Immunopathol., 1986, 9: 161-178.

Akahoshi, M., Nakashima, H., Tanaka, Y., Kohsaka, T., Nagano, S., Ohgami, E., Arinobu, Y., Yamaoka, K., Niino, H., Shinozaki, M., Hirakata, H., Horiuchi, T., Otsuka, T., Niho, Y. *Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum., 1999, 42 (8): 1644-1648.

al-Janadi, M., al-Balla, S., al-Dalaan, A., Raziuddin, S. *Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases*. J. Clin. Immunol., 1993, 13 (1): 58-67.

Alpy, F., Tomasetto, C. *Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals*. J. Cell Sci., 2005, 118: 2791-2801.

Atkinson, J. P. *Complement deficiency. Predisposing factor to autoimmune syndromes*. Am. J. Med., 1988, 85: 45-47.

Balow, J. E., Boumpas, D. T., Austin, H. A. "Systemic lupus erythematosus and the kidney". En: Lahita, R. G. *Systemic Lupus Erythematosus*. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1999, 657-685.

Barratt, J., Feehally, J., Smith, A. C. *Pathogenesis of IgA nephropathy*. Semin. Nephrol., 2004, 24: 197-217.

Berden, J. H., Licht, R., van Bruggen, M. C., Tax, W. J. *Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis*. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., 1999, 8 (3): 299-306.

Bernal, D., Quinones, S., Saus, J. *The human mRNA encoding the Goodpasture antigen is alternatively spliced.* J. Biol. Chem., 1993, 268: 12090-12094.

Bielschowsky, M., Goodall, C. M. *Origin of inbred NZ mouse strains.* Cancer Research, 1970, 30: 834-836.

Bona, C. A., Theofilopoulos, A. N. *The Molecular pathology of autoimmune diseases.* 2<sup>nd</sup> ed. Taylor and Francis, 2002.

Borza, D.B., Bondar, O., Todd, P., Sundaramoorthy, M., Sado, Y., Ninomiya, Y., Hudson, B. G. *Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the alpha 3(IV) collagen chain. Sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the alpha4 and alpha5 NC1 domains.* J. Biol. Chem., 2002, 277: 40075-40083.

Braverman, I. M. *Study of autoimmune disease in New Zealand mice. I. Genetic features and natural history of NZB, NZY and NZW strains and NZB-NZW hybrids.* J. Invest. Dermatol., 1968, 50: 483-99.

Butkowski, R. J., Langeveld, J. P., Wieslander, J., Hamilton, J., Hudson, B. G. *Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen.* J. Biol. Chem., 1987, 262: 7874-7877.

Calvete, J. J., Revert, F., Blanco, M., Cervera, J., Tárrega, C., Sanz, L., Revert-Ros, F., Granero, F., Pérez-Payá, E., Hudson, B. G., Saus, J. *Conformational diversity of the Goodpasture antigen, the noncollagenous-1 domain of the  $\alpha 3$  chain of collagen IV.* Proteomics, 2006, 6: S237-S244.

Chiang, C. K., Inagi, R. *Glomerular diseases: genetic causes and future therapeutics.* Nat. Rev. Nephrol., 2010, 6: 539-554.

Chung, E. S., Packer, M., Lo, K. H., Fasanmade, A. A., Willerson, J. T. *Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure.* *Circulation*, 2003, 107: 3133-3140.

D'Agati, V. D. "Renal Disease in Systemic Lupus Erythematosus, Mixed Connective Tissue Disease, Sjögren's Syndrome, and Rheumatoid Arthritis". En: Jennette, J. C., Olson, J. L., Schwartz, M. M., Silva, F. G. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2007, 12: 517-612.

David, M., Borza, D. B., Leinonen, A., Belmont, J. M., Hudson, B. G. *Hydrophobic amino acid residues are critical for the immunodominant epitope of the Goodpasture autoantigen. A molecular basis for the cryptic nature of the epitope.* *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 6370-6377.

Davidson, A., Diamond, B. *Autoimmune diseases.* *N. Engl. J. Med.*, 2001, 345: 340-350.

Deocharan, B., Qing, X., Lichauco, J., Putterman, C. *Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies.* *J. Immunol.*, 2002, 168 (6): 3072-3078.

Donadio, J. V., Grande, J. P. *IgA Nephropathy.* *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347 (10): 738-748.

Ermann, J., Fathman, C. G. *Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation.* *Nat. Immunol.*, 2001, 2: 759-761.

Feng, L., Xia, Y., Wilson, C. B. *Alternative splicing of the NC1 domain of the human alpha 3(IV) collagen gene. Differential expression of mRNA*

*transcripts that predict three protein variants with distinct carboxyl regions.* J. Biol. Chem., 1994, 269: 2342-2348.

Fielder, A. H., Walport, M. J., Batchelor, J. R., Rynes, R. I., Black, C. M., Dodi, I. A., Hughes, G. R. *Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility.* Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.), 1983, 286 (6363): 425-428.

Fugmann, T., Hausser, A., Schöffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., Olayioye, M. A. *Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramida transfer protein.* J. Cell Biol., 2007, 178: 15-22.

Gama Sosa, M. A., De Gasperi, R., Elder, G. A. *Animal transgenesis: an overview.* Brain Struct. Funct., 2010, 214: 91-109.

Gardiner, W. J., Teboul, L. *Overexpression transgenesis in mouse: pronuclear injection.* Methods Mol. Biol., 2009, 561: 111-26.

Gay, S., Losman, M. J., Koopman, W. J., Miller, E. J. *Interaction of DNA with connective tissue matrix proteins reveals preferential binding to type V collagen.* J. Immunol., 1985, 135: 1097.

Glick, B. R., Pasternak, J. J., Patten, C. L. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA.* 4<sup>th</sup> ed. cap. 21. ASM Press, 2010.

Goodpasture, E. *The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza.* Am. J. Med. Sci., 1919, 158: 863-870.

Grammer, A. C., Lipsky, P. E. *B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res. Ther.*, 2003, 5 Suppl. 4: S22-27.

Granero, F., Revert, F., Revert-Ros, F., Láinez, S., Martínez-Martínez, P., Saus, J. *A human-specific TNF-responsive promoter for Goodpasture antigen-binding protein*. *FEBS J.*, 2005, 272: 5291-5305.

Granero-Moltó, F., Sarmah, S., O'Rear, L., Spagnoli, A., Abrahamson, D., Saus, J., Hudson, B. G., Knapik, E. W. *Goodpasture antigen-binding protein and its spliced variant, ceramide transfer protein, have different functions in the modulation of apoptosis during zebrafish development*. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 20495-20504.

Gunwar, S., Saus, J., Noelken, M. E., Hudson, B. G. *Glomerular Basement Membrane*. *J. Biol. Chem.*, 1990, 266: 5466-5469.

Haas, M. "*IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis*". En: Jennette, J. C., Olson, J. L., Schwartz, M. M., Silva, F. G. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2007, 10: 423-486.

Haberern, C. L., Kupchik, H. Z. *Diversity of adhesion to basement membrane components of human pancreatic adenocarcinomas*. *Cancer Res.*, 1985, 45: 5246-5251.

Hahn, B. H., Shulman, L. E. *Autoantibodies and nephritis in the white strain (NZW) of New Zealand mice*. *Arthritis Rheum.*, 1969, 12: 355-64.

Hall, W. H., Simpson, L. O. *The origins of some hitherto undescribed inbred mouse strains*. *Lab. Anim.*, 1975, 9: 139-142.

Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., Nishijima, M. *Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramida*. Nature, 2003, 426: 803-809.

Hanada, K. *CERT-mediated trafficking of ceramide*. Biochim. Biophys. Acta., 2009, 1791: 684-691.

Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., Lacy, E. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., Neilson, E. G. *Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen*. N. Engl. J. Med., 2003, 348: 2543-2556.

Ioannou, Y., Isenberg, D. A. *Current concepts for the management of systemic lupus erythematosus in adults: a therapeutic challenge*. Postgrad. Med. J., 2002, 78 (924): 599-606.

Izui, S., Lambert, P. H., Miescher, P. A. *In vitro demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA. A possible basis for a local formation of DNA-anti-DNA complexes in systemic lupus erythematosus*. J. Exp. Med., 1976, 144: 428.

Johansson, C., Hellmark, T., Wieslander, J. *Anti-type IV collagen antibodies in Goodpasture syndrome*. Contrib. Nephrol., 1994, 107: 188-193.

Kalluri, R., Gattone, V. H. 2<sup>nd</sup>, Noelken, M. E., Hudson, B. G. *The alpha 3 chain of type IV collagen induces autoimmune Goodpasture syndrome*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91: 6201-6205.

Kammer, G. M., Khan, I. U., Malemud, C. J. *Deficient type I protein kinase A isozyme activity in systemic lupus erythematosus T lymphocytes*. J. Clin. Invest., 1994, 94: 422.

Kelley, V. E., Winkelstein, A. *Age- and sex-related glomerulonephritis in New Zealand white mice*. Clin. Immunol. Immunopathol., 1980, 16: 142-50.

Klinman, D. M., Steinberg, A. D. *Inquiry into murine and human lupus*. Immunol. Rev., 1995, 144: 157-193.

Kumagai, K., Kawano, M., Shinkai-Ouchi, F., Nishijima, M., Hanada, K. *Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT*. J. Biol. Chem., 2007, 282: 17758-17766.

Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970, 227: 680-685.

Lake, R. A., Morgan, A., Henderson, B., Staines, N. A. *A key role for fibronectin in the sequential binding of native dsDNA and monoclonal anti-DNA antibodies to components of the extracellular matrix: Its possible significance in glomerulonephritis*. Immunology, 1985, 54: 389.

Lamour, N. F., Stahelin, R. V., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Wang, E., Allegood, J. C., Merrill, A. H. Jr., Cho, W., Chalfant, C. E. *Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis*. J. Lipid Res., 2007, 48: 1293-1304.

Lemmon, M. A., Ferguson, K. M. *Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides*. Biochem. Soc. Trans., 2001, 4: 377-384.

Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., Abrams, C. S. *Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton*. FEBS Lett., 2002, 513: 71-76.

Lerner, R. A., Glassock, R. J., Dixon, F. J. *The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis*. J. Exp. Med., 1967, 126: 989-1004.

Linker-Israeli, M., Quismorio, F. P. Jr., Horwitz, D. A. *CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis*. Arthritis Rheum., 1990, 33 (8): 1216-1225.

Lipsky, P. E. *Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity*. Nat. Immunol., 2001, 2: 764-766.

Liu, A. H., Murphy, J. R. *Hygiene hypothesis: fact or fiction?* J. Allergy Clin. Immunol., 2003, 111: 471-478.

Llorente, L., Richaud-Patin, Y., Wijdenes, J., Alcocer-Varela, J., Maillot, M. C., Durand-Gasselin, I., Fourrier, B. M., Galanaud, P., Emile, D. *Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus*. Eur. Cytokine Netw., 1993, 4 (6): 421-427.

Lodish, H. F., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Darnell, J. E. *Molecular Cell Biology*. 3<sup>rd</sup> ed. Scientific American Press, N.Y., 1995.

Loewen, C. J., Roy, A., Levine, T. P. *A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP*. EMBO J., 2003, 22: 2025-2035.

Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., Roitt, I. *Inmunología*. 7ª ed. Elsevier Mosby, 2007.

Marquina, R., Díez, M. A., López-Hoyos, M., Buelta, L., Kuroki, A., Kikuchi, S., Villegas, J., Pihlgren, M., Siegrist, C. A., Arias, M., Izui, S., Merino, J., Merino, R. *Inhibition of B cell death causes the development of an IgA nephropathy in (New Zealand white x C57BL/6)F(1)-bcl-2 transgenic mice*. *J. Immunol.*, 2004, 172: 7177-85.

McCarthy, J. B., Furcht, L. T. *Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro*. *J. Cell Biol.*, 1984, 98: 1474-1480.

Melo, E. O., Canavessi, A. M., Franco, M. M., Rumpf, R. *Animal transgenesis: state of the art and applications*. *J. Appl. Genet.*, 2007, 48: 47-61.

Mencarelli, C., Hammels, C., Van Den Broeck, J., Losen, M., Steinbusch, H., Revert, F., Saus, J., Hopkins, D. A., De Baets, M. H., Steinbusch, H. W., Martínez-Martínez, P. *The expression of the Goodpasture antigen-binding protein (ceramida transporter) in adult rat brain*. *J. Chem. Neuroanat.*, 2009, 38: 97-105.

Monteiro, R. C. *New insights in the pathogenesis of IgA nephropathy*. *Nefrología*, 2005, 25 (2): 82-86.

Morimoto, C., Reinherz, E. L., Schlossman, S. F., Schur, P. H., Mills, J. A., Steinberg, A. D. *Alterations in immunoregulatory T cell subsets in active systemic lupus erythematosus*. *J. Clin. Invest.*, 1980, 66: 1171-1174.

Munoz, L. E., Gaipal, U. S., Franz, S., Sheriff, A., Voll, R. E., Kalden, J. R., Herrmann, M. *SLE--a disease of clearance deficiency?*. *Rheumatology* (Oxford), 2005, 44 (9): 1101-1107.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*. 7<sup>a</sup> ed. Mc Graw Hill, 2009.

Paul, W. E. *Fundamental immunology*. 7<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

Penadés, J. R., Bernal, D., Revert, F., Johansson, C., Fresquet, V. J., Cervera, J., Wieslander, J., Quinones, S., Saus, J. *Characterization and expression of multiple alternatively spliced transcripts of the Goodpasture antigen gene region. Goodpasture antibodies recognize recombinant proteins representing the autoantigen and one of its alternative forms*. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 229: 754-760.

Quinones, S., Bernal, D., Garcia-Sogo, M., Elena, S. F., Saus, J. *Exon/intron structure of the human alpha 3(IV) gene encompassing the Goodpasture antigen (alpha 3(IV) NC1). Identification of a potentially antigenic region at the triple helix/NC1 domain junction*. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267: 19780-19784.

Raya, A., Revert, F., Navarro, S., Saus, J. *Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human Goodpasture antigen*. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 12642-12649.

Raya, A., Revert-Ros, F., Martínez-Martínez, P., Navarro, S., Reselló, E., Vieites, B., Granero, F., Forteza, J., Saus, J. *Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the Goodpasture antigen, is an*

*alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis.* J. Biol. Chem., 2000, 275: 40392-40399.

Renneke, H. G., Cotran, R. S. y Venkatachalam, M. A. *Role of molecular charge in glomerular permeability: tracer studies with cationized ferritins.* J. Cell Biol., 1975, 67: 638-646.

Revert, F., Penadés, J. R., Plana, M., Bernal, D., Johansson, C., Itarte, E., Cervera, J., Wieslander, J., Quinones, S., Saus, J. *Phosphorylation of the Goodpasture antigen by type A protein kinase.* J. Biol. Chem., 1995, 270: 13254-13261.

Revert, F., Merino, R., Monteagudo, C., Macías, J., Peydró, A., Alcácer, J., Muniesa, P., Marquina, R., Blanco, M., Iglesias, M., Revert-Ros, F., Merino, J., Saus, J. *Increased Goodpasture Antigen-Binding Protein Expression Induces Type IV Collagen Disorganization and Deposit of Immunoglobulin A in Glomerular Basement Membrane.* Am. J. Pathol., 2007, 171: 1419-1430.

Revert, F., Ventura, I., Martínez-Martínez, P., Granero-Moltó, F., Revert-Ros, F., Macías, J., Saus, J. *Goodpasture antigen-binding protein is a soluble exportable protein that interacts with type IV collagen. Identification of novel membrane-bound isoforms.* J. Biol. Chem., 2008, 283: 30246-30255.

Revert-Ros, F., López-Pascual, E., Granero-Moltó, F., Macías, J., Breyer, R., Zent, R., Hudson, B. G., Saadeddin, A., Revert, F., Blasco, R., Navarro, C., Burks, D., Saus, J. *Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) directs myofibril formation: identification of intracellular downstream effector 130-kDa GPBP-interacting protein (GIP130).* J. Biol. Chem., 2011, 286: 35030-35043.

Saito, S., Matsui, H., Kawano, M., Kumagai, K., Tomishige, N., Hanada, K., Echigo, S., Tamura, S., Kobayashi, T. *Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes.* J. Biol. Chem., 2008, 283: 6584-6593.

Sandberg, W. J., Låg, M., Holme, J. A., Friede, B., Gualtieri, M., Kruszewski, M., Schwarze, P. E., Skuland, T., Refsnes, M. *Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 $\beta$  release from macrophages.* Part. Fibre Toxicol., 2012, 9: 32.

Saus, J., Wieslander, J., Langeveld, J. P., Quinones, S., Hudson, B. G. *Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV.* J. Biol. Chem., 1988, 263: 13374-13380.

Saus, J. "Goodpasture's Syndrome". En: Roitt, I.M. *Encyclopedia of Immunology.* 2<sup>nd</sup> ed. Londres: Academic Press Ltd., 1998, vol. 2, pp. 1005-1011.

Saus, J. *Goodpasture antigen binding protein.* 24/2/1999, E.E.U.U., PCT/IB00/00324, WO 00/50607, 60/121,483, 2000.

Saus, J. *TNF-inducible promoters and methods for using.* 8/12/2000, E.E.U.U., PCT/EP01/14412, WO 02/46433, 60/254,649, 2001.

Saus, J. *Methods and reagents for treating autoimmune disorders.* 31/01/2001, E.E.U.U., PCT/EP02/01010, WO 02/061430, 60/265,249, 2002.

Scheer, R., Grossman, M. *Immune aspects of the glomerulonephritis associated with pulmonary hemorrhage.* Ann. Int. Med., 1964, 60: 1009.

Shlomchik, M. J., Marshak-Rothstein, A., Wolfowicz, C. B., Rothstein, T. L., Weigert, M. G. *The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity*. Nature, 1987, 328: 805-811.

Shlomchik, M. J., Madaio, M. P., Ni, D., Trounstein, M., Huszar, D. *The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity*. J. Exp. Med., 1994, 180 (4): 1295-306.

Soccio, R. E., Breslow, J. L. *StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism*. J. Biol. Chem., 2003, 278: 22183-22186.

Stanton, M. C., Tange, J. D. *Goodpasture's syndrome (pulmonary hemorrhage associated with glomerulonephritis)*. Austral Ann. Med., 1958, 7: 132-144.

Sturfelt, G., Truedsson, L. *Complement and its breakdown products in SLE*. Rheumatology (Oxford), 2005, 44: 1227-1232.

Suzuki, H., Moldoveanu, Z., Hall, S., Brown, R., Vu, H. L., Novak, L., Julian, B. A., Tomana, M., Wyatt, R. J., Edberg, J. C., Alarcón, G. S., Kimberly, R. P., Tomino, Y., Mestecky, J., Novak, J. *IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1*. J. Clin. Invest., 2008, 118: 629-639.

Tanaka, M., Seki, G., Someya, T., Nagata, M., Fujita, T. *Aberrantly Glycosylated IgA1 as a Factor in the Pathogenesis of IgA Nephropathy*. Clinical Developmental Immunology, 2011, 1-7.

Tang, S., Lui, S. L., Lai, K. N. *Pathogenesis of lupus nephritis: An update*. Nephrology, 2005, 10: 174-179.

Termaat, R. M., Brinkman, K., van Gompel, F., van den Heuvel, L. P., Veerkamp, J. H., Smeenk, R. J., Berden, J. H. *Cross-reactivity of monoclonal anti-DNA antibodies with heparan sulfate is mediated via bound DNA/histone complexes*. Journal Autoimmunity, 1990, 3 (5): 531-545.

Termaat, R. M., Assmann, K. J., Dijkman, H. B., van Gompel, F., Smeenk, R. J., Berden, J. H. *Anti-DNA antibodies can bind to the glomerulus via two distinct mechanisms*. Kidney Int., 1992, 42: 1363-1371.

Theofilopoulos, A. N., Dixon, F. J. *Murine models of systemic lupus erythematosus*. Adv. Immunol., 1985, 37: 269-390.

Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H., Kuhn, K. *A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes*. Eur. J. Biochem., 1981, 120: 203-211.

Tsilibary, E. C., Charonis, A. S. *The role of the main noncollagenous domain (NC1) in type IV collagen self-assembly*. J. Cell Biol., 1986, 103: 2467-2473.

Vanacore, R., Ham, A-J. L., Vohler, M., Sanders, C. R., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Sharpless, K. B., Dawson, P. E., Hudson, B. G. *A Sulfilimine Bond Identified in Collagen IV*. Science, 2009, 325: 1230-1234.

Wang, X., Rao, R. P., Kosakowska-Cholody, T., Masood, M. A., Southon, E., Zhang, H., Berthet, C., Nagashim, K., Veenstra, T. K., Tessarollo, L., Acharya, U., Acharya, J. K. *Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice*. J. Cell Biol., 2009, 184: 143-158.

Wener, M. H., Mannik, M., Schwartz, M. M., Lewis, E. J. *Relationship between renal pathology and the size of circulating immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus*. *Medicine (Baltimore)*, 1987, 66 (2): 85-97.

Wieslander, J., Bygren, P., Heinegård, D. *Isolation of the specific glomerular basement membrane antigen involved in Goodpasture syndrome*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984a, 81: 1544-1548.

Wieslander, J., Barr, J. F., Butkowski, R. J., Edwards, S. J., Bygren, P., Heinegård, D., Hudson, B. G. *Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984b, 81: 3838-3842.

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., van Ree, R. *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis*. *Science*, 2002, 296: 490-494.



## **8. ABREVIATURAS.**



- °C: grado Celsius.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: ADN complementario.
- ADNdc: ADN de doble cadena.
- ADNsc: ADN de simple cadena.
- AF: AlexaFluor.
- ANA: *Antinuclear antigen*.
- ANOVA: *Analysis of Variance*.
- aprox.: aproximadamente.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: ARN mensajero.
- ATP: Adenosina 5'-trifosfato.
- BCA-1: *B-cell attracting chemokine-1*.
- bNLS: *Bipartite nuclear localization sequence* (Secuencia de localización nuclear bipartita).
- C-C: *Coiled-coil*.
- CEBA: Comité de ética y bienestar animal.
- CERT: *Ceramide transporter*.
- cGPBP: *circulating GPBP* (GPBP circulante).
- CKI $\gamma$ 2: *Casein kinase I isoform gamma-2*.
- cm: centímetro/s.
- CMV: Citomegalovirus.
- C-terminal: Carboxi-terminal.
- Da: Daltons.
- DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's médium*.
- DTT: *Dithiothreitol*.
- EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*.
- EGP: Enfermedad de Goodpasture.
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*.
- ERC: Enfermedad renal crónica.
- ERCT: Enfermedad renal crónica terminal.

FFAT: *Two phenylalanine in an acidic tract.*  
FITC: *Fluorescein isothiocyanate.*  
g: gramo/s.  
GN: Glomerulonefritis.  
GP: Antígeno Goodpasture.  
GPBP: *Goodpasture-antigen binding protein.*  
GRO- $\beta$ : Growth-regulated oncogene-beta.  
h: hora/s.  
HBSS: *Hanks balanced salt solution.*  
HE: Hematoxilina/Eosina.  
HEK 293: *Human Embryonic Kidney 293.*  
HRP: *Horseradish peroxidase.*  
IC: Inmunocomplejo/s.  
IF: Intensidad de fluorescencia.  
IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma.  
Ig: Inmunoglobulina/s.  
IP: Inmunoprecipitación.  
Kb: Kilobase/s.  
kDa: kilodalton/s.  
kV: kilovoltio/s.  
L: Litro/s.  
LES: Lupus eritematoso sistémico.  
LPS: Lipopolisacárido.  
M: Molar.  
mAb: *monoclonal Antibody* (Anticuerpo monoclonal).  
MBG: Membrana basal glomerular.  
MCP-1: *Monocyte Chemotactic Protein-1.*  
ME: Microscopía electrónica.  
MF: Microscopía de fluorescencia.  
mg: miligramo/s.  
min: minuto/s.

mL: mililitro/s.  
mM: milimolar.  
Mn<sup>+2</sup>: Manganeso<sup>+2</sup>.  
MO: Microscopía óptica.  
NC1: Dominio no colagenoso-1.  
NF-κB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.  
ng: nanogramo/s.  
NIgA: Nefropatía IgA.  
NL: Nefritis lúpica.  
nm: nanómetro/s.  
NP-40: Nonidet P-40.  
ns: no significativo.  
N-terminal: Amino-terminal.  
OMG: Organismo modificado genéticamente.  
ON: Oligonucleótido.  
ORF: *Open reading frame*. Pauta abierta de lectura.  
p. ej.: por ejemplo.  
p/v: peso/volumen.  
p: valor p.  
PAS: *Periodic acid-Schiff*.  
PB: *Phosphate buffered* (Tampón fosfato).  
pb: par/es de base/s.  
PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Tampón fosfato salino).  
PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa).  
pg: picogramo/s.  
PH, dominio: *Pleckstrin homology* (Dominio homólogo a pleckstrina).  
PI4P: *Phosphatidylinositol-4-phosphate*.  
PKD: *Protein kinase D*.  
pmoles: picomoles.  
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*.  
PP2Cε: Proteína fosfatasa 2Cε.

pSer: Fosfoserina.

pThr: Fosfotreonina.

pTyr: Fosfotirosina.

PVDF: *Polyvinylidene difluoride*.

RAW 264.7: Línea celular de macrófago murino con leucemia.

RE: Retículo endoplasmático.

rGPBP: *recombinant GPBP* (GPBP recombinante).

RT-qPCR: *Reverse transcription-quantitative PCR* (Retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa).

SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato sódico).

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis* (Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS).

SPF: *Specific pathogen free*.

SR, dominio: *Serine rich* (Dominio rico en serinas).

SRBC: *Sheep red blood cells*.

START: *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer*.

TBS: *Tris-Buffered Saline*.

TBST: *Tris-Buffered Saline Tween-20*.

Tc, linfocitos: Linfocitos T citotóxicos.

Tg: Transgénico.

TGF- $\beta$ : *Transforming growth factor-beta*.

Th, linfocitos: "*T-helper*" (Linfocitos T colaboradores).

TNF- $\alpha$ : *Tumor necrosis factor-alpha*.

Tris: Tris-hidroximetil-aminometano.

TRITC: *Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate*.

UA: Unidades arbitrarias.

v/v: volumen/volumen.

V: Voltio/s.

VAP: *Vesicle associated membrane protein-associated protein*.

x g: veces la gravedad.

$\mu$ g: microgramo/s.

## **9. AGRADECIMIENTOS.**



Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que he ido conociendo a lo largo de estos años y que han contribuido en mayor o menor medida a mi formación como investigador:

A Juan Saus por haberme dado la oportunidad de participar en esta hermosa aventura, y enseñarme la verdadera dedicación y pasión por una idea.

A Fernando Revert, fundamental para mi formación, por enseñarme desinteresadamente todo cuanto sé, e inculcarme la pasión por este trabajo. Gracias por todos los momentos que hemos pasado tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Paco Revert, investigador incansable y fuente de sabiduría inagotable. Gracias por tus consejos y por mostrarme el esfuerzo por el trabajo.

A todas las personas con las que he coincidido en el laboratorio. Al grupo que había cuando llegué: Pilar Sepulveda, Piluca, Froi, Dunja y Maria Helena. A Zahara y Filo que han estado a mi lado desde el principio, gracias por hacer del día a día algo más que un trabajo. Al grupo de pre-doctorales que empezamos: Nacho, Carlos, Mario y Sergio ¡Qué distinto hubiera sido todo sin esos almuerzos relajantes! A mi primer técnico, Andreu, por todo lo que pasamos juntos tanto dentro como fuera del trabajo. Al “moro” Anas, por esas charlas desde ese divino diferente punto de vista. A Gilberto, Eva, Irene, Ernesto, y a los más recientes, Natalia, Sandra, Carmen, Vanessa, Hector, Aida, Carol, Marcos, Dani, María, Christine, Raúl y Roberto,

A las personas que he conocido durante mi estancia en el Centro de Investigaciones Citológicas y posteriormente en el Príncipe Felipe. A los jefes de grupo, en particular a Javier Cervera, Chelo Guerri, Deborah Burks, José

Hernández Yago, Jose Enrique O'Connor, Quique Pérez Payá (DEP), y Pino. A los técnicos, entre ellos M<sup>a</sup> José Agulló, Eloisa, Carmen Verdejo, M<sup>a</sup> José Lazaro y Roberto Sánchez. Y como no, a los compañeros con los que he vivido numerosos momentos: Sole, Pilar, Elisa, Rafa, Eva, las "Guerris girls", Benito, Jesús Angel, Abelardo, M Carmen, Mario, Eliana, Virginia, Viviana. En mi última etapa en la Universidad de Valencia, a Ana Díaz y a "sus" chicas. A Javier Alcácer, por sus análisis patológicos tan didácticos.

Al grupo de Santander. A los investigadores Jesús y Ramón Merino, gracias por hacer que mi estancia fuera tan agradable, y al resto del equipo, María, Esther, Inés, Claudio, Jovana, y en especial Marcos y Maigüi, gracias por el tiempo que pasamos juntos y por hacer que fuera feliz durante esos meses del 2005.

A los "Citopeople". Gracias por desconectar del trabajo en tantas ocasiones, y evadirnos tantos viernes, desde cuando empezó todo, allá en la Alameda, hasta hace poco en una mesa redonda: Mariam, Juanqui, Rebeca, Ana Blanco, Ana Sánchez, Santi, Nuria, Gemma, y Alberto.

A los "Biolocos". A los que se dedican a esto, gracias por compartir vuestras experiencias, siempre ayuda saber donde se encuentra uno. Y a todos, gracias por pasárnoslo tan bien y reírnos tanto cada vez que nos vemos: Arantxa, Dani, Silvia, Pepe, Merche, Paula, Vicente y Sandra.

A los "Ribera". Ese grupo de adolescentes que hoy en día sigue compartiendo buenos momentos y más que vendrán a partir de ahora: Gloria, Vicent, Mari Carmen, Asier, Lorena, Carles, Rosi, Anna, Alejandro y María.

A toda mi gente de Xàtiva. Gracias por estar ahí cada vez que tenía la oportunidad de volver, y permitir que desconectara del trabajo, especialmente

a David y Álex. Y como no a los que siguen ahí desde la niñez: Jorge, Octavio, Sergio, Seve, Manu, Javi, Riki y Manolo.

A mi familia política, Mercedes, Ezequiel, Fernan, Merce, Jesús, y al pequeño Héctor.

A mis tíos, Juan, Eusebio, Avelina, y "Nanin", a mis primas Isa y M<sup>a</sup> Jesús, a Víctor y José Daniel, y al pequeño Adrián.

Por último, dar las gracias a mis padres, Jesús y Mari Carmen, por inculcarme la pasión por aprender y descubrir, de la paciencia una virtud, y porque sin su ayuda nunca hubiera podido llegar a ser lo que soy. A mi hermano David, fuente inagotable de ideas, por tener siempre algo que hacer. Y a Cris, por estar durante estos años a mi lado aportándome todo cuanto necesito.

A todos, ¡GRACIAS!