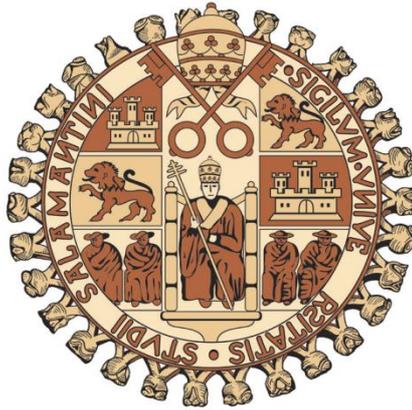


**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ABC EN EL TRÁFICO  
DE SUSTANCIAS COLEFÍLICAS EN EL  
COMPARTIMENTO NÚCLEO-RETICULO  
ENDOPLASMÁTICO DEL HEPATOCITO**

**TESIS DOCTORAL**

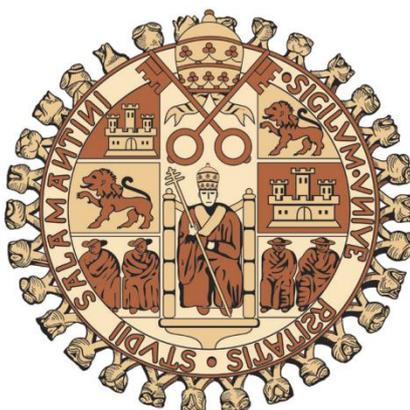
**RUBÉN ROSALES RODRÍGUEZ**

**2012**



**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ABC EN EL TRÁFICO  
DE SUSTANCIAS COLEFÍLICAS EN EL  
COMPARTIMENTO NÚCLEO-RETICULO  
ENDOPLASMÁTICO DEL HEPATOCITO**

Memoria que presenta **D. Rubén Rosales Rodríguez** para optar  
al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 1 de Diciembre de 2011



D<sup>a</sup>. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ABC EN EL TRÁFICO DE SUSTANCIAS COLEFÍLICAS EN EL COMPARTIMENTO NÚCLEO-RETICULO ENDOPLASMÁTICO DEL HEPATOCITO", presentada por D. Rubén Rosales Rodríguez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los Drs. D. José Juan García Marín y D<sup>a</sup> María Jesús Monte Río, del Departamento de Fisiología y Farmacología.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 1 de Diciembre de 2011.

Fdo. María Jesús Monte Río



D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN Y D<sup>a</sup>. MARÍA JESÚS MONTE RÍO  
CATEDRÁTICOS DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE  
LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ABC EN EL TRÁFICO DE SUSTANCIAS COLEFÍLICAS EN EL COMPARTIMENTO NÚCLEO-RETICULO ENDOPLASMÁTICO DEL HEPATOCITO”, presentada por D. Rubén Rosales Rodríguez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 1 de Diciembre de 2011.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. María Jesús Monte Ríó



El doctorando ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación, con referencia BES-2008-005526.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto BFU2006-12577/BFI. “Papel de transportadores de membrana de las familias OATP y ABC en los mecanismos hepáticos de defensa frente a la toxicidad de sustancias endógenas y xenobióticas”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2007-2009.

Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto BFU2007-30688-E/BFI. “Red española de investigación sobre proteínas transportadoras de membrana y sus implicaciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas (REIT)”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2008-2009.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA036/08. “Estudio de los mecanismos reguladores del tráfico núcleo-citoplasmático de moléculas orgánicas activadoras de receptores nucleares”. Investigador Principal: MJ Monte Río. 2008-2009.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto GR75/2008. “Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2008-2010.

Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña. VI Convocatoria. “Investigación de nuevas dianas moleculares para la detección y la quimioterapia del colangiocarcinoma”. Investigador principal: RI Rodríguez Macías. 2009-2012.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto SAF2009-08493. “Papel del receptor nuclear FXR en la defensa contra el estrés oxidativo y la carcinogénesis”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2010.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto: SAF2010-15517. "Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas". Investigador principal: JJ García Marín. 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA023A11-2. "Evaluación de estrategias de supresión tumoral por inducción de diferenciación celular mediante la activación de la vía de señalización regida por el gen NR1H4". Investigador Principal: MJ Monte Río. 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA070A11-2. "Valor diagnóstico e interés como diana farmacológica en el tratamiento del colangiocarcinoma del gen *SLC10A2*". Investigador Principal: RI Rodríguez Macías. 2011-2012.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO/11. "Bases moleculares de la respuesta SOS mediada por el receptor nuclear FXR y su papel en la hepatocarcinogénesis". Investigador Principal: JJ García Marín. 2011-2012.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Cytosol-nucleus traffic and colocalization with FXR of conjugated bile acids in rat hepatocytes. Monte MJ, Rosales R, Macias RI, Iannota V, Martinez-Fernandez A, Romero MR, Hofmann AF, Marin JJ. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 295(1): G54-G62, 2008.

Chemotherapy in the treatment of primary liver tumours. Marin JJ, Castaño B, Martinez-Becerra P, Rosales R, Monte MJ *Cancer Therapy*; 6 (1b): 711- 728, 2008.

Strategies for overcoming chemotherapy resistance in enterohepatic tumours. Marin JJ, Castaño B, Blazquez AG, Rosales R, Efferth T, Monte MJ. *Curr Mol Med*; 10(5); 467- 485, 2010.

Han sido presentados en los siguientes congresos:

Acceso restringido de aniones orgánicos al núcleo del hepatocito. ¿Mecanismo dependiente de ATP?  
Rosales R, Monte MJ, Macías RIR, Cuesta de Juan S, Romero MR, Martínez-Fernández A, Marín JJG.  
XXX de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Elche, 2006).

Selectively restricted access of bile acids and other organic anion to hepatocyte nucleus. Role of ATP-dependent mechanisms?  
Romero MR, Monte MJ, Rosales R, Macías RIR, Iannota V, Martínez-Fernández A, Hofmann AF, Marín JJG.  
XIX International Bile Acid Meeting. Bile Acids: Biological Actions and Clinical Relevance (Freiburg (Alemania), 2006).

Selectively restricted access of bile acids and other organic anion to hepatocyte nucleus. Role of ATP-dependent mechanisms?  
Marín JJG, Rosales R, Iannota V, Martinez-Fernandez A, Romero MR, Macías RIR, Hofmann AF, Monte MJ.  
The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (Boston (EEUU), 2006).  
Publicación: *Hepatology*, 44, 382A-383A.

Identificación de un acceso restringido al núcleo del hepatocito de moléculas orgánicas con capacidad de interaccionar con el ADN.  
Rosales R, Monte MJ, Macías RIR, Ramos Vecino M, Romero MR y Marín JJG.  
XXXII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. (Madrid, 2007).

Publicación: *Gastroenterología y Hepatología*, 30, 141.

Selectivity of the access to the nuclei of hepatocytes of bile acids species and small organic molecules.

Rosales R, Monte MJ, Macías RIR, Romero MR, Briz O, Perez MJ, Serrano MA, Homann AF, Marín JJG.

Comunicación Oral

42nd Annual Meeting of European Association for the Study of the Liver. (Barcelona, 2007).

Publicación: Journal of Hepatology, 46, S19.

Identificación de un acceso restringido al núcleo del hepatocito de moléculas orgánicas con capacidad de interaccionar con el ADN.

Rosales R, Monte MJ, Macías RIR, Romero MR, Marín JJG.

LXVI Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva. (Madrid, 2007).

Publicación: Revista Española de Enfermedades Digestivas, 99, 68.

Selectively restricted access of bile acids and other organic anion to hepatocyte nucleus. Role of ATP-dependent mechanisms?

Rosales R, Monte MJ, Macias RIR, Romero MR, Marín JJG.

XXXIV SECF Congress. (Valladolid, 2007).

Publicación: Acta Physiologica, 190, S655, 99.

Tráfico citosólico-nuclear de ácidos biliares y colocalización con el receptor nuclear FXR en hepatocitos de rata.

Rosales R, Monte MJ, Macías RIR, Blázquez AG, Martínez-Becerra P, Martínez-Becerra MJ, González-San Martín F, Serrano MA, Marín JJG.

Comunicación Oral

XXXIII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. (Madrid, 2008).

Publicación: Gastroenterología y Hepatología 31, 106.

Protein-independent cytosol-nucleus traffic of bile acids, subnuclear colocalization with FXR and role of ABC transporters in the hepatocyte nucleus envelope.

Rosales R, Monte MJ, Blazquez AG, Macias RIR, Herraes E, Perez MJ, Gonzalez-San Martin F, Marín JJG.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. (Milán (Italia), 2008).

Publicación: Journal of Hepatology, 48, S175.

Cytosol-nucleus traffic of bile acids and subnuclear colocalization with FXR

Rosales R, Monte MJ, Blazquez AG, Macías RIR, Marín JJG.

XX Internacional Bile Acid Meeting. Bile Acid Biology and Therapeutic Actions. (Amsterdam (Holanda), 2008).

Colocalización de sustancias colestílicas con FRX en regiones de cromatina transcripcionalmente activa y papel de proteínas ABC en su eliminación del núcleo.

Kunk F, Rosales R, Monte MJ, Macias RIR, Blázquez AG, Herraes E, Martínez-Becerra P, Keck E, Perez E, Briz O, Marín JJG.

LXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva. (Sitges, 2008).

## Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, al Dr. José Juan García Marín por darme la oportunidad de formar parte de este gran equipo, por su valioso apoyo desde el principio y porque ha estado pendiente de supervisar y alentar este trabajo día a día. A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río, por transmitirme el gusto por la investigación, por su paciencia y exigencia, por ofrecerme consejo, apoyo y tiempo. Gracias a los dos, han sido un ejemplo para mí.

A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano García, por su interés, por estar siempre dispuesta a ayudar y por seguir siempre de cerca mi trabajo, a pesar de sus nuevas obligaciones.

A la Dra. Rocío Rodríguez Macías, por introducirme en el fascinante mundo de la inmunocitoquímica, por su apoyo y sus valiosos consejos.

Al Dr. Oscar Briz Sánchez, por su gran ayuda en la clonación de MRP2, por todo lo que me ha enseñado en estos años y por tener siempre tiempo para los demás. Gracias por hacerlo todo mucho más sencillo.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, porque con ella di mis primeros pasos en los cultivos celulares y por su inestimable ayuda en los momentos finales de elaboración de esta Tesis. Gracias por su ánimo.

A la Dra. Alba García Blázquez y al Dr. Pablo Martínez Becerra, por su ayuda, su apoyo y sobre todo por su amistad. Gracias por tantos momentos vividos en el laboratorio.

Al resto de compañeros del grupo de investigación, por su contribución a formar un verdadero equipo. A la Dra. M<sup>a</sup> José Pérez García, por su ayuda y su buen humor. A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por su apoyo, su ayuda y su atenta disposición. A Javier Vaquero, por su ayuda con la transfección de FXR y sus "translocaciones". A Ester González, a Elisa Lozano y a Laura Sánchez, por su ánimo y por todos los buenos ratos que hemos pasado. A las nuevas incorporaciones, Alba, Virginia, Jorge, Alicia, Alex, Fernando, Lara y Laura. Y a toda la gente que ya no está en el laboratorio y con quien he tenido la suerte de coincidir. A todos ellos, muchas gracias por los buenos momentos en el trabajo diario.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y al Departamento de Microbiología y Genética un agradecimiento especial, por permitirme el uso de sus instalaciones.

A M<sup>a</sup> Isabel Hernández por su excelente trabajo en la secretaría y su ayuda.  
A los técnicos y auxiliares de laboratorio que han facilitado la elaboración de esta Tesis. Al personal del Servicio de Experimentación Animal por formar un excelente equipo.

## Dedicada a

Amanda, ¿cómo resumir en unas líneas tanta gratitud?  
Sin tu apoyo no hubiese sido posible.

Mis Padres y mi hermano Carlos, por su cariño y sus  
ánimos. Sois un referente y un orgullo para mí.

Mi familia y amigos, por estar siempre ahí.

Mis abuelos, siempre están conmigo.

“Cuando emprendas el viaje hacia Ítaca  
ruega que sea largo el camino,  
lleno de aventuras, lleno de experiencias.

A los Lestrigones, a los Cíclopes  
o al fiero Poseidón, nunca temas.

No encontrarás trabas en el camino  
si se mantiene elevado tu pensamiento y es exquisita  
la emoción que toca el espíritu y el cuerpo.

Ni a los Lestrigones, ni a los Cíclopes,  
ni al feroz Poseidón has de encontrar,  
si no los llevas dentro del corazón,  
si no los pone ante ti tu corazón.

Ruega que sea largo el camino.  
Que muchas sean las mañanas de verano  
en que - ¡con qué placer! ¡con qué alegría! –  
entres en puertos nunca antes vistos.  
Detente en los mercados fenicios  
para comprar finas mercancías  
madreperla y coral, ámbar y ébano,  
y voluptuosos perfumes de todo tipo,  
tantos perfumes voluptuosos como puedas.

Ve a muchas ciudades egipcias  
para que aprendas y aprendas de los sabios.  
Siempre en la mente has de tener a Ítaca.  
Llegar allá es tu destino.  
Pero no apresures el viaje.  
Es mejor que dure muchos años  
y que ya viejo llegues a la isla,  
rico de todo lo que hayas guardado en el camino  
sin esperar que Ítaca te de riquezas.  
Ítaca te ha dado el bello viaje.  
Sin ella no habrías aprendido el camino.  
No tiene otra cosa que darte ya.  
Y si la encuentras pobre, Ítaca no te ha engañado  
sabio como te has vuelto con tantas experiencias,  
habrás comprendido lo que significan las Ítacas.”

Konstantínos Kaváfis.

ÍTACA.

## ABREVIATURAS FRECUENTES

**AB:** Ácido biliar

**ABC:** "ATP-Binding cassette"

**ADNc:** ADN complementario

**ALT:** Alanina aminotransferasa

**ARNm:** ARN mensajero

**ARNr:** ARN ribosómico

**ASBT:** "Apical sodium-dependent bile acid transporter"

**AST:** Aspartato aminotransferasa

**BCRP:** "Breast cancer resistance protein"

**BSEP:** "Bile salt export pump"

**Ct:** Ciclo umbral

**CYP:** Enzimas citocromo P450

**DBD:** "DNA binding domain"

**DC:** Ácido desoxicólico

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EC<sub>50</sub>:** Concentración efectiva 50

**ECL:** "Enhanced chemiluminescence"

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético

**EEM:** Error estándar de la media

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**ERR:** "Estrogen related receptor"

**FD:** FITC dextrano

**FGF:** "Fibroblast grow factor"

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**FITC-GC:** Colilglicilamido fluoresceína

**FITC-GQDC:** Quenodesoxicolilglicilamido fluoresceína

**FITC-GUDC:** Desoxicolilglicilamido fluoresceína

**FSC:** "Forward light scatter"

**FXR:** "Farnesoid X receptor"

**GAPDH:** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

**GC:** Ácido glicocólico

**GR:** Receptor de glucocorticoides

**GUDC:** Ácido glicoursodesoxicólico

**GW4064:** ácido 3-(2,6-diclorofenil)-4-(3'-carboxi-2-cloro-estilbeno-4-il)-oximetil-5-isopropil-isoxazol

**HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazintansulfónico

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución

**IPTG:** Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

**LB:** Medio Luria-Bertani

**LBD:** "Ligand binding domain"

**LC:** Ácido litocólico

**LC-MS-MS:** Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

**LM:** "Loading medium"

**LRH-1:** "Liver receptor homologue-1"

**LXR:** "Liver X receptor"

**MCS:** "Multiple cloning site"

**MDR:** "Multidrug resistance"

**MEM:** "Minimum essential medium eagle"

**MOPS:** Ácido morfolino propansulfónico

**MR:** Receptor de mineralocorticoides

**MRP:** "Multidrug resistance associated protein"

**MSD:** "Membrane spanning domain"

**MTT:** Sal de tetrazolio

**NBD:** "Nucleotide binding domain"

**NES:** "Nuclear export signal"

**NLS:** "Nuclear localization signal"

**NPC:** "Nuclear pore complex"

**NR:** "Nuclear receptor"

**NTCP:** "Sodium taurocholate cotransporting polypeptide"

**OATP:** "Organic anion transporting polypeptide"

**ORF:** "Open reading frame"

**OST:** "Organic solute transporters"

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** Paraformaldehído

**PNC:** "Perinuclear compartments"

**PPAR:** "Peroxisome proliferator-activated receptor"

**PXR:** "Pregnane X receptor"

**QDC:** Ácido quenodesoxicólico  
**RAR:** “Retinoic acid receptor”  
**RIPA:** “Radioimmunoprecipitation assay”  
**RMN:** Resonancia magnética nuclear  
**ROR:** “Retinoid-related orphan receptor”  
**RT:** Transcripción reversa  
**RXR:** “Retinoid X receptor”  
**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**SHP:** “Small heterodimer partner”  
**SLC:** “Solute carriers”  
**SSC:** “Side light scatter”  
**TC:** Ácido taurocólico  
**TDC:** Ácido taurodesoxicólico  
**TEMED:** N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina  
**TGN38:** “Trans golgi network”  
**TLC:** Cromatografía en capa fina  
**Tm:** Temperatura de desnaturalización  
**TQDC:** Ácido tauroquenodesoxicólico  
**TR:** Receptor de hormonas tiroideas  
**TUDC:** Ácido tauroursodesoxicólico  
**UDC:** Ácido ursodesoxicólico  
**UGT:** Uridín difosfato (UDP)-glucuronosil transferasas  
**VDR:** Receptor de vitamina D  
**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido

# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. EL HÍGADO.....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Anatomía e Histología.....	9
2.1.2. Los ácidos Biliares.....	12
<b>2.2. RECEPTORES NUCLEARES.....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Concepto y tipos.....	16
2.2.2. FXR.....	19
2.2.3. Receptor de glucocorticoides.....	24
<b>2.3. COMPARTIMENTO NÚCLEO-RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....</b>	<b>26</b>
2.3.1. Envuelta Nuclear.....	26
2.3.2. Cuerpos Nucleares.....	29
2.3.3. Transporte Núcleo-Citoplasmático.....	31
2.3.4. Retículo Endoplasmático.....	33
<b>2.4. BOMBAS EXPORTADORAS DE LA SUPERFAMILIA ABC.....</b>	<b>35</b>
2.4.1. Familia ABCA.....	35
2.4.2. Familia ABCB.....	35
2.4.3. Familia ABCC.....	36
2.4.4. Familia ABCD.....	45
2.4.5. Familia ABCG.....	46
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. MATERIAL.....</b>	<b>53</b>

<b>3.1.1. Material biológico.....</b>	<b>53</b>
3.1.1.1. Animales.....	53
3.1.1.2. Líneas celulares.....	53
3.1.1.3. Bacterias.....	53
<b>3.1.2. Productos.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1.3. Medios instrumentales.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2. MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2.1. Síntesis, purificación y caracterización química de derivados fluorescentes de ácidos biliares.....</b>	<b>60</b>
3.2.1.1. Síntesis de colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC).....	60
3.2.1.2. Síntesis de ursodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GUDC) y de quenodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GQDC).....	60
3.2.1.3. Purificación y caracterización química.....	61
<b>3.2.2. Experimentos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>62</b>
3.2.2.1. Colestasis obstructiva.....	62
3.2.2.2. Estudio del efecto del cisplatino.....	62
3.2.2.3. Estudio del efecto de glucocorticoides.....	63
<b>3.2.3. Experimentos en hepatocitos aislados de rata.....</b>	<b>64</b>
3.2.3.1. Aislamiento de hepatocitos de rata.....	64
3.2.3.2. Captación de ácidos biliares en hepatocitos en suspensión.....	65
3.2.3.3. Captación de compuestos fluorescentes en hepatocitos en cultivo....	67
3.2.3.4. Captación de cisplatino en hepatocitos en cultivo.....	68
<b>3.2.4. Experimentos en núcleos aislados de hepatocitos.....</b>	<b>69</b>

3.2.4.1. Aislamiento de núcleos de hepatocitos de rata.....	69
3.2.4.2. Captación / eflujo de compuestos fluorescentes en núcleos.....	69
3.2.4.3. Análisis de fluorescencia en núcleos por citometría de flujo.....	72
<b>3.2.5. Experimentos en líneas celulares.....</b>	<b>74</b>
3.2.5.1. Estudio del efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de genes de interés.....	74
<b>3.2.6. Clonación de MRP2 con etiqueta V5.....</b>	<b>76</b>
3.2.6.1. Clonación por recombinación “Gateway”: fundamento.....	76
3.2.6.2. Clonación de MRP2 con etiqueta V5: procedimiento.....	78
<b>3.2.7. Cuantificación de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa a tiempo real.....</b>	<b>87</b>
3.2.7.1. Extracción de ARN total.....	87
3.2.7.2. Transcripción reversa (RT).....	88
3.2.7.3. Diseño de cebadores.....	88
3.2.7.4. Realización de la PCR cuantitativa.....	91
3.2.7.5. Cuantificación de los resultados.....	91
<b>3.2.8. Otras técnicas en biología molecular.....</b>	<b>93</b>
3.2.8.1. Transformación de bacterias competentes mediante choque térmico.....	93
3.2.8.2. Obtención y purificación del ADN plasmídico de bacterias transformadas.....	93
3.2.8.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	94
3.2.8.4. Purificación del ADN de geles de agarosa.....	95
3.2.8.5. Transfección de células en cultivo con lípidos catiónicos.....	95
<b>3.2.9. Detección de proteínas por Western blot.....</b>	<b>97</b>

3.2.9.1. Obtención de las muestras.....	97
3.2.9.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	98
3.2.9.3. Inmunodetección.....	99
<b>3.2.10. Detección de proteínas por inmunofluorescencia.....</b>	<b>101</b>
3.2.10.1. Preparación de muestras.....	101
3.2.10.2. Inmunodetección.....	101
<b>3.2.11. Métodos analíticos.....</b>	<b>104</b>
3.2.11.1. Determinación de ARN por el método del RiboGreen.....	104
3.2.11.2. Determinación de ADN por el método del PicoGreen.....	104
3.2.11.3. Determinación de ADN por el método de Hoescht.....	104
3.2.11.4. Determinación de la viabilidad celular (Test de Formazán).....	104
3.2.11.5. Determinación de proteínas.....	105
3.2.11.6. Determinación de platino por Absorción Atómica.....	105
3.2.11.7. Determinación de ácidos biliares por HPLC-MS/MS.....	105
<b>3.2.12. Análisis estadístico.....</b>	<b>107</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>4.1. ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA Y LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES.....</b>	<b>113</b>
4.1.1. Relación entre la concentración intracelular e intranuclear de ácidos biliares en hepatocitos de rata.....	113
4.1.2. Captación de derivados fluorescentes de ácidos biliares en núcleos aislados de hepatocitos.....	115
4.1.3. Efecto del volumen nuclear sobre la carga de compuestos fluorescentes.....	122

4.1.4. Localización de los derivados fluorescentes de ácidos biliares en el núcleo.....	124
4.1.5. Efecto del ATP sobre la carga y el eflujo nuclear de ácidos biliares y otros compuestos fluorescentes.....	128
<b>4.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE LA FAMILIA ABC EN LA ENVUELTA NUCLEAR DE HEPATOCITOS DE RATA.....</b>	<b>133</b>
4.2.1. Localización de Mrp2 en la envuelta nuclear de hepatocitos de rata...	136
4.2.2. Estudio de la posible función de Mrp2 en el compartimento Núcleo/Retículo Endoplásmático.....	143
<b>4.3. INTERACCIÓN ENTRE GLUCOCORTICOIDES Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE FXR EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC.....</b>	<b>149</b>
4.3.1. Efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de proteínas ABC en hígado de rata.....	150
4.3.2. Efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de proteínas ABC en células HepG2.....	153
4.3.3. Efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de receptores nucleares en hígado de rata.....	155
4.3.4. Efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de receptores nucleares en células HepG2.....	157
4.3.5. Efecto de la inducción de fxr sobre la expresión de bombas ABC en células HepG2 tratadas con glucocorticoides.....	158
<b>4.4. INTERACCIÓN ENTRE GLUCOCORTICOIDES Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE FXR EN LA HOMEOSTASIS DE LOS ÁCIDOS BILIARES.....</b>	<b>164</b>
4.4.1. Efecto de los glucocorticoides sobre la expresión hepática de enzimas y transportadores implicados en la homeostasis de los ácidos biliares.....	165

4.4.2. Efecto de los glucocorticoides sobre los niveles plasmáticos, hepáticos y biliares de ácidos biliares en ratas.....	167
4.4.3. Efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de proteínas implicadas en homeostasis de ácidos biliares en células HepG2.....	175
4.4.4. Efecto de los glucocorticoides en células de hepatoma humano transfectadas con fxr.....	179
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>193</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>199</b>



1

**OBJETIVOS**



En la última década el descubrimiento de la regulación de la función hepática por parte de receptores nucleares ha permitido realizar grandes avances en el conocimiento de la fisiología y patología hepáticas. Particularmente en el caso del receptor nuclear de ácidos biliares, FXR (del inglés “Farnesoid X Receptor”), que desempeña un papel central en dicha regulación. Además de controlar la síntesis, el transporte hepático y la absorción intestinal de ácidos biliares, FXR ejerce un efecto protector en los tejidos que lo expresan, y no sólo frente a la acumulación de estas moléculas detergentes en situaciones como la colestasis, sino también frente al daño inflamatorio y la carcinogénesis.

La presencia de este receptor en el núcleo de los hepatocitos y otras células implica que los ácidos biliares deben penetrar en el núcleo para interactuar con él. Estudios previos de nuestro grupo y otros grupos de investigación han demostrado la existencia de un conjunto de especies moleculares o “pool” de ácidos biliares en el núcleo de los hepatocitos de rata, cuya composición no se corresponde exactamente con la del “pool” intracelular global. Esto puede ser relevante, ya que se sabe que diferentes especies moleculares de ácidos biliares presentan diferente capacidad para unirse y activar a FXR, siendo el ácido quenodesoxicólico (QDC) el ligando natural más potente, mientras que otros, como el ácido ursodesoxicólico (UDC) se unen débilmente a FXR. La existencia de mecanismos selectivos implicados en el transporte de ácidos biliares entre el citoplasma y el núcleo, más allá de la simple difusión a través de los poros de la envuelta nuclear, podría, por tanto, desempeñar un papel en la señalización a través de este receptor nuclear.

Por otra parte, el hígado, al ser un órgano clave en los procesos de detoxificación, está continuamente expuesto a compuestos tóxicos que deben ser neutralizados. Muchos de estos agentes son moléculas orgánicas de pequeño tamaño, que podrían alcanzar fácilmente el núcleo del hepatocito y dañar el ADN. Aunque aún no se han investigado en profundidad, existen evidencias de la presencia de bombas exportadoras de la superfamilia ABC (“ATP-Binding Cassette”) en membranas de orgánulos intracelulares, entre ellas, en la envuelta nuclear de células nerviosas y reproductoras, aunque su papel en esta localización aún no está bien establecido. La presencia en la envuelta nuclear del hepatocito de éste u otros mecanismos que limiten la entrada, o bien potencien el flujo de moléculas de pequeño tamaño, como ligandos de receptores nucleares o compuestos potencialmente tóxicos para el ADN, podría ser importante tanto en la renovación de

señales activadas de los receptores nucleares, como en la protección del material genético contra el efecto de agentes genotóxicos.

Es importante considerar que entre las dianas de FXR cuya expresión hepática aumenta cuando se activa este receptor están varias proteínas ABC de localización canalicular, como la bomba exportadora de ácidos biliares, BSEP (del inglés “Bile Salt Export Pump”), la MRP2 (de “Multidrug Resistance-associated Protein 2”) y la MDR3 (de “Multidrug Resistance protein 3”).

Por último, recientemente se ha establecido la implicación de FXR en la regulación de la homeostasis de la glucosa y, como ya se ha mencionado, en procesos inflamatorios. Es bien sabido que las hormonas glucocorticoides, a través de su receptor, desempeñan un importante papel en el control de ambos procesos. Estos esteroides modifican también la expresión de proteínas ABC, probablemente actuando en parte a través del receptor nuclear de xenobióticos PXR (“Pregnane X Receptor”). A pesar de la cada vez más evidente relación entre las funciones reguladas por los glucocorticoides y las controladas por los ácidos biliares a través de FXR, aún se desconoce la posible interconexión entre la vía de señalización de FXR y la de glucocorticoides.

Atendiendo a estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral nos hemos planteado los siguientes objetivos:

**Objetivo 1:** Investigar el intercambio entre el citosol y el núcleo de los ácidos biliares en hepatocitos de rata, así como definir su localización intranuclear.

**Objetivo 2:** Investigar la presencia de proteínas transportadoras de la familia ABC en el compartimento núcleo/retículo endoplásmico, que pudieran estar implicadas en el transporte núcleo-citoplasmático de pequeñas moléculas, como ligandos de receptores nucleares y/o agentes genotóxicos.

**Objetivo 3:** Estudiar la interacción de los glucocorticoides con la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas ABC.

**Objetivo 4:** Estudiar la interacción de los glucocorticoides con la vía de señalización de FXR en la regulación de la circulación enterohepática.





# 2

## INTRODUCCIÓN

---



## **2.1. EL HÍGADO**

### **2.1.1. Anatomía e Histología**

Después de la piel y otros tegumentos, el hígado es el órgano de mayor tamaño del organismo, constituye aproximadamente el 2,5% del peso corporal en adultos sanos y un 5% en el recién nacido. Dentro de las funciones del hígado se distinguen: funciones vasculares, de almacenaje y filtrado de la sangre; funciones metabólicas, ya que participa en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas; y funciones secretoras y excretoras, puesto que es responsable de la formación de bilis y de la excreción de fármacos, hormonas y otras sustancias.

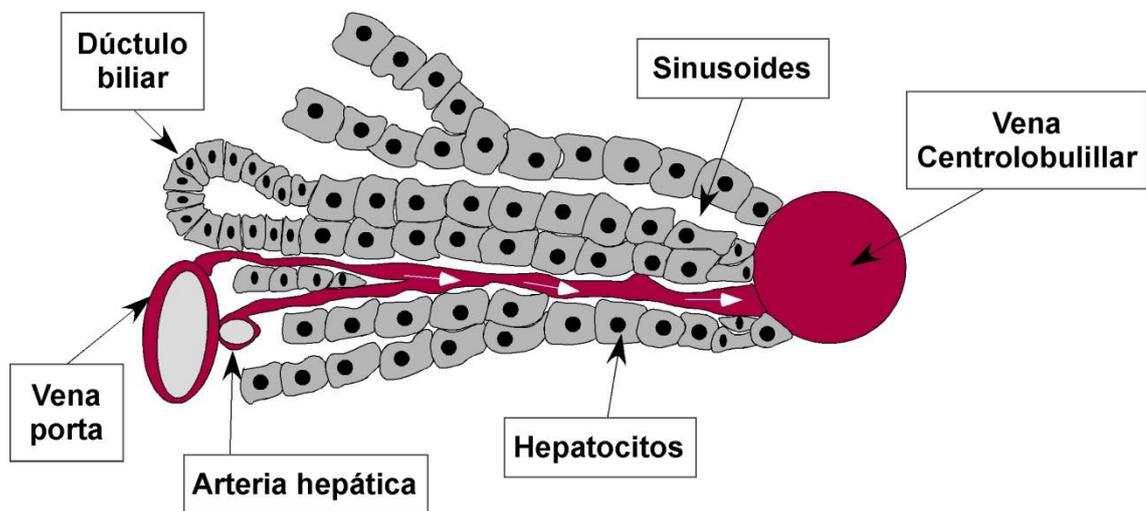
El hígado recibe aporte sanguíneo a través de la arteria hepática, procedente del tronco celíaco, que aporta sangre rica en oxígeno y constituye entre el 20-35% del flujo hepático, y a través de la vena porta procedente del bazo, páncreas, estómago e intestino, que aporta entre el 65-80% de la sangre que llega al hígado, aunque su concentración en oxígeno es menor que la de la sangre procedente de la arteria hepática.

La unidad estructural y funcional del parénquima hepático es el acino hepático formado por la porción de tejido hepático asociada a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática y a un conducto biliar, siendo así el espacio porta el organizador central del funcionamiento hepático. En el acino, la sangre procedente de la arteria hepática y de la vena porta se mezcla en los sinusoides hepáticos, espacios vasculares libres entre las láminas de células epiteliales o hepatocitos, y es drenada por las venas centrolobulillares, que convergen para formar la vena suprahepática. Microscópicamente, se puede observar que los hepatocitos se disponen formando cordones desde la entrada portal hacia la salida venosa. Esta estructura se repite por todo el parénquima.

Se pueden distinguir tres zonas acinares (Esquema 1), denominadas zona 1, 2 y 3 de Rappaport (Rappaport, 1973), de tal manera que los hepatocitos situados cerca de los espacios porta (zona 1) son los primeros expuestos a la sangre aferente y reciben las concentraciones más elevadas de solutos de procedencia arterial o portal, mientras que los hepatocitos centrolobulillares (zona 3) reciben menores concentraciones de oxígeno, de nutrientes y toxinas provenientes de la circulación portal, y también de señales hormonales (Gumucio, 1983).

A nivel subtisular, en el hígado se distinguen varios tipos celulares: células epiteliales, como los hepatocitos, que son la fracción más abundante y se agrupan en hileras de una o dos células de espesor, y las células ductulares biliares, ubicadas en los ductulos biliares; células endoteliales, ubicadas en los sinusoides a ambos lados de las hileras de hepatocitos; células de Kupffer o macrófagos del hígado, y células estrelladas.

Los hepatocitos representan alrededor del 60% de las células del hígado y ocupan casi el 80% del volumen parenquimal. Las células sinusoidales ocupan aproximadamente el 6,5% del volumen hepático, y los espacios extracelulares ocupan el 16-20%, del cual dos tercios los ocupa el lumen sinusoidal y el tercio restante el espacio perisinusoidal o espacio de Disse.



**Esquema 1:** Esquema de un acino hepático. Las flechas blancas indican el sentido de la circulación de la sangre a través del acino, desde las ramas de la vena porta y arteria hepática hacia la vena centrolobulillar, a través de los sinusoides.

## El Hepatocito

Los hepatocitos son las células mayoritarias del hígado. El hígado humano adulto contiene unos 250 billones de hepatocitos, todos ellos capaces en potencia de realizar todas las funciones del conjunto.

El hepatocito es una célula poliédrica con ocho o más caras y con un diámetro de entre 13 y 30  $\mu\text{m}$ , siendo la media de 25  $\mu\text{m}$ . Presenta una polaridad muy

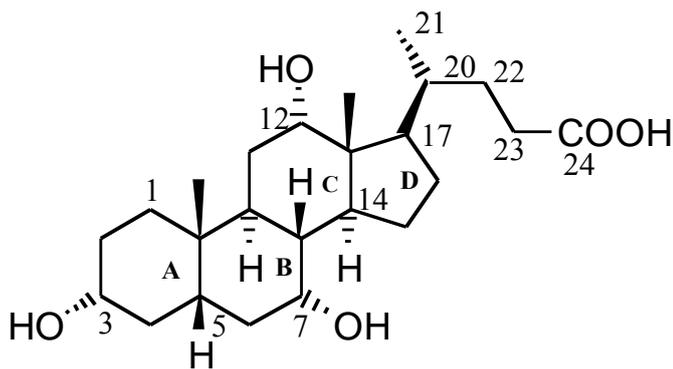
marcada, que determina su orientación respecto al sinusoides. Su membrana celular posee tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional (Evans, 1980; Meier, 1988). Estas regiones son:

- Membrana sinusoidal: orientada hacia el polo sanguíneo (espacio de Disse). Esta membrana está formada por microvellosidades que crean una elevada superficie de intercambio. Aunque discutida durante cierto tiempo (Erlinger, 1982; Nathanson y Boyer, 1991), hoy es evidente que la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa se localiza fundamentalmente en esta región de la membrana plasmática de los hepatocitos (Sellinger et al., 1990; Sztul et al., 1987).
- Membrana lateral: es la membrana situada entre hepatocitos colindantes; presenta un número menor de microvellosidades y además éstas son más cortas que en la membrana sinusoidal. Contiene estructuras celulares cuya función es mantener la adhesión mecánica y la conexión funcional entre los hepatocitos adyacentes (Meier, 1988), entre ellas:
  - “Tight junctions” o “zonulae ocludens”: uniones fuertes entre células que controlan en parte el paso de fluidos entre los hepatocitos.
  - Desmosomas o “maculae adherens”: estructuras de unión interhepatocitaria cuya función es dar resistencia mecánica a las uniones intercelulares.
  - “Gap junctions”: estructuras hexaméricas de naturaleza proteica que se repiten de forma casi regular. Presentan características de poro de membrana, por lo que se piensa que constituyen verdaderas vías de intercambio, permitiendo el paso de moléculas con un peso molecular inferior a 1600 Da, como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) o el inositol trifosfato y el calcio, entre células adyacentes en contacto.
- Membrana canalicular: es una invaginación de la superficie de la membrana celular del hepatocito, que al unirse a la del hepatocito adyacente, forma el canalículo biliar. Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades hacia la luz canalicular. Alrededor de los canalículos biliares hay una zona de citoplasma pobre en orgánulos, que posee filamentos y microtúbulos que mantienen la forma del canalículo y la secreción biliar (Meier, 1988; Watanabe et al., 1991).

### 2.1.2. Los Ácidos Biliares

Los ácidos biliares (ABs) son ácidos carboxílicos que se forman en el hígado como resultado del metabolismo del colesterol, obteniéndose compuestos hidrosolubles, fácilmente excretables y con utilidad en los procesos digestivos. Presentan una estructura anfipática con una región hidrófila y otra hidrófoba, que les confiere propiedades detergentes (Monte et al., 2009). Esta estructura peculiar les permite asociarse entre sí y formar micelas a partir de una concentración determinada, la concentración micelar crítica.

Respecto a su estructura química, los ABs son esteroides con 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral, que puede estar conjugado con glicina o taurina (Lester, 1983). Los ABs primarios son el ácido cólico ( $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihidroxi- $5\beta$ -colanoico) (Esquema 2) y el ácido quenodesoxicólico (QDC:  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta$ -colanoico). Se sintetizan directamente en el hígado y a su paso por el intestino las bacterias de la flora intestinal los degradan dando lugar a los denominados ABs secundarios (Ridlon et al., 2006). Éstos carecen del grupo hidroxilo en posición  $7\alpha$  y son el ácido desoxicólico (DC), procedente del ácido cólico, y el ácido litocólico (LC), procedente del QDC. Además de ésta existen otras transformaciones minoritarias que producen una gran variedad de derivados de los ABs primarios. En los fluidos biológicos la mayoría de los ABs se encuentra en forma de sales, formas ionizadas solubles de estos compuestos.



**Esquema 2.** Estructura química del ácido  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihidroxi-  $5\beta$ -colanoico: ácido cólico.

## **Biosíntesis de los ácidos biliares**

Los ABs primarios se sintetizan a partir del colesterol a través, principalmente, de dos vías (Monte et al., 2009):

a) la vía clásica o vía neutra, así denominada porque los compuestos intermediarios son esteroides neutros. Sus productos principales son el ácido cólico y el QDC, y el paso limitante es la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroideo, llevada a cabo por la enzima microsomal colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (gen *CYP7A1*).

b) la vía alternativa o vía ácida, donde los compuestos intermediarios tienen carácter ácido. El producto mayoritario de esta vía es el QDC (Bjorkhem, 1992), y el paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral, llevada a cabo por la enzima mitocondrial esteroide 27-hidroxilasa (gen *CYP27A1*).

La contribución relativa de ambas vías a la biosíntesis global de ABs no está muy clara. Parece ser que la vía clásica desempeña el papel principal en la biosíntesis de ABs en humanos en condiciones fisiológicas, y que, en estas condiciones, la vía alternativa apenas contribuye a la síntesis. Sin embargo, esta vía puede adquirir un papel fundamental en pacientes con enfermedades hepáticas, y parece ser la vía predominante durante la vida fetal (Deleze et al., 1978).

## **Conjugación de los ácidos biliares**

Las principales biotransformaciones que experimentan los ABs son conjugaciones con aminoácidos (glicina o taurina), sulfato o ácido glucurónico. A diferencia de la amidación con glicina o taurina, la glucuronidación o la sulfatación son vías minoritarias en individuos sanos. Sin embargo, cobran importancia en situaciones como la colestasis, en la cual los ABs se acumulan en el hepatocito donde se sulfatan y glucuronidan para posteriormente ser regurgitados al plasma, desde donde se eliminan por vía renal (Hofmann, 1994).

## **Transporte hepático e intestinal de los ácidos biliares**

Estos compuestos endógenos permanecen en su mayoría reclusos en la circulación enterohepática gracias a la existencia de proteínas transportadoras específicas localizadas en las membranas apical y basal de ileocitos y basolateral y canalicular de los hepatocitos. Los ABs son secretados a la bilis y concentrados en la vesícula biliar. Tras la ingesta, alcanzan el duodeno donde llevan a cabo sus funciones en la digestión y absorción de las grasas y vitaminas liposolubles.

Tras realizar sus funciones digestivas, la mayor parte de los ABs intestinales (95%) se recuperan por transporte activo en el intestino, principalmente en el íleon. El transporte activo de los ABs en la membrana apical de las células del epitelio intestinal lo lleva a cabo el transportador ASBT (del inglés “Apical Sodium Bile acid Transporter”, gen *SLC10A2*). ASBT es un cotransportador que transporta hacia el interior celular dos iones sodio junto a una molécula de AB (Craddock et al., 1998). Durante mucho tiempo, ha existido controversia acerca del mecanismo de exportación de ABs desde las células intestinales a través de la membrana basolateral. Actualmente se cree que este transporte lo lleva a cabo el heterodímero OST $\alpha$ /OST $\beta$  (de “Organic Solute Transporter”) (Dawson et al., 2005).

Los ABs, en parte unidos a la albúmina, alcanzan el hígado principalmente a través de la sangre portal, aunque también en menor medida por la arteria hepática, y son captados de forma muy eficiente gracias a transportadores situados en la membrana sinusoidal del hepatocito. La captación de ABs conjugados se realiza de forma mayoritaria por un proceso dependiente de sodio que desempeña el transportador NTCP (del inglés “Na-Taurocholate Co-transport Polypeptide”, gen *SLC10A1*) (Hagenbuch y Meier, 1994). También tiene lugar una captación de ABs independiente de sodio a través de la membrana sinusoidal. Este proceso lo llevan a cabo miembros de la familia OATP (de “Organic Anion Transporting Polypeptides”) principalmente las isoformas OATP1B1 (gen *SLCO1B1*) y OATP1B3 (gen *SLCO1B3*) (Kullak-Ublick et al., 2001). En el proceso general de transporte de ABs desde la sangre a la bilis, la secreción canalicular es el paso limitante. Para los ABs monoaniónicos, que son la mayoría de los ABs secretados, este transporte es ATP dependiente y es desempeñado principalmente por la BSEP (del inglés “Bile Salt Export Pump”, gen *ABCB11*) (Gerloff et al., 1998). Los ABs conjugados con sulfato o con ácido glucurónico son dianiónicos y son otras bombas, como la MRP2 (gen *ABCC2*) (Akita et al., 2001) o la BCRP (gen *ABCG2*) (Blazquez et al., 2011), las que llevan a cabo su transporte hacia la luz canalicular.

La gran especificidad de estos transportadores hepáticos e intestinales permite explicar los bajos niveles de los ABs en sangre, generalmente por debajo de 10  $\mu$ M en individuos sanos (El-Mir et al., 2001).

### **Papel fisiológico de los ácidos biliares**

Los efectos fisiológicos de los ABs son muy diversos (Monte et al., 2009). En el hígado, su secreción genera el flujo biliar dependiente de los ABs por su efecto

osmótico en la luz canalicular. Inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, y modulan la biosíntesis de colesterol. En la bilis forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas (colesterol, protoporfirinas, etc.) y actúan como agentes con cierta capacidad de quelar  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las micelas de ABs, a nivel intestinal, permiten emulsionar las grasas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) de la dieta, facilitando así su absorción. También inducen la secreción de agua y electrolitos, activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal y participan en el control de la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Combettes et al., 1992; Izukura et al., 1991).

Recientemente se ha descrito que los ABs intervienen en la regulación del metabolismo de lípidos y de la glucosa (Houten et al., 2006). También se ha confirmado, en modelos animales, que los ABs inhiben la obesidad inducida por la dieta y previenen el desarrollo de resistencia a la insulina (Ikemoto et al., 1997), lo que sugiere un papel de estos compuestos en la homeostasis energética.

En los últimos años se ha descrito que los ABs son moléculas señalizadoras, con funciones sistémicas endocrinas. Son capaces de activar cascadas de proteínas activadoras de mitógenos (MAPK, de "Mitogen-Activated Protein Kinases") (Qiao et al., 2003), son ligandos del receptor de membrana acoplado a proteínas G TGR5 (Kawamata et al., 2003) y activan receptores nucleares como FXR (de "Farnesoid X Receptor") (Houten et al., 2006). También se ha demostrado que los ABs están involucrados en el origen de la respuesta adaptativa en colestasis y en otros daños hepáticos (Chiang, 2002; Eloranta et al., 2005; Geier et al., 2007).

Además, se ha demostrado su participación en el control de la proliferación y apoptosis en los tejidos donde los ABs se encuentran en concentraciones elevadas (Benz et al., 1998; Marin et al., 1993). Algunas especies moleculares de ABs modulan la síntesis del ADN durante la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial en roedores (Marin et al., 1993; Monte et al., 1996), y el proceso regenerativo es dependiente de señales de ABs a través de su receptor nuclear FXR (Huang et al., 2006). También se ha sugerido la participación de los ABs en la etiología del cáncer en diferentes tejidos como colon, esófago o incluso tejidos no digestivos como la glándula mamaria (Costarelli y Sanders, 2002; Raju et al., 1990). Recientemente se ha demostrado que ratones carentes de FXR desarrollan tumores hepáticos espontáneamente (Kim et al., 2007; Yang et al., 2007).

## **2.2. RECEPTORES NUCLEARES**

### **2.2.1. Concepto y tipos**

Los receptores nucleares (NRs, del inglés “Nuclear Receptors”) son factores de transcripción, que por medio de su unión a un ligando, adquieren la capacidad de activar o inhibir la transcripción de genes. Constituyen una superfamilia formada por más de 150 miembros (Blumberg y Evans, 1998; Kliewer et al., 1999; Mangelsdorf y Evans, 1995). En general, estas proteínas contienen un dominio N-terminal de transactivación independiente de ligando (AF1, del inglés “Activation Function-1”), un dominio central de unión al ADN (DBD, del inglés “DNA Binding Domain”), una región intermedia flexible, región bisagra, que permite que el receptor forme un dímero y se una simultáneamente al ADN, y finalmente, una amplia región C-terminal que contiene el dominio de unión a ligando (LBD, del inglés “Ligand Binding Domain”), la región de dimerización y la región de activación dependiente de ligando (Aranda y Pascual, 2001; Chawla et al., 2001).

Los NRs llevan a cabo su acción por unión a zonas reguladoras específicas del gen diana, que reciben el nombre de elementos respuesta. En general estos elementos respuesta son 2 secuencias de 6 pares de bases separadas por entre 0 y 8 nucleótidos. Están organizados como repeticiones (directas, invertidas o evertidas), cuya especificidad se basa tanto en la secuencia, como en la orientación y en el espacio entre dichas repeticiones. Los NRs se unen a sus elementos de respuesta en el ADN en forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros (Aranda y Pascual, 2001).

En ausencia de un ligando, los NRs pueden localizarse en el citoplasma o en el núcleo, donde están constitutivamente unidos a elementos de respuesta a hormonas en el ADN, pero permanecen reprimidos por un complejo correpresor. Muchos NRs se unen a sus elementos de respuesta como heterodímeros con el receptor RXR (del inglés “Retinoid X Receptor”) (Mangelsdorf y Evans, 1995). La unión del ligando al LBD provoca un cambio conformacional que facilita la liberación de correpresores y de enzimas histona desacetilasas y el reclutamiento de coactivadores y de histona aciltransferasas, provocando un cambio conformacional de la cromatina y posibilitando el acceso al promotor de la maquinaria transcripcional (Gronemeyer et al., 2004; Sonoda et al., 2008). Esta regulación transcripcional en eucariotas se lleva a cabo en dos pasos generales:

- Primer paso: El NR se une al agonista y se libera del complejo correpresor, de este modo interacciona con complejos activadores multiproteicos que modifican la estructura de la cromatina, permitiendo el acceso de factores de transcripción generales (GTFs, del inglés “General Transcription Factors”) y la ARN polimerasa II al promotor de ADN.
- Segundo paso: los activadores estimulan la unión al ADN de la polimerasa II y de los GTFs para favorecer la formación del complejo preiniciador (PIC, del inglés “Preinitiation Complex”).

### Tipos de NRs

Los NRs pueden clasificarse en tres grupos, en base a sus ligandos fisiológicos y sus funciones potenciales:

- **Receptores endocrinos:** Este grupo de receptores incluye el receptor de glucocorticoides (GR, del inglés “Glucocorticoid Receptor”) y el receptor de mineralocorticoides (MR, de “Mineralocorticoid Receptor”), así como los de andrógenos, de estrógenos, de progesterona, de hormonas tiroideas (TR, del inglés “Thyroid hormone Receptor”) y los receptores de vitaminas A (RAR, de “Retinoic Acid Receptor”) y D (VDR, de “Vitamin D Receptor”), que son esenciales para el control homeostático del sistema endocrino. Los receptores de hormonas esteroides funcionan como homodímeros, mientras que TR, VDR y RAR forman heterodímeros con RXR.
- **Receptores huérfanos adoptados:** en un principio, este segundo tipo de receptores fue incluido entre los receptores endocrinos por la homología de su secuencia, y se les denominó huérfanos. Pero la identificación de sus ligandos provocó su “adopción”. La identificación de un derivado de la vitamina A, el ácido 9-cis retinoico, como un ligando endógeno de alta afinidad por RXR provocó la primera adopción de un NR huérfano (Szanto et al., 2004).

A este grupo pertenecen receptores intensamente investigados como es el caso del receptor de ABs FXR, el PXR (de “Pregnane X Receptor”), el LXR (de “Liver X Receptor”) activable por oxisteroles, el PPAR (de “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor”) y el RXR. Es previsible que los receptores de este tipo sean dianas farmacológicas en desórdenes metabólicos, ya que regulan la homeostasis de lípidos y/o glucosa controlando su captación, síntesis, almacenamiento y eliminación. PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  son dianas

farmacológicas para la mejora de la resistencia a insulina y la dislipemia, respectivamente (Lefebvre et al., 2006; Semple et al., 2006).

Incluidos dentro de este grupo están los denominados “huérfanos adoptados enigmáticos”, cuyo ligando ha sido identificado pero aún no se ha establecido la naturaleza de su regulación. Este grupo incluye receptores cuya actividad e interacción con cofactores puede ser modulada, a través de la unión al LBD, en condiciones no fisiológicas por estrógenos sintéticos (receptor relacionado con estrógenos, ERR $\beta$  y  $\gamma$ , del inglés “Estrogen Related Receptors”) y/o por moléculas endógenas como el colesterol (receptor huérfano asociado a retinoide, ROR $\alpha$ , del inglés “Retinoid-Related Orphan Receptor”), retinoides (ROR $\beta$ ), androstano (receptor constitutivo de androstano, CAR, de “Constitutive Androstane Receptor”), o fosfolípidos (factor esteroideogénico-1, SF-1, de “Steroidogenic Factor-1” y el homólogo del receptor de hígado humano-1, LRH-1, de “Liver Receptor Homologue-1”) (Forman, 2005; Giguere, 2002; Kallen et al., 2004; Li et al., 2003; Nagy y Schwabe, 2004; Timsit y Negishi, 2007).

- **Auténticos receptores huérfanos:** esta tercera clase incluye a aquellos receptores cuyos ligandos son desconocidos. Sin embargo se sabe que son regulados por la disponibilidad de coactivadores, por su propia expresión, por modificaciones covalentes o por una combinación de estos factores.

La expresión de un receptor nuclear está condicionada por el tipo celular, por el periodo de vida del individuo y de la célula, por el promotor, por el elemento respuesta al que se une y por la posible existencia de otras señales (Smirlis et al., 2001).

En el hígado, la unión de constituyentes de la bilis (como ABs o bilirrubina), de productos del metabolismo lipídico (como los oxisteroles) o de xenobióticos (como fármacos) a NRs modula la expresión de los transportadores y el metabolismo de estos compuestos y, en ocasiones, potencia o reduce la respuesta a otro factor de transcripción, en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Karpen, 2002).

### 2.2.2. FXR

El FXR o NR1H4 (de sus siglas en inglés "Nuclear Receptor subfamily 1, group H, member 4") es un receptor nuclear perteneciente al grupo de los huérfanos adoptados (Sonoda et al., 2008) codificado por el gen *NR1H4*. FXR fue "adoptado" en 1999 con el descubrimiento de su activación por ABs (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999).

FXR puede unirse al ADN como monómero o como heterodímero con RXR. Esta última configuración es la más común y está generalmente asociada a la activación de genes, mientras que la forma monomérica puede estar asociada a la represión génica (Lefebvre et al., 2009).

#### Estructura génica

Tanto en humanos como en ratones, el gen *NR1H4* codifica cuatro isoformas que inicialmente se denominaron  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Zhang et al., 2003). Sin embargo, la identificación de FXR $\beta$  (gen *NR1H5*), un pseudogen en primates (Otte et al., 2003) pero un receptor de lanosterol en otros mamíferos, ha provocado la adopción de una nueva nomenclatura para denominar las cuatro isoformas de NR1H4, FXR $\alpha 1$  (el anterior FXR $\alpha 1$ ), FXR $\alpha 2$  (el anterior FXR $\alpha 2$ ), FXR $\alpha 3$  (el anterior FXR $\beta 1$ ) y FXR $\alpha 4$  (el anterior FXR $\beta 2$ ).

El gen murino *FXR $\alpha$*  (al que se denominará simplemente FXR en este trabajo) está formado por 11 exones y 10 intrones. Dos promotores diferentes situados aguas arriba del exón 1 y del exón 3 provocan la expresión de FXR $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  o de FXR $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ , respectivamente. Asimismo, un sitio de "splicing" alternativo localizado aguas abajo del exón 5 conduce a la expresión de isoformas que contienen una inserción de 12 pares de bases que codifican para la secuencia aminoacídica MYTG ( $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ ) o a isoformas que carecen de ella ( $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ ). Los exones 4-11 son comunes para todas las isoformas, por lo que se cree que todas son activadas indistintamente por los ligandos de FXR (Zhang et al., 2003).

Dado que la terminología de las isoformas de FXR se presta a cierta confusión, en este trabajo hemos optado por denominar a la isoforma que transfectaremos en células Alexander, la FXR $\alpha 2$ , como FXR $\alpha^-$ , para indicar que carece del inserto de 12 pares de bases.

## **Distribución tisular**

Se ha descrito que en hígado y glándulas suprarrenales humanos, sólo se expresan las isoformas FXR $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, mientras que en colon y riñón se expresan exclusivamente las isoformas FXR $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 4. En intestino delgado se expresan todas las isoformas en niveles muy similares, y no se detecta FXR en cerebro, corazón, pulmón ni músculo esquelético (Huber et al., 2002). Sin embargo, por técnicas inmunohistoquímicas, se ha detectado la presencia de FXR en biopsias humanas de músculo cardíaco (Bishop-Bailey et al., 2004).

FXR también se detecta en el tejido adiposo blanco de ratones (Cariou et al., 2006; Rizzo et al., 2006) y es uno de los numerosos NRs que se expresan en células inmunes humanas. El ARNm de FXR también se detecta en células mononucleadas humanas y en algunos linfocitos y monocitos (Schote et al., 2007), pero no en macrófagos peritoneales de ratón (Guo et al., 2006).

Por otro lado, se ha detectado ARNm de FXR en trofoblastos humanos (positivos para citoqueratina-7) y en líneas celulares de coriocarcinoma humano. Por lo tanto, FXR podría jugar un papel en el control de la función excretora de la placenta (Serrano et al., 2007).

## **Ligandos de FXR**

Entre los ligandos naturales de FXR, el QDC parece ser el más potente. En ensayos de transfección transitoria se determinó una EC<sub>50</sub> (de "half maximal Effective Concentration") de ~50 $\mu$ M (Makishima et al., 1999). También se demostró que los ABs secundarios DC y LC, presentan capacidad de activar FXR, aunque con baja eficiencia. En los primeros ensayos transcripcionales clásicos, el ácido ursodesoxicólico (UDC) fue inactivo, pero resultó ser un agonista parcial, capaz de inhibir la actividad del QDC (Campana et al., 2005; Howard et al., 2000).

En cuanto a ligandos sintéticos, inicialmente se observó que el retinoide sintético TTNPB (ácido [E] - 4 - [2 - (5,6,7,8 - tetrahidro - 5,5,8,8 - tetrametil - 2 - naftalenil) propen - 1 - il] benzoico) activa FXR, aunque con baja afinidad (Zavacki et al., 1997), lo que desembocó en la síntesis de derivados de este compuesto (Maloney et al., 2000). Así, mediante ensayos transcripcionales se demostró que el derivado del TTNPB, denominado GW9047, era un activador débil de FXR. Modulaciones farmacológicas en torno a esta molécula llevaron a la identificación del compuesto GW4064 (ácido 3-(2,6-diclorofenil)-4-(3'-carboxi-2-cloro-estilbeno-4-il)-oximetil-5-

isopropil-isoxazol) como un agonista de FXR potente y sensible ( $EC_{50} = 90$  nM) tanto *in vivo* como *in vitro* (Goodwin et al., 2000; Maloney et al., 2000; Sinal et al., 2000). GW4064 ha adquirido una gran popularidad entre los investigadores de FXR y ha sido de uso generalizado como ligando potente y selectivo de FXR. A pesar de su limitada biodisponibilidad, se considera el ligando de referencia para este receptor.

### **Papel fisiológico de FXR**

- **Regulación transcripcional de la síntesis de ácidos biliares**

Estudios con ratones genéticamente deficientes en FXR (FXR<sup>-/-</sup>) demostraron el papel de este NR en el control del metabolismo de ABs (Sinal et al., 2000). En estos animales se han observado elevados niveles de ARNm de CYP7A1, la enzima llave de la síntesis de ABs, pero, sorprendentemente, también presentan una reducción del conjunto o “pool” total de ABs y mayor pérdida fecal de los mismos. Estos datos podrían sugerir que la ausencia de un FXR funcional puede deprimir la síntesis de ABs. Sin embargo, en otro modelo de ratones deficientes con elevada expresión de CYP7A1, se observó, como era de esperar, un incremento en la síntesis de ABs y un aumento en el tamaño del “pool” de ABs. Esto puede implicar que la deficiencia de FXR tiene un impacto en el mantenimiento del “pool” a otros niveles, por ejemplo en el intestino. Para comprobarlo, Kok y colaboradores (Kok et al., 2003) evaluaron parámetros de la circulación enterohepática del ácido cólico, el AB más abundante en ratón, en relación con la formación de bilis y la expresión de proteínas transportadoras en otro modelo de ratones deficientes en FXR. Observaron un incremento de la síntesis de ácido cólico sin efecto sobre el índice de recirculación. También aumentó la reabsorción intestinal de ácido cólico, lo que condujo a un incremento en el tamaño del “pool” de ABs. La aparente discrepancia entre los hallazgos de Sinal (Sinal et al., 2000) y Kok (Kok et al., 2003) parece estar causada por los diferentes procedimientos utilizados para la generación de estos ratones.

La represión de CYP7A1 mediada por FXR tiene lugar a través de la regulación directa de SHP (del inglés “Small Heterodimer Partner”) por FXR. SHP es un NR desprovisto de dominio de unión a ADN que ejerce un efecto represivo sobre la dimerización con muchos factores de transcripción (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000). La interacción SHP-LRH-1 provoca la reducción de la expresión de CYP7A1 y en último término de la síntesis de

ABs. Sin embargo, otras vías reguladoras independientes de SHP pueden explicar el hecho de que la carencia de SHP en ratones incrementa sólo dos veces, los niveles hepáticos de CYP7A1 y CYP8B1, que es mucho menos de lo observado en ratones con una depleción del “pool” de ABs (Kerr et al., 2002; Wang et al., 2002).

En el íleon los ABs activan FXR, que a su vez induce la expresión del factor de crecimiento Fgf15 (del inglés “Fibroblast Grow Factor 15”) en ratón y FGF19 en humanos (Inagaki et al., 2005; Li et al., 2005). Fgf15 es secretado por el enterocito y llega al hígado a través de la circulación portal. En el hígado Fgf15 se une a su receptor de membrana FGFR4, con actividad tirosina kinasa endógena. La activación de FGFR4 desencadena una cascada de señalización que involucra cJun y ERK, que inhiben la transcripción del gen *CYP7A1* (Inagaki et al., 2005; Song et al., 2009; Yu et al., 2005), y por tanto reduce la síntesis de ABs.

- **Regulación transcripcional de transportadores de ABs**

La expresión de transportadores hepáticos de ABs está regulada, en gran medida, por FXR (Trauner y Boyer, 2003). Por ejemplo, la secreción de ABs al canalículo hepático es dependiente de BSEP, cuya expresión está directamente estimulada por FXR (Ananthanarayanan et al., 2001).

La expresión de otros transportadores de la superfamilia ABC, MDR3 (*ABCB4*) y MRP2 (*ABCC2*), también se estimulan por la activación de FXR (Huang et al., 2003; Kast et al., 2002). Por otro lado, FXR reprime la expresión de NTCP. Esta regulación es específica de cada especie y puede involucrar a SHP (Denson et al., 2001). Es sorprendente el caso de OATP1B3, un transportador basolateral de captación de ABs, que en lugar de ser reprimido, aumenta su expresión en respuesta a FXR. Este comportamiento se ha interpretado como un recurso de los hepatocitos para mantener su potencial para eliminar xenobióticos, incluso en colestasis (Jung et al., 2002).

- **Colestasis**

En situaciones de colestasis, la acumulación de ABs, que en condiciones normales son secretados a bilis, puede provocar daños en la célula hepática, inflamación, y ocasionalmente fallo orgánico. Durante la colestasis tiene lugar una serie de reacciones adaptativas que contribuyen a disminuir la toxicidad

de los ABs: inhibición de la síntesis endógena, inducción de las reacciones de detoxificación de fase I y II para hacer más hidrofílicos a los ABs, e inducción de rutas de transporte alternativas para eliminar estos compuestos. FXR y otros NRs como PXR, VDR y CAR, están involucrados en la regulación de estas reacciones compensatorias (Zollner et al., 2006a). FXR juega un papel en la supresión de la síntesis de ABs induciendo SHP. Como se ha mencionado anteriormente, SHP se une a LRH-1 e inhibe la transcripción del gen *Cyp7A1* (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000).

En ratones deficientes en FXR se ha hallado un descenso en la sensibilidad al daño hepático inducido por ligadura del conducto biliar (Stedman et al., 2006; Wagner et al., 2003), debido, probablemente, a que en estos ratones, al contrario de los ratones silvestres, la expresión de BSEP no es activada, vía FXR, por los ABs acumulados en el hígado. También se ha descrito que estos ratones deficientes se adaptan a la obstrucción biliar incrementando la hidroxilación de ABs mediante la inducción de la enzima *Cyp3a11*, provocando así una mayor excreción urinaria (Marschall et al., 2006).

En estudios realizados en diferentes modelos de colestasis en rata se ha observado que la activación de FXR con GW4064 provoca la reducción de los niveles séricos de ALT, AST y otros marcadores de daño hepático (Liu et al., 2003). Se ha propuesto la modulación de la actividad de FXR como una diana alternativa para el tratamiento de las enfermedades hepáticas que cursan con colestasis.

En modelos de rata con colestasis intra y extrahepática, se ha atribuido a la activación de FXR la ya mencionada represión de genes implicados en la síntesis de ABs, como *Cyp7a1*, y la inducción de genes relacionados con el transporte biliar, como el transportador de fosfolípidos *Mdr2 (Abcb4)* (Liu et al., 2003). La activación de FXR también presenta un efecto inductor sobre la expresión de bombas basolaterales de ABs, como *Mrp3 (Abcc3)* y *Mrp4 (Abcc4)*, y sobre el transportador bidireccional de ABs *Osta/Ostβ* (Zollner et al., 2006b).

Parte de los efectos beneficiosos de la estimulación de FXR pueden ser debidos a la activación de la transcripción del receptor nuclear de xenobióticos PXR por parte de FXR (Jung et al., 2006). Se sabe que PXR induce diversas

vías de detoxificación de ABs, incluyendo la del citocromo P-450, y reprime la expresión de *CYP7A1* (Meyer et al., 2005).

### 2.2.3. Receptor de glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas producidas en la zona fascicular media de la corteza suprarrenal durante situaciones de estrés, como puede ser el ayuno, y ejercen una gran variedad de funciones metabólicas a través de su receptor, el receptor de glucocorticoides (GR, del inglés “Glucocorticoid Receptor”, gen *NR3C1*). Durante el ayuno, los glucocorticoides promueven la gluconeogénesis hepática. En tejidos periféricos, promueven el catabolismo de aminoácidos, la lipólisis y suprimen el sistema inmunitario, principalmente. Así pues, en el síndrome de Cushing, el exceso de secreción de glucocorticoides produce obesidad e hiperglucemia, además de un deficiente funcionamiento del sistema inmunitario.

Los glucocorticoides están entre los fármacos antiinflamatorios más efectivos y se emplean en el tratamiento de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. También se emplean en la terapéutica clínica del cáncer y de trasplantes de tejidos u órganos. Sin embargo, la dosis efectiva es limitada, debido a la variedad de efectos secundarios que originan, como dislipemia, pérdida de masa muscular, osteoporosis, problemas conductuales, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e incluso diabetes (Schacke et al., 2002; van Raalte et al., 2009).

Como ya hemos mencionado, los glucocorticoides actúan activando el GR. El GR pertenece al grupo de los receptores endocrinos (ver apartado 2.2.1.) (Sonoda et al., 2008) y fue el primer NR clonado (Chrousos y Kino, 2005).

Existen dos isoformas de GR, GR $\alpha$  y GR $\beta$ , que son el producto de un mismo gen. Este gen consta de 8 exones comunes a las dos isoformas, y dos exones 9 diferentes (9 $\alpha$  y 9 $\beta$ , respectivamente) (Hollenberg et al., 1985).

GR $\alpha$  es el GR clásico que se une a glucocorticoides, mientras que GR $\beta$ , que no se une a estas hormonas, presenta una actividad transcripcional intrínseca que es independiente de GR $\alpha$  y ejerce un efecto inhibitor sobre la transcripción mediada por GR $\alpha$  (Kino et al., 2009; Oakley et al., 1999).

En ausencia de glucocorticoides, GR $\alpha$  se encuentra inactivo en el citoplasma. En dicho estado permanece unido a las proteínas HSPs 90, 70 y 50 (del inglés “Heat-

Shock Proteins”) y a las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 (Davies et al., 2002; Grad y Picard, 2007; Pratt et al., 2004). Tras su unión a glucocorticoides, el GR sufre un cambio conformacional, se disocia de las HSPs, homodimeriza y se dirige al núcleo, donde se une a los elementos de respuesta a GR en el promotor de sus genes diana.

En general, se pueden distinguir seis modos de acción del GR a nivel celular (Beck et al., 2009):

- El GR entra en el núcleo, se unen al elemento de respuesta a glucocorticoides en el promotor de algunos genes, e induce la expresión de los mismos. A este mecanismo se le denomina “transactivación”.
- El GR se transloca al núcleo y facilita la acción de otro u otros factores de transcripción.
- El GR entra en el núcleo, se une al elemento de respuesta a glucocorticoides y reprime la expresión de ciertos genes.
- El GR entra en el núcleo y dificulta la unión de otro u otros factores de transcripción.
- El GR no entra en el núcleo, pero incrementa la actividad de una proteína en el citoplasma.
- El GR reduce la actividad de una proteína en el citoplasma.

Estructuralmente, el GR consta, como ya se ha descrito para los NR en general, de un dominio de transactivación (AF-1) situado en el extremo N-terminal, un dominio central de unión al ADN (DBD), y un dominio de unión a ligando (LBD) que es el responsable de la unión al ligando y contiene un dominio de transactivación (AF-2). La región bisagra, situada entre los dominios DBD y LBD, está implicada en la dimerización del GR, mientras que el dominio N-terminal contiene numerosos residuos que pueden ser fosforilados y que están implicados en diversas funciones reguladoras (Beck et al., 2009). Además, la región bisagra posee dos sitios de acetilación posiblemente implicados en la regulación circadiana de este receptor (Nader et al., 2009).

## **2.3. COMPARTIMENTO NÚCLEO-RETICULO ENDOPLASMÁTICO**

La característica que define a las células eucariotas es la segregación de la síntesis de ácidos nucleicos y su procesamiento en un compartimento rodeado por una membrana, el núcleo.

El núcleo del hepatocito es redondeado, ocupa un poco más del 7% del volumen celular y presenta una posición central con un gran nucleolo en su interior. Existen hepatocitos binucleados, importantes a la hora de caracterizar el crecimiento hepatocelular: en momentos de proliferación normal, los hepatocitos binucleados son frecuentes, mientras que en situaciones de regeneración o crecimiento neoplásico, su número disminuye (Gerlyng et al., 1992).

El núcleo de las células del parénquima hepático aumenta de tamaño en situaciones tumorales, generalmente por un incremento en el contenido de ADN y en la ploidía (paso de diploide a poliploide) (Clawson et al., 1992). El significado biológico de la ploidía no está claro, pero se cree que un genoma poliploide proporciona una protección frente a la expresión dominante de oncogenes mutados, especialmente en un órgano muy relacionado con la inactivación/eliminación de agentes genotóxicos como es el hígado (Gerlyng et al., 1992).

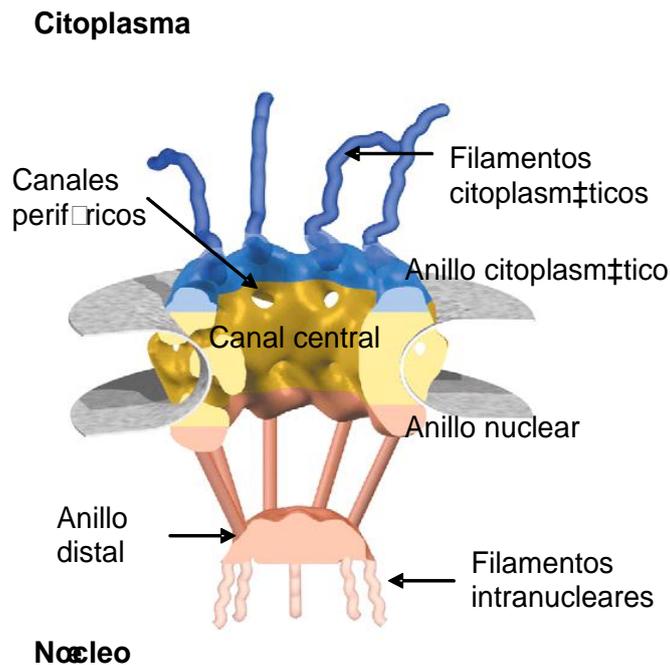
### **2.3.1. Envuelta Nuclear**

Dentro del núcleo existe una matriz interna rodeada por una envuelta de doble capa de elevada porosidad, la envuelta nuclear formada por un sistema de membranas denominado nucleolema. Está formada por dos membranas concéntricas que encierran un espacio perinuclear estrecho, de unos 15 nm de ancho. La superficie de la cara citoplasmática de la membrana nuclear externa está densamente cubierta por ribosomas y a menudo dicha membrana se continúa con el retículo endoplasmático. A determinados intervalos las dos membranas del nucleolema se fusionan y dan lugar a la formación de poros nucleares, con la conformación de los denominados complejos de poro nuclear (NPCs, del inglés "Nuclear Pore Complex"), que representan alrededor del 15% de la superficie de la membrana nuclear y permiten el paso de partículas desde el núcleo al citoplasma y viceversa (Arias et al., 1982).

Los NPCs son grandes complejos de proteínas ensambladas, de aproximadamente 125 MDa en células de mamíferos, y de 60 MDa en células de levadura. Se han obtenido modelos de la arquitectura en 3 dimensiones de los NPCs (Esquema 3) gracias a la tomografía electrónica realizada en levaduras y eucariotas (Hinshaw et al., 1992; Stoffler et al., 2003). Estos modelos indican que los NPCs están formados por un armazón central plegado en ocho partes simétricas, también llamado “spoke complex”, que representa la parte del NPC embebida en la envuelta nuclear. El armazón central tiene forma de anillo, construido alrededor de un poro central (Davis, 1995; Rout y Blobel, 1993; Wentz, 2000). Emparedando este armazón central hay otros dos anillos. Unidos al anillo citoplasmático hay ocho pequeños filamentos, mientras que el anillo nuclear está “taponado” por una cesta nuclear: un ensamblaje de ocho filamentos unidos a un anillo distal. El anillo de esta cesta parece ser capaz de abrirse y cerrarse en respuesta a la concentración de iones calcio, pero la función de este cambio conformacional se desconoce (Stoffler et al., 1999).

Las proteínas que componen los NPCs se llaman nucleoporinas. Pueden dividirse en 3 grupos: las proteínas que atraviesan la membrana nuclear, las que no atraviesan la membrana y poseen múltiples repeticiones de motivos Phe-Gly, y las proteínas que no atraviesan la membrana nuclear y tampoco presentan estas repeticiones. Asociadas al NPC aparecen además otras proteínas, que quizá actúen más como cofactores del transporte a través del mismo, o como factores de ensamblaje, que como componentes estructurales propiamente dichos del NPC (Fahrenkrog et al., 2000; Rout et al., 2000; Strambio-de-Castillia et al., 1999; Yang et al., 1998).

El número de NPCs por núcleo varía ligeramente según el organismo, el tipo celular y las condiciones de crecimiento, pero las células típicas de mamífero contienen de 3000 a 5000 NPCs (Maul, 1977; Rout y Blobel, 1993).



**Esquema 3.** Visión esquemática del complejo de poro nuclear (NPC).

Actualmente se considera que el NPC permite la difusión libre de iones y pequeñas moléculas a través de la envuelta nuclear, y facilita el transporte nucleocitoplasmático, mediado por receptores, de proteínas, ARN y ribonucleoproteínas. El poro o canal central tiene un diámetro de 45-50 nm, y permite la translocación mediada por receptor y dependiente de señal, de moléculas con un diámetro de hasta 35-40 nm, lo que indica que su diámetro funcional coincide con su diámetro físico.

Además del transporte nucleoplasmático, los NPCs parecen estar implicados, tanto directa como indirectamente, en muchos otros procesos, como son la segregación de los cromosomas, la expresión de genes y la apoptosis.

Dentro de la envuelta nuclear e inmediatamente adyacente a la membrana interna está la lámina nuclear, formada por unas proteínas denominadas laminas. Los filamentos de laminas son esenciales para el ensamblaje, estructura, forma y estabilidad mecánica del núcleo. Existen evidencias que implican a las láminas en la regulación de la organización de la cromatina y la expresión génica, e influyen en la señalización (Dechat et al., 2008; Gruenbaum et al., 2005).

En mamíferos, la envuelta nuclear interna contiene más de 50 proteínas de membrana diferentes, muchas de ellas aun sin caracterizar. Entre las proteínas ya caracterizadas, la mayoría se unen directamente a las laminas A, B o a ambas.

Las proteínas de unión a laminas involucradas en la arquitectura nuclear y en la organización de la cromatina comparten el denominado dominio LEM, un motivo de 45 residuos que se pliega en dos  $\alpha$ -hélices (Laguri et al., 2001). El dominio LEM se une a la proteína BAF, una proteína asociada a la cromatina que hace de puente entre el ADN y las histonas (Margalit et al., 2007).

### 2.3.2. Cuerpos Nucleares

El núcleo eucariota está compuesto por numerosos subdominios y compartimentos denominados comúnmente “cuerpos nucleares”. Estas estructuras, carentes de membranas que los delimiten, incluyen nucleolos, cuerpos de Cajal, cuerpos de locus de histonas (HLBs, del inglés “Histone Locus Bodies”), compartimentos de factores de “splicing” (como los speckles o los grupos de gránulos intercromatínicos), “paraspeckles”, cuerpos Gemini (“gems”), compartimentos perinucleolares (PNCs, del inglés “Perinucleolar Compartments”) y muchos otros. Importantes procesos nucleares como la replicación y reparación del ADN (Hozak et al., 1993; Jackson et al., 1994; Lisby et al., 2003; Nakamura et al., 1986; Nakayasu y Berezney, 1989) o la transcripción y procesado del ARN (Carmo-Fonseca et al., 1992; Fu y Maniatis, 1990; Jackson et al., 1993; Matera y Ward, 1993; Wansink et al., 1993), se organizan en estos subdominios discretos. En los últimos años han surgido hipótesis que sugieren la asociación de dominios subnucleares con loci genéticos específicos, y que esta asociación puede cambiar en respuesta a señales celulares.

- **El nucleolo** es el compartimento nuclear más evidente. En él tiene lugar la síntesis y el procesamiento del ARNr, así como el ensamblaje de las unidades de los ribosomas (Spector, 1993). La mayoría de las células de mamífero contienen de 1 a 5 nucleolos de entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el nucleolo se diferencian tres regiones: los “centros fibrilares” rodeados por los denominados “componentes fibrilares densos” (DFCs, siglas del inglés “Dense Fibrillar Components”), y los “componentes granulares” que irradian desde los DFCs. Se cree que los centros fibrilares son el equivalente en interfase a las regiones organizadoras nucleolares (NORs, siglas de “Nucleolar-Organizing Regions”). Los centros fibrilares contienen cientos de genes de ARNr. En los

DFCs se produce la transcripción y el procesado de ARNr, mientras que los componentes granulares están compuestos por partículas de pre-ribosomas en diferentes estados de maduración, así como subunidades grandes y pequeñas de los ribosomas.

- **Los “splicing speckles” o SFCs** (siglas del inglés “Splicing-Factor Compartment”) son otros de los cuerpos nucleares mejor estudiados. Mediante microscopía electrónica se ha observado que los SFCs son fibrillas de pericromatina (transcritos nacientes) (Fakan, 1994) y gránulos de intercromatina (Monneron y Bernhard, 1969). La función de los SFCs parece ser la de almacenar y ensamblar componentes del espliceosoma (Misteli, 2000).
- **Los cuerpos de Cajal (CBs, siglas del inglés “Cajal Bodies”)** fueron descritos por primera vez por Santiago Ramón y Cajal a principios del siglo pasado. Los CBs son pequeñas estructuras esféricas de un tamaño que oscila entre 0,1 y 1  $\mu\text{m}$  y en una cantidad que va de 1 a 5 copias por núcleo. La función de los CBs se desconoce. Se localizan principalmente en el nucleoplasma, aunque también se han observado en el nucleolo de células de carcinoma de mama humanas, de adipocitos marrones y de hepatocitos de liriones en hibernación (Malatesta et al., 1994; Ochs et al., 1994).

Aunque se desconoce por qué se forman estos cuerpos nucleares, existen hipótesis acerca de cómo se forman. Se han considerado dos modelos diferentes. Ambos incluyen el reclutamiento de subunidades individuales que proceden de un “pool” nucleoplásmico soluble (Cook, 2002; Misteli, 2001; Misteli, 2007). La principal diferencia radica en que mientras un modelo sostiene que las subunidades se ensamblan de un modo ordenado alrededor de un factor estructural, el otro asevera que esas estructuras se construyen principalmente de forma aleatoria.

La estructura descrita para el núcleo celular corresponde a las células que se encuentran en interfase, es decir, que no están en proceso de división.

### **2.3.3. Transporte Núcleo-Citoplasmático**

La separación espacial de la transcripción y la traducción provee a las células eucariotas de mecanismos muy potentes para regular la expresión génica. Sin embargo también genera la necesidad de un transporte selectivo entre el núcleo y el citoplasma para que ambos mantengan su composición característica. De este modo, la envuelta nuclear se convierte en una barrera a través de la cual proteínas y ARN deben ser transportados de forma regulada.

Las macromoléculas de un tamaño superior a 40 kDa se transportan de forma activa a través de la envuelta nuclear gracias a los NPCs y a factores transportadores o moléculas portadoras que recirculan entre el núcleo y el citoplasma (Conti y Izaurralde, 2001; Conti et al., 2006; Chook y Blobel, 2001; Fahrenkrog y Aebi, 2003; Gorlich y Kutay, 1999; Macara, 2001; Madrid y Weis, 2006; Mosammaparast y Pemberton, 2004; Pemberton y Paschal, 2005; Stewart et al., 2001; Weis, 2003).

#### **Importación Nuclear**

El ciclo de importación nuclear de proteínas se basa en una coreografía de interacciones que es controlada espacial y temporalmente de forma muy precisa.

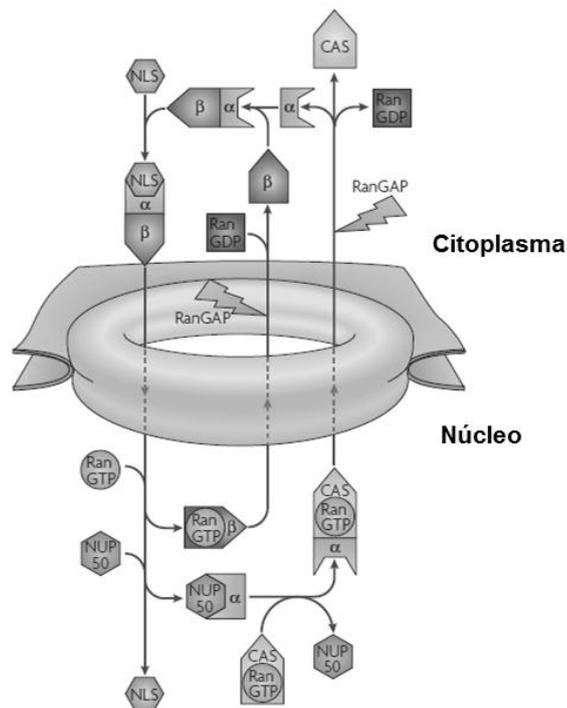
Existen diferentes vías de importación de proteínas al núcleo que usan distintos transportadores, pero comparten muchas características y se basan en una serie de proteínas de interacción por las que las moléculas a transportar son reconocidas en el citoplasma, trasladadas a través de los NPCs y liberadas en el interior del núcleo (Conti y Izaurralde, 2001; Chook y Blobel, 2001; Fahrenkrog y Aebi, 2003; Gorlich y Kutay, 1999; Macara, 2001; Mosammaparast y Pemberton, 2004; Pemberton y Paschal, 2005).

En cada vía, las proteínas a transportar son dirigidas al núcleo gracias a que en su estructura se incluyen pequeñas secuencias denominadas señales de localización nuclear (NLS, del inglés "Nuclear Localization Signal"). Se han identificado diferentes clases de NLS, cada una de las cuales es reconocida por componentes de una vía diferente.

El ciclo clásico de importación nuclear de proteínas (Esquema 4) genera una tasa de transporte de 100-1000 cargas por minuto y por NPC. Las proteínas con una NLS clásica son transportadas por la molécula importina- $\beta$ , que se une a ellas a través de la proteína adaptadora importina- $\alpha$  (Conti y Izaurralde, 2001; Conti et al., 2006;

Chook y Blobel, 2001; Fahrenkrog y Aebi, 2003; Gorlich y Kutay, 1999; Macara, 2001; Madrid y Weis, 2006; Mosammaparast y Pemberton, 2004; Pemberton y Paschal, 2005; Stewart et al., 2001; Weis, 2003). Ambas importinas son moléculas citoplasmáticas constituidas por motivos de aminoácidos repetidos en tándem. En el citoplasma, las proteínas con una NLS clásica, forman un complejo de importación con el heterodímero importina- $\alpha$ - $\beta$  que facilita el movimiento a través de los NPCs. En el interior del núcleo, la proteína RanGTP se une a la importina- $\beta$ , disociando el complejo de importación y liberando la molécula a transportar.

El complejo importina- $\beta$ -RanGTP es reciclado al citoplasma, mientras que la importina- $\alpha$  se une a la  $\beta$ -karioferina CAS. Finalmente, en el citoplasma, la RanGAP ("Ran GTPasa Activating Protein") estimula la RanGTPasa, generando RanGDP, que se disocia de las importinas y las libera para nuevos ciclos de importación.



**Esquema 4:** Resumen del proceso de importación nuclear de proteínas.

## **Exportación Nuclear**

Los avances en la comprensión de los mecanismos implicados en la exportación han estado más rezagados que los relativos a la importación nuclear. Se tardaron muchos años en comprender que la exportación nuclear en esencia es un proceso recíproco a la importación nuclear.

Además de la ya mencionada  $\beta$ -karioferina CAS que media la exportación nuclear de la importina- $\alpha$  mediante un complejo con Ran-GTP, la salida de proteínas del núcleo eucariota está mediada por la proteína Crm1. Ésta exporta una serie de proteínas nucleares que contienen una pequeña secuencia con un patrón de residuos de leucina característico denominado NES (del inglés "Nuclear Export Signal") (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Stade et al., 1997).

### **2.3.4. Retículo Endoplasmático**

El retículo endoplásmico es un orgánulo intracelular responsable de la síntesis, procesamiento y tráfico de una gran variedad de proteínas, incluyendo hormonas, enzimas, receptores, canales iónicos y transportadores. El retículo endoplásmico desempeña numerosas funciones generales, incluyendo síntesis de proteínas, control de calidad de su plegamiento o exportación de las mismas desde el retículo al Golgi. Además, está implicado en el metabolismo de esteroides y xenobióticos, en la homeostasis del calcio y en la señalización intracelular (Lavoie y Paiement, 2008).

Morfológicamente, el retículo endoplásmico está compuesto por una red de sáculos aplanados o cisternas y túbulos que se extiende por toda la célula y que se continúa con la envuelta nuclear externa, con la que comparte el espacio luminal (Lee et al., 2004; Sitia y Braakman, 2003). El retículo endoplásmico posee subdominios especializados con diferentes morfologías y funciones. Las vesículas recubiertas por el complejo de proteínas denominado COPII (del inglés "Coat Protein Complex II") median la exportación de proteínas desde el retículo y su transporte anterógrado hacia el Golgi, mientras que las vesículas recubiertas de COPI, median el transporte retrógrado de reciclaje de proteínas al retículo (Lee et al., 2004). Las interacciones entre las membranas derivadas del retículo y el Golgi incluyen la formación de sitios de salida del retículo para permitir que las proteínas recién sintetizadas sean transportadas hasta el Golgi (Palade, 1975) y la formación de compartimentos intermedios retículo-Golgi para permitir el reciclaje de membrana entre estos

orgánulos (Lee et al., 2004). El retículo endoplásmico de transición desempeña un papel clave en estos sitios de salida y compartimentos intermedios retículo-Golgi.

Además de proteínas ribosomales y proteínas implicadas en el metabolismo del ARN, en el retículo están presentes proteínas implicadas en el proceso de glicosilación de proteínas. Los residuos de asparagina, en los motivos Asn-x-Ser/Thr de la cadena polipeptídica nascente, son glicosilados en el lumen del retículo gracias al complejo proteico denominado oligosacariltransferasa. Este complejo consta de siete proteínas, STT3-A, riboforina I, riboforina II, OST48, DAD1, DC2 y KCP2 (Shibatani et al., 2005) y transfiere oligosacáridos de (glucosa)<sub>3</sub>-(manosa)<sub>9</sub>-(N-acetilglucosamina)<sub>2</sub> desde el donador lipídico, dolicol pirofosfato, hasta la cadena polipeptídica nascente.

La glicosilación facilita el plegamiento de la proteína y permite a la cadena nascente ser reclutada por las chaperonas calnexina y calreticulina (Ellgaard et al., 1999). Para acceder al sistema calnexina/calreticulina es necesaria la modificación de los N-glicanos por los enzimas glucosidasa I (GI), glucosidasa II (GII), UDP glucuroniltransferasa 1 (UGT1), ER-manosidasa 1 y EDEMs (del inglés “ER Degradation Enhancing-Mannosidase-like protein”) (Ruddock y Molinari, 2006). Los polipéptidos que cumplen los requisitos de calidad pueden salir del retículo y dirigirse a su destino final. Sin embargo, los polipéptidos mal plegados o no ensamblados son reconocidos y retenidos en el retículo y posteriormente excretados, poliubiquitinados y finalmente degradados en el citoplasma por el complejo del proteasoma 26S (Meusser et al., 2005; Romisch, 2005). Análisis proteómicos han demostrado que, tanto las subunidades del proteasoma, como enzimas del metabolismo de la ubiquitina están presentes sólo en el retículo endoplásmico liso (Gilchrist et al., 2006).

## **2.4. BOMBAS EXPORTADORAS DE LA SUPERFAMILIA ABC**

La superfamilia de proteínas ABC ("ATP-Binding Cassette") incluye 48 genes que codifican para bombas exportadoras de membrana y reguladores de canales iónicos. Están formados por una o dos partes; cada una de ellas contiene un dominio de unión a nucleótido (NBD) y un número variable de dominios transmembrana. Aunque los mecanismos que determinan el fallo de la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer son muy variados y frecuentemente es un proceso multifactorial (Marin et al., 2010), la sobreexpresión de algunos miembros de esta superfamilia en células tumorales constituye uno de los principales obstáculos de la terapia antitumoral al conferirles mayor resistencia a muchos fármacos antitumorales, puesto que contribuyen a reducir los niveles intracelulares del fármaco activo.

### **2.4.1. Familia ABCA**

Hasta la fecha se han identificado 12 miembros de esta subfamilia de proteínas ABC en humanos, pero sólo 6 de ellas, ABCA1, 5, 6, 8, 9 y 10, se expresan en el hígado (Zarubica et al., 2007); (Albrecht y Viturro, 2007). Su papel principal parece ser el transporte de lípidos a través de la membrana plasmática y la membrana de orgánulos intracelulares. Por otro lado, los transportadores ABCA podrían participar en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral, probablemente mediando el almacenamiento de los fármacos en lisosomas y promoviendo su expulsión de la célula (Albrecht y Viturro, 2007).

### **2.4.2. Familia ABCB**

La excreción biliar de muchos compuestos endógenos, xenobióticos y sus metabolitos tiene lugar predominantemente mediante un mecanismo dependiente de ATP, mediado por transportadores pertenecientes a la familia de proteínas ABC localizadas en la membrana plasmática canalicular de los hepatocitos. Entre ellos, la glicoproteína P o proteína de resistencia a múltiples fármacos ("Multidrug Resistance Protein 1" o MDR1; gen *ABCB1*) es el que primero se caracterizó y es uno de los más estudiados (Kartner et al., 1983). La MDR1 se expresa, además de en los hepatocitos, en células ductulares biliares, pulmón, placenta, riñón, intestino y en muchos tumores de origen epitelial (Chan et al., 2004). La sobreexpresión de esta proteína es uno de

los mecanismos más frecuentes por el cual las células tumorales desarrollan resistencia a un amplio rango de agentes antineoplásicos que presentan una gran variedad de estructuras y mecanismos de acción (Pastan et al., 1988). Se han descrito varios polimorfismos en el gen *ABCB1* que afectan a la biodisponibilidad de estos fármacos (Hoffmeyer et al., 2000). La actividad transportadora de la MDR1 y la actividad de las enzimas de fase I y II, como las de la familia del citocromo P450 (CYP) y las glutatión-S-transferasas, está coordinada (Gatmaitan y Arias, 1993). En particular, la isoforma CYP3A4, una de las más abundantes en el hígado, junto con la MDR1, se consideran piezas clave en el efecto de primer paso que sufren muchos fármacos (Schuetz et al., 1996), reduciendo su biodisponibilidad a menos de un 50% (Wacher et al., 1998).

Otro miembro de la familia ABCB es la MDR3 (gen *ABCB4*), denominada Mdr2 en roedores, que está implicada en la translocación de fosfatidilcolina desde la cara interna a la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana canalicular (Ruetz y Gros, 1994), un papel fundamental para neutralizar el efecto detergente de los ABs, presentes en la bilis a una concentración elevada.

La bomba exportadora de sales biliares (“Bile Salt Export Pump” o BSEP; gen *ABCB11*), como ya se ha mencionado, es el principal mecanismo de secreción de ABs a bilis (Gerloff et al., 1998). La BSEP utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para transportar ABs monoaniónicos a través de la membrana canalicular de los hepatocitos con alta afinidad (Byrne et al., 2002); (Noe et al., 2002).

### **2.4.3. Familia ABCC**

La familia ABCC incluye varios transportadores conocidos como proteínas de resistencia a múltiples fármacos (“Multidrug Resistance Proteins” o MRPs). La proteína MRP2 (gen *ABCC2*) es la que presenta una mayor expresión en hígado sano y la mejor estudiada, a ella dedicaremos más adelante una consideración especial por ser objeto de investigación en esta Tesis. La MRP1 (*ABCC1*) se expresa a nivel de la membrana basolateral de muchos tejidos, incluyendo cerebro, intestino, riñón, pulmón, testículo y, aunque en menor medida, en el hígado (Cherrington et al., 2002); (Flens et al., 1996); (Zaman et al., 1993); (Zhang et al., 2000).

MRP3 (gen *ABCC3*) es también una proteína basolateral (Kool et al., 1999) con una marcada homología con MRP1, con quien comparte un 58% de la secuencia

aminoacídica (Belinsky y Kruh, 1999). MRP3 se expresa en hígado, intestino y, aunque en menor proporción, en el riñón (Kiuchi et al., 1998; Kool et al., 1997; Scheffer et al., 2002). Los niveles de expresión de MRP3 en hígado sano son bajos pero, como en el caso de MRP1 y MRP4 (gen *ABCC4*), estos niveles aumentan bajo determinadas circunstancias fisiopatológicas, como en colestasis y en el síndrome de Dubin-Johnson (Kartenbeck et al., 1996). MRP3 comparte muchos sustratos con MRP2 y, en menor grado, con BSEP (Hirohashi et al., 2000; Zeng et al., 2000).

MRP4 se expresa a niveles bajos en la membrana basolateral de los hepatocitos en condiciones normales (Kartenbeck et al., 1996), aunque también se encuentra presente en otros tejidos como yeyuno, riñón, cerebro, pulmón y vesícula biliar (Kool et al., 1997; Taipalensuu et al., 2001; van Aubel et al., 2002; Zhang et al., 2000). En cuanto a la estructura de la proteína, MRP4 presenta más similitudes con MDR1 que con otros miembros de la familia MRP (Belinsky et al., 1998). Es capaz de transportar oxazafosforinas, análogos de nucleósidos acíclicos, derivados de purinas, metotrexato y camptotecinas (Adachi et al., 2002; Chen et al., 2001; Tian et al., 2005; Zhang et al., 2005).

MRP5 (gen *ABCC5*) es una típica bomba transportadora de aniones orgánicos que transporta colorantes orgánicos ácidos (McAleer et al., 1999) (pero no calceína), glutatión reducido (GSH) y conjugados de glutatión como DNP-GS (Wijnholds et al., 2000) y se inhibe por la sulfinpirazona y la benzbromarona (Wijnholds et al., 2000). MRP5, al igual que MRP4 y MRP8, destaca por su capacidad para transportar análogos de nucleósido monofosfato (Wijnholds et al., 2000). La expresión de este transportador es muy ubicua aunque sus niveles son muy bajos (Wijnholds et al., 2000).

La MRP6 (gen *ABCC6*) se ha caracterizado como un transportador basolateral y canalicular en hepatocitos de rata (Madon et al., 2000). Aunque se han encontrado niveles elevados del ARNm de MRP6 en hígado humano, su papel en el transporte de fármacos no está claro (Bergen et al., 2007). Parece que no está implicada en el transporte de productos de biotransformación de fase II como conjugados con ácido glucurónico, sulfato o glutatión, aunque tiene capacidad de transportar cisplatino, doxorubicina o etopósido (Belinsky et al., 2002).

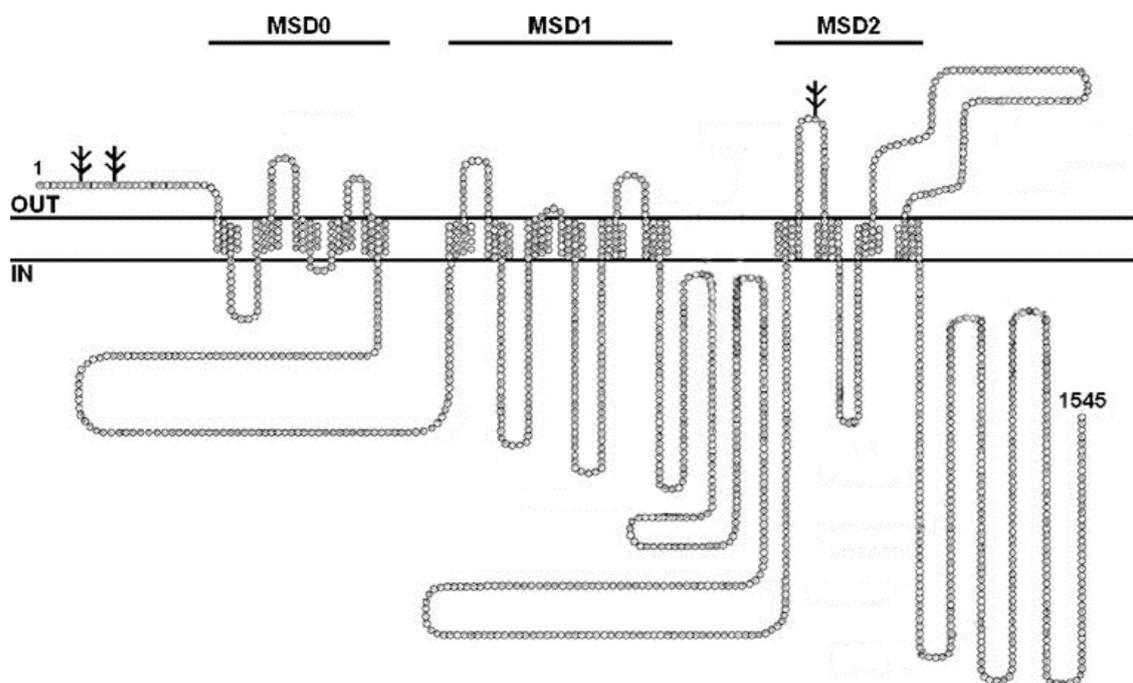
Otros miembros menos conocidos de esta familia son MRP7 y MRP8 (genes *ABCC10* y *ABCC11*). El ARNm de MRP7 se ha encontrado en numerosos tejidos, incluyendo el hígado (Hopper-Borge et al., 2004), y en células transfectadas con el

ADNc del transportador se ha puesto de manifiesto su capacidad de transportar algunos fármacos antitumorales, como paclitaxel y vincristina (Hopper-Borge et al., 2004). El ARNm de MRP8 está presente en el hígado a niveles bajos. Esta proteína transporta metotrexato (Chen et al., 2005) y fluorouracilo (Guo et al., 2003).

La MRP2 es quizás el miembro más característico y mejor estudiado de la subfamilia ABCC. Se localiza en la membrana apical de células polarizadas, como los hepatocitos, el epitelio del túbulo proximal del riñón y el epitelio intestinal. Esta localización implica a MRP2 en la excreción y detoxificación de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos, particularmente en el eflujo unidireccional de sustancias conjugadas con glutatión, glucuronato o sulfato. La MRP2 hepática también contribuye a la fuerza motriz del flujo biliar.

Estructuralmente, dentro de la subfamilia ABCC, MRP2 tiene el mayor grado de identidad en su secuencia de aminoácidos con ABCC1 (50%) y el menor con ABCC11 (Nies y Keppler, 2007). Funcional y estructuralmente, MRP2 es muy diferente de MDR1 (ABCB1), con la que sólo comparte el 26% de identidad en la secuencia aminoacídica. El gen de la MRP2 humana se localiza en el locus cromosómico 10q24 (Taniguchi et al., 1996), tiene una extensión de 65 pares de kb y consta de 32 exones (Toh et al., 1999).

La topología de la subfamilia ABCC está relacionada con la de muchos otros transportadores ABC y comprende 2 regiones MSD ("Membrane Spanning Domain") con varios segmentos transmembrana seguidas cada una de un dominio de unión a nucleótido (Haimeur et al., 2004; Kruh y Belinsky, 2003) (Esquema 5). Sin embargo, MRP2, junto con MRP1, MRP3, MRP6 y MRP7, posee adicionalmente una tercera región o dominio MSD0 amino terminal con segmentos transmembrana (Esquema 5), que se requieren para el correcto funcionamiento y localización de la proteína (Fernandez et al., 2002; Gao et al., 1998; Westlake et al., 2005).



**Esquema 5:** Esquema de la topología de membrana de la MRP2 humana. Las estructuras en forma de árbol indican la localización de los sitios de N-glicosilación.

MRP2 fue identificada por primera vez en la membrana canalicular de hepatocitos de rata (Buchler et al., 1996) y humanos (Keppler y Kartenbeck, 1996; Paulusma et al., 1997). Su posterior localización en la membrana apical del epitelio del túbulo proximal de riñón de rata fue la primera demostración de una localización extrahepática de esta bomba de eflujo (Schaub et al., 1997). Además de en riñón humano (Schaub et al., 1999), se ha localizado MRP2 en otros tejidos polarizados humanos como son el intestino delgado (Fromm et al., 2000; Sandusky et al., 2002), colon (König J, 2003), la vesícula biliar (Rost et al., 2001), bronquios (König J, 2003; Sandusky et al., 2002) y la placenta (St-Pierre et al., 2000). No obstante, MRP2 no está presente en la barrera hematotesticular (Bart et al., 2004; Sandusky et al., 2002) ni en la barrera hematoencefálica (Nies et al., 2004; Sandusky et al., 2002; Zhang et al., 2004). Sin embargo, se ha identificado MRP2 en capilares del hipocampo de pacientes con epilepsia en el lóbulo temporal (Aronica et al., 2004), y en la barrera hematoencefálica tras convulsiones epilépticas inducidas por pilocarpina (Hoffmann et al., 2006). Por otra parte, algunos estudios localizan MRP2 en capilares cerebrales de ratas sanas (Miller et al., 2000; van Vliet et al., 2005).

Diferentes tejidos humanos como son la piel, el páncreas exocrino, el tejido conectivo y los sistemas reproductor femenino, linfático y cardiovascular, no expresan MRP2 en cantidades detectables (Sandusky et al., 2002).

Además de en tejidos humanos sanos, MRP2 también está presente en gran número de tumores malignos, como se ha puesto en evidencia mediante inmunomarcaje de muestras clínicas procedentes de carcinomas de células claras renales (Sandusky et al., 2002; Schaub et al., 1999), hepatocelular (Nies et al., 2001; Zollner et al., 2005), de ovario (Arts et al., 1999; Sandusky et al., 2002) y colorrectal (Hinoshita et al., 2000; Sandusky et al., 2002).

Empleando microarrays de tejidos, se ha detectado MRP2 en carcinomas gástrico, de pulmón y mama (Sandusky et al., 2002). Por el contrario, la expresión de MRP2 es insignificante o bien está ausente en tumores testiculares primarios (Bart et al., 2004), adenocarcinomas pancreáticos (Konig et al., 2005) y gliomas (Bronger et al., 2005). A causa de su capacidad para conferir resistencia a una gran variedad de fármacos antitumorales (Cui et al., 1999; Chen et al., 1999; Hooijberg et al., 1999; Kawabe et al., 1999), MRP2 contribuye al fenotipo de resistencia a múltiples fármacos de diversos tumores sólidos malignos.

Con respecto a su localización subcelular, el mecanismo molecular por el que MRP2 se vectoriza hacia la membrana apical no se conoce completamente. Se ha descrito que algunas proteínas interactúan con MRP2 *in vitro*. La radixina, un miembro de la familia ezrina/radixina/moesina que interactúa con muchas proteínas integrales de membrana (Bretscher et al., 2000), parece ser necesaria para la correcta localización apical de MRP2, ya que los ratones “knock-out” para radixina exhiben hiperbilirrubinemia conjugada y una pérdida selectiva de MRP2 de la membrana canalicular del hepatocito (Kikuchi et al., 2002). La localización canalicular de la MRP2 humana depende también de la interacción con radixina (Kojima et al., 2003). Otras proteínas que interactúan con MRP2 *in vitro*, pertenecen a la familia PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ) y se unen al extremo C terminal de MRP2 mediante una secuencia del tipo T/S-X- $\Phi$  (donde X es cualquier aminoácido y  $\Phi$  un aminoácido hidrofóbico) (Hegedus et al., 2003; Kocher et al., 1999). Muchos de los ortólogos de MRP2 conocidos poseen este motivo de unión a PDZ en su extremo C terminal. Curiosamente, los ratones “knock-out” para PDZK1 presentan una localización apical correcta de MRP2 en el epitelio del túbulo proximal renal, lo que indica que la interacción de MRP2 con PDZK1 no se requiere *in vivo*, o que otras proteínas PDZ son capaces de compensar su defecto (Kocher et al., 2003).

Otros estudios especulan sobre la posibilidad de que el motivo de unión a PDZ sea la señal de vectorización de MRP2 hacia la membrana apical (Harris et al., 2001), sin embargo esto no ha sido confirmado por otros autores (Fernandez et al., 2002;

Konno et al., 2003; Nies et al., 2002; Westlake et al., 2005). Estos últimos estudios indican que el motivo de vectorización apical de MRP2 no está definido por una única secuencia aminoacídica, sino que parece estar formado por diversos motivos localizados en distintas partes de MRP2, de modo que se unen sólo en la proteína completa.

Bajo determinadas condiciones experimentales, MRP2 puede ser redistribuida hacia la membrana basolateral, por ejemplo en hepatocitos recién aislados (Rius et al., 2006) y en la línea celular humana de hepatoma HepG2, tras su activación con proteína kinasa C (Kubitz et al., 2001).

La especificidad de sustrato de MRP2 es muy amplia, y comprende muchos aniones orgánicos, con gran afinidad por los conjugados de glucuronato y glutatión (Jedlitschky y Keppler, 2002). Además, se han identificado como sustratos muchas sustancias aniónicas sin residuos conjugados aniónicos, como metotrexato y bromosulfoftaleína. Otro sustrato es el glutatión reducido y oxidado (Nies y Keppler, 2007).

La mencionada localización de ABCC2 en la membrana apical de diversas células polarizadas implicadas en la secreción de sustratos endógenos conjugados y xenobióticos favorece la función de ésta bomba de eflujo en la fase terminal de detoxificación (Keppler y König, 1997; König et al., 1999).

Gracias a su especificidad de sustrato, MRP2, en lugar de ABCB1 o ABCG2, es la bomba óptima para la eliminación a bilis, orina o lumen intestinal, de diversas toxinas y carcinógenos conjugados con glutatión, glucuronato o sulfato. Particularmente, en células no polarizadas, miembros adicionales de la subfamilia ABCC, como ABCC1, pueden tener esta función en la detoxificación terminal.

MRP2 juega un papel decisivo en la eliminación de glucuronósidos de bilirrubina desde el hepatocito a bilis. En consecuencia, la ausencia de MRP2 funcional en la membrana canalicular (Kartenbeck et al., 1996; Keppler y Kartenbeck, 1996) provoca un cuadro clínico de hiperbilirrubinemia conjugada, como se observa en el síndrome hereditario de Dubin-Johnson (Dubin y Johnson, 1954). Se han descrito muchas variantes en la secuencia del gen de MRP2, pero sólo algunas de ellas provocan ésta enfermedad.

Las ratas TR- (Jansen et al., 1985) y las EHBR (del inglés "Eisai hiperbilirubinemic") (Hosokawa et al., 1992; Takikawa et al., 1991) son dos cepas

mutantes con hiperbilirrubinemia que tienen un defecto hereditario en la secreción de conjugados aniónicos a bilis. Ambas cepas son consideradas un modelo animal del síndrome de Dubin-Johnson. Las dos variantes naturales de la secuencia del gen de rata *Abcc2*, tanto en el codón 401 (TR-) (Paulusma et al., 1996) como en el 855 (EHBR) (Ito et al., 1997), provocan un codón de parada prematuro y la ausencia de proteína Mrp2 en la membrana canalicular del hepatocito (Buchler et al., 1996; Mayer et al., 1995; Paulusma et al., 1996). Recientemente diferentes grupos de investigación han generado ratones “knock-out” para *Abcc2* (Chu et al., 2006; Nezasa et al., 2006; Vlaming et al., 2006). Aparentemente estos ratones son sanos y fértiles, al igual que las ratas carentes de Mrp2.

La deficiencia hereditaria de MRP2 en humanos, en ratas y en ratones “knock-out” para *Abcc2* (Chu et al., 2006; Nezasa et al., 2006; Vlaming et al., 2006) ilustra la función de esta bomba de eflujo en la eliminación de conjugados aniónicos del organismo. Cabe destacar que esta pérdida de función de ABCC2 suele ser bien tolerada y compensada gracias a la sobre-expresión de otros transportadores de membrana, como es el caso de ABCC3 en la membrana basolateral de los hepatocitos (Donner y Keppler, 2001; Keppler y Kartenbeck, 1996; König J, 2003). Así la deficiencia de MRP2 en humanos provoca un incremento en la concentración de glucuronósidos de bilirrubina en sangre, ya que son expulsados del hepatocito por la MRP3 basolateral.

En lo que se refiere a su regulación transcripcional y postranscripcional, MRP2 no se expresa constitutivamente con igual abundancia en todos los tejidos donde lo hace, sino que su expresión está regulada en respuesta a muchas sustancias endógenas y xenobióticas, y a diversos estados patológicos. La regulación transcripcional se produce en respuesta a cambios en la concentración intracelular de ABs y de una serie de compuestos lipofílicos que son ligandos de ciertos receptores nucleares. Los mecanismos postranscripcionales permiten la regulación de MRP2 a corto plazo. Frecuentemente, la regulación de MRP2 viene acompañada de regulaciones coordinadas de enzimas de conjugación y de otros transportadores de ABs.

La clonación de MRP2 ha permitido identificar varios sitios de unión a factores de transcripción ubicuos o también específicos de hígado (Kauffmann y Schrenk, 1998; Stockel et al., 2000; Tanaka et al., 1999). La región comprendida entre los nucleótidos 517 y 197, frente al codón de inicio de la transcripción, es importante para la expresión de la MRP2 humana (Stockel et al., 2000), con el sitio de inicio de

transcripción situado en el aminoácido 247. Además, se ha identificado un elemento de respuesta a hormonas (ER-8) en el promotor de Mrp2 de rata que se une, mediante heterodímeros con RXR $\alpha$ , a FXR, a PXR o a CAR (Kast et al., 2002). Estos NRs son activados por ABs, cómo en el caso de FXR (Parks et al., 1999), por varios xenobióticos cómo el antibiótico rifampicina, el glucocorticoide sintético dexametasona, y la pregnenolona 16 $\alpha$ -carbonitrilo como ocurre con PXR (Blumberg et al., 1998; Goodwin et al., 1999; Kliewer et al., 1998), o por fenobarbital, en CAR (Sueyoshi et al., 1999).

La presencia del ER-8 en el promotor de la Mrp2 de rata (Kast et al., 2002) puede explicar los estudios que describen la inducción del ARNm y de la proteína Mrp2 en cultivos primarios de hepatocitos de rata por ciertos xenobióticos, incluidos el carcinógeno 2-acetilaminofluoreno, el fármaco antitumoral cisplatino, el agente antifúngico clotrimazol, el antibiótico cicloheximida, la dexametasona, los agentes quimiopreventivos oltipraz y sulforafan, el fenobarbital y la pregnanolona 16 $\alpha$ -carbonitrilo (Courtois et al., 1999b; Kast et al., 2002; Kauffmann et al., 1997; Kubitz et al., 1999a; Payen et al., 2001). Existen factores adicionales probablemente involucrados en la regulación *in vivo* de ABCC2/Abcc2 ya que el tratamiento de ratas con fenobarbital u oltipraz no incrementa la expresión de ARNm de Abcc2 (Courtois et al., 1999b; Gerk y Vore, 2002; Hagenbuch et al., 2001; Johnson y Klaassen, 2002). Por el contrario, en ratones alimentados con diversos compuestos, cómo los ABs cólico y ursodesoxicólico (Fickert et al., 2001), o el herbicida ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (Wielandt et al., 1999), se induce la expresión de ARNm y proteína de Mrp2, lo que puede prevenir la acumulación de conjugados de ABs o xenobióticos potencialmente tóxicos.

Del mismo modo, se ha detectado la inducción de MRP2 en el hígado de primates no humanos (Kauffmann et al., 1998) y en el intestino de humanos (Fromm et al., 2000) tras el tratamiento con el ligando de PXR, rifampicina. La regulación de MRP2/Mrp2 en patologías puede también, al menos en parte, ser el resultado de la mediación de factores de transcripción.

La expresión de Mrp2, tanto a nivel de ARNm como de proteína, disminuye en hígado de rata tras la inducción experimental de colestasis, bien mediante ligadura del conducto biliar, o bien mediante tratamiento con endotoxinas (Kubitz et al., 1999b; Trauner et al., 1997; Vos et al., 1998). Esto puede deberse a la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias como la interleucina-1 $\beta$ , que a su vez reduce la expresión del NR RXR $\alpha$ , necesario para formar heterodímeros con FXR, PXR o CAR, lo que

conduciría a la disminución de la actividad del promotor de *MRP2* (Denson et al., 2002). Curiosamente, los niveles de expresión de Mrp2 en riñón durante la colestasis se mantienen constantes o incluso se incrementan (Denson et al., 2002; Lee et al., 2001).

En humanos, los niveles de ARNm están reducidos en hígado de pacientes con colangitis esclerosante primaria (Oswald et al., 2001) o con colestasis obstructiva (Shoda et al., 2001). La colestasis obstructiva reduce los niveles de proteína MRP2 en intestino pero sin afectar a los niveles de su ARNm (Dietrich et al., 2004).

Además de esta regulación transcripcional, numerosos estudios describen una regulación postranscripcional de MRP2/Mrp2. Uno de los mecanismos es la modulación de la cantidad de esta bomba de eflujo en la membrana apical, mediante reclutamiento de moléculas del transportador desde compartimentos multivesiculares perinucleares o su retirada y secuestro en estas microvesículas intracelulares. La inserción de Mrp2 en la membrana apical de hepatocitos de rata podría depender de la fosfoinositol 3-quinasa (Misra et al., 1998), de la proteína quinasa C (Beuers et al., 2001), o del AMPc (Roelofsen et al., 1998). La retirada de Mrp2 de rata desde la membrana canalicular al interior del hepatocito, se ha detectado bajo diferentes condiciones de colestasis (Mottino et al., 2002; Paulusma et al., 2000; Trauner et al., 1997), tras tratamiento con faloidina (Rost et al., 1999), tras estimulación con citoquinas (Dombrowski et al., 2000; Kubitz et al., 1999b), y bajo condiciones hiperosmolares (Dombrowski et al., 2000; Kubitz et al., 1997). En estas condiciones, el inmunomarcaje de Mrp2 no se limita a la membrana canalicular, sino que se muestra difuso, lo que sugiere una acumulación de moléculas de transportador dentro del hepatocito. Un inmunomarcaje difuso comparable, indicador de la retirada endocítica de moléculas de transportador, se ha descrito en enfermedades hepáticas como la colestasis icterica inducida por inflamación (Zollner et al., 2001), la colestasis obstructiva (Shoda et al., 2001; Yamada et al., 2005), y la cirrosis biliar primaria en estado avanzado (Kojima et al., 2003; Kullak-Ublick et al., 2002).

La cantidad de moléculas de transportador en la membrana canalicular del hepatocito puede ser regulada también por un cambio en su síntesis y/o tasa de degradación. La vida media de la Mrp2 de rata en la membrana canalicular del hepatocito es de aproximadamente 27 horas (Jones et al., 2005). En un hígado de rata normal, la tasa de síntesis y degradación de proteína Mrp2 es muy similar dentro de un mismo lóbulo (Paulusma et al., 2000). Sin embargo, durante la colestasis, Mrp2 en los hepatocitos periportales es degradada más rápidamente que en condiciones

normales, lo que lleva a observar una mayor concentración de Mrp2 cerca del área central (perivenosa) del lóbulo hepático (Paulusma et al., 2000). En ratas tratadas con etinilestradiol (Trauner et al., 1997) y en ratas preñadas (Cao et al., 2002), se ha detectado una disminución de los niveles de la proteína Mrp2 mientras que los de su ARNm permanecen inalterados, en comparación a los niveles observados para ratas control.

El clofibrato, un ligando de PPAR $\alpha$  (del inglés “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$ ”, gen *NR1C1* (Issemann et al., 1993)), también disminuye los niveles de la proteína Mrp2 mediante mecanismos postranscripcionales (Johnson y Klaassen, 2002).

#### **2.4.4. Familia ABCD**

La familia ABCD consta de 4 miembros en los mamíferos, todos ellos son semi-transportadores (“half-transporters”) asociados a los peroxisomas, aunque aún se desconoce si forman homodímeros o heterodímeros.

El primer transportador ABC peroxisomal identificado fue PMP70, codificado por el gen *ABCD3*, que es la principal proteína integral de membrana de los peroxisomas (Kamijo et al., 1990). Los mayores niveles del ARNm de *ABCD3* se detectan en hígado y riñón, tanto humano como murino (Berger et al., 1999; Langmann et al., 2003). Con respecto a la función de PMP70, se cree que transporta ácidos grasos de cadena larga unidos a acil-CoA (Imanaka et al., 1999).

El segundo miembro de la familia identificado fue la proteína ALDP (del inglés “Adrenoleukodystrophy Protein”) codificada por el gen *ABCD1* y descrita por primera vez por Mosser en 1993 (Mosser et al., 1993). Los mayores niveles de ARNm en tejidos humanos y murinos se han detectado en corazón, testículo, pulmón e intestino (Berger et al., 1999; Langmann et al., 2003). Respecto a su función, se cree que la ALDP está implicada en el transporte de ésteres de coenzima A y de ácidos grasos de cadena muy larga al interior del peroxisoma. La adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (X-ALD) es una patología humana causada por mutaciones en el gen *ABCD1*, de la que se han descrito al menos 6 variantes fenotípicas de la enfermedad. Bioquímicamente, esta enfermedad se caracteriza por los elevados niveles en plasma y tejidos de ácidos grasos de cadena larga saturada (principalmente de 24 o 26

átomos de carbono), aunque también se han detectado niveles elevados de ácidos grasos monoinsaturados de 26 carbonos.

El tercer transportador ABC peroxisomal identificado fue ALDRP (del inglés "Adrenoleukodystrophy-Related Protein), codificado por el gen *ABCD2*. ALDRP posee una homología del 63% con la secuencia de aminoácidos de ALDP, con el que también comparte la especificidad de sustrato, aunque con menor eficiencia. Su expresión es elevada en cerebro y músculo esquelético (Berger et al., 1999; Langmann et al., 2003).

El último miembro de la familia en ser identificado y también el peor conocido es PMP69, codificado por el gen *ABCD4*. Los mayores niveles de su ARNm se han detectado en pulmón, testículo y riñón (Langmann et al., 2003), sin embargo aún se desconoce el papel fisiológico que desempeña.

#### **2.4.5. Familia ABCG**

La mayoría de los miembros de esta familia de transportadores ABC, como ABCG1, ABCG4, ABCG5 y ABCG8, son bombas exportadoras de colesterol (Kusuhara y Sugiyama, 2007). Los que presentan una mayor expresión en los hepatocitos son los transportadores ABCG5 y ABCG8, que forman un heterodímero localizado en la membrana canalicular (Berge et al., 2000), que promueve la excreción biliar de esteroides neutros (Wittenburg y Carey, 2002).

La proteína de resistencia del cáncer de mama ("Breast Cancer Resistance Protein" o BCRP; gen *ABCG2*) es otro miembro de esta familia de transportadores, que presenta una especificidad de sustrato mucho más amplia que el resto, incluyendo una gran variedad de fármacos antitumorales. Desempeña un papel importante en la biodisponibilidad y eliminación hepática de fármacos y en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral (Kusuhara y Sugiyama, 2007). La BCRP consta de un solo dominio de unión de ATP y 6 segmentos transmembrana, por lo que se le clasifica como un semi-transportador ("half-transporter") (Litman et al., 2000). Aunque puede formar homodímeros unidos por puentes disulfuro, parece que los niveles de monómeros y homodímeros de ABCG2 son bajos en la membrana plasmática de los hepatocitos (Xu et al., 2004). La principal unidad oligomérica de ABCG2 es un homotetrámero, aunque se han encontrado oligómeros mayores, de hasta 12 unidades (Xu et al., 2004).

A nivel de ARNm la ABCG2 está altamente expresada en la placenta (Allikmets et al., 1998; Serrano et al., 2007) y, en menor grado, en cerebro, hígado, próstata, intestino delgado y colon (Doyle et al., 1998). Por inmunohistoquímica se ha puesto de manifiesto su localización en la membrana plasmática apical de los hepatocitos, trofocitos y células epiteliales del colon e intestino delgado (Maliepaard et al., 2001).

Entre los compuestos endógenos que son sustratos de BCRP se encuentran varios esteroides, incluyendo ABs (Blazquez et al., 2011), con mayor eficacia para los derivados sulfatados, sobre todo estrona 3-sulfato y dehidroepiandrosterona sulfato (Imai et al., 2003; Janvilisri et al., 2005), y porfirinas (Krishnamurthy et al., 2004). Además, tiene capacidad para transportar fármacos antitumorales como oxazafosforinas (Zhang et al., 2005), metotrexato (Volk et al., 2000) y sus metabolitos glutamilados (Volk y Schneider, 2003), flavopiridol (Robey et al., 2001), tamoxifeno (Sugimoto et al., 2003), bisantreno (Litman et al., 2000), doxorubicina y mitoxantrona (Doyle et al., 1998; Allen et al., 1999), irinotecan y topotecan (Schellens et al., 2000; Maliepaard et al., 1999), etopósido (Allen et al., 2003) e imatinib (Burger et al., 2004).

Se han descrito varias mutaciones de *ABCG2*, la mayoría en líneas celulares tumorales, que afectan a la expresión, localización y actividad transportadora de la proteína, alterando la farmacocinética y el espectro de resistencia a fármacos antitumorales (Yanase et al., 2006; Tamura et al., 2007).







# 3

## MATERIAL Y MÉTODOS

---



### **3.1. MATERIAL**

#### **3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

##### **3.1.1.1. Animales**

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho de la raza Wistar, procedentes de la casa Panlab (Madrid) y ratas HsdAmc: TR-Abcc<sup>2</sup> procedentes de la casa Harlan (Oregon, EE.UU.) y procreadas en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Se alimentaron con pienso granulado de cría (A.03) o de mantenimiento (A.04) para ratas (Panlab). Los animales tenían libre acceso tanto al agua como al alimento. Se mantuvieron en una habitación a temperatura y humedad controladas, dotada de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

En todo momento los animales fueron tratados según las especificaciones de la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" ("Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook", 2ª edición, 2002). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

##### **3.1.1.2. Líneas celulares**

En el desarrollo de este trabajo se emplearon las siguientes líneas celulares:

- Alexander o PLC/PRF/5, de hepatoma humano (nº ATCC: CRL-8024).
- HepG2, de hepatoblastoma humano (nº ATCC: HB-8065).
- LS 174T, de carcinoma de colon humano (nº ATCC: CL-188).

##### **3.1.1.3. Bacterias**

Las bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes fueron preparadas y suministradas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Las bacterias *E. coli* “One Shot Mach1 T1” competentes de elevada eficacia de transformación fueron compradas a Invitrogen (Barcelona).

### 3.1.2. PRODUCTOS

Los productos utilizados en este estudio se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Abbot (Madrid): Pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Abcam (Cambridge, Inglaterra): Anticuerpo monoclonal de ratón, BXP21, frente a BCRP, anticuerpo policlonal de conejo frente a calnexina (ab22595), anticuerpo policlonal de conejo frente a laminina B1 (ab16048), anticuerpo monoclonal de ratón, Mab 414, frente a proteínas del complejo de poro nuclear, anticuerpo monoclonal de ratón, C219, frente a MDR1/3 y Mdr1/2 (ab3364), anticuerpo monoclonal de rata frente a MRP4 (ab15602), anticuerpo monoclonal de ratón frente a la Na/K ATPasa (M7-PB-E9) y anticuerpo policlonal de conejo frente a pan cadherina (ab16505).
- Air Liquid (Valladolid): dióxido de carbono, carbógeno y nitrógeno líquido.
- Alexis Axxora (Lausana, Suiza): Anticuerpos monoclonales M<sub>2</sub>III-5 y M<sub>2</sub>III-6 de ratón, frente a la proteína ABCC2 (MRP2) y anticuerpo monoclonal de ratón, BXP34, frente a BCRP.
- AppliChem (Ecogen, Madrid): agar, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal), extracto de levaduras, glicerol, isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) y triptona.
- Applied Biosystems (Madrid): reactivos para PCR cuantitativa “Power SYBR Green PCR Master Mix” y “Taqman Universal PCR Master Mix”, y kit de RNA ribosómico 18S Taqman.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, marcadores de pesos moleculares de proteínas (“High range”, “Low range” y “Kaleidoscope”), membrana de nitrocelulosa, persulfato de amonio, TEMED (N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina) y rojo ponceau.
- BDH (Poole, Inglaterra): Sacarosa.

- Becton Dickinson (Madrid): Tampón FACSFlow para el citómetro.
- Calbiochem (Darmstadt, Alemania): Ácido glicoursodesoxicólico (GUDC).
- Dako (Barcelona): Medio de montaje para fluorescencia “Fluorescent Mounting Medium”.
- Fermentas (Quimigranel, Madrid): T4 polinucleótido kinasa.
- GE Healthcare (Madrid): algunas enzimas de restricción, reactivos para la purificación de ADN de reacciones enzimáticas y geles de agarosa “GFX PCR DNA & Gel Band Purification kit”, para el aislamiento de ADN plasmídico de bacterias “PlasmidPrep Mini spin kit”, para el aislamiento de ARN total “Illustra RNAspin Mini Isolation kit” y reactivos de detección ECL “Enhanced ChemioLuminiscence”.
- Invitrogen (Barcelona): 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), estándares de ADN (25 y 100 pb y 1 kb plus) y de ARN (0,24-9,5 kb y 0,5-10 kb), enzima Accuprime Pfx ADN polimerasa, enzima Platinum Taq ADN polimerasa, anticuerpo monoclonal de ratón frente a V5 (R961), anticuerpo policlonal de cabra frente a IgG de conejo conjugado con Cianina 5, Cy5 (A10523), reactivos para la transfección de células en cultivo “Lipofectamine LTX and PLUS Reagents”, reactivos para la retrotranscripción “Enhanced Avian RT-PCR kit”, bacterias “One Shot Mach T1”, SYBR Green I (SYBR Safe), la enzima “Gateway LR Clonase II” y los kits para cuantificar ADN y ARN “Pico-Green DNA-Quantitation Kit” y “RiboGreen RNA-Quantitation Kit”.
- Leo Laboratorios S.A. (Madrid): heparina.
- Millipore Ibérica (Madrid): filtros de 0,22 µm de diámetro de poro y anticuerpo policlonal de conejo frente a UGT1A1 (AB10339).
- Molecular Probes (Leiden, Holanda): anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo Alexa 488, anti-IgG de ratón Alexa 594 y Alexa 488.
- MP Biomedicals LLC (Santa Ana, EE.UU.): líquido de centelleo UniverSol™ ES.
- New England Nuclear (Pacisa, Madrid): ácido [<sup>3</sup>H]-taurocólico ([<sup>3</sup>H]-TC, 50 mCi/mmol).

- New England Biolabs (Izasa, Barcelona): enzima PNGasa F.
- Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU): T4 DNA ligasa y algunas enzimas de restricción.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): Reactivos para extracción de ADN genómico “QIAamp DNA Blood Mini kit” y para la conservación/estabilización del ARN “RNA lator”.
- Roche (Barcelona): Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (Hepes).
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.): anticuerpo primario frente a GAPDH (sc32233).
- Sigma-Aldrich Química (Madrid): Ácido glicocólico (GC), ácido glicoquenosodesoxicólico (GQDC), ácido ursodesoxicólico (UDC), ATP, azul de tripán, calceína, cisplatino, solución estándar de Pt 1020 µg/ml, colagenasa, creatin fosfato, creatinfosfoquinasa, isotiocianato de fluoresceína (FITC), dextranos marcados con FITC (FD-10s, FD-40s, y FD-70s, de peso molecular 10 kDa, 40 kDa y 70 kDa, respectivamente), doxorubicina (Dox), ribonucleasa A, rodamina 123 (Rho), yoduro de propidio (IP), dexametasona, prednisolona, budesonida, coctel inhibidor de proteasas y el medio de cultivo, los suplementos y la solución de antibióticos/antimitóticos utilizados en el cultivo de hepatocitos y líneas celulares.
- TaKaRa (Conda): algunas enzimas de restricción y solución de carga para electroforesis en gel.
- TDI (Madrid): suero bovino fetal (FCS).
- Thermo Scientific (Madrid): anticuerpo monoclonal de ratón frente a la red trans del Golgi (TGN38).
- Waters (Madrid): cartuchos Sep-Pak Plus C18.

Todos los demás reactivos y disolventes orgánicos utilizados fueron de grado analítico.

### 3.1.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

Todo el material de vidrio utilizado para la síntesis química era de Afora (Madrid). Para la cromatografía en capa fina (TLC) se utilizaron placas de gel de sílice (60 F254, 20 x 20 cm, Merk, Barcelona) sobre soporte de aluminio, de 0,2 mm de espesor (TLC analítica), y sobre soporte de vidrio, de 2 mm de espesor (TLC preparativa). La fluorescencia de las placas de TLC se visualizó con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta (Vilber Lourmat, Francia).

Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid). Para pesar los animales se utilizó también una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600 C (Grupo Taper, Madrid). Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crison Instruments, Barcelona). El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro 10 Plus y Milli-Q (Millipore Ibérica, Madrid).

Para la canulación de las venas porta y cava, y el conducto biliar de las ratas se utilizaron catéteres Braun (B. Braun, Melsungen, Alemania). En la perfusión hepática se utilizó una bomba Easy load Masterflex de Cole Parmer Instruments Co. (Chicago, EEUU). Las homogeneizaciones del tejido hepático se realizaron en un Potter S-779 (B. Braun Surgical GMBH, Melsungen, Alemania).

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Megafugue-1,0 R (Heraeus Spatach, Kalsberg, Alemania). La centrifugación de tubos eppendorf se llevó a cabo en una centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5417R (Merk Eurolab, Barcelona). Las ultracentrifugaciones se realizaron en una ultracentrífuga refrigerada Beckman L8-70 (Beckman Instruments, Madrid).

Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050 (Millipore Ibérica, Madrid). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper, Madrid).

El análisis por citometría de flujo de la captación de compuestos fluorescentes en núcleos aislados se realizó en un citómetro FACSort, de la casa Becton Dickinson (Madrid). El programa informático utilizado para la adquisición y análisis de datos fue el CellQuest, de la misma casa comercial, al igual que el programa utilizado para representar los resultados, Paint-a-Gate™.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado tipo “fuera borda” marca Selecta modelo Unitronic-320 (Pacisa Giralt, Grupo Taper, Madrid).

Para la realizaci3n de los cultivos celulares se utiliz3 una campana de flujo laminar modelo Telstar AV-30/70 (Telstar, Barcelona) y una estufa New Brunswick Scientific Co. Inc. (Pacisa Giralt, Grupo Taper, Madrid). Se utilizaron placas de cultivo de tipo Labtek de ocho pocillos (Becton Dickinson, Madrid), as3 como placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) en el cultivo de las l3neas celulares. La esterilizaci3n de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore Ib3rica).

Para visualizar la fluorescencia se utiliz3 un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duero Lab) o un microscopio confocal modelo TCS SP5 (Leica, Barcelona), perteneciente al Centro de Investigaci3n del C3ncer (Salamanca).

Para la PCR anal3tica y para la transcripci3n reversa (RT) se utiliz3 un termociclador modelo RoboCycler Gradient 96 de Stratagene (La Jolla, EE.UU.). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un equipo ABI Prism 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.

La electroforesis de 3cidos nucleicos en geles de agarosa se realiz3 en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplado a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid).

Las homogeneizaciones se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinem3tica GMBH (Lucerna, Suiza)

La electroforesis de prote3nas se llev3 a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentaci3n modelo PowerPac 300. La transferencia electrofor3tica a membranas de nitrocelulosa se realiz3 en un sistema Trans-Blot Cell II utilizando para ello la misma fuente de alimentaci3n, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.

Los an3lisis de Pt se llevaron a cabo en un espectrof3tometro de absorci3n at3mica con horno de grafito (Z-8100 Polarized Zeeman) de la casa Hitachi, utilizando cubetas tipo tubo pirol3ticas, tambi3n de Hitachi (Pacisa). La l3mpara de Pt de c3todo hueco era de la casa Photron (Victoria, Australia). Para la mineralizaci3n de las muestras se utiliz3 un termostato de bloque met3lico Tembloc (Selecta, Barcelona).

La radiactividad del isótopo  $^3\text{H}$  se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6500 (Beckman Instruments, Madrid), utilizando líquido de centelleo UniverSol (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, EE.UU.).

Para la determinación de ácidos biliares (ABs) se usó un equipo de HPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem o HPLC-MS/MS (6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La columna cromatográfica de fase reversa Zorbax empleada era de Agilent Technologies (Madrid). Los reactivos y solventes para las técnicas de HPLC fueron de grado HPLC. Los estándares de ABs se adquirieron en las casas Steraloids y Sigma.

Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a  $37^\circ\text{C}$  modelo S-20 (Selecta, Barcelona).

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y la quimioluminiscencia de membranas de nitrocelulosa se empleó el equipo de captura y análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid).

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó un espectrofotómetro ELISA ELx808 (BioTek).

Para la cuantificación de ADN o ARN se utilizó el espectrofotómetro “Nanodrop 1000” de Thermo Scientifica o un fluorímetro Hitachi F-4010 (Grupo Taper) y cubetas de cuarzo de la marca Hellma (Duerolab, Salamanca).

Las muestras se conservaron en un congelador  $-80^\circ\text{C}$  marca Revco (Pacisa) y en contenedores de nitrógeno líquido.

La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Además se contó con otro pequeño equipamiento: agitador magnético calefactor (Selecta, Barcelona), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Wilson (Prosisa, Salamanca).

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE DERIVADOS FLUORESCENTES DE ÁCIDOS BILIARES**

Se siguió el método descrito por Sherman y Fisher (Sherman y Fisher, 1986), para la obtención de un AB fluorescente por reacción entre ácido glicocólico (GC) e isotiocianato de fluoresceína, isómero I (FITC), en dimetil sulfóxido (DMSO). El producto mayoritario de esta reacción es aquel en el que el FITC se une al grupo carboxilo del GC mediante un enlace amida (Schteingart et al., 1992).

#### **3.2.1.1. Síntesis de colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC)**

Se hicieron reaccionar cantidades equimoleculares de FITC y GC, disueltos en DMSO. Esta mezcla, protegida de la luz, se calentó a 90-95°C durante 60 min. Transcurrido ese tiempo, se paró la reacción por adición de agua destilada y la solución resultante se acidificó con HCl. El producto de reacción, FITC-GC, es soluble en acetato de etilo (Sherman y Fisher, 1986) y se extrajo con este solvente. Los restos de ácido de la fase orgánica se eliminaron por lavado con una solución saturada de NaCl. A continuación, se eliminó el agua remanente por adición de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro y filtración sobre papel. Finalmente, se evaporó el acetato de etilo para obtener el producto de reacción sólido.

#### **3.2.1.2. Síntesis de ursodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GUDC) y de quenodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GQDC)**

Se utilizó el método descrito anteriormente para la síntesis de FITC-GC, pero en este caso los ABs de partida fueron el ácido glicoursodesoxicólico (GUDC) y el ácido glicoquenodesoxicólico (GQDC). De nuevo se hicieron reaccionar cantidades equimoleculares de FITC y de GUDC o GQDC, en DMSO, durante 60 min, a 90-95°C. El producto de las reacciones se extrajo también en acetato de etilo.

### 3.2.1.3. Purificación y caracterización química

Para la observación de los productos resultantes de cada síntesis, se realizaron cromatografías en capa fina (TLC) analíticas. En la cromatografía se incluyeron, además del producto de reacción obtenido, los patrones comerciales de los compuestos de partida, FITC y GC, GUDC o GQDC según el caso. Todos los compuestos se disolvieron en metanol para aplicarlos sobre la placa de TLC. Se probaron diferentes fases móviles, hasta encontrar la que mejor separase los diferentes compuestos cromatografiados.

Tras la cromatografía las placas se observaron bajo luz ultravioleta, para visualizar los productos fluorescentes. Posteriormente se revelaron con ácido fosfomolibdico (10% en etanol) que, tras ser expuesto a temperaturas de 110°C, pone de manifiesto los grupos hidroxilos unidos a un anillo carbonado (Coleman et al., 1995), dándoles una coloración azul oscura frente al amarillo que adopta el resto de la placa.

Para la purificación de los productos obtenidos se realizó una TLC preparativa, utilizando placas de sílice sobre soporte de vidrio. La fase móvil fue la misma, en cada caso, que la empleada en la TLC analítica. Los compuestos purificados se conservaron como sólidos, a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

En el caso de la síntesis del FITC-GUDC y del FITC-GQDC, para confirmar que la estructura de los ABs fluorescentes obtenidos y purificados era la esperada de acuerdo con el método de síntesis empleado (Schteingart et al., 1992; Sherman y Fisher, 1986), una alícuota se disolvió en metanol deuterado y se realizó un espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , en el Servicio de Espectrometría de RMN de la Universidad de Salamanca. Con fines comparativos se realizaron además espectros de RMN de los productos de partida de la reacción de síntesis, FITC, GUDC y GQDC.

### **3.2.2. EXPERIMENTOS *IN VIVO***

Con el objeto de modificar la expresión de la proteína Abcc2 *in vivo*, se llevaron a cabo 3 tipos de experimentos en rata.

#### **3.2.2.1. Colestasis obstructiva**

La colestasis obstructiva se indujo en ratas macho Wistar y TR-. Tras anestesiarse al animal con isoflurano (Forane), se afeitó el campo operatorio, se desinfectó con tintura de yodo y se practicó una laparotomía media de 4-5 cm desde el cartílago xifoides. Tras separar el conducto biliar común, se realizó una ligadura doble por encima de la desembocadura de los conductos pancreáticos y se cortó el conducto entre las dos ligaduras. A continuación, se cerró la cavidad abdominal por planos con sutura continua en el peritoneo y músculo, y con puntos individuales en "U", en el caso del plano cutáneo. La región abdominal se impregnó exteriormente con un antiséptico (aerosol de violeta de genciana) para evitar posibles infecciones. Los animales se dejaron recuperar de la anestesia bajo una lámpara calefactora.

Transcurridos 2 días desde la ligadura del conducto biliar, se procedió al aislamiento de núcleos de hepatocitos (apartado 3.2.4.1.) y a la recogida de una muestra de tejido hepático, que se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### **3.2.2.2. Estudio del efecto del cisplatino**

Para el estudio del efecto del cisplatino sobre la expresión proteica de Abcc2 en núcleos de hepatocitos de rata, se utilizaron ratas Wistar macho de 200-300 g. A estos animales se les administró una suspensión de cisplatino en solución salina, a una dosis de 2 mg/kg p.c./día. El tratamiento se llevó a cabo durante 4 días y la vía de administración fue intraperitoneal. Se siguió el mismo procedimiento con ratas control a las que sólo se les inyectó el volumen adecuado de solución salina.

Finalizado el tratamiento se procedió al aislamiento de núcleos de hepatocitos (apartado 3.2.4.1.) y a la recogida de una muestra de tejido hepático, que se congeló en nitrógeno líquido. Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 3.2.2.3. Estudio del efecto de glucocorticoides

Para el estudio del efecto de glucocorticoides sobre la expresión génica y proteica de *Abcc2* y de otras proteínas de interés *in vivo*, se utilizaron ratas Wistar macho de 200-300 g. A estas ratas se les administró una suspensión de dexametasona, prednisolona o budesonida en aceite de maíz, a una dosis de 50 mg/kg p.c./día. El tratamiento se llevó a cabo durante 4 días y la vía de administración fue intraperitoneal. Se siguió el mismo procedimiento con ratas control a las que sólo se les inyectó el volumen pertinente de aceite de maíz. En algunos casos se realizó el mismo tratamiento con dexametasona en ratas TR-, que no expresan *Abcc2*.

Finalizado el tratamiento, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico vía intraperitoneal, con una dosis de 50 mg/kg p.c. Una vez afeitado y desinfectado el campo operatorio con tintura de yodo, se practicó una laparotomía ventral media y se procedió a la recogida de bilis, sangre e hígado.

Las muestras de bilis se obtuvieron mediante canulación del conducto biliar. Se recogió bilis durante 30 min en viales previamente tarados, que posteriormente se pesaron para determinar el flujo biliar por diferencia de pesada, al considerar que la densidad relativa de la bilis es aproximadamente igual a uno (Klaassen, 1974).

La sangre se recogió por venopunción de la vena cava inferior para analizar los ABs en suero (apartado 3.2.11.7.)

Al finalizar el proceso experimental se recogieron muestras de hígado y tras lavarlas en solución salina, se secaron ligeramente, se embebieron en “RNAlater” (Qiagen)” o se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización. El ARN hepático total se extrajo según se detalla en el apartado 3.2.7.1.

### **3.2.3. EXPERIMENTOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA**

#### **3.2.3.1. Aislamiento de hepatocitos de rata**

Se siguió una adaptación del método de Berry (Berry et al., 1991; Berry y Friend, 1969) con algunas modificaciones, como se indica a continuación.

##### **Procedimiento quirúrgico**

Como donantes de hepatocitos se utilizaron ratas macho, de peso comprendido entre 180-200 g, a las que se ponía en ayunas la noche anterior. Se les permitió libre acceso al agua en todo momento.

Para el aislamiento de hepatocitos se siguió la técnica de perfusión con colagenasa, en una preparación quirúrgica similar a la utilizada para preparaciones de hígado de rata aislado y perfundido "*in situ*" (Marin et al., 1990).

Se iniciaba el proceso anestesiando al animal con pentobarbital sódico vía intraperitoneal, con una dosis de 50 mg/kg p.c. Una vez afeitado y desinfectado el campo operatorio con tintura de yodo, se practicaba una laparotomía ventral media. Posteriormente se situaban hilos para llevar a cabo ligaduras en la vena gastroduodenal y la arteria hepática, así como en la vena porta y la vena cava inferior, justo por encima de los pedículos renales.

Se procedía entonces a la canulación de la vena porta, a través de la cual se comenzaba una pre-perfusión con un tampón PBS sin calcio (previamente gaseado con carbógeno y estabilizado a 37°C). Rápidamente, se cortaba la vena cava inferior a nivel abdominal y se cerraban todas las vías de salida, excepto la vena cava inferior en la que se insertaba una cánula a través de la aurícula derecha. Esta primera perfusión se mantenía, de manera no recirculante, durante 10 min, a una velocidad aproximada de 40 ml/min.

El siguiente paso era la perfusión del hígado con una solución de colagenasa en un sistema recirculante, durante 5-7 min. Transcurrido este tiempo, se extraía el hígado y se colocaba en un crisol que contenía solución de colagenasa. Se disgregaba el tejido, diluyendo después la suspensión celular con un PBS con calcio; la suspensión resultante se filtraba a través de tres mallas de diferente tamaño de poro, eliminando así los restos más grandes de tejido y acúmulos de hepatocitos.

Para separar los hepatocitos viables de las células no parenquimales y de los hepatocitos dañados o muertos se realizaban varias centrifugaciones a 43 xg, durante 2 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendía en PBS con calcio. La última centrifugación se hacía en las mismas condiciones, durante 4 min, usando tubos tarados para poder calcular el peso del precipitado húmedo, que posteriormente se resuspendía en medio de anclaje (Williams' Medium E suplementado con Hepes, bicarbonato, selenito, dexametasona, insulina y galactosa) o en medio Earlé's, en función del destino final de los hepatocitos.

Para el conteo de las células, una alícuota de la suspensión celular se teñía con azul de tripán y se observaba una cámara de Neubauer para determinar el porcentaje de células vivas (no teñidas) y muertas (de color azul intenso) y conocer la viabilidad de la preparación. Si el porcentaje de hepatocitos vivos era elevado ( $\geq 85\%$ ), se procedía a la realización de los experimentos.

Los hepatocitos en medio Earlé's se empleaban en suspensión (apartado 3.2.3.2.), mientras que los resuspendidos en medio de anclaje se sembraban a la densidad celular deseada en placas previamente recubiertas con colágeno tipo I (obtenido a partir de tendones de cola de rata). Las placas se mantenían en un incubador a 37°C, durante 90 min, para permitir el anclaje de los hepatocitos. Transcurrido este tiempo se retiraba el medio de anclaje (junto con las células no viables que no se hubiesen anclado) y se sustituía por medio de cultivo (medio de anclaje suplementado con EGF, etanolamina, transferrina, ácido linoléico, albúmina, nicotinamida y ornitina).

Tanto las soluciones utilizadas para el aislamiento de hepatocitos como los medios de cultivo se esterilizaron previamente a su uso por filtración a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore Ibérica, Madrid).

### **3.2.3.2. Captación de ácidos biliares en hepatocitos en suspensión**

Una vez resuspendidos los hepatocitos a una densidad de  $2,5 \times 10^6$  células/ml en medio Earlé's, se repartían 20 ml de esta suspensión (50 millones de células) en frascos Roux, que se colocaban sobre un agitador basculante dentro de una cámara termostaticada a 37°C. Se gaseaba la suspensión celular con carbógeno a través de un orificio practicado en los tapones de los frascos. Tras 15 min de equilibrio, para permitir la estabilización de la temperatura, se añadía a cada frasco la cantidad

adecuada de ácido taurocólico (TC) radiactivo, y se incubaban los hepatocitos con este AB a 37°C, con agitación constante y gaseados con carbógeno, durante el tiempo deseado según el tipo de experimento.

Tras esta incubación se tomaban dos alícuotas de la suspensión de hepatocitos. En una de ellas se determinaba la radiactividad total y la otra se centrifugaba a 43 xg durante 2 min y se determinaba la radiactividad no captada en el sobrenadante. Esto permitía estimar, por diferencia, la cantidad de TC captado por los hepatocitos.

El resto de las células se precipitaban a 43 xg durante 2 min y se lavaban con PBS con calcio para eliminar los restos de radiactividad extracelular, antes de proceder al aislamiento de los núcleos.

Se realizaron dos tipos de experimentos:

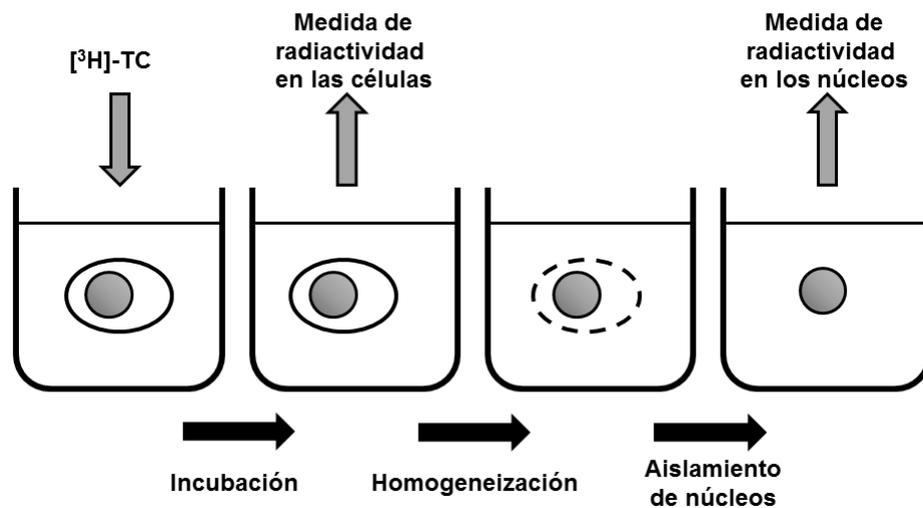
1. Captación de TC en función del tiempo de incubación. Para ello se incubaron los hepatocitos en presencia de una concentración 10  $\mu\text{M}$  de [ $^3\text{H}$ ]-TC, durante 10, 20, 30 o 60 min, transcurridos los cuales las células se procesaron para aislar los núcleos.
2. Captación de TC en función de su concentración en el medio. Para ello se incubaron los hepatocitos durante 20 min en presencia de concentraciones de 10, 50, 100 o 200  $\mu\text{M}$  de [ $^3\text{H}$ ]-TC.

En todos los experimentos se determinó además la captación celular a 4°C y tiempo 0, para lo cual alícuotas de la suspensión inicial de hepatocitos se mantuvieron en todo momento sobre hielo e inmediatamente después de añadir el AB radiactivo se tomó una muestra para determinar la radiactividad total y el resto se centrifugó a 43 xg durante 2 min y 4°C, para determinar la radiactividad remanente en el sobrenadante.

Para aislar los núcleos de los hepatocitos tras el experimento de captación, se utilizó una variación del método de Roncero (Roncero et al., 1998). Tras dos lavados con PBS con calcio, los hepatocitos se resuspendían en medio hipotónico de hinchamiento, manteniéndolos durante una hora sobre hielo con agitación cada 15 min.

A continuación, se homogeneizaba esta suspensión dando 6 “golpes” en un homogeneizador mecánico poco ajustado, y otros 6 con uno ajustado hasta la ruptura total de las células.

Los núcleos se recuperaban centrifugando a 500 xg 4 min a 4°C. El precipitado se lavaba dos veces con PBS con calcio, se resuspendía en PBS y se contaban los núcleos aislados en el microscopio óptico en una cámara Neubauer, tiñéndolos previamente con azul de metileno. De la suspensión resultante, 200 µl se destinaban a la medida de ADN y el resto servía para el conteo de la radiactividad presente en los núcleos (Esquema 1).



**Esquema 1.** Procedimiento experimental seguido para la determinación de ácidos biliares en hepatocitos y en sus núcleos. Tras incubar los hepatocitos aislados con una solución 10, 50, 100 o 200 µM de  $[^3\text{H}]\text{-TC}$ , se tomaba una muestra de la suspensión para determinar el contenido intracelular del ácido biliar. A continuación se homogeneizaban las células y se procedía al aislamiento de los núcleos para determinar su contenido en ácidos biliares.

### 3.2.3.3. Captación de compuestos fluorescentes en hepatocitos en cultivo

Se realizaron experimentos en los que se incubaron los hepatocitos de rata en cultivo primario con los ABs fluorescentes FITC-GC o FITC-GUDC, o bien con la parte fluorescente de estas moléculas, el FITC, para posteriormente fijar las células y visualizar, mediante microscopía confocal, la presencia o no de fluorescencia en sus núcleos.

Se utilizaron placas Labtek de ocho pocillos, en las que se sembraban 100.000 hepatocitos/pocillo, en medio de anclaje. Los experimentos se iniciaron tras 90 min de incubación de los hepatocitos con medio de cultivo. Se aspiró entonces el medio de cada pocillo y se sustituyó por nuevo medio que contenía el compuesto fluorescente a estudiar, a una concentración 20 µM. Las placas se incubaron durante

30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavaron las células con PBS y se fijaron/permeabilizaron con paraformaldehído (PFA)/Triton X-100 (apartado 3.2.10.2.) en oscuridad. En algunas placas se llevó a cabo la inmunodetección del receptor nuclear de ABs FXR (apartado 3.2.10.2.). Finalmente se retiraron las paredes de las placas Labtek, se llevó a cabo el montaje con medio de montaje para fluorescencia, se colocaron cubre objetos y se sellaron con laca de uñas. Las placas se conservaron a 4°C, protegidas de la luz, hasta su observación en el microscopio confocal.

#### **3.2.3.4. Captación de cisplatino en hepatocitos en cultivo**

Los hepatocitos, aislados a partir de ratas Wistar, o TR-, se sembraron en placas de 6 cm de diámetro a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/placa. Tras 90 min de incubación en medio de anclaje, éste se sustituyó por medio de cultivo, 6 h después el medio de cultivo se cambió por medio fresco que contenía concentraciones crecientes de cisplatino (1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ ). Tras 3 h de incubación se retiró el medio de cultivo, se lavó la placa con PBS y se adicionaron en cada placa 3 ml de un medio de lisis que contenía Triton X-100. Transcurridos 30 min a 4°C, los hepatocitos lisados se recogieron mediante raspado.

Las muestras obtenidas se emplearon para determinar proteínas (apartado 3.2.11.5.), extraer ADN (siguiendo las instrucciones del proveedor del kit de extracción de ADN genómico de Qiagen) y medir el contenido en platino, tanto del lisado celular como del ADN extraído (apartado 3.2.11.6.).

### **3.2.4. EXPERIMENTOS EN NÚCLEOS AISLADOS DE HEPATOCITOS**

#### **3.2.4.1. Aislamiento de núcleos de hepatocitos de rata**

Se siguió el método de Kaufmann y Shaper (Kaufmann y Shaper, 1984). Para cada preparación de núcleos aislados se utilizaron los hígados de dos ratas. Se anestesió a los animales utilizando pentobarbital sódico (50 mg/kg p.c.). Una vez afeitada la zona a intervenir, se practicó una laparotomía ventral media. Se canuló la vena porta y se perfundió el hígado con solución salina heparinizada, a 37°C, hasta que quedó limpio de sangre. Posteriormente se procedió a su extracción, lavado y pesado. Siempre sobre hielo, se cortó el hígado en trozos pequeños y se homogeneizó en un homogeneizador mecánico, utilizando medio STM (con sacarosa, Trizma base y magnesio) y dando 6 golpes con el émbolo de teflón. Este homogenado se centrifugó a 818 xg, durante 15 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en STM y se homogeneizó 6 veces en un potter de vidrio manual y se volvió a centrifugar a 818 xg durante 15 min a 4°C.

El precipitado obtenido se resuspendió en medio DS, con mayor concentración de sacarosa, y se homogeneizó en dos potter de vidrio manuales más pequeños. Se realizó después un gradiente de sacarosa ultracentrifugando a 32.000 xg durante 60 min a 4°C. El precipitado obtenido, correspondiente a los núcleos, se volvió a resuspender en medio STM y se homogeneizó con una pipeta Pasteur para una nueva ultracentrifugación, a 32.000 xg durante 30 min a 4°C.

El precipitado final obtenido, correspondiente a los núcleos purificados, se resuspendió en medio STM y se procedió a su conteo en una cámara de Neubauer, tiñendo los núcleos con azul de metileno.

#### **3.2.4.2. Captación / eflujo de compuestos fluorescentes en núcleos aislados**

##### **Soluciones utilizadas**

- FITC, FITC-GC y FITC-GUDC, disueltos en DMSO.
- Dextranos marcados con FITC: FD-10S, FD-40S y FD-70S, en DMSO.
- Calceína, doxorubicina (Dox) y rodamina (Rho), en DMSO.
- Medio de carga ("loading medium"; LM) de pH 7,4 ó 9,5:

- ATP + sistema regenerante de ATP, en LM pH 9,5:
  - ATP 3 mM
  - Creatin fosfato 3 mM
  - Creatinfosfokinasa 0,1 mg/ml
- FACSFlow (fluido envolvente para el citómetro)

## **Procedimiento**

Se realizaron experimentos en los que las suspensiones de núcleos de hepatocitos previamente aislados, se incubaron con los ABs fluorescentes FITC-GC o FITC-GUDC, o con diferentes agentes fluorescentes (calceína, rodamina o doxorubicina). La carga nuclear de estos agentes se analizó por citometría de flujo (apartado 3.2.4.3.) y su localización en los núcleos se visualizó por microscopía confocal. En algunos casos se utilizó yoduro de propidio para teñir el ADN nuclear y el anticuerpo monoclonal Mab 414 para la inmunodetección del complejo de poro nuclear (apartado 3.2.10.2.).

Se llevaron a cabo cinco tipos de experimentos:

### **A. Experimentos de captación a tiempo final**

Las suspensiones de núcleos se incubaron a 37°C, durante 30 min en la oscuridad y con agitación, en medio STM que contenía el compuesto fluorescente a estudiar, a una concentración 20 µM. Se realizaron siempre blancos de captación, en los que los núcleos se incubaban en STM sin añadir ningún compuesto fluorescente.

El experimento se iniciaba añadiendo los núcleos sobre la solución del compuesto a estudiar (la suspensión resultante contenía  $25 \times 10^6$  núcleos/ml). Inmediatamente tras la adición de los núcleos (tiempo 30 seg) se tomaba una alícuota de la suspensión nuclear, se añadía sobre FACSFlow y se analizaba la fluorescencia de los núcleos en el citómetro de flujo (apartado 3.2.4.3.). Tras la incubación se tomaba otra alícuota para citometría de flujo y el resto de los núcleos se procesaban para su fijación y observación por microscopía confocal.

## **B. Experimentos de captación en función del tiempo**

Las suspensiones de núcleos se incubaron a 37°C, en la oscuridad y con agitación, en medio STM ( $25 \times 10^6$  núcleos/ml) que contenía el compuesto fluorescente a estudiar, a una concentración 20  $\mu$ M. Se tomaron alícuotas de la suspensión nuclear inmediatamente tras el inicio de experimento (tiempo 30 seg) y a los 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 y 30 min de incubación. Dichas alícuotas se añadían sobre FACSFlow y se analizaba la fluorescencia de los núcleos en el citómetro de flujo (apartado 3.2.4.3.).

## **C. Estudio del efecto del ATP sobre la carga nuclear de compuestos fluorescentes**

Las suspensiones de núcleos se incubaron a 37°C, durante 5 min en la oscuridad y con agitación, en un medio que contenía el compuesto fluorescente a estudiar, a una concentración 20  $\mu$ M (para el FITC y los ABs fluorescentes) o 5  $\mu$ g/ml, para el resto de los fluorocromos. El medio de incubación utilizado variaba según el tipo de experimento:

- Sin ATP: medio LM pH 7,4.
- ATP: medio LM pH 9,5 con ATP + sistema regenerante de ATP.

El experimento se iniciaba añadiendo los núcleos sobre la solución del compuesto a estudiar (la suspensión resultante contenía  $25 \times 10^6$  núcleos/ml). Inmediatamente tras la adición de los núcleos (tiempo 30 seg) y a los 5 min de incubación se tomaba una alícuota de la suspensión nuclear, se añadía sobre FACSFlow y se analizaba la fluorescencia de los núcleos en el citómetro de flujo (apartado 3.2.4.3.).

## **D. Estudio de la dependencia del volumen nuclear sobre la carga de agentes fluorescentes**

Para estudiar el efecto del tamaño nuclear, éste fue modificado incubando núcleos aislados en un tampón que contenía concentraciones crecientes de sacarosa (0-250 mM). Por otro lado, núcleos aislados fueron incubados durante 30 min a 37°C en un tampón que contenía sacarosa 250 mM y 10  $\mu$ M de FITC, FD-4S o FITC-GC.

Las modificaciones en volúmen y carga fueron determinadas mediante citometría de flujo (apartado 3.2.4.3.).

### **E. Estudio del eflujo de compuestos fluorescentes en núcleos precargados**

Los núcleos aislados fueron preincubados con 20  $\mu\text{M}$  de FITC-GUDC durante 30 min a 37°C antes de ser diluidos en 100 volúmenes de medio sin agente fluorescente. Se analizó la fluorescencia retenida en las muestras de estos núcleos a diferentes tiempos de eflujo (10 seg, 2, 5, 10, 20 y 30 min).

También se estudió el efecto que la presencia de ATP tenía sobre estos procesos de eflujo nuclear. Para ello los núcleos precargados fueron diluidos en medios que contenían o no ATP + un sistema regenerante del mismo.

#### **3.2.4.3. Análisis de fluorescencia en núcleos por citometría de flujo**

Este método permite la realización de varias medidas simultáneas en células, orgánulos celulares u otras partículas que viajan inmersas en un fluido. Estas partículas son alineadas frente a una fuente de luz láser, gracias a la presión ejercida por otro fluido denominado envolvente, de manera que se consigue su paso individual y constante frente a la luz. De este modo es posible recoger la información correspondiente a dos tipos de parámetros, los que reflejan la dispersión de la luz cuando incide sobre una partícula y los relacionados con la emisión de la luz por fluorocromos presentes en dicha partícula, cuando ésta es excitada por el láser.

La luz que incide sobre la partícula en suspensión es dispersada en todas las direcciones y la intensidad luminosa a distintos ángulos constituye un índice relativo de ciertos parámetros relacionados con dicha partícula:

- La cantidad de luz dispersada en un ángulo inferior a 10° es recogida por un detector situado frente a la fuente luminosa, constituyendo uno de los parámetros analizados, el FSC (“forward light scatter”). La magnitud de este parámetro depende del índice de refracción de la partícula y es directamente proporcional al tamaño de la misma.
- La luz dispersada lateralmente y recogida en ángulo cercano a 90° constituye otro de los parámetros analizados, el SSC (“side light scatter”). En este caso, la dispersión de la luz depende de múltiples factores como la rugosidad de la membrana o la densidad y complejidad interna de la partícula (Muirhead et al., 1985).

La citometría de flujo permite también detectar la presencia de fluorocromos, ya formen parte de las partículas que se están analizando (fluorescencia natural o autofluorescencia), o bien se hallen unidos a las partículas artificialmente. También permite analizar la captación o el eflujo de los fluorocromos cuando las partículas han sido previamente incubadas con ellos, como en el caso de los experimentos realizados con núcleos de hepatocitos en este trabajo de Tesis Doctoral.

En este trabajo hemos utilizado la técnica de citometría de flujo para cuantificar la captación y el eflujo de los análogos fluorescentes de ABs (FITC-GC y FITC-GUDC) y de otros compuestos fluorescentes en núcleos aislados de hepatocitos de rata. Para la detección del FITC (y de los derivados fluorescentes de ABs) se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm (láser azul) y se registró la fluorescencia en el canal FL1 del citómetro (530 nm; paso de banda 30 nm). Para el resto de fluorocromos se utilizó el canal adecuado en cada caso.

En todos los análisis se recogieron datos correspondientes a 5.000 eventos (núcleos) como mínimo y se registró la fluorescencia media ( $\pm$  desviación estandar - SD-) de la población nuclear.

### **3.2.5. EXPERIMENTOS EN LÍNEAS CELULARES**

El medio de cultivo estéril para las líneas celulares Alexander y HepG2, fue MEM suplementado con L-glutamina, bicarbonato sódico y piruvato sódico.

A ambas líneas se les añadió suero bovino fetal inactivado al 10% (v/v). La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 min. También se añadió una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1% que contenía: penicilina (20 U/ml), estreptomicina (0,02 mg/ml) y anfotericina B (0,05 µg/ml).

Tanto al recibir las células del proveedor como al recuperarlas del N<sub>2</sub> líquido en el que se almacenaban, la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 250 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo adecuado y se pasó a frascos Roux que se introdujeron en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Una vez confluyente el cultivo se realizó una tripsinización (siguiendo las instrucciones del proveedor) para desprender las células de la placa de cultivo, y así, poder realizar los pases, sembrar las placas para los distintos tipos de experimentos o bien congelar alícuotas para su almacenamiento.

#### **3.2.5.1. Estudio del efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de genes de interés**

En estos estudios se emplearon células HepG2, que se sembraron a 700.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos, y células Alexander transfectadas con la construcción FXR $\alpha$ -RXR (apartado 3.2.8.5). 24 h después de la siembra (células HepG2) o de la transfección (células Alexander), el medio de cultivo se sustituyó por otro que contenía 20 µM de dexametasona o prednisolona. Transcurridas otras 24 h, las placas se lavaron con PBS estéril y se aisló el ARN utilizando el kit comercial “Illustra RNAspin Mini Isolation” (apartado 3.2.7.1.).

Se realizaron además otros experimentos en los que, tras 24 h de exposición a dexametasona o prednisolona (20 µM), se añadió o no un ligando del receptor FXR, el GW4064, a una concentración 1 µM, y se incubaron las placas durante otras 24 h antes de extraer el ARN (apartado 3.2.7.1.).

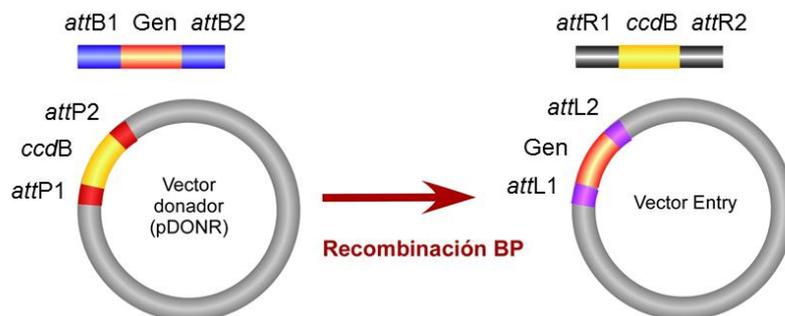
Para determinar la posible toxicidad de los glucocorticoides dexametasona y prednisolona sobre las líneas celulares a estudiar, se realizó un ensayo de viabilidad celular en presencia de dosis crecientes de cada compuesto (de 0 a 100  $\mu$ M). Para ello, las células Alexander y HepG2 se sembraron a una densidad de 15.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (100 $\mu$ l/pocillo). A las 24 h se sustituyó el medio de cultivo por medio que contenía el glucocorticoide a la concentración deseada. La viabilidad celular se determinó mediante test de formazán (apartado 3.2.11.4.) después de 48 h de incubación en presencia de los glucocorticoides.

### 3.2.6. CLONACIÓN DE MRP2 CON ETIQUETA V5

#### 3.2.6.1. Clonación por recombinación “Gateway”: fundamento

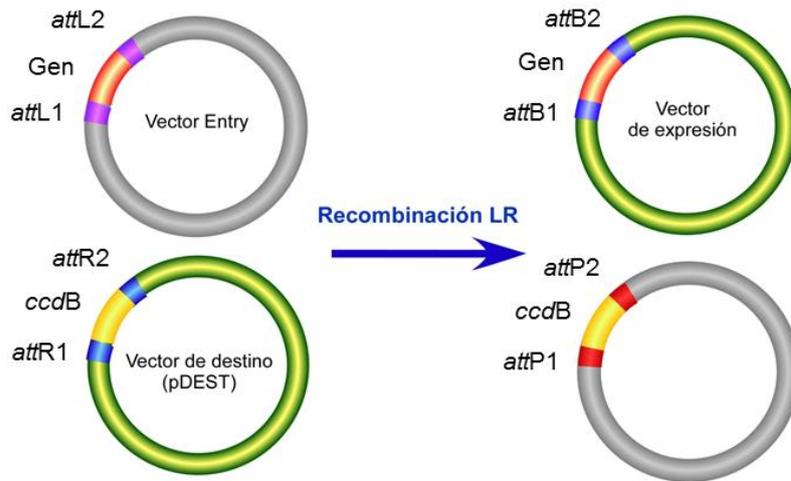
Es una tecnología de clonación altamente eficaz para clonar de manera direccional fragmentos de ADN (Hartley et al., 2000). Está basada en el sistema de recombinación del fago lambda y permite la transferencia de fragmentos de ADN entre diferentes vectores manteniendo la orientación y la secuencia de lectura con respecto a los tripletes. Las reacciones de recombinación Gateway son versiones *in vitro* de las reacciones de integración y escisión del fago lambda. Es un método de clonación más rápido y eficaz que los procedimientos tradicionales que requieren reacciones de ligación o tratamiento con enzimas de restricción.

La reacción BP (Esquema 2) es aquella en la que un vector donador (pDONR), con sitios *attP*, reacciona con un fragmento de ADN flanqueado por sitios *attB*, para dar lugar a un vector denominado “Entry”, con sitios *attL*, y un producto secundario con sitios *attR*. Los sitios *att* confieren direccionalidad y especificidad a la reacción (Hartley et al., 2000).



**Esquema 2.** Esquema de la reacción de recombinación BP.

La reacción LR (Esquema 3) es aquella en la que un vector “Entry”, con el ADN de interés flanqueado por sitios *attL*, reacciona con un vector de destino para dar lugar a un vector útil para ser empleado en el sistema de expresión correspondiente (Hartley et al., 2000).



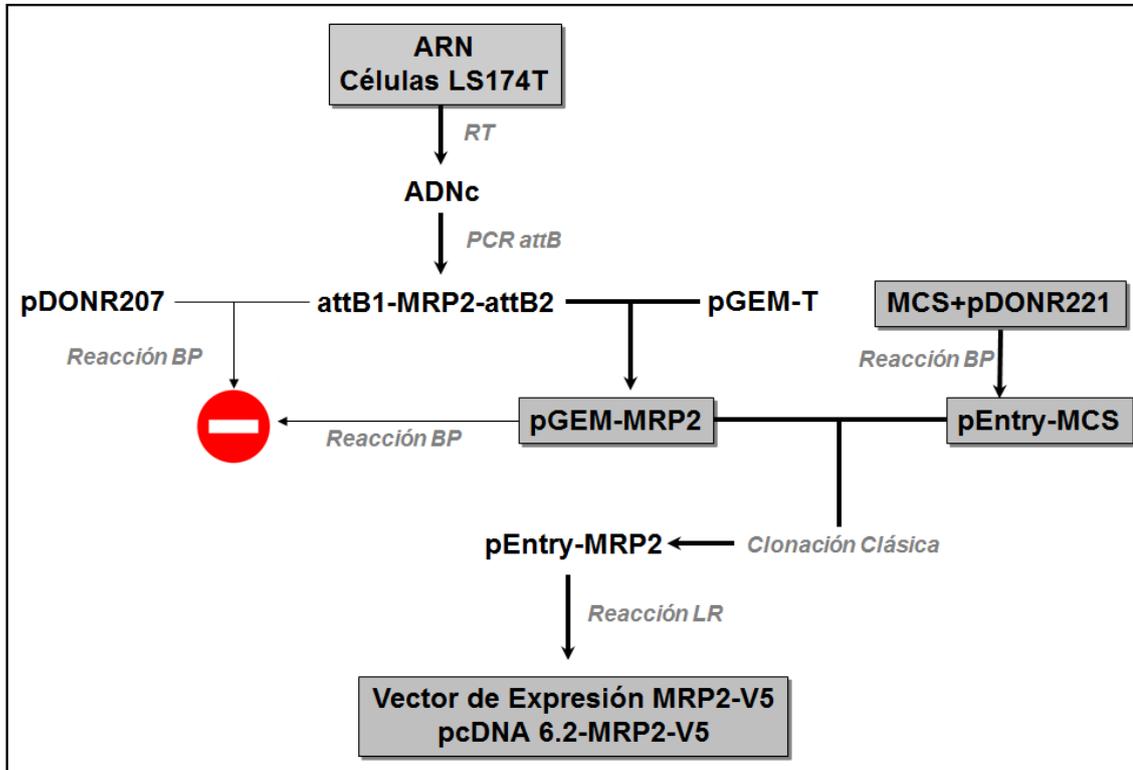
**Esquema 3.** Esquema de la reacción LR.

El gen *ccdB* que contienen algunos vectores intermedios impide el crecimiento de las bacterias que posean un vector donador o de destino no recombinado, o un producto secundario. El producto del gen *ccdB* interfiere con la girasa bacteriana, impidiendo la proliferación de las colonias que contienen dichos vectores, que se desean eliminar del proceso de selección. La propagación y amplificación de los vectores que contienen el gen *ccdB* puede llevarse a cabo en la cepa de bacterias One Shot *ccdB* Survival T1, resistente a la acción tóxica del producto de este gen.

La clonación Gateway permite incluso la transferencia de varios fragmentos de ADN entre diferentes vectores en un único ensayo (Magnani et al., 2006).

### 3.2.6.2. Clonación de MRP2 con etiqueta V5: procedimiento

La clonación de MRP2 con etiqueta V5 se llevó a cabo según los pasos mostrados en el esquema 4. Cada uno de los pasos se detalla en los siguientes apartados.



**Esquema 4.** Representación esquemática de la estrategia diseñada para la clonación del transportador MRP2 marcado con la etiqueta V5.

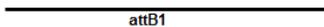
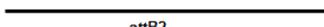
#### Obtención del ADNc del gen *ABCC2*

La secuencia codificante del gen *ABCC2* se amplificó por RT-PCR de alta fidelidad. Se utilizó como molde para la RT, ARN total extraído de células LS174T (apartado 3.2.7.1.) que se retro-transcribió empleando la enzima “Cloned AMV RT” y hexámeros “random” como cebador (apartado 3.2.7.2).

A continuación se amplificó la secuencia codificante de MRP2 por PCR de alta fidelidad, para ello se diseñaron cebadores. En el extremo 5' de cada uno de ellos se añadió un adaptador que contenía la secuencia *attB* para poder clonar el gen en un vector Gateway. En este caso se añadió en los extremos de los oligonucleótidos la secuencia *attB1* para el cebador “forward” o directo y *attB2* para el cebador “reverse”

o inverso. En la tabla 1 se recogen las secuencias de los cebadores (con las secuencias attB señaladas en azul). En rojo aparecen los nucleótidos adicionales que se añadieron para que la ORF de V5 y MRP2 estuviesen en fase de lectura.

En la reacción de PCR se usó la enzima de alta fidelidad “Accuprime Pfx ADN polimerasa” (Invitrogen) con las condiciones de tiempo y temperatura especificadas en la tabla 1.

Tabla 1: Cebadores y condiciones de PCR para amplificar el ORF de ABCC2 con adaptadores attB.	
Oligonucleótidos	Condiciones para la PCR
Cebador Fwd FA1 (5α→3α): GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGCTGGAGAAGTTCTGCAAC <div style="text-align: center;">  </div>	5 min. 95°C  15 seg. 95°C 30 seg. 60-65°C 5 min. 68°C   x40  10 min. 68°C
Cebador Rev RA2 (5α→3α): GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGAATTTTGTGCTGTTACATTCTC <div style="text-align: center;">  </div>	

### Clonación en el vector pGEM-T

El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T-Easy, que contiene una desoxitimidina en los extremos 5' de las cadenas de ADN. Debido a que la PCR se realizó con una ADN polimerasa que posee actividad 3'-5' endonucleasa que genera cadenas de ADN de extremos romos, antes de clonar el producto de PCR en el vector pGEM-T se añadió una desoxiadenosina en los extremos 3' de las cadenas de ADN del inserto utilizando la enzima “Platinum Taq ADN polimerasa” (Invitrogen), que carece de actividad endonucleasa y genera cadenas con extremos 3' extendidos. De este modo se obtuvieron los extremos 3' extendidos complementarios a los del vector pGEM-T-Easy.

A continuación, se llevó a cabo la reacción de ligación entre el producto de la PCR y el vector pGEM-T-Easy, catalizada por la enzima T4 DNA ligasa.

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar mediante choque térmico bacterias *E. coli* DH5α competentes. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina, utilizada como antibiótico de selección y por α-complementación mediante el test blanco/azul (apartado 3.2.8.1.).

Tras aislar y purificar el plásmido recombinante pGEM-MRP2 de las colonias de bacterias transformadas (apartado 3.2.8.2.), se llevó a cabo un estudio de restricción con las enzimas *Pst* I y *Xho* I para comprobar la identidad del plásmido. Los productos de la reacción se visualizaron en un gel de agarosa no desnaturizante al 1% teñido con SYBR Green I (SYBR Safe, Invitrogen) tras la electroforesis (apartado 3.2.8.3.).

Finalmente se secuenció el plásmido recombinante pGEM-MRP2 (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca) hallándose una mutación que se procedió a corregir.

### **Mutagénesis dirigida**

La mutación detectada en la secuencia codificante de MRP2 (c.1811 T>A; p.Leu604Hys) fue corregida mediante mutagénesis dirigida según un método puesto a punto en nuestro laboratorio. Para ello se amplificaron dos regiones del plásmido, que denominamos AMP1 y AMP2 (Fig. 1C), para lo que se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos, que no se solapaban en ninguna parte de su secuencia. Los dos primeros oligonucleótidos se diseñaron de manera que reconocieran una secuencia común para este tipo de vectores, la ORF del gen de resistencia a ampicilina. Presentaban, como parte de su secuencia, un sitio de corte de la enzima *Cla* I (Fig. 1B, en verde), para generar extremos extendidos cohesivos que darían direccionalidad a la ligación posterior de AMP1 y AMP2. Esta secuencia de corte de la enzima *Cla* I se generó previa introducción de una mutación silenciosa en la secuencia del gen de resistencia a ampicilina.

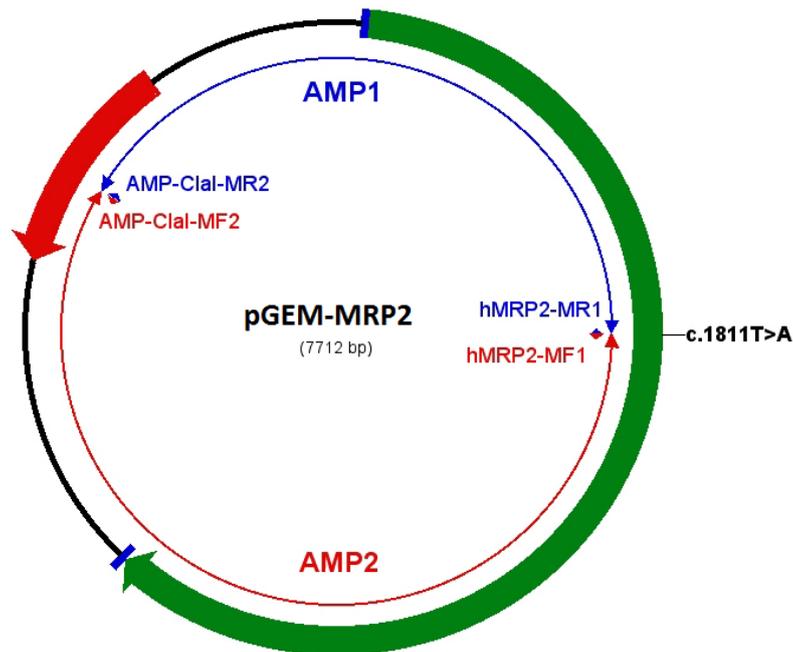
Por su parte, otros oligonucleótidos reconocían parte de la ORF de MRP2 donde se encontraba la mutación (Fig. 1A). A diferencia de los anteriores se disponían seguidamente (aunque en sentido contrario) y uno de ellos corregía la mutación.

**A**

1988 CTG AGC ATG CTT CCC ATG ATG ATC TCC TCC ATG cTc CAG GCC AGT GTT TCC ACA GAG CGG CTA GAG AAG TAC TTG

**B**

Oligonucleótidos	Código	Secuencia (5α→3α)
Cebador hMRP2-MF1		CTC CAG GCC AGT GTT TCC ACA
Cebador hMRP2-MR1		CAT GGA GGA GAT CAT CAT GGG AAG C
Cebador AMP-CIaI-MF2		ATATGCATGCATCGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
Cebador AMP-CIaI-MR2		ATATGCATGCATCGATGGGAACCGGAGCTGAATGAAG

**C**

**Fig. 1.** (A) Representación de la secuencia de MRP2 con la posición y dirección de los oligonucleótidos usados para corregir la mutación c.1811T>A. En rojo se marca el nucleótido corregido. (B) Oligonucleótidos usados como cebadores en la PCR. En la tabla aparece el nombre de los oligonucleótidos, con el código de colores utilizado y su secuencia, con los adaptadores que contenían la secuencia de corte de la enzima de restricción *Cla* I (en verde). (C) Esquema del vector pGEM-MRP2 que se utilizó para amplificar dos regiones (AMP1, en azul, y AMP2, en rojo) para corregir la mutación c.1811 T>A.

Los fragmentos del vector recombinante, AMP1 y AMP2, se obtuvieron por separado mediante PCR de alta fidelidad con la enzima “Accuprime Pfx DNA polimerasa”. Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa y la banda del tamaño adecuado fue purificada (apartado 3.2.8.4.). Los fragmentos AMP1 y AMP2 purificados se incubaron con la enzima *Cla* I, generándose extremos cohesivos que darían direccionalidad a la ligación posterior. Tras inactivar la enzima y purificar AMP1 y AMP2 por columna (apartado 3.2.8.2.), se llevó a cabo la reacción de fosforilación de los extremos 5’ catalizada por la enzima “T4 polinucleótido kinasa” (Fermentas) siguiendo las indicaciones del proveedor. Los productos nuevamente purificados fueron sometidos a la reacción de ligación. Cantidades equimolares de AMP1 y AMP2 reaccionaron en presencia de la enzima “T4 DNA ligasa” (Promega).

El vector denominado pGEM-MRP2 (Fig. 1C) se purificó y se empleó en la transformación de bacterias *dH5 $\alpha$*  (ver apartado 3.2.8.1.) de las que se extrajo el ADN plasmídico. Se realizó un estudio de restricción del plásmido empleando las enzimas *Pvu* II y *Acc65* I y la secuencia se confirmó por secuenciación (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca).

### **Clonación de pEntry-MCS**

Debido a que las reacciones de recombinación Gateway entre el plásmido pGEM-MRP2 que contenía MRP2 flanqueado por los *attB* y el vector donador pDONR207 no funcionaron, se llevó a cabo otra estrategia, que consistía en insertar en un plásmido Entry la secuencia codificante de MRP2 por clonación clásica.

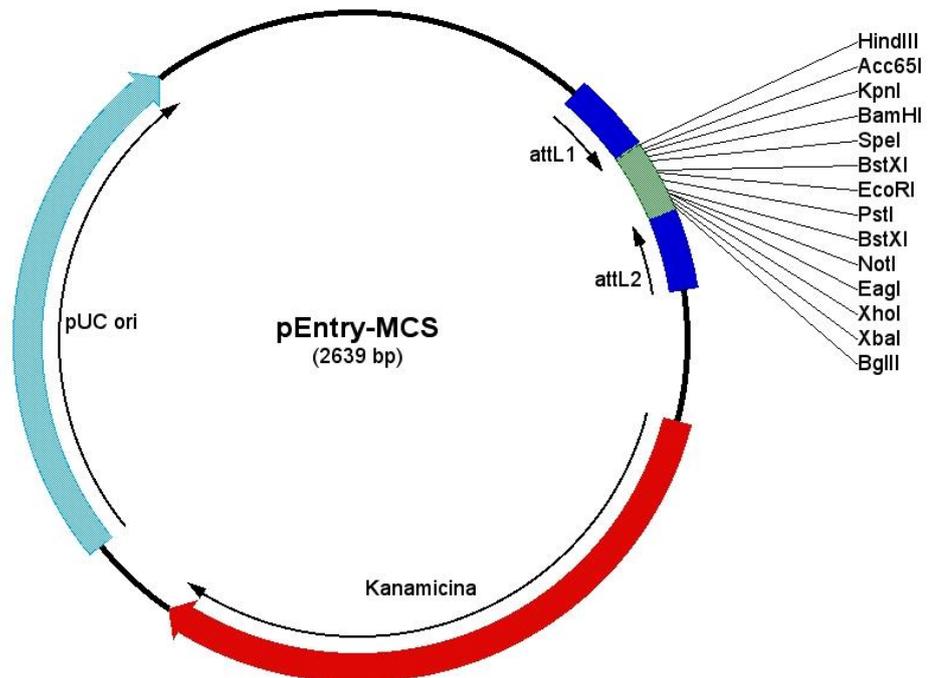
En primer lugar se diseñó una pareja de cebadores (Fig. 2A) para clonar una secuencia MCS (del inglés “Multiple Clonning Site”), que contiene numerosos sitios de corte para enzimas de restricción, procedente del plásmido pcDNA3.1-Hygro(+).

Empleando estos oligonucleótidos y mediante PCR de alta fidelidad se amplificó la región MCS, de 153pb, flanqueada por las secuencias *attB*1 y *attB*2. El producto de la PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y la banda de tamaño adecuado fue purificada por extracción del ADN del gel de agarosa (ver apartado 3.2.8.4.).

**A**

Cebadores y condiciones de PCR para amplificar el MCS de pcDNA3.1-Hygro con adaptadores attB.	
Oligonucleótidos	Condiciones para la PCR
Cebador Fwd MCSF1 (5α→3α): GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAAAGCTTGGTACCGAGCTC <div style="text-align: center;"> <p>attB1</p> </div>	5 min. 95°C 15 seg. 95°C 30 seg. 56-60°C 5 min. 68°C   x40 10 min. 68°C
Cebador Rev MCSR1 (5α→3α): GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGATCTTCTAGACTCGAGCGGC <div style="text-align: center;"> <p>attB2</p> </div>	

**B**



**Fig. 2.** (A) Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar el MCS del plásmido pcDNA3.1-Hygro(+). En azul están marcados los adaptadores *attB*. Aparecen en rojo los nucleótidos adicionales añadidos. (B) Representación del plásmido pEntry-MCS obtenido tras la reacción BP del pDONR 221 y el MCS flanqueado por secuencias *attB*. En verde se representa la secuencia del MCS.

Mediante la reacción BP, descrita anteriormente, se insertó la secuencia MCS flanqueada por *attB*1 y 2 en el vector pDONR 221 y se obtuvo el pEntry-MCS (Fig. 2B). Con esta construcción se transformaron bacterias de alta eficacia de transformación One Shot Match (apartado 3.2.8.1.) que fueron sembradas en medio LB con agar suplementado con el antibiótico kanamicina. Algunas de las bacterias que

crecieron fueron sembradas en medio líquido y se extrajo el ADN plasmídico (apartado 3.2.8.2.). La identidad de los clones seleccionados fue confirmada mediante estudio de restricción.

### **Obtención de pEntry-MRP2 por clonación clásica**

Para la inserción de MRP2 en el vector pEntry-MCS en primer lugar se diseñó una pareja de oligonucleótidos que poseían las secuencias reconocidas por las enzimas *Hind* III y *Bgl* II (Fig. 3A). Mediante estos cebadores y PCR de alta fidelidad se amplificó una construcción de MRP2 flanqueada por las secuencias de las enzimas de restricción mencionadas. El producto obtenido se separó por electroforesis en gel de agarosa y la banda de tamaño adecuado fue purificada por extracción del ADN del gel (ver apartado 3.2.8.4.).

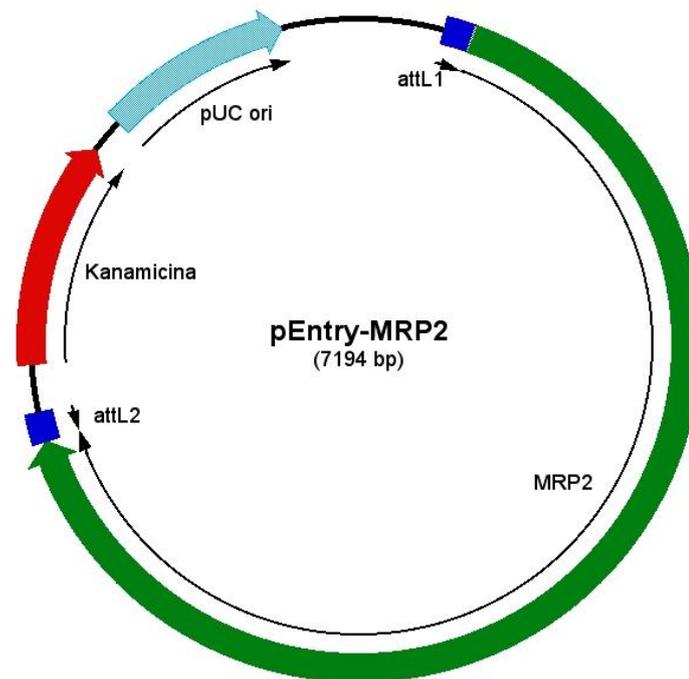
Tanto el producto de la PCR purificado como el plásmido pEntry-MCS fueron digeridos en primer lugar con la enzima *Hind* III, y tras su inactivación, se llevó a cabo otra digestión con la enzima *Bgl* II. Los productos de las digestiones fueron purificados por columna.

Los productos de las digestiones, MRP2 y pEntry-MCS, que ahora contaban con extremos cohesivos, fueron sometidos a la reacción de ligación catalizada por la enzima "T4 DNA ligasa" (Promega).

El producto de la reacción de ligación (pEntry-MRP2, fig. 3B) se purificó y se empleó en la transformación de bacterias *dH5 $\alpha$*  (apartado 3.2.8.1.) de las que se extrajo el ADN plasmídico. Se realizó un estudio de restricción del plásmido empleando las enzimas *EcoR* V y *Acc65* I y se secuenció para confirmar su secuencia (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca).

**A**

Cebadores y condiciones de PCR para amplificar MRP2 flanqueada por sitios de corte para <i>Hind</i> III y <i>Bgl</i> II		
Oligonucleótidos		Condiciones para la PCR
Cebador C.ShMRP2-F1 (5α→3α):	ATATGCATGCAGCTTATGCTGGAGAAGTTCTGCAAC Hind III	5 min. 95°C 15 seg. 95°C 30 seg. 56-61°C 5 min. 68°C   x40 10 min. 68°C
Cebador C.ShMRP2-R1 (5α→3α):	ATATGCATGCAGATCTGAATTTTGTGCTGTTACATTCTC Bgl II	

**B**

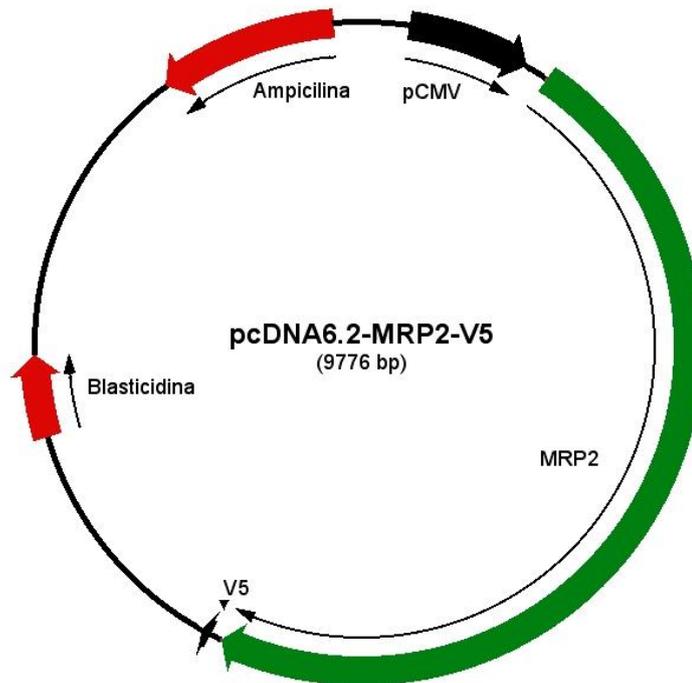
**Fig. 3.** (A) Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar MRP2 flanqueada por sitios de corte para *Hind* III y *Bgl* II (en rojo). (B) Representación del plásmido pEntry-MRP2 obtenido tras la reacción de ligación del pEntry-MCS y MRP2 flanqueado por las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Hind* III y *Bgl* II.

### Reacción de recombinación LR

Consistió en la recombinación del vector pEntry-MRP2 con un vector de destino (pcDNA6.2/V5-DEST) para obtener un vector de expresión.

La reacción se llevó a cabo empleando la mezcla enzimática “Gateway LR Clonase II” (Invitrogen) y se detuvo por tratamiento con proteinasa K.

Se transformaron bacterias dH5 $\alpha$  con el producto de reacción por choque térmico (apartado 3.2.8.1.). Se sembraron en placas de medio LB con agar y se realizó un estudio de restricción del plásmido empleando las enzimas *EcoRV* y *Acc65 I/Pvu I* y la secuencia del vector de expresión generado pcDNA6.2-MRP2-V5 (MRP2-V5, fig. 4) se confirmó por secuenciación (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca).



**Fig. 4.** Representación del vector de expresión pcDNA6.2-MRP2-V5 (MRP2-V5) obtenido tras la reacción de recombinación LR del pEntry-MRP2 y el vector de destino pcDNA6.2-V5.

### **3.2.7. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL**

Para determinar los niveles de expresión de genes de interés se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986), la PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica además de amplificar una secuencia específica de ADN, permite cuantificar de forma absoluta o relativa el producto acumulado en la reacción durante la fase exponencial del proceso, cuando todos los componentes de la reacción están en exceso y no son limitantes.

La PCR cuantitativa se realizó en el termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystem) que detecta la fluorescencia emitida por un fluorocromo excitado a una determinada longitud de onda. En la mayoría de los casos se utilizó SYBR Green I (componente de la mezcla de reacción "SYBR Green PCR Master Mix"). Este compuesto se une al surco menor de cualquier doble hélice de ADN generada aumentando enormemente sus propiedades fluorescentes. El incremento de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto sintetizado. Además, nos permite confirmar la especificidad de los productos amplificados, a través de un ciclo de desnaturalización que se programa al terminar la PCR. La curva de disociación que se obtiene al representar la primera derivada de la absorbancia frente a la temperatura de desnaturalización o "melting temperature" ( $T_m$ ), sólo tendrá un pico cuando un único fragmento de ADN haya sido amplificado.

#### **3.2.7.1. Extracción de ARN total**

Para extraer el ARN total a partir de homogenados de tejido o de extractos celulares, se utilizó el kit comercial "Illustra RNAspin Mini Isolation" (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido ó  $1 \times 10^6$  células, según el caso.

Las muestras se conservaron inmediatamente a  $-80^\circ\text{C}$  en el agente de estabilización "RNAlater" (Qiagen) hasta el momento de la extracción del ARN total. Para comenzar, las muestras se lisaron y homogeneizaron en un tampón desnaturalizante que contenía tiocianato de guanidina, que inactiva las ARNasas y asegura la integridad del ARN durante la extracción. A continuación se añadió etanol, para proporcionar las condiciones adecuadas de retención, y las muestras se aplicaron a las columnas, donde el ARN se une a las membranas y los contaminantes

se eliminan por lavados y centrifugaciones sucesivas. El ARN adsorbido en la membrana se trató con ADNasa I (GE Healthcare). Finalmente, el ARN total se eluyó de las columnas con agua bidestilada libre de ARNasas y se cuantificó fluorimétricamente utilizando el método de RiboGreen (apartado 3.2.11.1).

La integridad del ARN extraído se comprobó mediante la visualización de las bandas del ARNr 18S y 28S tras ser sometido a electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% (apartado 3.2.8.3). Al finalizar, los geles se fotografiaron en un transiluminador. Se consideró que el ARN extraído no se había degradado si eran visibles, de forma nítida y localizada, las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S.

### **3.2.7.2. Transcripción reversa (RT)**

Para sintetizar el ADN complementario (ADNc), que se usaría como molde en la PCR, se realizó una RT del ARN total extraído utilizando el método comercial “Enhanced Avian RT-PCR Kit” que contiene la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de las aves (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, AMV-RT (Invitrogen)).

### **3.2.7.3. Diseño de cebadores**

Los cebadores o “primers” específicos para el ADN codificante de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa “Primer Express” y su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Ambos cebadores se diseñaron, siempre que era posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como secuencia de referencia la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

Una vez diseñados, los cebadores fueron suministrados liofilizados por la casa comercial Biomers.net. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua bidestilada y se valoraron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

Proteína/Gen	Cebador Forward (5' → 3')	Cebador Reverse (5' → 3')	Amplificación (Pb)	Nº de Acceso
BAAT (BAA7)	GGGCAGGTTCTTGCTAGGTTTT	CTGGCTCATCAACAAGTGCACCTCA	128	NM 001701
BCRP (ABCG2)	TTAAAGTGGAAACTGCTGCTTTAGAGT	TCGGTCTTAAACCAAGGCTCA	134	BC021281
BSEP (ABCB11)	ACATGCTTGCAGGACCTTTA	GGAGGTCGTGCACCAGGTA	106	NM 003742
CYP27A1 (CYP27A1)	ACTGCAACAGTTACAGGTGCTTTACA	CCATGTGCTTCCGTAAGGGTACT	152	NM 000784
CYP7A1 (CYP7A1)	CCATAAGGTGTTGTGCCACGGAAA	GCCCCAAATGCCTTCGCAGAAG	72	NM 000780
FXR (NR1H4)	TCTCCTGGGTGCGCCTGACT	ACTGCACGTCCCAGATTTTCCAC	122	NM 005123
GR $\alpha$ (NR3C1)	CTCCTGGATTCTATGCATGAAGTGGTTGAAAA	TGATTTCAGCTAACATCTCGGGGAATTC AAT	109	NM 000176
GR $\alpha$ / $\beta$ (NR3C1)	CTAATGGCTATTCAAGCCCCAGCAT	GTGCTGTCCTTCCACTGCTCT	191	NM 000176/NM 001020825
MRP2 (ABCC2)	GGCAGTGAAGAAGAAGACGATGA	ATTGGACCTAGAACTGCGGCT	132	NM 000392
MRP4 (ABCC4)	TGCAAGGTTCTGGGATAAAGA	CTTTGGCACTTTCCTCAATTAACG	140	NM 005845
OST $\alpha$ (OST1pha)	TTCCAGGTTCTCCTCCTCCTGAC	AATTCATCACTTGAACCTGGTTTT	120	NM 152672
OST $\beta$ (OST1beta)	TGGCAGCTGTGTGTGTCATT	TGTGTGCTGCATCGTTTCTT	90	NM 178859
SHP (NR0B2)	GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT	CCCTTTCAGGCAGGCATATT	71	NM 021969

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de rata por RT-PCR cuantitativa.

Proteína/Gen	Cebador Forward (5'→3')	Cebador Reverse (5'→3')	Amplificación (Pb)	Nº de Acceso
Baat ( <i>Baat</i> )	CTGTGGAACACGGTTTTGGCGAA	TCAGGCCTGTGACCCGGATA	136	NM 017300
Bcrp ( <i>Abcg2</i> )	ATGATGCTCTTTCTGGCCTCT	AAGCCATATCGAGGAATGCTAAA	92	NM 181381
Bsep ( <i>Abcb11</i> )	GCCATTGTGCGAGATCCTAAA	TGCAGGTCCGACCCTCTCT	118	NM 031760
Cyp27A1 ( <i>Cyp27a1</i> )	CCTTTGGGACTCGCACCA	GCCCTCCTGTCTCATCACTTG	70	M 73231
Cyp7A1 ( <i>Cyp7a1</i> )	GCTTTACAGAGTGCTGGCCAA	CTGTCTAGTACCGGCAGGTCATT	92	NM 012942
Fxr ( <i>Nr1h4</i> )	GAAAAGCGGCATCTCCGA	TGCTGTGAGCAGAGCGTACTCTT	104	NM 021745
GR ( <i>Nr3c1</i> )	GGGTACTCAAGCCCTGGAATGAGA	AGCACCCCGTAATGACATCCTGAA	131	NM 012576
Mrp2 ( <i>Abcc2</i> )	TGATCGGTTTGCTGAAAGGCT	ACGCACATTCCTCAACACAAA	139	NM 012833
Mrp4 ( <i>Abcc4</i> )	TGTCAATCATACCTCAGGAACCTGT	TGTACCTCCTCTAGGGCTTTCCA	112	NM 133411
Ntcp ( <i>Slc10a1</i> )	CGTTGCCGGAATGTTGTCT	TGCCCTTCTGTCTCAGTTCATG	75	NM 017047
Shp ( <i>Nr0b2</i> )	TCTTCAACCCAGATGTGCCAG	GAAGCCATGAGGAGGATTCG	145	NM 057133

En las tablas 2 y 3 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la cuantificación de la abundancia de ARNm de las diferentes proteínas estudiadas en este trabajo. Se detallan también el tamaño de los amplicones esperados, y los números de acceso de las secuencias de cada gen publicadas en la base de datos GenBank.

#### **3.2.7.4. Realización de la PCR cuantitativa**

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron, en todos los casos, las mismas. Las muestras se incubaron primero 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, y por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 seg a 95°C y de 1 min a 60°C. Tras finalizar la reacción de PCR, las muestras se calentaron en el termociclador desde 60 a 95°C, mientras que se monitorizó la fluorescencia, para obtener las curvas de desnaturalización del ADN amplificado.

Durante la puesta a punto de los métodos para amplificar el ADNc de cada proteína, se comprobó la especificidad de la reacción de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante al 2,5% (apartado 3.2.8.3.) de los productos amplificados y de los blancos de reacción.

Las determinaciones se realizaron siempre por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua bidestilada. Para corregir las pequeñas variaciones que pueden producirse en la obtención del ARN total y en la RT, se determinaron paralelamente en cada muestra los niveles de expresión de un gen normalizador. Se utilizó, según el caso,  $\beta$ actina, GAPDH, o el ARN ribosómico (ARNr) 18S. Este último se determinó utilizando los reactivos “Taqman Ribosomal RNA Control Reagents Kit” y la mezcla de reacción “Taqman Universal PCR Master Mix”.

#### **3.2.7.5. Cuantificación de los resultados**

La cuantificación en la PCR a tiempo real se basa en el ciclo en el que se detecta la amplificación de un determinado producto, y no en la cantidad del producto acumulado después de un determinado número de ciclos. Cuantas más copias del gen de interés hubiera inicialmente, antes se detectará un incremento de la fluorescencia. El parámetro Ct (ciclo umbral o “threshold cycle”) se define como el

ciclo en el que la fluorescencia supera un umbral fijado arbitrariamente y éste será el parámetro que nos permita realizar la cuantificación. Cuanto menor sea el Ct de una muestra, mayor será la cantidad de producto inicial de la misma, ya que habrá alcanzado el umbral de fluorescencia en un menor número de ciclos.

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación de Cts. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno nos dará un valor de Ct normalizado del gen diana. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ADNc añadido a la reacción y corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Para poder comparar los resultados, es necesario designar una muestra como calibrador, al que se le otorga el valor 1 o 100% de expresión.

La cantidad de diana, normalizada frente al control endógeno y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Para conseguir este valor es necesario realizar los siguientes cálculos:

1. Calcular el Ct promedio de cada muestra para cada una de las dianas y del control endógeno (en cada placa se dispone cada muestra por duplicado).
2. Calcular  $\Delta Ct$  como Ct diana-Ct control endógeno.
3. Calcular  $\Delta\Delta Ct$  como  $\Delta Ct$  muestra –  $\Delta Ct$  calibrador/muestra control.

### **3.2.8. OTRAS TÉCNICAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

#### **3.2.8.1. Transformación de bacterias competentes mediante choque térmico**

Sobre la suspensión de bacterias competentes se añadió el volumen adecuado del plásmido correspondiente o del producto de recombinación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Para facilitar la internalización de los plásmidos se sometió a las bacterias a un choque térmico: se incubaron en un baño a 42°C durante 2 min e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 2 min. Se añadió entonces medio SOC frío y se incubaron las bacterias a 37°C durante 1 h en agitación.

Las cepas de *E.coli* que se usaron permiten la selección de los transformantes por “screening” blanco/azul en placas suplementadas con el inductor del promotor lacZ IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) y el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) que al ser hidrolizado por la enzima β-galactosidasa da un precipitado azul insoluble en agua cuando se ha producido la α-complementación y las bacterias han adquirido los vectores circularizados sin el ADN foráneo. De tal modo que las bacterias transformadas con los plásmidos recombinantes darán lugar a colonias blancas ya que no regeneran la actividad β-galactosidasa porque tienen interrumpida la región codificante de la enzima por el ADNc clonado.

Para seleccionar los transformantes, se sembraron las bacterias en placas de Luria-Bertani (LB)-agar suplementadas con ampicilina/IPTG/X-Gal y se incubaron a 37°C durante 12 h. Se seleccionaron las colonias blancas, bien definidas y aisladas.

#### **3.2.8.2. Obtención y purificación del ADN plasmídico de bacterias transformadas**

Para purificar el ADN plasmídico se utilizó el kit comercial “PlasmidPrep Mini spin kit” (GE Healthcare) que se basa en aplicar el lisado de bacterias transformantes, obtenido en condiciones alcalinas, sobre una columna constituida por una resina de intercambio iónico. A continuación se realizan lavados sucesivos para eliminar las endonucleasas y las sales. Finalmente, el ADN plasmídico se eluye de las columnas, en condiciones de baja salinidad. La concentración de ADN se determinó por el método de PicoGreen (apartado 3.2.11.2.).

### **3.2.8.3. Electroforesis en gel de agarosa**

#### **Geles de agarosa desnaturalizantes**

##### **Soluciones utilizadas**

- Tampón MOPS 10x: MOPS 0,2 M, acetato sódico anhidro 80 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0.
- Solución de carga desnaturalizante: formamida 95% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v), xileno cianol 0,025% (p/v), EDTA 18 mM y SDS 0,025% (p/v).

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa adecuada para alcanzar la concentración del 1% (p/v) y se disolvió en agua bidestilada. Para facilitar la disolución, la mezcla se calentó hasta ebullición y se mantuvo en agitación constante. Seguidamente, se añadió el tampón MOPS 10x (10% v/v) y formaldehído (18% v/v). Cuando la solución se enfrió hasta unos 50°C, se depositó sobre un molde y se colocó el peine adecuado al número de muestras de que se disponían. Una vez polimerizada la agarosa, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis que contenía el tampón de electroforesis MOPS. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN (0,5-10 kb) se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturalizante que contenía bromuro de etidio al 0,008% y se calentaron a 75°C durante 10 min. Antes de cargar las muestras, el gel se sometió a una corriente de 50 V para limpiar las calles.

Todo el material utilizado en la realización de los geles fue convenientemente tratado para eliminar las ARNasas y evitar así la degradación del ARN.

#### **Geles de agarosa no desnaturalizantes**

##### **Soluciones utilizadas**

- Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.
- Solución de carga no desnaturalizante: sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v).

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa necesaria y se disolvió en TAE para alcanzar el 1% o el 2,5% (p/v) en función de los tamaños moleculares de las muestras a analizar. Para disolver la agarosa, la mezcla se calentó hasta ebullición. Se añadió a continuación SYBR Green I (SYBR Safe, Invitrogen)

para teñir el ADN. Una vez que la agarosa hubo polimerizado en un molde con el peine adecuado, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de carga antes de depositarse en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se emplearon los estándares de 100 pb, 500 pb ó 1 kb, según los casos. Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica a una velocidad constante de 80 V. Posteriormente las bandas del gel se visualizaron bajo luz UV.

#### **3.2.8.4. Purificación del ADN de geles de agarosa**

El fragmento del gel que contenía la banda de ADN teñido con SYBR Green I se cortó bajo luz azul de 460 nm. Para disolver la agarosa se usó el kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare), calentando con la solución correspondiente a 60°C durante 15 min. El ADN se purificó en una columna, que se eluyó con solución tampón TE de pH 8,0. Si la solución de ADN se iba a utilizar en reacciones enzimáticas o de secuenciación, se utilizó agua ultrapura como eluyente.

#### **3.2.8.5. Transfección de células en cultivo con lípidos catiónicos**

Las células Alexander se sembraron en placas de 24 pocillos, con cubreobjetos estériles o en placas de 6 pocillos, a una densidad de 10.700 cel/cm<sup>2</sup>. 24 h después se transfectaron añadiendo en cada pocillo diferentes cantidades de lípido y de ADN hasta lograr la mejor eficacia de transfección posible. Las transfecciones se llevaron a cabo con lipofectamina.

Las células transfectadas con la construcción MRP2-V5 se incubaron a 37°C durante 24 h, tiempo en que se aspiró el medio para retirar los complejos lípido-ADN y se añadió medio de cultivo fresco. Transcurridas 24, 48, 72, 96, 120 o 144 h, las células transfectadas fueron fijadas (1 min con metanol a -20°C) para inmunodetección (apartado 3.2.10.2.).

Las células cotransfectadas con las construcciones de FXR $\alpha$ -RXR (obtenidas en nuestro grupo de investigación por el Ldo. Javier Rodríguez Vaquero como parte de su Tesis Doctoral) se incubaron a 37°C durante 24 h, tiempo en que se aspiró el medio para retirar los complejos lípido-ADN y se añadió medio de cultivo fresco

suplementado con DMSO, dexametasona o prednisolona (20  $\mu\text{M}$ ) (apartado 3.2.5.1.). Transcurridas 24 h, se añadía al medio el agonista de FXR, GW4064 (1  $\mu\text{M}$ ). Los pocillos control se suplementaron con DMSO. 24 h después se recogieron las células para extraer ARN (apartado 3.2.7.1.) o proteínas (apartado 3.2.9.1.). Se utilizaron como control células transfectadas con el vector vacío 3.1.

Una vez extraído el ARN de las células, y realizada la RT, una alícuota del ADNc se sometió a una digestión de 60 min a 37°C con la enzima de restricción *DpnI*. Esta enzima reconoce la secuencia nucleotídica GATC y corta el ADN metilado, de forma que se eliminan los restos del vector que podrían interferir en la PCR.

### **3.2.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT**

#### **3.2.9.1. Obtención de las muestras**

##### **Homogenados hepáticos**

Los fragmentos de tejido almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se pesaron y se cortaron en pequeños trozos, evitando la descongelación durante el proceso. El tejido se dejó descongelar sobre hielo en tampón RIPA (PBS con nonidet 1%, desoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas. Una vez descongelado, se homogeneizó con un politrón. Posteriormente, el homogenado se incubó durante 30 min sobre hielo y a continuación se centrifugó dos veces a 500 xg durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el sobrenadante (homogenado tisular) se alicuotó y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

##### **Crudos de membrana**

Para obtener el crudo de membrana los fragmentos de hígado almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se cortaron en pequeños trozos y se resuspendieron en el mismo volumen de tampón H (sacarosa 250 mM, EDTA 0,5 M,  $\text{CaCl}_2$  0,2 mM, Hepes-Tris 100 mM, pH 7,4) frío con inhibidores de proteasas. Las muestras se homogeneizaron con el politrón y se centrifugaron a 200.000 xg durante 90 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se resuspendió en tampón H con inhibidores de proteasas, se alicuotó y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

##### **Núcleos aislados**

Las preparaciones de núcleos aislados resuspendidos en STM (apartado 3.2.4.1.) se centrifugaron a 12.000 xg, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón RIPA suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas. A continuación las muestras se alicuotaron y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

##### **Envuelta nuclear de hepatocitos de rata**

Se obtuvieron a partir de núcleos aislados, siguiendo una modificación del método de Matunis (Matunis, 2006).

Se partió de núcleos recién aislados y suspendidos en STM, que fueron precipitados por centrifugación. A continuación se resuspendió el precipitado en un tampón de lisis que contenía ADNasa y ARNasa y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación

suave durante 4 h. Se añadió un tampón de extracción y la mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se depositó sobre sacarosa fría al 30% y se centrifugó a 4.000 xg durante 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en tampón de extracción, se volvió a depositar sobre sacarosa fría al 30% y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente se retiró el sobrenadante y el precipitado (envueltas nucleares aisladas) se resuspendió en tampón de extracción a pH 7,5 a 4°C. Las envueltas nucleares aisladas se conservaron a -80°C hasta su uso.

### **Células en cultivo**

Las células en cultivo se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con RIPA suplementado con coctel inhibidor de proteasas durante 25 min a 4°C. A continuación se recogieron las células mediante raspado de la placa y se incubaron a 4°C durante 20 min. Finalmente, este lisado celular se centrifugó a 20.000 xg durante 20 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -80°C hasta su uso.

#### **3.2.9.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las muestras se trataron previamente añadiendo un volumen de 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8 conteniendo SDS 4,6% (p/v), 0,025 µl de 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol al 4% (p/v) y 0,05 volúmenes de glicerol. Se incubaron durante 3 min en un baño de agua hirviendo.

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al porcentaje (p/v) adecuado en Tris-HCl, utilizando el sistema "Mini-Protean II Cell". La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de migración, a una corriente constante de 10 mA para el gel concentrador, incrementándose a 20 mA para el gel separador o de resolución. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cubeta con tampón de transferencia, a una corriente de 15 V durante toda la noche a 4°C y en agitación constante.

Para comprobar que las proteínas se encontraban en la membrana tras la transferencia, ésta se tiñó con colorante rojo ponceau durante 5 min. Esta tinción también permite estimar la carga de proteínas en cada calle.

### 3.2.9.3. Inmunodetección

La membrana se sometió al siguiente procedimiento a temperatura ambiente: se realizó un bloqueo con leche descremada al 5% (p/v) en PBS suplementado con Tween-20 (PBS-T), durante 1 h en agitación. Se lavó la membrana con PBS-T en agitación (5 min) y se incubó (1-2 h) con el anticuerpo primario correspondiente, también en continua agitación. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche descremada al 1% (p/v) en PBS-T (Tabla 4).

<b>Antígeno</b>	<b>Nombre</b>	<b>Especie de Origen</b>	<b>Dilución Utilizada</b>	<b>Procedencia</b>
<b>BCRP</b>	BXP21	Monoclonal Ratón	1:500	Abcam
<b>Calnexina</b>	ab22595	Policlonal Conejo	1:500	Abcam
<b>GAPDH</b>	sc32233	Monoclonal Ratón	1:1000	Santa Cruz
<b>Laminina B1</b>	ab16048	Policlonal Conejo	1:500	Abcam
<b>Mdr1/Mdr2</b>	ab3364	Monoclonal Ratón	1:500	Abcam
<b>MRP2</b>	M2III5	Monoclonal Ratón	1:250	Alexis
<b>MRP2</b>	M2III6	Monoclonal Ratón	1:250	Alexis
<b>Mrp2</b>	K13	Policlonal Conejo	1:500	Dr B. Estieger *
<b>MRP3</b>	M0318	Policlonal Conejo	1:300	Sigma
<b>MRP4</b>	ab15602	Monoclonal Rata	1:500	Abcam
<b>MRP6</b>	sc-25505	Policlonal Conejo	1:200	Santa Cruz
<b>NPC</b>	Mab414	Monoclonal Ratón	1:5000	Abcam
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa</b>	M7-PB-E9	Monoclonal Ratón	1:100	Abcam
<b>Red Trans Golgi</b>	TGN38	Monoclonal Ratón	1:500	Thermo Scientific
<b>UGT1A1</b>	AB10339	Policlonal Conejo	1:500	Millipore

\* Dr. Bruno Estieger, Hospital Universitario de Zurich (Zurich, Suiza)

Tras varios lavados con PBS-T, la membrana se incubó durante 1 h en agitación con el anticuerpo secundario adecuado marcado con peroxidasa y diluido en leche descremada al 5% (p/v) en PBS-T, según las indicaciones del proveedor. A continuación se lavó la membrana con PBS-T y se procedió a la detección utilizando los reactivos de detección ECL (Enhanced ChemioLuminiscence). La membrana se

reveló en un analizador de imagen LAS-4000 (Fujifilm), durante el tiempo necesario para encontrar una señal detectable con el menor ruido de fondo.

### **3.2.10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA**

#### **3.2.10.1. Preparación de muestras**

##### **Células en cultivo**

Para el marcaje por inmunofluorescencia las células se sembraron en placas Labtek o en cubreobjetos estériles dentro de placas de cultivo y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaban entre el 60 y el 80% de confluencia.

En el caso de las células Alexander transfectadas con la construcción MRP2-V5, fueron sembradas 24 h antes de su transfección (apartado 3.2.8.5.) y se fijaron a diferentes días después de la transfección.

##### **Núcleos aislados**

Los núcleos previamente incubados con los diferentes compuestos fluorescentes (apartado 3.2.4.2.) se centrifugaron y se resuspendieron en PBS a 4°C. Se fijaron con PFA durante 15 min a 4°C, y se lavaron una vez más con PBS frío. Finalmente los núcleos se centrifugaron en una citocentrífuga para fijarlos sobre portaobjetos, y se cubrieron con cubreobjetos utilizando un medio de montaje adecuado. Las preparaciones se conservaron a 4°C, protegidas de la luz, hasta que fueron observadas en el microscopio confocal.

#### **3.2.10.2. Inmunodetección**

Las preparaciones se fijaron con PFA y se permeabilizaron con Triton X-100, o bien se fijaron/permeabilizaron con metanol a -20°C. Tras varios lavados con PBS, se realizó una incubación con suero bovino fetal al 10% en PBS para bloquear los sitios de unión inespecífica.

La incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 5% de suero bovino fetal se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. La tabla 5 muestra los anticuerpos primarios y las diluciones utilizados en este estudio.

A continuación se lavaron las preparaciones con PBS y se incubaron, durante 1 h en oscuridad, con los anticuerpos secundarios apropiados en cada caso: anti-IgG de ratón o conejo conjugados con Alexa 488 ó Alexa 594 (diluidos 1:1000) o Cy5

(diluido 1:250), junto con DAPI o yoduro de propidio para teñir los núcleos (diluidos 1:5000).

Tras varios lavados con PBS, se realizó el montaje con medio de montaje para fluorescencia. Se colocó el cubreobjetos y se selló con laca de uñas. La visualización del marcaje se realizó con un microscopio confocal.

**Tabla 5:** Anticuerpos primarios empleados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Antígeno	Nombre	Especie de Origen	Dilución Utilizada	Procedencia
<b>BCRP</b>	BXP34	Monoclonal Ratón	1:20	Alexis
<b>Calnexina</b>	ab22595	Policlonal Conejo	1:500	Abcam
<b>FXR</b>	sc13063	Policlonal Conejo	1:100	Santa Cruz
<b>Laminina B1</b>	ab16048	Policlonal Conejo	1:500	Abcam
<b>MRP2</b>	M2III5	Monoclonal Ratón	1:500	Alexis
<b>MRP2</b>	M2III6	Monoclonal Ratón	1:500	Alexis
<b>Mrp2</b>	K13	Policlonal Conejo	1:500	Dr B. Estieger *
<b>NPC</b>	Mab414	Monoclonal Ratón	1:5000	Abcam
<b>Nucleolina</b>	C23 (H-6)	Monoclonal Ratón	1:500	Santa Cruz
<b>Pan Cadherina</b>	ab16505	Policlonal Conejo	1:500	Abcam
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	MA1-822	Monoclonal Ratón	1:100	AffinityBioreagents
<b>Red Trans Golgi</b>	TGN38	Monoclonal Ratón	1:500	Thermo Scientific
<b>UGT1A1</b>	AB10339	Policlonal Conejo	1:500	Millipore
<b>V5</b>	R961	Monoclonal Ratón	1:200	Invitrogen

\* Dr. Bruno Estieger, Hospital Universitario de Zurich (Zurich, Suiza)

Para comprobar la especificidad de la técnica de inmunofluorescencia se llevaron a cabo los siguientes controles negativos:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.
- Omisión de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia para detectar autofluorescencia de las muestras o de los anticuerpos primarios.

- En los casos de doble marcaje, incubación de cada anticuerpo primario con el secundario del otro anticuerpo primario para detectar uniones cruzadas.

### **Microscopía confocal**

Tras el inmunomarcaje, las preparaciones se observaron en un microscopio confocal modelo TCS SP5 (Leica Microsystems), utilizando un objetivo de inmersión de 63x/1,4-0,6 Oil –Plan Apo –HCX y el programa informático LEICA LAS AF. La detección del marcaje del fluorocromo FITC y de los anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 488 se realizó a una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión entre 499-582 nm, utilizando un láser de Argón. Para el yoduro de propidio y los anticuerpos secundarios marcados con Alexa 594 se utilizó el láser DPSS, a una longitud de onda de excitación de 561 nm y de emisión entre 595-705 nm. Para el DAPI se utilizó el Diodo 405 a una longitud de onda de excitación de 405 nm y de emisión entre 416-480 nm. Para el anticuerpo secundario marcado con Cy5 se empleó el láser HeNe a una longitud de onda de excitación de 633 nm y se detectó una emisión entre 645-750 nm.

### **3.2.11. MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.2.11.1. Determinación de ARN por el método del RiboGreen**

El ARN total se valoró por fluorimetría utilizando el método comercial “RiboGreen RNA Quantification Kit”. La técnica se basa en la unión específica de un fluorocromo (RiboGreen) al ARN, el cual emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra.

#### **3.2.11.2. Determinación de ADN por el método del PicoGreen**

Para cuantificar la cantidad de ADN de doble cadena se utilizó el método comercial “Pico-Green DNA-Quantitation Kit” (Invitrogen). La técnica se basa en la unión de un grupo fluorocromo al ADN, el cual emite una señal proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra.

#### **3.2.11.3. Determinación de ADN por el método de Hoescht**

La valoración del ADN en las preparaciones de núcleos y envueltas nucleares aisladas se realizó mediante fluorimetría (Labarca y Paigen, 1980), empleando el reactivo Hoescht H-33258, cuya fluorescencia aumenta cuando se une al ADN.

#### **3.2.11.4. Determinación de la viabilidad celular (Test de Formazán)**

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. El formazán, soluble en medios acuosos, se forma a partir de sales de tetrazolio (MTT) por la acción de deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas (Marshall et al., 1995). Se puede cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de formazán producido ya que es un compuesto que absorbe a 490 nm. Dicha cantidad será directamente proporcional al número de células vivas.

Terminado el periodo experimental descrito en el apartado 3.2.5.1., las células se incubaron durante 4 h en presencia de MTT a 37°C, en una estufa con atmósfera del 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 80%. Transcurrido este tiempo se añadió la

solución de lisis y solubilización (10% SDS en 0,01 M de HCl) y las placas se incubaron en la estufa a 37°C durante 12 h. Finalmente se determinó el color del sobrenadante por espectrofotometría en un lector de ELISA.

#### **3.2.11.5. Determinación de proteínas**

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Lowry et al., 1951) realizada por Markwell (Markwell et al., 1978), que se basa en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas.

#### **3.2.11.6. Determinación de platino por Absorción Atómica**

El contenido en Pt se determinó por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito, utilizando una longitud de onda de 265,9 nm.

Las muestras de lisado celular se mineralizaron con HNO<sub>3</sub> en un baño a 60°C durante 2 h. A continuación, los tubos se calentaron en un termostato de bloque metálico a 150°C hasta que el HNO<sub>3</sub> añadido a la muestra se había evaporado y el Pt, ya sin restos de materia orgánica, se resuspendió con HCl 0,02 N. Se depositaron 20 µl de esta solución en la cubeta del espectrofotómetro de absorción atómica, que se calentaba desde 90°C a 3000°C siguiendo una secuencia previamente establecida (Briz et al., 2002). Para la determinación del grado de platinación del ADN, las muestras de ADN se analizaron en el espectrofotómetro sin mineralización previa.

El cálculo de la concentración de Pt se realizó a partir de una curva patrón, preparada por dilución de una solución estándar de PtCl<sub>2</sub> en HCl 0,02 N.

#### **3.2.11.7. Determinación de ácidos biliares por HPLC-MS/MS**

Previo a su análisis por HPLC-MS/MS se extrajeron y concentraron los ABs del plasma y del tejido hepático, para lo que se realizó una extracción sólido-líquido en cartuchos Sep-Pak con relleno de octadecilsilano (C18). Los cartuchos Sep-Pak Plus C18 fueron suministrados por Waters (Madrid).

### **Preparación de las muestras de plasma**

Tras diluir el plasma 1:4 (vol:vol) con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,4 M, se añadió la cantidad adecuada de ácido nor-desoxicólico (norDCA) en metanol, que se utilizó como estándar interno. A continuación la mezcla se calentó a 65°C durante 2 h y, posteriormente, se centrifugó 10 min a 2.200 xg. El sobrenadante resultante se aplicó al cartucho.

### **Preparación de las muestras de tejido hepático**

Se realizó un homogenado diluyendo el tejido hepático 1:3 (peso:vol) en agua destilada, utilizando un politrón. Se añadió la cantidad adecuada de norDCA en metanol. A continuación se diluyó el homogenado con etanol absoluto, se calentó 2 h a 65°C y posteriormente se centrifugó 10 min a 2.200 xg. El sobrenadante se recogió y el precipitado se extrajo de nuevo con etanol. Los sobrenadantes se evaporaron hasta sequedad y el extracto se resuspendió en metanol. A continuación se añadió NaOH 0,1 N y la mezcla se aplicó al cartucho.

### **Preparación de las muestras de bilis**

Debido a la naturaleza pobre en proteínas de la bilis y a su elevada concentración de ABs, las muestras de bilis se diluyeron en metanol a la proporción adecuada para analizarlas directamente en el HPLC-MS/MS, sin extracción previa.

### **Extracción sólido-líquido en cartuchos Sep-Pak con relleno C18**

Antes de iniciar el procedimiento, el cartucho se activó con 5 ml de metanol seguidos de 5 ml de agua destilada. Una vez activado, se aplicó lentamente la muestra en caliente. A continuación, se lavó el cartucho aplicando sobre el mismo de manera sucesiva 10 ml de agua destilada, 3 ml de acetona al 10% en agua y 10 ml de agua destilada. Posteriormente, se extrajeron los ABs retenidos en el cartucho aplicando lentamente 5 ml de metanol, que se evaporó bajo corriente de aire hasta sequedad.

### **Análisis de ácidos biliares por HPLC-MS/MS**

El método utilizado para el análisis de ABs fue una modificación del descrito por Ye y colaboradores (Ye et al., 2007).

Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, termostaticada a 35°C. Se utilizó un método de elución en gradiente usando como fase móvil una mezcla de metanol y agua, conteniendo ambos 5 mM de acetato amónico y 0,01% de ácido fórmico, pH 4,6. Se comenzó a trabajar con 80:20 de metanol/agua y se fue incrementando la concentración de metanol en la mezcla hasta el 97%, de manera lineal durante 9 min, para retornar a la proporción inicial en 1 min y mantenerla durante los últimos 5 min del análisis. El flujo de trabajo fue de 0,5 ml/min.

La determinación de los ABs en el triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización negativa, para obtener los aniones moleculares de cada una de las especies moleculares analizadas. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N<sub>2</sub>) 350°C, flujo del gas 8 ml/min, presión del nebulizador 10 psi, voltaje 2.500 V. Se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica de cada uno de los iones precursores (ión molecular - H<sup>+</sup>) a los respectivos iones producto resultantes. En el caso de los ABs tauroconjugados se monitorizó el ión producto 80,2 m/z, correspondiente al grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup> de la taurina; para los glicoconjugados se siguió el ión 74 m/z, correspondiente a la glicina desprendida en su fragmentación. Desafortunadamente, en el caso de los ABs libres no fue posible fragmentar el ión molecular obteniendo iones hijos característicos, como ya habían observado otros autores (Ye et al., 2007). Por ello se siguió la transición de ión molecular a ión molecular, por ejemplo, de 407,4 m/z a 407,4 m/z en el caso del ácido cólico.

Las muestras se reconstituyeron en 200 µl de metanol y se centrifugaron durante 30 segundos a 18.000 xg antes de su inyección en el cromatógrafo. El volumen de inyección fue de 2 µl.

Se construyeron rectas patrón para cada una de las especies moleculares de ABs mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de cada AB entre 0,1 y 25 µM. Se corrigió la concentración de cada AB calculada a partir de su recta patrón por la recuperación obtenida para el estándar interno norDCA, que se detectó siguiendo la transición específica de 377 m/z a 331,3 m/z.

### **3.2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM). Para calcular la significación estadística de la

comparación entre dos medias se utilizó el test de la t de Student. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni o el test de t de Student de valores apareados, según el caso. Las correlaciones se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados.





# 4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



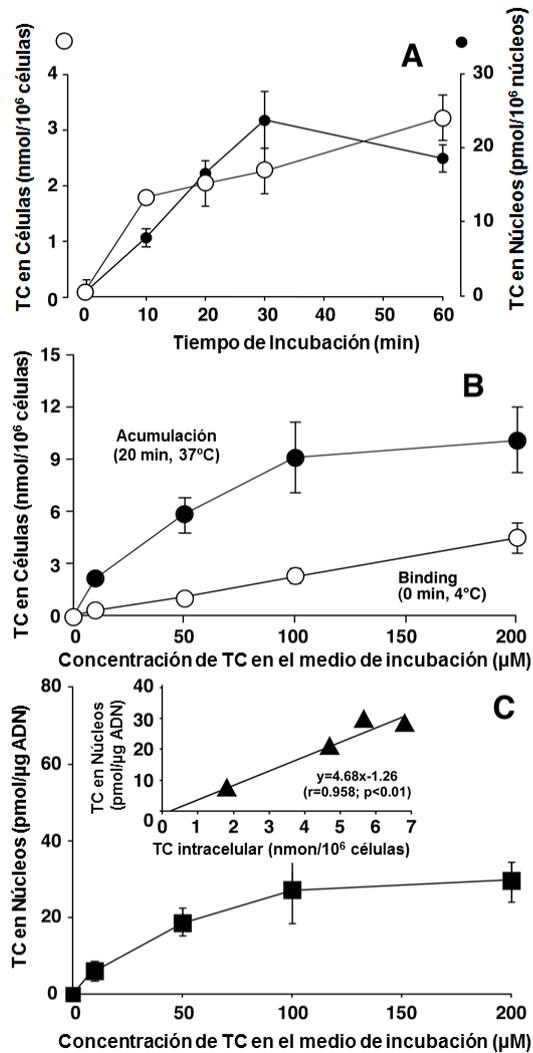
#### **4.1. ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA Y LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES**

Como ya se ha expuesto en la Introducción de este trabajo, la homeostasis de los ácidos biliares (ABs) está controlada, en gran parte, por receptores nucleares (NRs), principalmente por FXR, que activa específicamente la transcripción de genes implicados en la síntesis, transporte hepatobiliar y absorción intestinal de estas moléculas. En general, la activación de FXR actúa previniendo y protegiendo de las consecuencias tóxicas de la acumulación de los ABs en los tejidos en los que se expresa este receptor. Dependiendo de la estructura molecular (p.e. hidroxilación en el carbono 7 en posición  $\alpha$  o  $\beta$ ), las distintas especies de ABs poseen diferente capacidad para unirse a FXR (Lew et al., 2004; Makishima et al., 1999), pero para lograr esta unión todas ellas deben alcanzar el núcleo. Se ha demostrado la presencia de ABs en el núcleo de hepatocitos de rata (Mendoza et al., 2002; Monte et al., 2002; Setchell et al., 1997) y se ha observado que sus niveles en el núcleo aumentan tras la ligadura del conducto biliar (Setchell et al., 1997). Además, se ha descrito que la composición cualitativa del conjunto de especies moleculares o “pool” de ABs en el núcleo es diferente de la del “pool” citoplasmático, y en situaciones como la regeneración hepática (Monte et al., 2002) y la carcinogénesis (Mendoza et al., 2002) se producen variaciones en la composición del “pool” intranuclear diferentes a las que se observan en el citoplasmático. Se desconoce si el “intercambio” de ABs entre el núcleo y el citoplasma se lleva a cabo exclusivamente por difusión simple a través de los NPCs, por translocación tras la unión a proteínas citosólicas solubles, o por otros mecanismos. A pesar de los importantes avances que en las últimas décadas se han llevado a cabo en el conocimiento de los mecanismos responsables del tráfico núcleo-citoplasmático de proteínas y ácidos nucleicos (Bonner, 1975; Dingwall et al., 1982; Kalderon et al., 1984), se conoce muy poco sobre el tráfico nuclear de moléculas orgánicas de bajo peso molecular (<1000 Da), entre las que estarían los ligandos de los diferentes NRs, tales como ABs, ácido retinoico, oxisteroles y numerosos xenobióticos.

##### **4.1.1. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR E INTRANUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES EN HEPATOCITOS DE RATA**

Nuestro primer objetivo fue estudiar la entrada y retención de ABs en el núcleo de los hepatocitos, y relacionarlas con su concentración intracelular. Para ello se aislaron hepatocitos de rata como se detalla en el apartado 3.2.3.1. Los hepatocitos

recién aislados se incubaron en suspensión con un AB radiactivo, ácido taurocólico tritiado ( $[^3\text{H}]\text{-TC}$ ), en condiciones adecuadas de oxigenación, temperatura y agitación. Finalizada la incubación se aislaron los núcleos de los hepatocitos (apartado 3.2.3.2) y se determinó su contenido en radiactividad.



**Fig. 1.** (A) Evolución temporal de la acumulación de ácido taurocólico (TC) en hepatocitos de rata (○) y del contenido de TC en sus núcleos (●). Los hepatocitos recién aislados se incubaron con 10 μM de  $[^3\text{H}]\text{-TC}$  durante los tiempos indicados. (B) Acumulación total de TC (●) y unión o "binding" extracelular (○) en hepatocitos de rata incubados durante 20 min con 10, 50, 100 o 200 μM de  $[^3\text{H}]\text{-TC}$ . (C) Contenido de TC en núcleos aislados tras la incubación de los hepatocitos con el ácido biliar (■). Inserto: relación entre el TC en los núcleos, y el contenido intracelular de TC (▲), que se calculó como la diferencia entre el TC total en las células y el "binding" del TC, mostrados en la figura B. Los valores son la media ± EEM de experimentos realizados con 4-8 preparaciones diferentes de hepatocitos.

En primer lugar se llevaron a cabo experimentos para determinar la evolución temporal de la captación nuclear de TC, utilizando una concentración 10 μM del AB

radiactivo. En la figura 1A se observa que el contenido nuclear de TC aumentó de manera lineal hasta los 30 min de incubación, de ahí que eligiésemos un tiempo inferior, 20 min, para realizar el resto de los estudios en condiciones que podríamos denominar de velocidad inicial.

A continuación se incubaron los hepatocitos durante 20 min, a 37°C, con concentraciones crecientes de [<sup>3</sup>H]-TC (10, 50, 100 o 200 μM) y se observó que tanto el contenido en TC de las células (Fig. 1B) como el de los núcleos (Fig. 1C) se incrementaba progresiva y paralelamente al aumentar la concentración de TC en el medio extracelular. Se determinó también la unión inespecífica o “binding” extracelular de TC, por medida de radiactividad en hepatocitos expuestos al AB a 4°C y en los que se detuvo inmediatamente la captación (tiempo 0 min). Como era esperable, este parámetro aumentó linealmente con la concentración de TC en el medio (Fig. 1B).

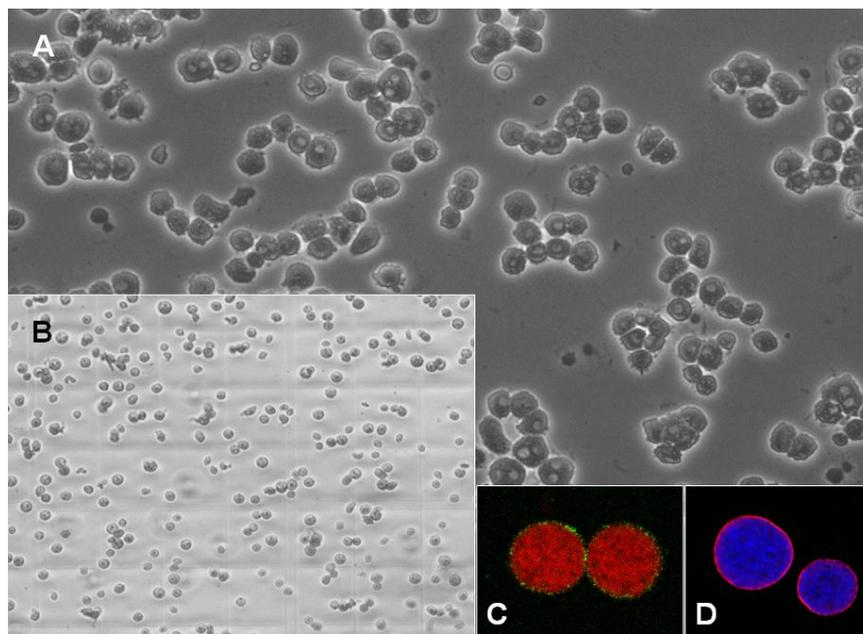
Dado que las preparaciones contenían hepatocitos binucleados y tetraploides, los resultados del contenido nuclear de TC se normalizaron por la cantidad de ADN presente en la muestra (Fig. 1C). El valor medio de este parámetro fue de  $2,86 \pm 0,34$  μg ADN/10<sup>6</sup> células y no se alteró por la incubación con el TC.

La representación del contenido nuclear de TC frente a su acumulación intracelular (calculada como la diferencia entre el contenido total en las células y el “binding” inespecífico) mostró una correlación lineal (Fig. 1C, inserto). Estos resultados indican que la cantidad de AB que alcanza el núcleo de los hepatocitos depende directamente de sus niveles intracelulares. El valor positivo obtenido para la intersección con el eje de abscisas sugiere, además, la existencia de cierto grado de unión del TC a estructuras intracelulares.

#### **4.1.2. CAPTACIÓN DE DERIVADOS FLUORESCENTES DE ÁCIDOS BILIARES EN NÚCLEOS AISLADOS DE HEPATOCITOS**

Los experimentos que acabamos de describir presentaban la limitación de que, debido a la manipulación que entrañaba el proceso de aislamiento de los núcleos, no se podía descartar que durante el mismo se perdiera parte del AB que llegaba a ellos durante la incubación de las células. Por ello, y también para investigar si la entrada de los ABs al núcleo dependía o no de estructuras o componentes citoplasmáticos, decidimos investigar la captación/retención de estos compuestos en núcleos previamente aislados a partir de hepatocitos de rata. Utilizamos como sustrato

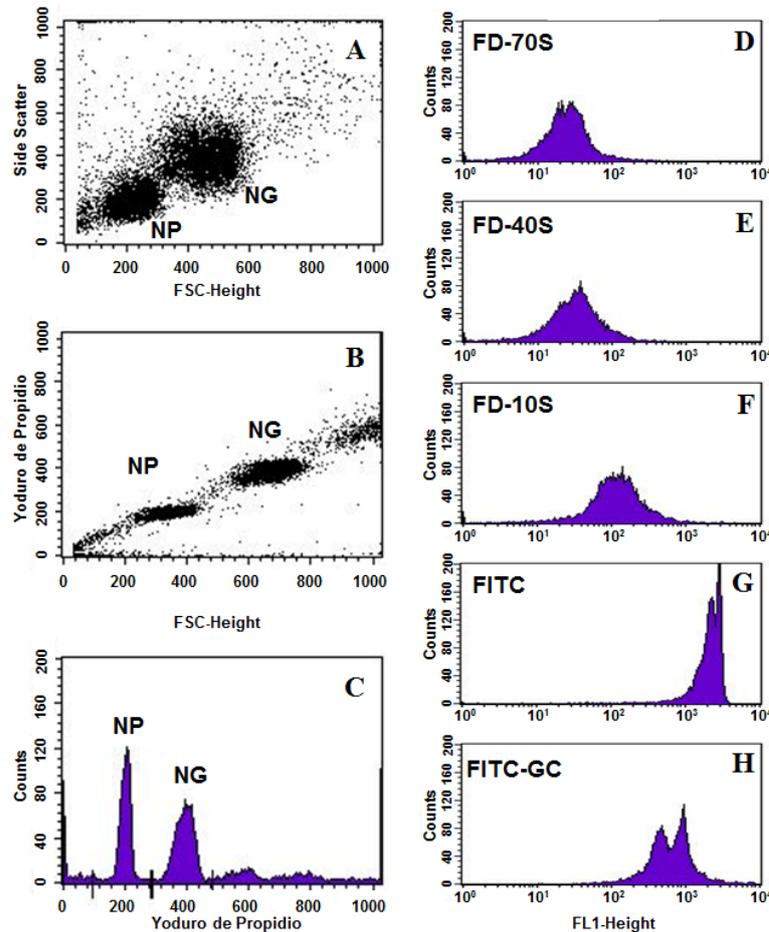
derivados fluorescentes de ABs que habíamos sintetizado por conjugación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (apartado 3.2.1.), y que nos permitían estudiar el proceso mediante citometría de flujo. Los núcleos de hepatocitos se aislaron a partir de homogenado hepático, mediante centrifugaciones sucesivas en gradiente de sacarosa (apartado 3.2.4.1). La pureza de las preparaciones obtenidas y la ausencia de otros restos celulares se comprobó, en una primera aproximación, por microscopía de contraste de fases. En la figura 2 se muestra una de esas preparaciones de núcleos aislados (Fig. 2B) y se puede comparar su tamaño y aspecto con el que presentan los hepatocitos de rata en cultivo primario (Fig. 2A). Los núcleos aislados se observaron también por microscopía confocal, comprobando su integridad mediante la tinción de elementos de la envuelta nuclear como el complejo de poro nuclear (NPC) (Fig. 2C) o la lamina B1 (Fig. 2D).



**Fig. 2.** (A y B) Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de un cultivo primario de hepatocitos de rata (A) y de una preparación de núcleos de rata (B) aislados a partir de homogenado hepático. (C y D) Imágenes representativas, obtenidas por microscopía confocal, de los núcleos aislados de hepatocitos. El ADN se marcó con yoduro de propidio (rojo, C) o con DAPI (azul, D). La envuelta nuclear se marcó mediante anticuerpos frente al complejo de poro nuclear (verde, C) o frente a la lamina B1 (rojo, D).

Tras marcar el ADN con yoduro de propidio, los núcleos aislados se analizaron por citometría de flujo (Fig. 3). Se observó que las preparaciones contenían dos poblaciones de núcleos de diferente tamaño (Fig. 3A). El contenido en ADN de la

población de núcleos grandes era aproximadamente el doble que el de los núcleos pequeños (Fig. 3B y 3C). Esto indica que estas poblaciones se obtuvieron a partir de hepatocitos tetraploides y diploides, respectivamente.



**Fig. 3.** Análisis por citometría de flujo de núcleos aislados de hepatocitos de rata. (A y B) Diagramas de puntos o “Dot plots” representativos que muestran las 2 poblaciones nucleares obtenidas al aislar núcleos a partir de tejido hepático, e incubarlos con yoduro de propidio para marcar su contenido en ADN. (C) Histograma representativo del contenido en ADN en las 2 poblaciones de núcleos; NP, núcleos pequeños; NG, núcleos grandes. (D-H) Histogramas representativos correspondientes a núcleos de hepatocitos tras 30 min de incubación con 20  $\mu$ M de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (G), o de dextranos de diferentes pesos moleculares marcados con FITC: FD-70S (70 kDa, D), FD-40S (40kDa, E), y FD-10S (10 kDa, F) o del ácido biliar fluorescente colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC, H). Los núcleos se resuspendieron en medio de carga (LM) que contenía el agente fluorescente a ensayar y se incubaron a 37°C en oscuridad con agitación suave. Su fluorescencia se analizó en el citómetro de flujo. En cada análisis se recogieron datos de 10.000 eventos (núcleos).

Para comprobar si estas preparaciones de núcleos de hepatocitos en combinación con la técnica de citometría de flujo, podían ser útiles para estudiar el transporte nuclear de moléculas fluorescentes, se realizó un primer tipo de

experimentos cuyo objetivo era investigar la capacidad de los NPCs de limitar el paso de moléculas al núcleo en razón del tamaño de dichas moléculas. Para ello se utilizaron dextransos marcados fluorescentemente con FITC, de peso molecular 10 kDa, 40 kDa y 70 kDa (FD-10S, FD-40S y FD-70S, respectivamente), cuya captación nuclear se comparó con la de FITC.

Las suspensiones de núcleos se incubaron durante 30 min, a 37°C, con una concentración 20  $\mu$ M del compuesto a estudiar. Tras la incubación, una alícuota de la suspensión se añadía al tampón FACSFlow utilizado como fluido envolvente y se analizaba en el citómetro. Las condiciones de adquisición de datos en el citómetro, tales como el umbral de tamaño de la partícula y el voltaje de los detectores de los parámetros FSC y SSC y del canal FL1, en el que se detecta la fluorescencia del FITC, se ajustaron al inicio de cada análisis, utilizando para ello núcleos no tratados con ningún compuesto fluorescente (Blanco) y núcleos preincubados con FITC. El voltaje del canal FL1 se ajustó de manera que la población nuclear Blanco presentase siempre un valor de fluorescencia inferior a 10 unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). En cada análisis se recogieron datos correspondientes a 10.000 eventos (núcleos).

Cuando se incubaron los núcleos aislados con dextransos de diferentes pesos moleculares marcados con FITC, se observó que la fluorescencia detectada en los núcleos se fue incrementando a medida que el peso molecular de los FITC-dextransos disminuía (Fig. 3D-3F). Estos datos concuerdan con los obtenidos en estudios previos que afirman que los dextransos de tamaño inferior a 40 kDa pueden moverse libremente entre el citoplasma y el núcleo (Peters, 1986). Los niveles de fluorescencia en los núcleos fueron muy superiores tras incubarlos con FITC (389 Da) (Fig. 3G). En núcleos incubados con un derivado fluorescente de ABs, el conjugado de ácido glicocólico FITC-GC (794 Da) se hallaron niveles menores de fluorescencia (aunque entre 5-8 veces superiores a los niveles detectados para el dextrano de 10 kDa) (Fig. 3H).

A la vista de estos resultados parece evidente que el tamaño de la molécula es determinante para su entrada/retención en los núcleos aislados de hepatocitos. La vía mayoritaria de entrada en el núcleo es a través de los NPCs. Estas estructuras permiten el intercambio núcleo-citoplasmático de iones, moléculas pequeñas y proteínas de pequeño tamaño. Ya se ha indicado que los dextransos de peso molecular inferior a 20-40 kDa pueden moverse libremente entre el citoplasma y el núcleo (Peters, 1986). Existen datos estructurales y funcionales que apoyan la

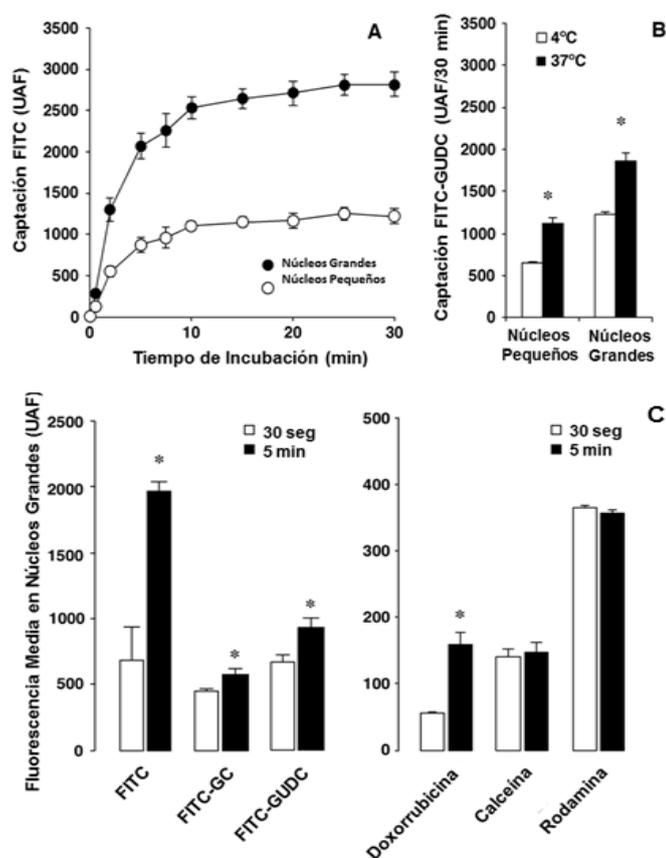
existencia en el NPC de 8 canales periféricos pequeños dispuestos circularmente alrededor de un gran canal central (Aebi, 1992; Shahin et al., 2001). Los dextranos de 10 KDa son demasiado grandes para entrar a través de estos canales periféricos, pero difunden libremente a través del canal central. Nuestros resultados coinciden con las observaciones de estos autores.

Los núcleos tratados con los dextranos de 40 y 70 kDa, que debido a su tamaño no podrían pasar a través de los NPCs, presentaban una fluorescencia inicial (inmediatamente tras añadir el compuesto fluorescente) similar en ambos casos (datos no mostrados), que no se modificó con el tiempo de incubación, lo que sería compatible con una unión rápida, probablemente inespecífica, de estas moléculas fluorescentes a la envuelta nuclear ("binding"). Sin embargo, para el FD-10S, se encontraron niveles de fluorescencia 3 veces más altos ya al inicio del experimento (datos no mostrados), junto con un moderado incremento con el tiempo de incubación, presumiblemente debido a la mayor entrada y retención de este compuesto en los núcleos (Fig. 3F).

Moléculas pequeñas, como el FITC, probablemente son capaces de entrar en el núcleo a través tanto del canal central como de los canales periféricos de los NPCs. Eso justificaría el marcado incremento de la fluorescencia de la población nuclear encontrado tras 30 min de incubación con este compuesto (Fig. 3G), que estaría siendo captado y retenido dentro de los núcleos.

Por otra parte, la capacidad de captar estos compuestos fluorescentes de manera selectiva en función de su tamaño es otra prueba en favor de que los núcleos aislados en nuestras preparaciones conservaban su integridad. Otros autores han utilizado también la capacidad de excluir dextranos fluorescentes de 64 kDa para comprobar la integridad de núcleos aislados de oocitos de *Xenopus laevis* (Enss et al., 2003).

Para estudiar la captación nuclear de derivados fluorescentes de ABs y otros compuestos fluorescentes de bajo peso molecular se realizaron experimentos que se iniciaban añadiendo los núcleos sobre la solución del compuesto a estudiar (la suspensión resultante contenía  $25 \times 10^6$  núcleos/ml). Inmediatamente tras la adición de los núcleos (30 seg) y a diferentes tiempos de incubación se tomaba una alícuota de la suspensión nuclear, se añadía sobre FACSFlow y se analizaba la fluorescencia de los núcleos en el citómetro de flujo. En primer lugar se estudió la evolución temporal y la dependencia de la temperatura del proceso de captación (Fig. 4).



**Fig. 4.** Análisis por citometría de flujo de la captación de compuestos fluorescentes por núcleos aislados de hepatocitos de rata. **(A)** Evolución temporal de la captación nuclear de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los núcleos se incubaron en presencia de 20  $\mu$ M de FITC durante el tiempo indicado. Se distinguieron dos poblaciones de núcleos en función de su tamaño y contenido en ADN, núcleos pequeños ( $\circ$ ) y núcleos grandes ( $\bullet$ ). **(B)** Captación nuclear de ursodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GUDC) durante 30 min. Los núcleos se incubaron en presencia de 20  $\mu$ M de FITC-GUDC a 4 y 37°C. **(C)** Captación de compuestos fluorescentes por núcleos aislados incubados con 20  $\mu$ M de FITC, colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC) o FITC-GUDC, o con 5  $\mu$ g/ml de calceína, rodamina 123, o doxorubicina, a 37°C durante 30 seg o 5 min. Los valores son medias  $\pm$  EEM de los valores de fluorescencia media, obtenidos por citometría de flujo, en 5 experimentos realizados por duplicado con 5 preparaciones de núcleos distintas. \* $p < 0,05$ , significativamente diferentes al comparar núcleos incubados a 4 y 37°C (B) o al comparar con los valores medidos a 30 seg (C) por el test de t de Student para valores apareados. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia.

Se observó que la captación de FITC (Fig. 4A) y de los ABs fluorescentes (datos no mostrados) por los núcleos era un proceso rápido, tras los primeros 10 min de incubación los niveles de fluorescencia permanecían ya prácticamente constantes, siendo aproximadamente el doble en los núcleos grandes que en los pequeños, como era de esperar. También se comprobó que la captación era dependiente de la temperatura, ya que fue significativamente mayor en los núcleos incubados a 37°C que en los incubados a 4°C (Fig. 4B).

Se analizó a continuación la captación de FITC, de los derivados fluorescentes de ABs, FITC-GC y FITC-GUDC, y de otros compuestos fluorescentes como doxorubicina, calceína y rodamina 123, tras incubación con los núcleos a 37°C durante 5 min. En la Fig. 4C se muestran los niveles de fluorescencia detectados en la población de núcleos grandes; se obtuvieron resultados cualitativamente similares (aunque cuantitativamente diferentes) para los núcleos pequeños (datos no mostrados).

Tras la retención inicial detectada a los 30 seg (debida probablemente a la unión inespecífica del compuesto, o "binding") los núcleos ya no captaron más calceína (un polianión de 666 Da) ni rodamina 123 (un compuesto catiónico de 380 Da). Sin embargo, la fluorescencia de los núcleos sí se incrementó tras 5 min de incubación con los conjugados fluorescentes de ABs, con doxorubicina (580 Da) y, más marcadamente, con FITC (Fig. 4C).

Estos resultados contradicen la idea de la difusión simple como única responsable de la entrada al núcleo de moléculas pequeñas, inferiores a 40 kDa (Peters, 1986). Parece existir cierto grado de selectividad molecular, ya que moléculas de similar tamaño y con carga eléctrica positiva o negativa, son capaces de entrar en el núcleo con más (FITC) o menos (calceína y rodamina 123) eficacia que los ABs. Nuestros resultados sugieren que, además de difusión simple a través de los NPCs, existen otros factores, distintos del tamaño molecular, que determinan el contenido nuclear total de pequeñas moléculas orgánicas, incluidos los ABs.

Debemos considerar que, en comparación con lo que ocurre en condiciones fisiológicas, el componente de difusión en el intercambio de ABs entre el citosol y el núcleo a través de los NPCs ha sido probablemente sobrestimado en las condiciones experimentales de nuestro estudio. En primer lugar porque, en las preparaciones empleadas, los NPCs no están involucrados en el tráfico de macromoléculas, que en condiciones normales tendría lugar en la célula viva. Se puede suponer que las proteínas y el ARN que atraviesan estas estructuras se comportan como "tapones parciales" transitorios dificultando la transferencia de pequeñas moléculas a través del NPC. En segundo lugar porque, aunque no hay mucha información acerca de las concentraciones de ABs monoméricos en el citoplasma, se cree que están en torno a 1  $\mu$ M (Weinman y Maglova, 1994). Así, la magnitud del gradiente de concentración de ABs entre el núcleo y el citosol probablemente es menor al empleado en este estudio. Y por último, debido al carácter hidrófobo de los ABs conjugados, éstos se unirán a

proteínas y lípidos intracelulares, que disminuyen sus gradientes de concentración eficientes para la difusión a través de los NPCs.

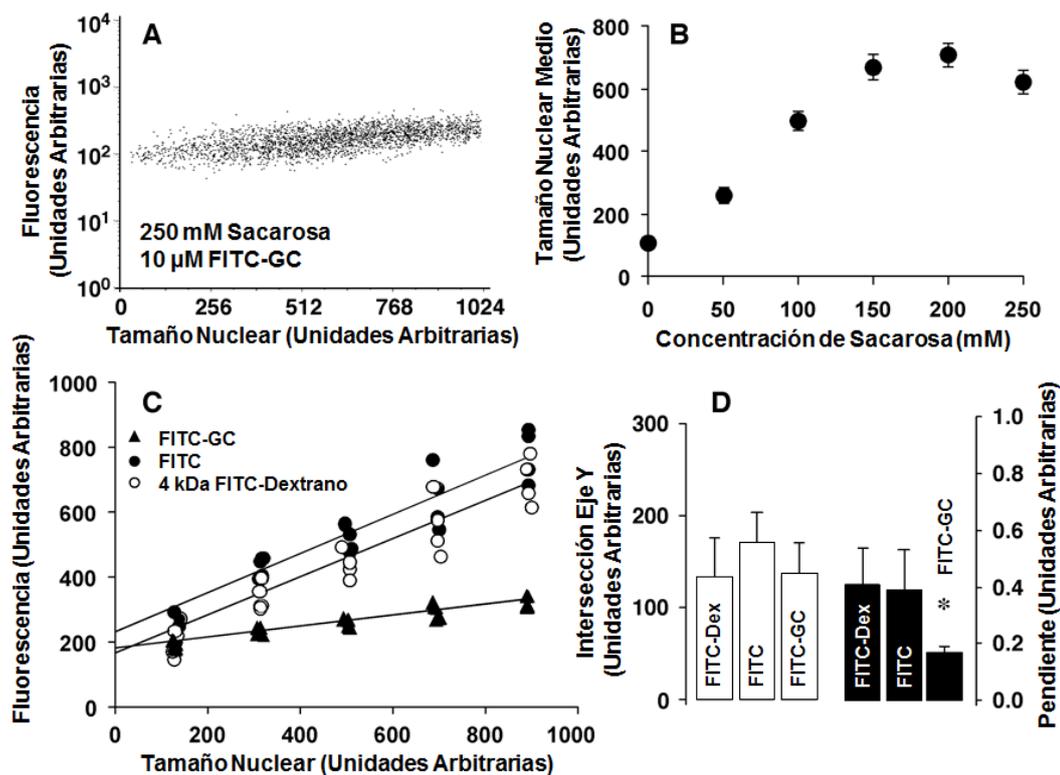
Por otra parte, para comprobar si el proceso de incorporación de los ABs al núcleo era saturable, se llevaron también a cabo experimentos de auto-inhibición con FITC-GUDC y de inhibición cruzada con ABs naturales. La carga nuclear de FITC-GUDC fue lineal hasta una concentración 120  $\mu\text{M}$  en el medio extranuclear (datos no mostrados). Además, los ácidos GC, TC, GUDC, TUDC, TQDC y TDC no fueron capaces de inhibir la carga de FITC-GUDC cuando los núcleos se incubaron durante 2 min con 5  $\mu\text{M}$  de este derivado fluorescente y con 100  $\mu\text{M}$  de cualquiera de los ABs mencionados (datos no mostrados).

#### **4.1.3. EFECTO DEL VOLUMEN NUCLEAR SOBRE LA CARGA DE COMPUESTOS FLUORESCENTES**

Para estudiar la influencia del tamaño nuclear sobre la acumulación de compuestos fluorescentes en los núcleos, se diseñaron una serie de experimentos en los que se modificó el tamaño nuclear por la presencia de diferentes concentraciones de sacarosa (0-250 mM) en el medio de incubación.

Cuando se incubaron núcleos aislados de hepatocitos de rata con FITC-GC (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de sacarosa y se analizaron por citometría de flujo, ya no se distinguieron las dos poblaciones de núcleos grandes y pequeños. Los núcleos se distribuían en un amplio rango de tamaño (Fig. 5A), cuyo valor medio dependía de la concentración de sacarosa en el medio de incubación (Fig. 5B).

Al combinar datos obtenidos a partir de la misma preparación de núcleos aislados e incubados con diferentes concentraciones de sacarosa, se pudo analizar un gran número de núcleos de diferentes tamaños. Estos se dividieron en 5 segmentos de tamaño que contenían un número de núcleos similar (>1000). Los valores de los experimentos realizados con sacarosa 0 y 50 mM no se incluyeron, porque el tamaño de los núcleos no se distribuyó en todos los segmentos de rango arbitrario que se establecieron, sino que se concentró casi exclusivamente en uno de ellos.



**Fig. 5.** (A) Diagrama de puntos o “Dot plot” representativo del tamaño nuclear frente a la fluorescencia acumulada, tras 30 min de incubación a 37°C, de los núcleos aislados con un medio que contenía 10 μM de colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC), sacarosa 250 mM, y HEPES/Tris 10 mM a pH 7,4. (B) Tamaño medio de los núcleos aislados de hepatocitos incubados en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa (0-250 mM). Los valores son las medias ± EEM de 4 preparaciones de núcleos diferentes. (C) Experimentos representativos de la captación de compuestos fluorescentes por estos núcleos. Los núcleos se incubaron con 10 μM de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (●), FITC-dextrano de 4 kDa (○) o FITC-GC (▲) a 37°C durante 30 min. Cada punto es el valor medio de más de 1.000 núcleos del mismo segmento arbitrario de tamaño. (D) Media ± EEM de los valores de la intersección con el eje Y (barras blancas) y de las pendientes de las rectas de ajuste (barras negras) obtenidas en 4 experimentos individuales similares a los ilustrados en C. \**p* < 0.05, significativamente diferente de FITC mediante el test de Bonferroni.

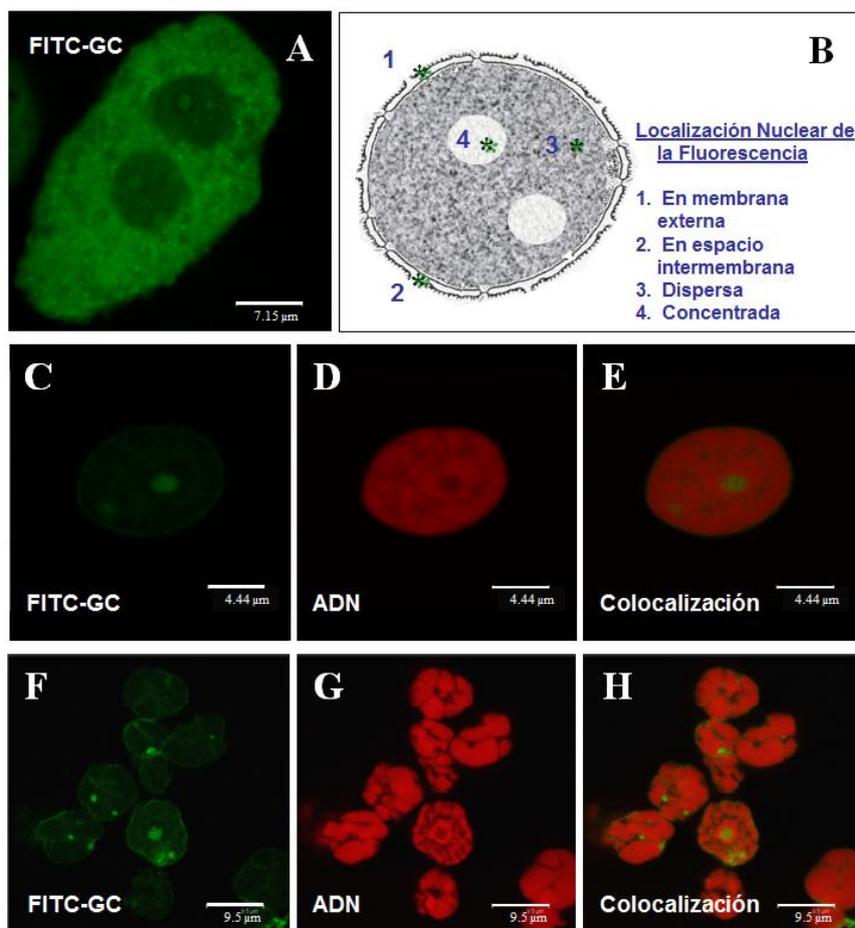
Quando se representó el valor del tamaño medio de cada segmento (corregido por el número de eventos en cada uno) frente a la fluorescencia se observó una correlación lineal estadísticamente significativa entre el volumen nuclear y la acumulación de FITC, de FITC-GC y de un FITC-dextrano de 4 kDa (FD-4S) que también se incluyó en el estudio (Fig. 5C). El punto de corte de las rectas de regresión con el eje de ordenadas, que presumiblemente corresponde a la retención del compuesto fluorescente en un compartimento independiente del volumen nuclear, fue muy similar para los tres compuestos fluorescentes (Fig. 5D). Sin embargo la pendiente, es decir, la fluorescencia acumulada probablemente en el espacio

intranuclear cuyo volumen podemos modificar con sacarosa, era significativamente menor en el caso del FITC-GC que en los del FITC y el FD-4S (Fig. 5D). Hay que señalar que la fluorescencia de estos compuestos no se vio modificada por la presencia de sacarosa en el medio.

El hecho de que la acumulación intranuclear de FITC y del dextrano de 4 kDa sean similares, mientras que el FITC-GC, con un peso molecular intermedio entre ambos, presenta una acumulación intranuclear significativamente menor, apoya la hipótesis de que, además de un componente difusional, deben existir otros mecanismos de transferencia afectados por factores, no estrictamente dependientes del peso molecular y la carga, que determinen el contenido nuclear total de moléculas pequeñas, entre ellas los ABs.

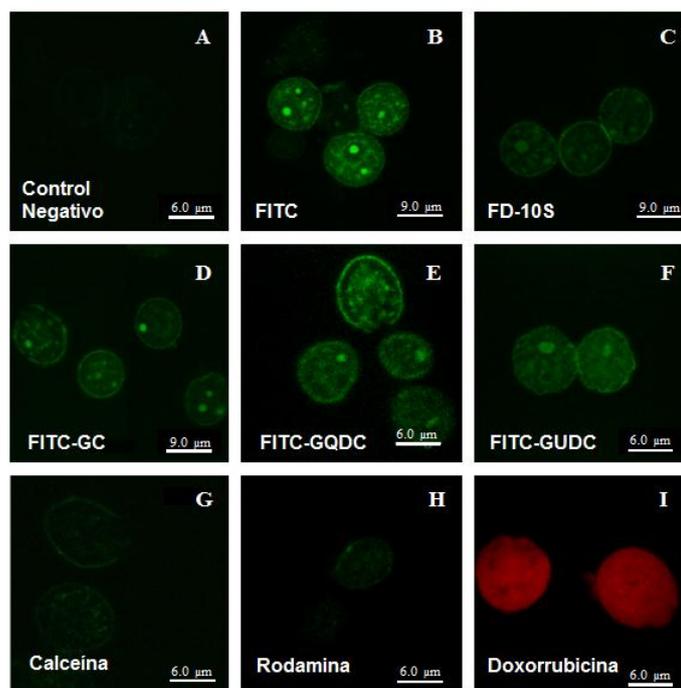
#### **4.1.4. LOCALIZACIÓN DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE ÁCIDOS BILIARES EN EL NÚCLEO**

Nos planteamos a continuación tratar de visualizar los derivados fluorescentes de ABs en el núcleo, para conocer su distribución y localización en ese compartimento. En primer lugar se hicieron estudios en hepatocitos de rata en cultivo primario, que se incubaron con 20  $\mu$ M de FITC-GC durante 30 min, a 37°C. En el microscopio confocal se observó una marcada fluorescencia verde en el citosol, junto con una señal mucho más débil en el núcleo (Fig. 6A), donde el FITC-GC se distribuía en diferentes compartimentos, como se esquematiza en la figura 6B. Dentro del espacio intranuclear la fluorescencia del FITC-GC aparecía dispersa en el nucleoplasma, pero también acumulada en ciertos puntos de mayor intensidad (Fig. 6A). El mismo tipo de estudios se llevó a cabo también con núcleos previamente aislados de hepatocitos de rata, e incubados con el derivado fluorescente del AB (Fig. 6C-6H). En este caso, la fluorescencia del FITC-GC se observó con mayor nitidez localizada en la envuelta nuclear y en el interior del núcleo, tanto dispersa como concentrada en ciertas regiones (Fig. 6C y 6F). Las zonas del núcleo en las que se concentraba el AB eran regiones en las que el ADN parecía estar en un estado de empaquetamiento más laxo, ya que la fluorescencia del yoduro de propidio era menos intensa en ellas (Fig. 6D y 6E).



**Fig. 6.** (A) Imagen representativa de microscopía confocal de un hepatocito binucleado de rata en cultivo primario tras la incubación durante 30 min con colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC) 20  $\mu$ M. (B) Representación esquemática de la localización de la fluorescencia en los compartimentos del núcleo, indicada con asteriscos. (C-H) Se llevaron a cabo experimentos similares con núcleos aislados que, tras la incubación con FITC-GC (fluorescencia verde, C y F), se fijaron y su ADN se tiñó con 50  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio (fluorescencia roja, D y G). (E y H) Co-localización de FITC-GC y ADN.

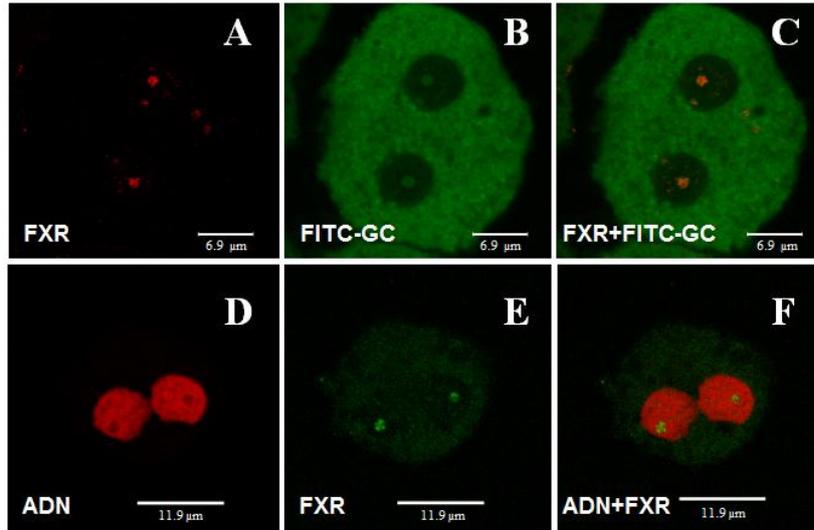
El mismo patrón de distribución nuclear se encontró cuando se incubaron tanto las células (datos no mostrados) como los núcleos aislados con FITC (Fig. 7B), con el FITC-dextrano de 10 kDa (Fig. 7C), y con varios derivados fluorescentes de ABs: FITC-GC (Fig. 7D), FITC-GQDC (Fig. 7E), o FITC-GUDC (Fig. 7F). Sin embargo, en el caso de núcleos incubados con calceína (Fig. 7G) o rodamina 123 (Fig. 7H), la intensidad de la fluorescencia fue mucho menor, comparable a la autofluorescencia de los núcleos no incubados con agentes fluorescentes, que se utilizaron como control negativo (Fig. 7A), y no se observaron zonas intranucleares más intensas. La doxorubicina, que penetraba en el núcleo con gran facilidad (Fig. 4C), se distribuía en él homogéneamente, con una fluorescencia roja intensa (Fig. 7I).



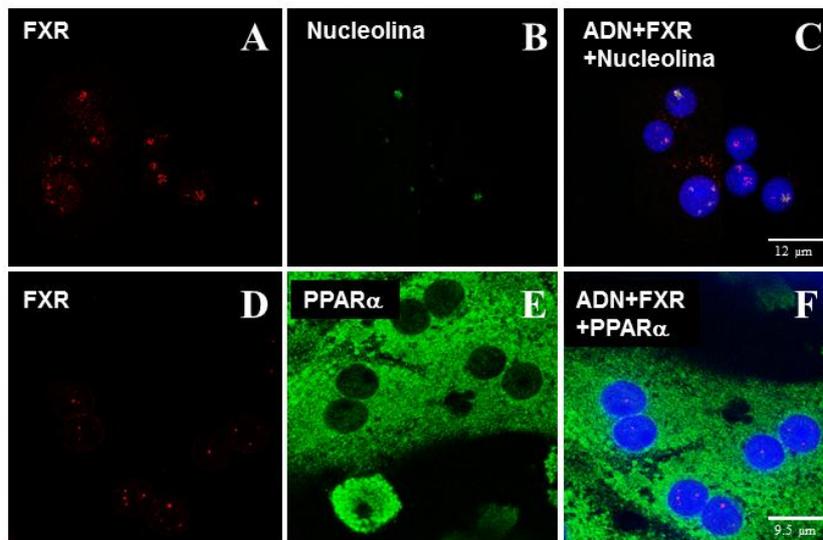
**Fig. 7.** Imágenes representativas, obtenidas mediante microscopía confocal, de núcleos aislados de hepatocitos de rata tras la incubación con diferentes agentes fluorescentes. **(A)** La autofluorescencia de los núcleos no incubados se consideró como control negativo. **(B-I)** Los núcleos se incubaron durante 30 min con 20  $\mu$ M de isotiocianato de fluoresceína (FITC) **(B)**, un dextrano de 10 kDa marcado con FITC (FD-10S) **(C)**, colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC) **(D)**, quenodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GQDC) **(E)**, ursodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GUDC) **(F)** o con 5  $\mu$ g/ml de calceína **(G)**, rodamina 123 **(H)**, o doxorubicina **(I)**.

El siguiente paso de nuestro estudio fue poner a punto la inmunolocalización, en hepatocitos de rata en cultivo primario, del receptor nuclear de ABs, FXR, utilizando para ello un anticuerpo comercial específico (Fig. 8). La fluorescencia correspondiente a FXR se localizó fundamentalmente en el núcleo, en determinadas zonas donde parecía acumularse (Fig. 8A y 8E). En hepatocitos preincubados con FITC-GC se observó que la señal intranuclear de FXR se localizaba en las mismas regiones de baja densidad de ADN en las que también se concentraba el AB (Fig. 8C).

Estos estudios de inmunocitoquímica combinada con microscopía confocal se extendieron también a la nucleolina y a otro receptor nuclear no relacionado con los ABs, el PPAR $\alpha$ , para profundizar en la especificidad y el significado fisiológico de la co-localización de ABs y FXR (Fig. 9). Se empleó nucleolina como un marcador de regiones en las que la cromatina está transcripcionalmente activa (Mongelard y Bouvet, 2007; Storck et al., 2007).



**Fig. 8.** (A-C) Imágenes representativas de microscopía confocal de la localización de FXR (A, fluorescencia roja), FITC-GC (B, fluorescencia verde) o ambos en hepatocitos de rata en cultivo primario preincubados durante 30 min con 20  $\mu$ M de colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC) (C). Tras la incubación, los hepatocitos se fijaron y se llevó a cabo la detección por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico frente a FXR. (D y E) En una preparación diferente, el ADN se marcó con yoduro de propidio (fluorescencia roja) (D) y FXR con fluorescencia verde (E). En la imagen F se muestra una mezcla de ambas fluorescencias.



**Fig. 9.** Imágenes representativas, obtenidas mediante microscopía confocal, de la localización en hepatocitos de rata en cultivo primario, de FXR (A, fluorescencia roja), nucleolina (B, fluorescencia verde), o ambas, junto a la tinción del ADN con DAPI (fluorescencia azul) (C). En una preparación diferente, se realizó un doble marcaje por inmunofluorescencia de FXR (rojo, D) y PPAR $\alpha$  (verde, E). En la imagen F se muestra una mezcla de ambas fluorescencias junto a la azul debida a la tinción del ADN con DAPI.

La inmunodetección de FXR y nucleolina puso de manifiesto la co-localización de ambas proteínas en pequeñas regiones intranucleares (Fig. 9A-9C). Por el

contrario, PPAR $\alpha$  mostró una localización fundamentalmente citosólica, ya descrita para algunos receptores nucleares de tipo II y en ciertas subpoblaciones de PPAR $\alpha$  en tejido hepático (Patel et al., 2005; Sumanasekera et al., 2003). La inmunodetección de FXR y PPAR $\alpha$  evidenció una localización subcelular diferente de ambos receptores: distribución principalmente nuclear en el caso de FXR y citosólica en el caso de PPAR $\alpha$  (Fig. 9D-9F).

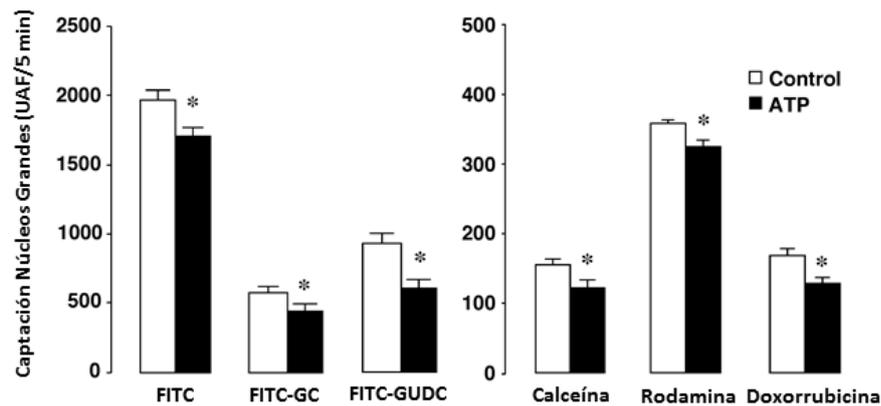
En resumen, los estudios de microscopia confocal mostraron que los derivados fluorescentes de ABs aparecen en la envuelta nuclear y también dentro del núcleo donde, sin embargo, no se distribuyen de manera homogénea, sino que se concentran en determinadas regiones en las que la cromatina está menos densamente empaquetada, pues son zonas que presentan un marcaje más débil con yoduro de propidio. Este tipo de distribución no se da en el caso de otros compuestos fluorescentes que también entran en el núcleo, como por ejemplo la doxorubicina. Por inmunocitoquímica pudimos comprobar que estas regiones coinciden con la localización subnuclear del receptor de ABs, FXR, lo que sugiere que es la interacción específica con su receptor lo que determina la localización de los ABs en el núcleo. Además, las zonas del núcleo donde se concentran los ABs y se localiza FXR corresponden a regiones de transcripción activa de genes, como lo demuestra la presencia en ellas de nucleolina. La co-localización en el núcleo de nucleolina y otros receptores nucleares, como el receptor de glucocorticoides (Schulz et al., 2001) y de estrógenos (Solakidi et al., 2007) ya se ha descrito. Esto apoya el concepto de que, además de su presencia en el nucleolo contribuyendo a la síntesis de ARNr mediada por la ARN polimerasa I, la nucleolina está también implicada la síntesis de ARNm llevada a cabo por la ARN polimerasa II en zonas transcripcionalmente activas (Angelov et al., 2006).

#### **4.1.5. EFECTO DEL ATP SOBRE LA CARGA Y EL EFLUJO NUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES Y OTROS COMPUESTOS FLUORESCENTES**

Para profundizar en la naturaleza de los mecanismos implicados en la captación y/o retención nuclear de los derivados fluorescentes de ABs, se realizaron experimentos cuyo objetivo era investigar si éste es un proceso dependiente de energía.

Para ello los núcleos aislados se incubaron con los compuestos fluorescentes a estudiar en presencia de ATP, junto con un sistema regenerante del mismo (Marin

et al., 1995). Este método se utiliza habitualmente para estudiar la dependencia de ATP del transporte a través de membrana en sistemas, como las vesículas de membrana plasmática, en las que la maquinaria celular implicada en la generación de energía no está presente, incluyendo los estudios de transporte en núcleos aislados (Enss et al., 2003).



**Fig. 10.** Efecto del ATP sobre la captación de compuestos fluorescentes en la población de núcleos grandes. Los núcleos se incubaron en presencia de 20  $\mu$ M de isotiocianato de fluoresceína (FITC), colilglicilamido fluoresceína (FITC-GC), ursodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GUDC) o de 5  $\mu$ g/ml de calceína, rodamina 123 o doxorubicina durante 5 min a 37°C en presencia o ausencia de ATP. Los valores son medias  $\pm$  EEM de los valores de fluorescencia media, obtenidos por citometría de flujo, de las poblaciones de núcleos en 5 experimentos realizados por duplicado con 5 preparaciones de núcleos distintas. \* $p < 0,05$ , al comparar núcleos incubados en presencia o ausencia de ATP en el medio. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia.

La cantidad de compuesto fluorescente incorporado al núcleo se determinó por citometría de flujo tras un periodo de 5 min de incubación con los agentes fluorescentes (Fig. 10). Se observó que la presencia de ATP en el medio redujo de manera moderada, aunque estadísticamente significativa, la carga nuclear de los compuestos ensayados. En el caso del FITC, por ejemplo, la fluorescencia media de los núcleos fue 13% menor que la que se encontró en ausencia de ATP (Fig. 10).

Estos resultados sugieren la existencia de un efecto inhibitorio o limitante del ATP sobre la carga nuclear de estos compuestos, lo que podría deberse, bien a que el ATP bloquea su entrada en el núcleo a través de los NPCs, o bien a que existen sistemas dependientes de ATP que facilitan su expulsión, reduciendo así la carga nuclear. Se ha descrito que la difusión de pequeños iones a través de los canales

periféricos del NPC es sensible al ATP (Shahin et al., 2001), pero no se sabe si esto afecta también al paso de moléculas de pequeño tamaño como las aquí estudiadas.

Además del efecto del ATP, en estos ensayos se puso otra vez de manifiesto que la conjugación con un AB, ya sea el GC o el GUDC, tenía como consecuencia una reducción de la carga nuclear de FITC. De nuevo, no podemos saber si esto se debe a que la unión al AB dificulta de algún modo la entrada del compuesto fluorescente en el núcleo a través del NPC, por ejemplo al aumentar el tamaño o cambiar las propiedades fisicoquímicas de la molécula, o a que facilita su expulsión a través de un mecanismo aún no conocido y que, de acuerdo con nuestros resultados, podría ser dependiente de ATP.

Otro de los compuestos investigados, la doxorubicina o adriamicina, es un antibiótico derivado de la antraquinona que se utiliza como agente inmunosupresor e inhibidor de la transcriptasa reversa y de la ARN polimerasa. Es sustrato de la bomba exportadora MDR1 y también de proteínas de la familia MRP ("Multidrug Resistance-associated Protein") (Hendrikse, 2000). En células tumorales que sobreexpresan estas proteínas se reduce el contenido intracelular de doxorubicina y, como consecuencia de ello, su unión al ADN nuclear. En presencia de ATP la fluorescencia media de doxorubicina determinada en los núcleos fue inferior a la registrada en ausencia de ATP (Fig. 10). Lo mismo ocurrió en el caso de núcleos incubados con calceína, un polianión de pequeño tamaño (666 Da) que también es sustrato de las proteínas exportadoras de la familia MRP (Feller et al., 1995).

Por último, se incluyó en el estudio la rodamina 123, un compuesto fluorescente de naturaleza catiónica que, precisamente por ello, tiende a acumularse en las mitocondrias, siendo útil para estudiar el potencial de membrana mitocondrial. La fluorescencia media de los núcleos tratados con rodamina también experimentó un descenso con la presencia de ATP en el medio (Fig. 10).

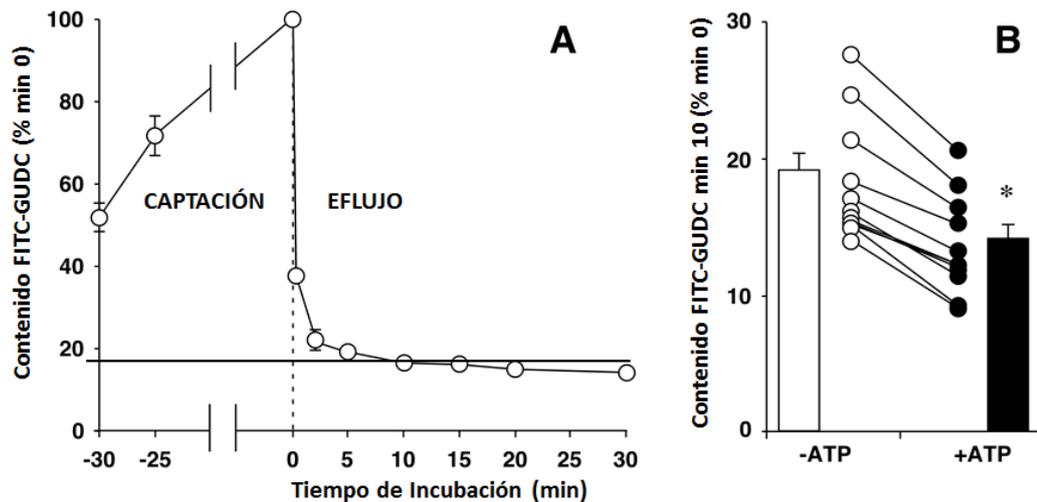
Estos resultados refuerzan la evidencia de que existen en el núcleo mecanismos capaces de limitar o reducir la carga nuclear de moléculas de pequeño tamaño, que podrían ser dependientes de ATP. El hecho de que tanto la calceína como la doxorubicina, al igual que los ABs y el FITC (Dhar et al., 1998), sean sustrato de bombas transportadoras de la familia ABC, que son capaces de expulsarlos de las células a expensas de la hidrólisis de ATP, sugiere que quizá en la envuelta nuclear existen también transportadores de ese tipo, que aún no han sido identificados, y que

podieran expulsar del núcleo moléculas que por su pequeño tamaño entren libremente a través de los NPCs.

A la vista de los resultados que acabamos de describir, y para profundizar en los mecanismos que podrían estar implicados en el descenso de la carga nuclear de los derivados fluorescentes de ABs en presencia de ATP, se realizaron experimentos en los que se pre-cargaron núcleos aislados con estos agentes para estudiar posteriormente su salida al medio. Tras 30 min de incubación a 37°C en un medio que contenía 20  $\mu$ M del AB fluorescente (Fig. 11A), los núcleos se suspendían en 100 volúmenes de medio sin agente fluorescente, que contenía o no ATP y un sistema regenerante de ATP. Mediante citometría de flujo se analizó la fluorescencia retenida en los núcleos a diferentes tiempos de eflujo.

Como se observa en la figura 11A, el contenido de FITC-GUDC en los núcleos pre-cargados disminuyó rápidamente al ponerlos en el medio libre de fluorescencia, hasta alcanzar valores más o menos estables, de aproximadamente un 20% de la carga inicial, a los 5-10 min de iniciarse el eflujo. Resultados similares se obtuvieron también en núcleos pre-cargados con FITC-GC (datos no mostrados).

En la figura 11B se comparan los niveles de FITC-GUDC en los núcleos determinados en el min 10 de eflujo, cuando éste ocurría en ausencia o en presencia de ATP en el medio. El contenido fue siempre inferior en los núcleos incubados en presencia de ATP, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Cuando se representaron los resultados obtenidos en las distintas preparaciones de núcleos aislados de manera individual, se observó que el fenómeno se repetía en todos los casos dentro de la misma preparación (Fig. 11B).



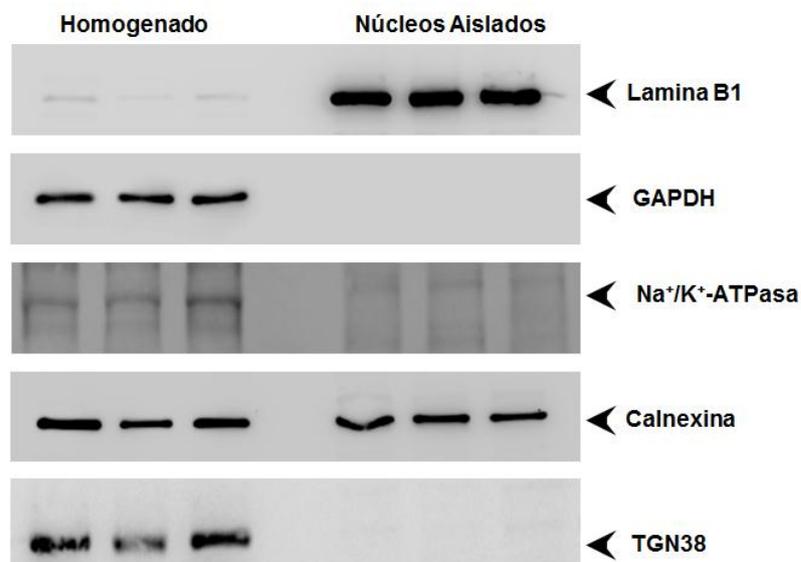
**Fig. 11. (A)** Evolución temporal del contenido de ursodesoxicolilglicilamido fluoresceína (FITC-GUDC) en núcleos pre-cargados durante 30 min con 20  $\mu$ M de FITC-GUDC (CAPTACIÓN) e incubados después 30 min en un medio sin FITC-GUDC (EFLUJO). **(B)** Contenido de FITC-GUDC en los núcleos tras 10 min de eflujo en presencia (+ATP) o ausencia (-ATP) de ATP y un sistema regenerante de ATP en el medio de incubación. Los valores son medias  $\pm$  EEM de los valores de fluorescencia media, obtenidos por citometría de flujo, en 5 experimentos realizados por duplicado con 5 preparaciones de núcleos distintas. Se muestran también los valores individuales obtenidos en cada experimento. Los datos corresponden a la población de núcleos grandes y están expresados en porcentaje respecto del contenido nuclear de FITC-GUDC a tiempo 0 min. \* $p < 0,05$ , al comparar los núcleos incubados en presencia y en ausencia de ATP por el test de valores apareados.

Estos resultados también apoyan la hipótesis de la presencia en la envuelta nuclear de una bomba de eflujo estimulada por ATP. Son muchos los sistemas de transporte a través de membranas que son activados por el ATP, como las proteínas de la familia ABC ("ATP Binding Cassette") de la membrana plasmática, capaces de expulsar una amplia variedad de sustratos de las células donde se expresan, reduciendo así su concentración intracelular. La existencia en la membrana nuclear de transportadores de este tipo podría reducir el contenido intranuclear de moléculas de tamaño pequeño o medio, capaces de difundir hacia el interior del núcleo a través de los poros de la envuelta nuclear. Hay que tener en cuenta que de las más de 70 proteínas localizadas en la membrana de la envuelta nuclear sólo se conoce la función de menos de una decena (D'Angelo y Hetzer, 2006), por lo que no es descabellado proponer que entre las más de 50 por identificar, se encuentre una o varias bombas exportadoras. Además, se han presentado evidencias que sugieren que las células de carcinoma de ovario y mama expresan MRP2 en la envuelta nuclear (Maciejczyk et al., 2011; Surowiak et al., 2006), una proteína de la superfamilia ABC capaz de transportar gran variedad de aniones orgánicos, aunque no ABs monoaniónicos.

## 4.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE LA FAMILIA ABC EN LA ENVUELTA NUCLEAR DE HEPATOCITOS DE RATA

Los resultados descritos en el apartado anterior parecen sugerir la existencia, en la envuelta nuclear, de proteínas ATP-dependientes capaces de expulsar del núcleo de forma selectiva diferentes compuestos orgánicos de tamaño medio. Tanto la doxorubicina como la calceína y los ABs marcados con fluoresceína son sustratos de bombas de eflujo de la familia ABC (Briz et al., 2007). La presencia de una de estas proteínas en la envuelta nuclear podría explicar la reducción del contenido nuclear de estos compuestos en presencia de ATP.

Con el fin de investigar esta hipótesis, se decidió estudiar la presencia de varias proteínas transportadoras de la familia ABC en núcleos aislados de hepatocitos de rata. En primer lugar se determinó, por Western blot, la pureza de las preparaciones de núcleos aislados, para confirmar la ausencia de contaminación con otras membranas, tanto de la membrana plasmática como de las membranas de otros orgánulos subcelulares (Fig. 12).



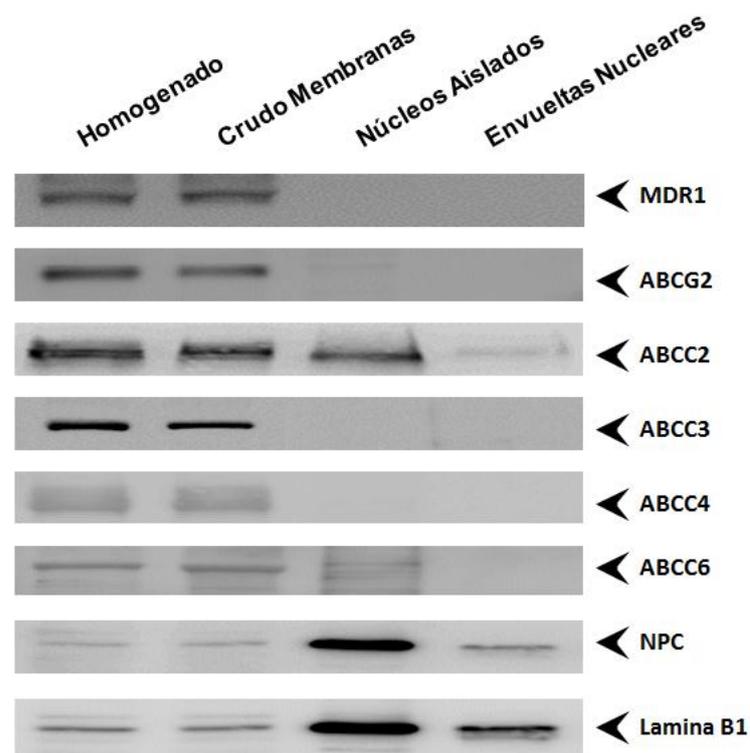
**Fig. 12.** Detección por Western blot de diferentes marcadores de orgánulos y membranas celulares en tres homogenados hepáticos (calles 1-3) y tres preparaciones de núcleos aislados de hepatocitos de rata (calles 4-6). La detección se llevó a cabo utilizando los correspondientes anticuerpos específicos (tabla 4 de Material y Métodos). Se cargaron 25 µg de proteína en cada calle. Los pesos moleculares de las bandas se corresponden con los esperados para lamina B1 (68 kDa), GAPDH (37 kDa), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (110 kDa), calnexina (90 kDa) y para la proteína de la red trans del Golgi TGN38 (38 kDa).

Se llevó a cabo la inmunodetección de marcadores característicos de diferentes orgánulos y membranas celulares en varias preparaciones de homogenado hepático y de núcleos de hepatocitos de rata aislados a partir de estos homogenados. En la figura 12 se muestran imágenes representativas correspondientes a este estudio. Observamos un claro enriquecimiento de las preparaciones de núcleos con lamina B1. Esta proteína se localiza adherida a la cara interior de la envuelta nuclear interna (Dechat et al., 2008; Gruenbaum et al., 2005), por lo que se empleó como marcador nuclear. Por el contrario, en las preparaciones de núcleos no se apreció contaminación con proteínas citosólicas (la enzima GAPDH, abundante en homogenado, no se detectaba), con membrana plasmática (ausencia de la enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa), ni con el aparato de Golgi (ausencia de la proteína de la red trans-Golgi TGN38). En los núcleos aislados sí se detectó calnexina, una proteína integral de membrana que se localiza tanto en el retículo endoplasmático (RE) como en la envuelta nuclear externa (Dreger et al., 2001), por lo que su presencia en las fracciones nucleares aisladas era esperable. Estos resultados nos confirman la ausencia de contaminación con otros orgánulos celulares de las preparaciones de núcleos aislados, cuya morfología y aparente integridad funcional se habían puesto ya de manifiesto en los experimentos descritos en el apartado 4.1.

A partir de estas preparaciones de núcleos se aislaron y purificaron las envueltas nucleares. Para ello se sometieron los núcleos a digestión con ADNasas y ARNasas (apartado 3.2.9.1.). Para caracterizar las preparaciones se determinó su empobrecimiento en ADN. Al final del proceso se consiguió reducir el contenido de ADN al 15-20% del determinado inicialmente en las preparaciones de núcleos. Las envueltas o membranas nucleares así obtenidas se incluyeron, junto con los núcleos de partida, en el análisis por Western blot de una serie de proteínas de la superfamilia ABC que se expresan en el tejido hepático sano (Fig. 13). Se incluyeron también muestras de homogenado hepático (calle 1) y de crudo de membranas (calle 2) como controles positivos de las proteínas de interés. En todos los casos se cargó la misma cantidad de proteína (25  $\mu\text{g}$ ) en cada calle. Como marcadores de la envuelta nuclear se utilizaron lamina B1 y nucleoporina, proteína que forma parte del NPC.

Todas las proteínas ABC analizadas se detectaban en las muestras de homogenado hepático y de crudo de membranas (Fig. 13), obteniéndose bandas de diferente intensidad, pero del peso molecular esperable en todos los casos. Estas bandas no aparecían en las preparaciones de núcleos y envueltas nucleares aislados, con una excepción. La banda de 190 kDa correspondiente a Mrp2 (Abcc2) se

detectaba no sólo en las muestras de homogenado y crudo de membranas, como era esperable tratándose de una proteína de la membrana canalicular del hepatocito, sino también en las muestras de núcleos y envueltas nucleares. También con el anticuerpo frente a Abcc6 se detectó una señal tenue en la calle de los núcleos (Fig. 13), pero la doble banda observada no se correspondía exactamente con la única banda detectada en homogenado y crudo de membrana, y no aparecía tampoco en las muestras de envuelta nuclear, por lo que pensamos que probablemente se trata de una señal inespecífica.



**Fig. 13.** Imágenes representativas de la detección por Western blot de proteínas de la superfamilia ABC en muestras de homogenados hepáticos de rata (calle 1), y preparaciones de crudo de membranas (calle 2), de núcleos aislados de hepatocitos de rata (calle 3) y de envueltas nucleares aisladas (calle 4). Se cargaron 25 µg de proteína en cada calle. Los pesos moleculares de las bandas se corresponden con los esperados para cada transportador: MDR1 (140 kDa), ABCG2 (72 kDa), ABCC2 (190 kDa), ABCC3 (180 kDa), ABCC4 (159 kDa) y ABCC6 (170 kDa), y para cada uno de los dos marcadores de envuelta nuclear empleados, el complejo de poro nuclear (NPC) (62 kDa) y lamina B1 (68 kDa). La detección se llevó a cabo utilizando los anticuerpos indicados en la tabla 4 de Material y Métodos.

La señal para Mrp2 detectada en las fracciones nucleares llamó nuestra atención ya que era la primera vez que se describía la localización nuclear de esta proteína en hepatocitos. Sin embargo, aunque con resultados poco contundentes, ya se había sugerido la presencia de MRP2 en la membrana nuclear de células de

carcinoma de ovario (Surowiak et al., 2006) y de mama (Maciejczyk et al., 2011), mientras que Babakhanian y colaboradores han descrito la presencia de la p-glicoproteína (Mdr1) en la envuelta nuclear de células cerebrales de rata (Babakhanian et al., 2007). Sin embargo, en nuestras preparaciones de núcleos aislados y envueltas nucleares no observamos señal positiva para Mdr1.

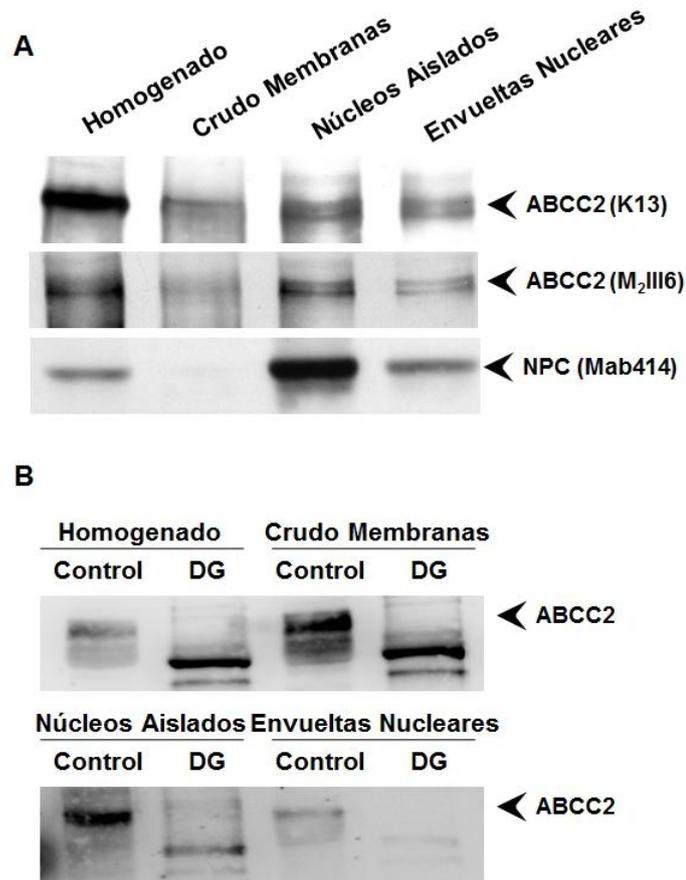
#### **4.2.1. LOCALIZACIÓN DE MRP2 EN LA ENVUELTA NUCLEAR DE HEPATOCITOS DE RATA**

Para confirmar la presencia de Mrp2 en la envuelta nuclear se decidió en primer lugar probar otros anticuerpos anti-Mrp2, que reconociesen otros epítomos de la proteína, diferentes al reconocido por el anticuerpo comercial M<sub>2</sub>III5 monoclonal de ratón utilizado en los estudios que se muestran en la figura 13. Se empleó un anticuerpo policlonal de conejo (K13), cedido amablemente por el Dr. Bruno Stieger de la Universidad de Zurich, y el anticuerpo comercial M<sub>2</sub>III6, otro anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce un epítomo situado en el extremo carboxi-terminal de la proteína Mrp2. Con ambos anticuerpos se pudo observar también una señal positiva para Mrp2, tanto en las preparaciones de núcleos aislados como en las de envueltas nucleares (Fig. 14A).

A continuación se investigó si la Mrp2 presente en la envuelta nuclear era una proteína madura y potencialmente funcional, ya que se ha demostrado que sólo las proteínas ABC N-glicosiladas muestran actividad excretora en hepatocitos cultivados en sándwich (Draheim et al., 2010). Para ello se sometió a las muestras de homogenado hepático, crudo de membranas, núcleos aislados y envueltas nucleares a un tratamiento con la enzima N-glicosidasa F (PNGasa F). Esta enzima es una amidasa que rompe el enlace N-glicosídico entre el aminoácido asparragina y oligosacaridos complejos ricos en manosa (Tretter et al., 1991).

Como se puede observar en la figura 14B, el tratamiento con PNGasa F redujo el tamaño de la proteína Mrp2 tanto en las muestras de homogenado y crudo de membranas, como en las de núcleos y envueltas nucleares. El tamaño de la proteína detectada pasó de 190 a 180 kDa. Como se indicó en el esquema 5 de la Introducción, MRP2 posee 3 sitios de N-glicosilación. Si la proteína no está glicosilada correctamente, como ocurre en el caso de la MRP2 mutada de los pacientes con síndrome de Dubin-Johnson, su tamaño es menor y es retenida y degradada en el RE (Keitel et al., 2000), lo que podría explicar su eventual localización en el

compartimento envuelta nuclear-RE. Sin embargo, la proteína que estamos detectando en la envuelta nuclear de hepatocitos de rata tiene el tamaño adecuado para la proteína madura y está glicosilada, ya que es susceptible de ser desglicosilada (Fig. 14B).



**Fig. 14. (A)** Imágenes representativas de la detección por Western blot de la proteína MRP2 (ABCC2) en muestras de homogenados hepáticos de rata (calle 1), y en preparaciones de crudo de membranas (calle 2), de núcleos aislados de hepatocitos de rata (calle 3) y de envoltas nucleares aisladas (calle 4). La detección se llevó a cabo utilizando dos anticuerpos diferentes frente a dos epítomos distintos de MRP2 (K13 y M2III6, ver tabla 4 de Material y Métodos). Se analizó también el complejo de poro nuclear (NPC) como marcador de envoltas nucleares. **(B)** Imágenes representativas de la detección por Western blot de la proteína MRP2 (ABCC2) en muestras tratadas o no con la enzima PNGasa F para desglicosilar glicoproteínas. En la imagen superior se observan las muestras tratadas (DG) o no (Control) de homogenado hepático de rata (calles 1 y 2) y de crudo de membranas (calles 3 y 4). En la imagen inferior las muestras de preparaciones de núcleos aislados de hepatocitos de rata (calles 1 y 2) y de envoltas nucleares aisladas (calles 3 y 4) tratadas (DG) o no (Control) con PNGasa F. La detección se llevó a cabo utilizando el anticuerpo monoclonal M2III6. En todos los casos se cargaron 25 µg de proteína en cada calle. El peso molecular de la banda corresponde a 190 kDa, en el caso de la proteína MRP2 madura, y a 180 kDa en el caso de la proteína desglicosilada.

Para confirmar la localización nuclear de Mrp2, a modo de control negativo decidimos emplear muestras procedentes de ratas Wistar TR<sup>-</sup>, deficientes en Mrp2,

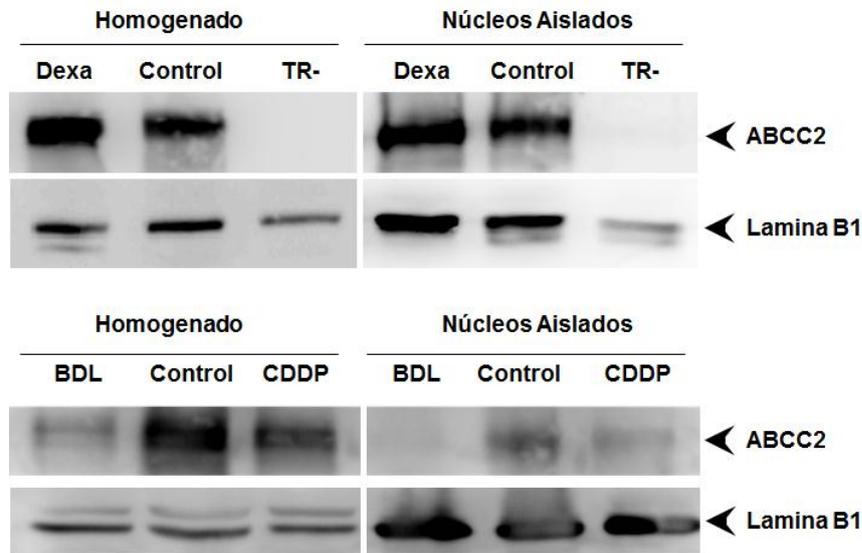
que se consideran un modelo animal del síndrome de Dubin-Johnson. En estas ratas, la delección de un nucleótido en el gen *Abcc2* provoca la reducción de los niveles de ARNm y la ausencia de proteína, con la consiguiente aparición de hiperbilirrubinemia conjugada (fenotipo TR-) (Paulusma et al., 1996). En la figura 15 se puede observar la ausencia de proteína Mrp2 en las muestras procedentes de estas ratas hiperbilirrubinémicas, tanto en homogenado hepático como en núcleos aislados. Esto sugiere que la señal detectada en los núcleos de las ratas Wistar silvestres es una señal genuina de Mrp2.

Por otro lado, decidimos investigar si los niveles de expresión de la Mrp2 perinuclear respondían a las manipulaciones experimentales que se sabe que alteran la expresión de la Mrp2 canalicular. Para ello, en primer lugar, se trataron ratas Wistar con dexametasona, un glucocorticoide sintético que induce la expresión de Mrp2 en hepatocitos de rata (Courtois et al., 1999a). En el panel superior de la figura 15 se puede apreciar el incremento de la expresión de *Abcc2* en los animales tratados durante 4 días con dexametasona (50 mg/kg p.c./día, vía i.p.), tanto en homogenado hepático como en la fracción nuclear.

La colestasis extrahepática es una patología que, entre otras alteraciones, provoca en el hígado una represión de los niveles de Mrp2, junto con un incremento compensatorio de los de otros transportadores asociados a la resistencia a fármacos (como Mrp3 o Mrp4) (Denk et al., 2004; Donner y Keppler, 2001). Para inducir quirúrgicamente la colestasis se realizó una ligadura del conducto biliar (BDL, del inglés "Bile Duct Ligation") en ratas Wistar. Tras 2 días de obstrucción se obtuvieron muestras y se analizaron mediante Western blot (Fig. 15, panel inferior), observándose una marcada reducción de los niveles de Mrp2 con respecto a los de las ratas control, tanto en el tejido hepático como en los núcleos aislados a partir del mismo.

Se ha sugerido que el cisplatino podría ser sustrato de MRP2 siempre que esté conjugado con glutatión (Paulusma et al., 1999). Existe cierta controversia acerca de la capacidad de este agente citostático de alterar los niveles de expresión de diferentes transportadores, entre ellos MRP2. Se ha descrito tanto una inducción - en hepatocitos y líneas celulares humanas expuestos a cisplatino (Kauffmann et al., 1997; Taniguchi et al., 1996) - como la ausencia de cambios en ratas tratadas con este agente (Demeule et al., 1999). El análisis de la expresión de Mrp2 en hígado de rata tras un tratamiento con cisplatino durante 4 días (2 mg/kg p.c./día, vía i.p.) puso de manifiesto, a diferencia de lo descrito en la bibliografía, un descenso en los niveles

de esta proteína. Este descenso fue evidente tanto en el homogenado hepático como en las muestras de núcleos aislados (Fig. 15, panel inferior).



**Fig. 15.** Imágenes representativas de la detección por Western blot de la proteína MRP2 (ABCC2) en muestras de homogenados hepáticos de rata (paneles izquierdos) y en preparaciones de núcleos aislados de hepatocitos de rata (paneles derechos). En cada calle se cargaron 25  $\mu$ g de proteína procedentes de muestras de ratas Wistar no tratadas (control), tratadas con dexametasona (Dexa) o cisplatino (CDDP) o con ligadura del conducto biliar (BDL). Como control negativo se utilizaron homogenados y núcleos obtenidos de ratas TR-, que no expresan MRP2. Como normalizador de carga se empleó la lamina B1 (68 kDa). El peso molecular de la banda fue el esperado para la proteína Mrp2 (190 kDa).

Todos estos resultados sugieren la presencia de la proteína Mrp2 madura y glicosilada en lo que denominaremos compartimento núcleo/retículo endoplásmico (N/RE) o compartimento perinuclear, cuyos niveles de expresión son regulables por señales que modulan la expresión de esta proteína en el canalículo biliar. Sustenta esta hipótesis la detección de la proteína con diferentes anticuerpos específicos anti-Mrp2, así como la ausencia de señal en las muestras procedentes de ratas TR-, que no expresan Mrp2. Además está el hecho de que la proteína perinuclear responde a diferentes tratamientos que inducen (dexametasona) o reprimen (BDL y cisplatino) la expresión de la Mrp2 canalicular.

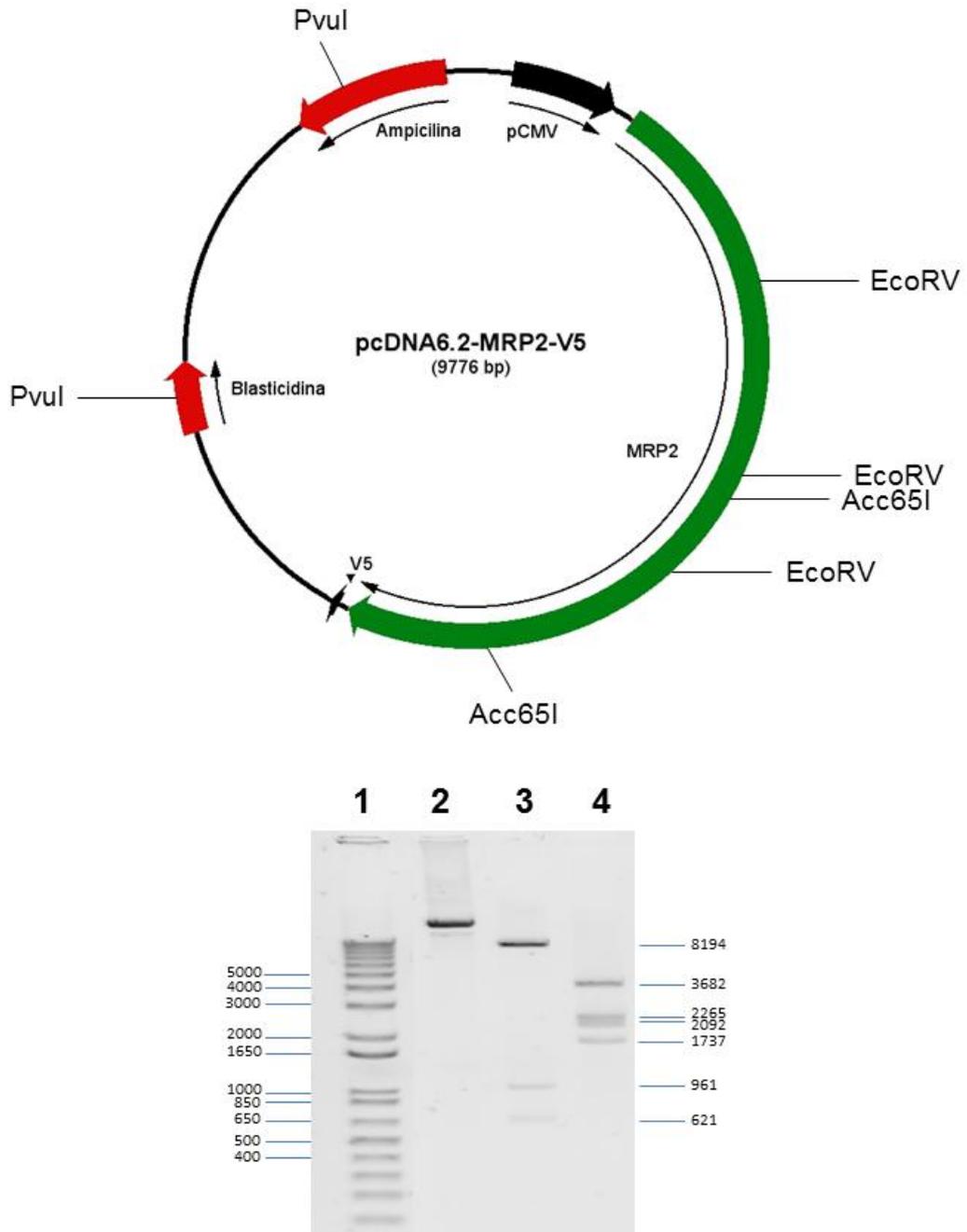
La MRP2, entre otros tejidos, se localiza en el hígado, concretamente en la membrana canalicular de los hepatocitos (Buchler et al., 1996; Keppler y Kartenbeck, 1996; Paulusma et al., 1997). Algunos estudios han sugerido la presencia de proteínas ABC en la envuelta nuclear de células de cerebro de rata y de carcinoma de ovario humano (Babakhanian et al., 2007; Surowiak et al., 2006). Basándonos en esos

estudios y en los resultados obtenidos por Western blot, nuestro siguiente objetivo fue intentar visualizar la localización subcelular de MRP2 mediante microscopía.

En una primera aproximación se realizó inmunolocalización de Mrp2 en hepatocitos de rata, tanto recién aislados como en cultivo primario, y también en las preparaciones de núcleos aislados en las que habíamos detectado la proteína por Western blot. Se probaron los tres anticuerpos frente a Mrp2 (tabla 5 de Material y Métodos) que habían dado señal positiva en las membranas y se observaron las preparaciones en el microscopio confocal, buscando co-localización con marcadores de la envuelta nuclear como la lamina B1 o la nucleoporina. Sin embargo, tras numerosos intentos modificando las condiciones del cultivo y/o del inmunomarcaje, no pudimos visualizar de manera inequívoca y reproducible Mrp2 en la envuelta nuclear de los hepatocitos, aunque sí se detectaba el transportador en la membrana plasmática y también en acúmulos intracelulares más o menos próximos al núcleo (datos no mostrados).

Este revés nos llevó a plantearnos la posibilidad de clonar MRP2 con una etiqueta que pudiéramos seguir fácilmente por inmunocitoquímica, transfectar con esa construcción células hepáticas y estudiar su localización subcelular.

Mediante tecnología Gateway se obtuvo un vector de expresión que contenía el ortólogo humano de MRP2 marcado con la etiqueta V5 (apartado 3.2.6.2. de Material y Métodos). Este vector, denominado pcDNA6.2-MRP2-V5, cuyo esquema se muestra en la figura 16, presenta en su secuencia el promotor CMV con objeto de activar la expresión de MRP2-V5 en células de mamífero. El estudio de restricción con las enzimas *EcoRV* y *Acc65I/PvuI* (Fig. 16) permitió confirmar la estructura del vector pcDNA6.2-MRP2-V5 que se había construido, pues los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión con estas enzimas coincidían con los esperados. Posteriormente, se secuenció la construcción, y no se encontraron diferencias entre la secuencia obtenida y la depositada en GenBank para la ORF de MRP2 (NM\_000392; 25-SEP-2011).

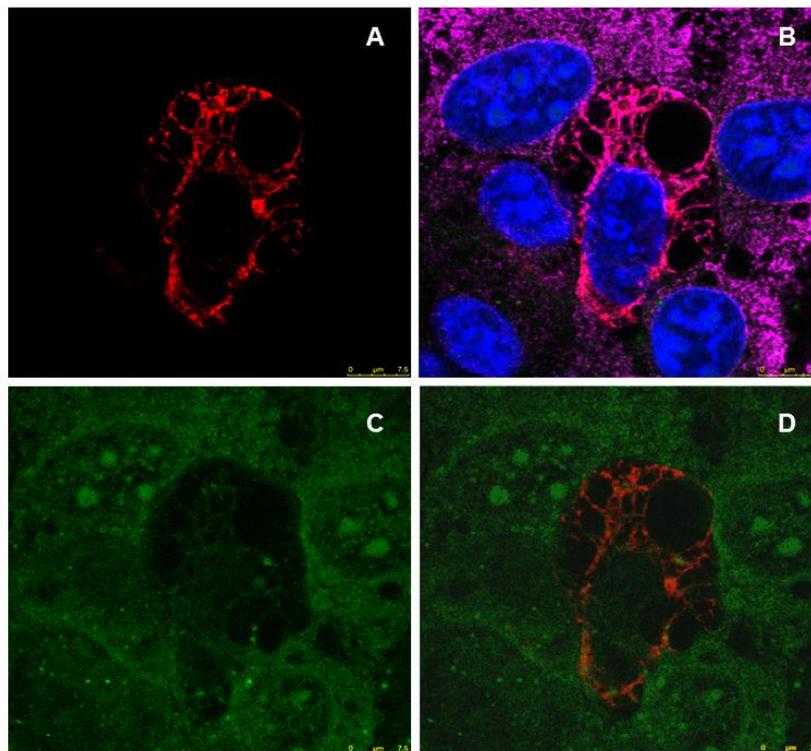


**Fig. 16.** Mapa del vector pcDNA6.2-MRP2-V5 y separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos de restricción obtenidos tras su digestión con las enzimas *EcoRV* (calle 3) y *Acc65I/PvuI* (calle 4). La calle 2 corresponde al plásmido sin digerir, y la calle 1 al patrón de tamaños del ADN.

Se transfectaron células Alexander de hepatoma humano con la construcción utilizando lípidos catiónicos (apartado 3.2.8.5.). En la figura 17 se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de las células Alexander transfectadas. Las células, 48 h después de la transfección, se incubaron durante 30 min con calceína,

un sustrato fluorescente de MRP2 (Feller et al., 1995). Se inmunolocalizó la proteína exógena MRP2 utilizando un anticuerpo frente a la etiqueta V5, y la calnexina como un marcador de RE. Se observó que la MRP2 se localizaba en el compartimento perinuclear y también en la membrana de vesículas citoplasmáticas, donde co-localizaba con calnexina (Fig. 17).

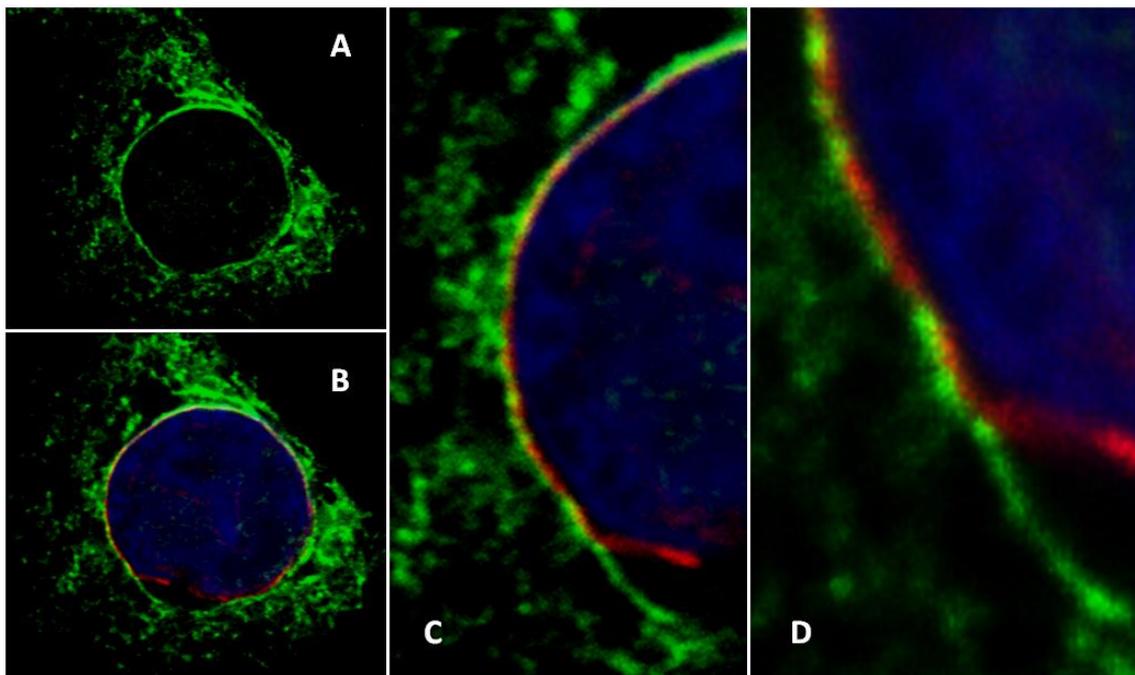
Se observó también que células transfectadas con MRP2-V5 retenían menos calceína que las células circundantes no transfectadas, lo que sugiere que se trata de una proteína funcional. Del mismo modo, el hecho de que el núcleo y las vesículas en cuya membrana se expresa la MRP2 exógena excluyan también la fluorescencia verde correspondiente a la calceína, apoya la funcionalidad de esta MRP2 de localización intracelular (Fig. 17).



**Fig. 17.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células Alexander de hepatoma humano, en cultivo. Las células se transfectaron con la construcción MRP2-V5 y 48 h después se incubaron durante 30 min con 10  $\mu$ M de calceína (fluorescencia verde). Se inmunolocalizó calnexina como marcador de retículo endoplasmático (fluorescencia violeta) y V5 como marcador de la proteína exógena MRP2-V5 (fluorescencia roja). Los núcleos, de color azul, se tiñeron con DAPI.

En la figura 18 se puede apreciar en detalle la localización perinuclear de MRP2 en las células Alexander transfectadas. Las imágenes de microscopía confocal muestran la inmunolocalización de MRP2 (fluorescencia verde) y lamina B1

(fluorescencia roja) utilizada como marcador de la envuelta nuclear interna. Las ampliaciones de la imagen (C y D) demuestran que, a pesar de su proximidad, MRP2 y lamina B1 no co-localizan exactamente, sino que MRP2 parece estar situada en la envuelta nuclear externa, mientras que la lamina B1 presenta su característica localización adherida a la cara interior a la envuelta nuclear interna (Dechat et al., 2008; Gruenbaum et al., 2005). En esta microfotografía podemos observar como las envueltas nucleares interna y externa se separan en una zona (parte inferior de la imagen), evidenciando más aún la diferente localización de ambas proteínas.



**Fig. 18.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células Alexander de hepatoma humano transfectadas con la construcción MRP2-V5. Inmunolocalización de V5 como marcador de la proteína exógena MRP2-V5 (fluorescencia verde) y de lamina B1 como marcador de la envuelta nuclear interna (fluorescencia roja). Los núcleos, de color azul, se tiñeron con DAPI. En **D** se observa una ampliación de la parte inferior de **C**, donde se aprecia la separación de las membranas nucleares externa e interna.

#### **4.2.2. ESTUDIO DE LA POSIBLE FUNCIÓN DE MRP2 EN EL COMPARTIMENTO NÚCLEO/RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

El siguiente paso de nuestro estudio fue tratar de encontrar una explicación funcional a la presencia de Mrp2 en el compartimento N/RE.

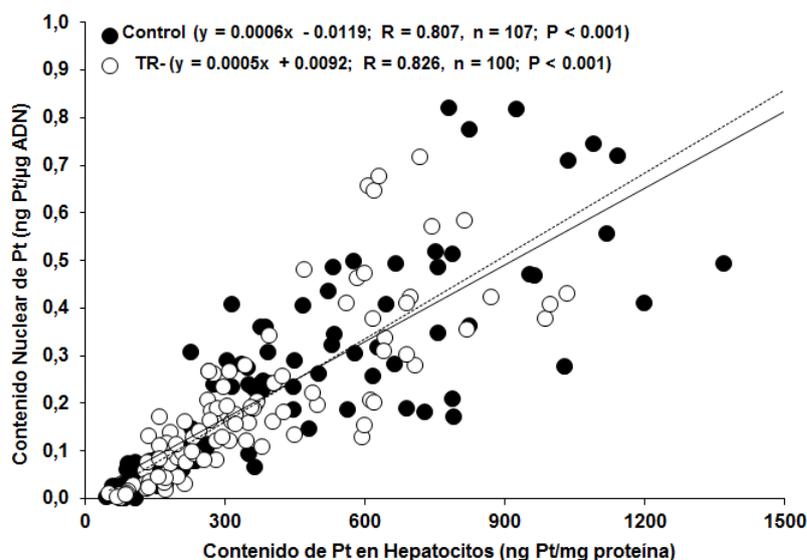
El cisplatino es un fármaco antitumoral ampliamente empleado en el tratamiento de muchos tipos de cáncer. Su mecanismo de acción se basa en su unión

a residuos de guanina del ADN para formar aductos, que interfieren con la replicación del ADN (Fichtinger-Schepman et al., 1985).

La resistencia al cisplatino se ha relacionado con la sobreexpresión de MRP2 en tejidos tumorales (Cui et al., 1999). De hecho, los mismos autores que describieron la presencia de MRP2 en la envuelta nuclear de células de carcinoma de ovario, encontraron que ésta se correlaciona positivamente con la resistencia a cisplatino en estos tumores, y con un mal pronóstico clínico (Surowiak et al., 2006). Por ello elegimos este fármaco, sustrato de MRP2, para llevar a cabo un estudio *in vitro*, utilizando hepatocitos de rata en cultivo primario expuestos a cisplatino, en los que se analizó tanto el contenido celular de este agente como el grado de platinación del ADN. La hipótesis que pretendíamos comprobar era que, si la Mrp2 localizada en la envuelta nuclear protege al ADN nuclear expulsando cisplatino de este compartimento, para un mismo nivel de cisplatino en las células deberíamos encontrar mayor grado de platinación del ADN en hepatocitos procedentes ratas TR-, que carecen de Mrp2, que en hepatocitos de ratas Wistar control.

Tras exponer el cultivo a diferentes concentraciones de cisplatino durante 3 h, las células se lisaban y el lisado se fraccionaba, empleando una parte para determinar el contenido celular total de platino (que se corrigió por la cantidad de proteínas) y el resto para aislar ADN y analizar después su cantidad y el contenido de platino, lo que permite calcular el grado de platinación del ADN. La determinación de platino se llevó a cabo mediante espectrometría de absorción atómica.

Al representar el grado de platinación del ADN frente al contenido de platino en los hepatocitos (Fig. 19), se observó que ambos parámetros se alineaban según correlaciones estadísticamente significativas. Sin embargo, las pendientes de las rectas de regresión obtenidas para hepatocitos control y TR- eran muy similares. Estos datos indican a que, a diferencia de lo esperado, para un mismo nivel intracelular del fármaco no existe una mayor acumulación de platino en los núcleos de los hepatocitos de ratas TR- que en los de ratas control.



**Fig. 19.** Relación entre el grado de platinación del ADN y el contenido total de cisplatino en hepatocitos en cultivo primario obtenidos a partir de ratas Wistar control (●) y TR-, deficientes en Mrp2 (○). Los hepatocitos se incubaron durante 3 h en un medio que contenía cisplatino a distintas concentraciones (0-200  $\mu$ M). Se muestran las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas para cada grupo (Control y TR-).

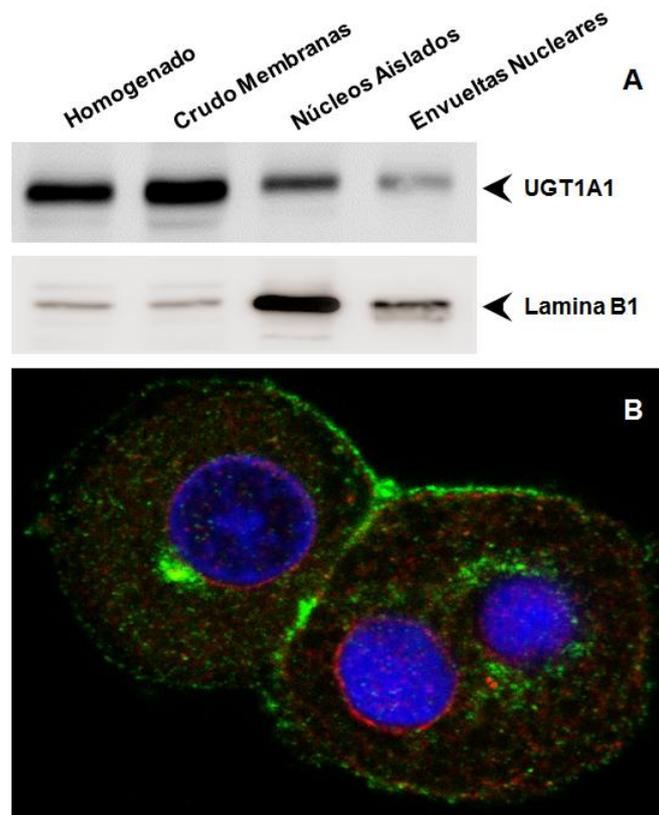
Es decir, la Mrp2 presente en el compartimento N/RE de los hepatocitos control no parece tener un papel protector del ADN nuclear frente un agente de pequeño tamaño como el cisplatino, que probablemente puede entrar con facilidad en el núcleo a través de los poros de la envuelta nuclear. Una posible explicación podría ser que el cisplatino que alcanza el núcleo lo haga sin ser previamente metabolizado (conjugado con glutatión), ya que se cree que sólo el conjugado de cisplatino, y no la forma libre, es sustrato de Mrp2 (Paulusma et al., 1999).

Aunque estos resultados no invalidan la idea de que la Mrp2 perinuclear sea una proteína madura y funcional, sigue sin estar claro qué papel podría desempeñar en esta localización subcelular.

Las UDP-glucuroniltransferasas (UGTs) constituyen una familia de enzimas implicadas en la detoxificación de una gran variedad de compuestos hidrofóbicos, tanto endógenos como exógenos. Las isoenzimas UGT se clasifican, en base a la homología de su secuencia, en dos familias, UGT1A y UGT2B. Las enzimas UGT2B catalizan la glucuronidación de ABs, esteroides, ácidos grasos y retinoides, mientras que las UGT1A llevan a cabo la glucuronidación de bilirrubina, fenoles, algunos esteroides y diversos fármacos (Radomska-Pandya et al., 1999).

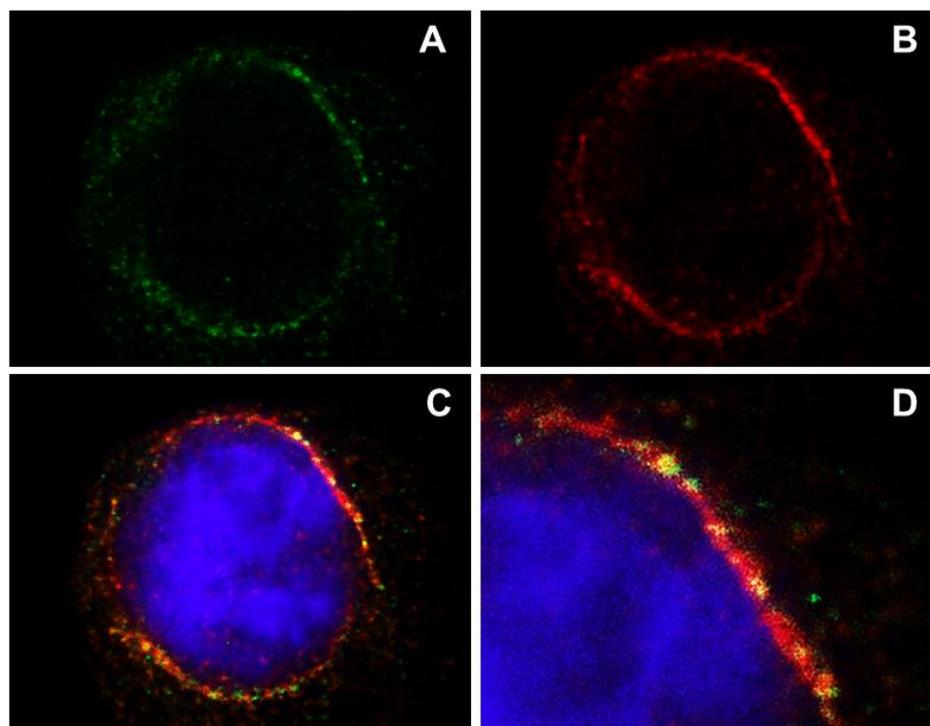
Estas enzimas se localizan unidas a la membrana del RE y algunas de ellas, como UGT1A6 y UGT2B7 se han situado también en la envuelta nuclear (Radomska-Pandya et al., 2002). En base a estos datos, al hecho bien conocido de que MRP2 en el canalículo transporta bilirrubina conjugada con ácido glucurónico a la bilis, y a que nuestros resultados apuntaban a la localización perinuclear de una Mrp2 madura y funcional en células hepáticas, decidimos estudiar la posibilidad de una “cooperación” entre la Mrp2 perinuclear y las enzimas UGTs.

En primer lugar se analizó, mediante Western blot , si la enzima conjugante de bilirrubina (Ugt1a1) estaba presente en las muestras de núcleos aislados y envueltas nucleares de hepatocitos de rata. El análisis confirmó la presencia de la enzima en estas preparaciones (Fig. 20A), en las que se había detectado también la presencia de Mrp2 (Fig. 13 a 15).



**Fig. 20.** (A) Imágenes representativas de la detección por Western blot de la enzima Ugt1a1 en muestras de homogenado hepático (calle 1), crudo de membranas (calle 2), núcleos aislados de hepatocitos de rata (calle 3) y envueltas nucleares aisladas (calle 4). Se cargaron 25  $\mu$ g de proteína en cada calle. Se empleó lamina B1 para comprobar el enriquecimiento de las preparaciones en envueltas nucleares. (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de hepatocitos de rata en cultivo primario. Inmunolocalización de Ugt1a1 (fluorescencia roja) y Mrp2 (fluorescencia verde). Los núcleos, de color azul, se tiñeron con DAPI.

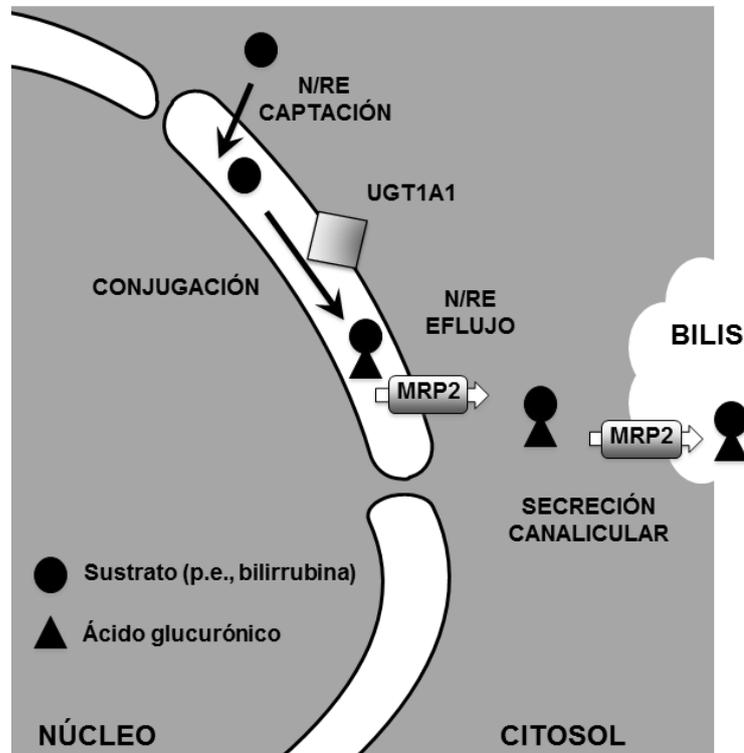
También se realizaron estudios de inmunocitoquímica para Ugt1a1 y Mrp2 en hepatocitos de rata en cultivo primario, que se visualizaron mediante microscopía confocal (Fig. 20B). Las imágenes mostraron la localización perinuclear de la enzima (fluorescencia roja). En el caso de Mrp2 (fluorescencia verde), se visualizó principalmente en la membrana plasmática, aunque también se pudo apreciar señal en zonas cercanas al núcleo, como ya habíamos observado previamente. Este mismo tipo de ensayos se llevaron a cabo en células Alexander transfectadas con la construcción MRP2-V5 (Fig. 21). En las imágenes se puede observar la localización perinuclear de MRP2 (fluorescencia verde, Fig. 21A) y de UGT1A1 (fluorescencia roja, Fig. 21B). Las imágenes C y D de la figura muestran en detalle la co-localización de ambas fluorescencia en color amarillo.



**Fig. 21.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células Alexander de hepatoma humano transfectadas con la construcción MRP2-V5. Inmunolocalización de UGT1A1 (fluorescencia roja) y de V5 como marcador de la proteína exógena MRP2 (fluorescencia verde). Los núcleos, de color azul, se tiñeron con DAPI. En **D** se observa una ampliación de **C**, donde se aprecia la co-localización de MRP2 y UGT1A1.

Estos resultados sugieren una posible función para la Mrp2 perinuclear, que podría colaborar con la enzima Ugt1a1 (u otras enzimas de la familia UGT) en el transporte intracelular de bilirrubina y otros compuestos potencialmente tóxicos, de manera que, una vez conjugados con glucurónico en el compartimento N/RE, los

derivados glucuronados podrían ser bombeados hacia el citoplasma por la MRP2 desde donde pueden ser secretados a bilis por la MRP2 situada en la membrana canalicular (Esquema 1).



**Esquema 1.** Representación esquemática de la posible función de la MRP2 perinuclear transportando bilirrubina y otros compuestos potencialmente tóxicos hacia el citosol del hepatocito, previa conjugación con ácido glucurónico por la UGT1A1.

#### **4.3. INTERACCIÓN ENTRE GLUCOCORTICOIDES Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE FXR EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC**

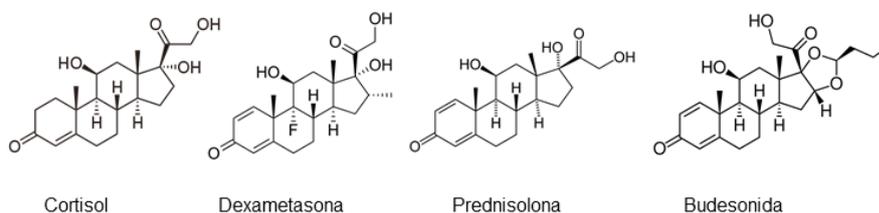
Como ya hemos comentado, en experimentos realizados *in vivo* con animales tratados con glucocorticoides, habíamos comprobado que la dexametasona, un glucocorticoide sintético empleado en la terapéutica de procesos inflamatorios, es capaz de incrementar la expresión hepática de Mrp2 en roedores (Courtois et al., 1999a; Kubitz et al., 1999b; Turncliff et al., 2004). Se cree que el efecto de los glucocorticoides sobre ésta y otras dianas no se debe sólo a su interacción directa con el receptor de glucocorticoides (GR, del inglés “Glucocorticoid Receptor”), sino que puede estar también modulado indirectamente por otros NRs. Así, el receptor nuclear CAR se ha identificado como un gen de respuesta primaria al GR, ya que posee un elemento de respuesta a glucocorticoides en su región promotora (Zollner y Trauner, 2009). Además, los glucocorticoides incrementan los niveles de ARNm y proteína de otros NRs como PXR y RXR $\alpha$ , e inducen la translocación al núcleo de CAR (Pascussi et al., 2000).

Por otra parte, algunos glucocorticoides como la budesonida o la prednisona, se han empleado en el tratamiento de diversos desórdenes colestáticos y han mostrado efectos beneficiosos sobre los parámetros séricos indicadores de lesión hepática por acumulación de sustancias biliares. También se ha observado una mejoría en la histología hepática en estos pacientes, especialmente cuando los glucocorticoides se combinan con la administración de ácido ursodesoxicólico (Leuschner et al., 1996; Mitchison et al., 1992; Rautiainen et al., 2005). Si estos efectos son sólo consecuencia de sus propiedades antiinflamatorias o si pueden ser atribuidos, en parte, a la modulación del metabolismo y/o transporte de ABs, es aún una incógnita.

Basándonos en estos antecedentes, decidimos estudiar el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión hepática de diferentes proteínas ABC y de algunos NRs relevantes en su regulación.

Para el desarrollo de este trabajo elegimos la dexametasona, la prednisolona y la budesonida (Esquema 2). Se trata de tres esteroides sintéticos con actividad glucocorticoide pero con baja actividad mineralocorticoide. El mecanismo por el que llevan a cabo sus efectos está determinado por la alta afinidad de éstos fármacos por el GR, es decir que actúan como agonistas del cortisol. Presentan actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora que justifica la mayor parte de sus utilidades

en clínica. La dexametasona es un compuesto fluorado con acción antiinflamatoria 20-30 veces más potente que la de la hidrocortisona y 7 veces más potente que la prednisolona, el derivado activo de la prednisona, generada a partir de ésta por metabolismo hepático. La metabolización de la dexametasona y la prednisolona se realiza en el hígado y su vida media en la sangre es del orden de 3-5 horas. Por el contrario, la budesonida es rápidamente metabolizada en su primer paso por el hígado que de forma muy eficaz (85%-95%) la convierte en sus metabolitos prácticamente carentes de actividad glucocorticoide. Por ello, la utilidad de la budesonida se limita prácticamente a aplicaciones tópicas.



**Esquema 2:** Estructura química del cortisol y de los agonistas utilizados en este estudio.

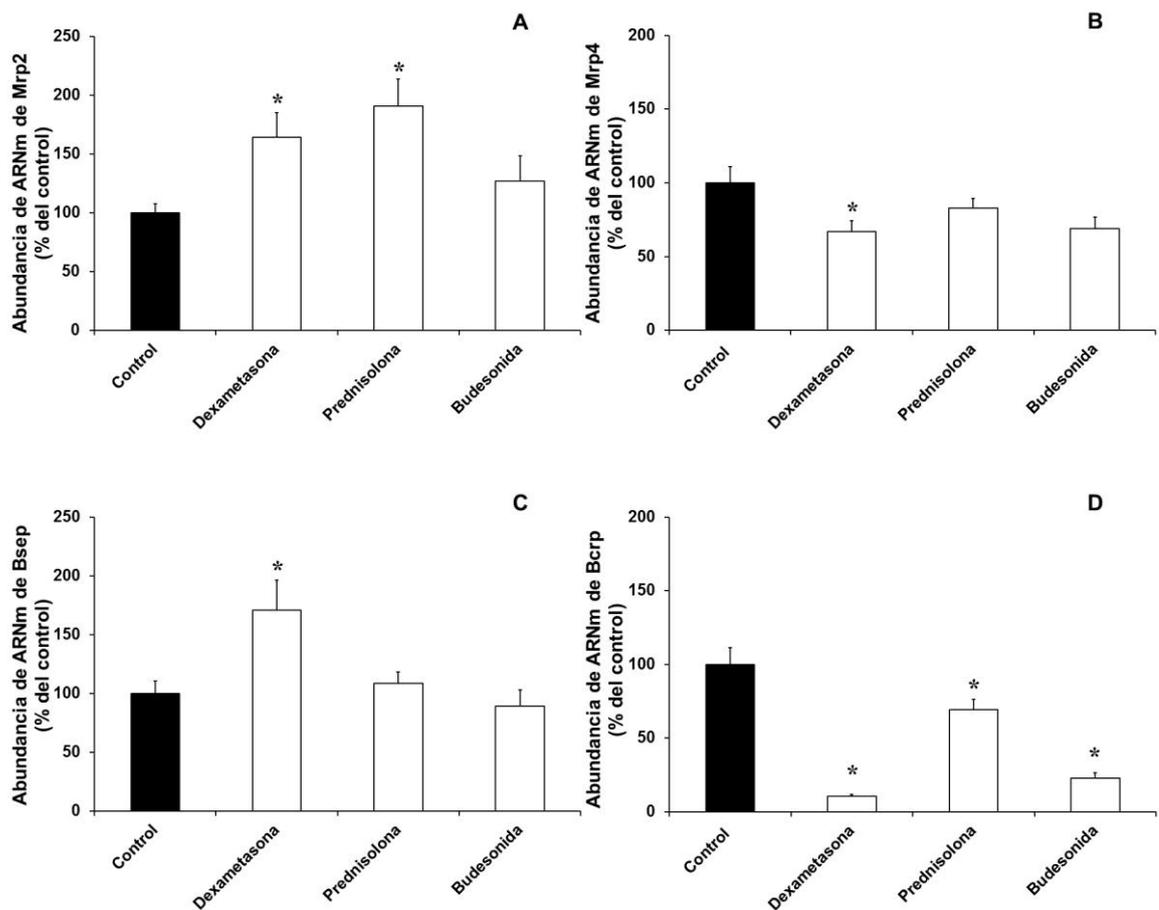
#### 4.3.1. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC EN HÍGADO DE RATA

Para investigar el efecto que los glucocorticoides ejercen sobre la expresión hepática de proteínas ABC, en primer lugar se trataron ratas Wistar con dexametasona, prednisolona o budesonida (50 mg/kg p.c./día, vía i.p.) durante 4 días. A los animales empleados como control se les administró el vehículo (aceite de maíz) siguiendo la misma pauta.

La expresión en hígado de los genes de interés se determinó por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (apartado 3.2.7. de Material y Métodos). Se analizaron los niveles de ARNm de Mrp2 (Abcc2) y de tres transportadores de esta familia implicados en el transporte de ABs: la bomba exportadora de ABs Bsep (Abcb11), Mrp4 (Abcc4) y Bcrp (Abcg2) (Fig. 22). La expresión de estas bombas exportadoras en hígado control era elevada en el caso de Mrp2 y Bsep, y más baja, aunque abundante, en el caso de Mrp4 y Bcrp, como se deduce del valor del ciclo umbral (Ct) medio encontrado para cada una de ellas en las PCRs (ver leyenda de la figura 22).

La administración de dexametasona incrementó los niveles de ARNm de Mrp2 (+64%) en hígado de rata (Fig. 22A). Este resultado, como hemos señalado, está de acuerdo con lo descrito por otros autores en hepatocitos de rata (Courtois et al., 1999a; Kubitz et al., 1999b; Turncliff et al., 2004). El aumento de ARNm se tradujo en un incremento de los niveles de proteína, como demostraban los análisis por Western blot comentados en el apartado 4.2. (Fig. 15). El tratamiento con prednisolona, el metabolito activo del glucocorticoide sintético prednisona, también indujo la expresión de ARNm de Mrp2. Sin embargo, la budesonida, otro glucocorticoide sintético indicado en el tratamiento del asma o del síndrome de Crohn, no provocó cambios estadísticamente significativos sobre los niveles de ARNm de este transportador. Es posible que la ausencia de efecto se deba a la menor potencia antiinflamatoria de la budesonida y/o su limitada biodisponibilidad debido a su metabolismo hepático de primer paso por las enzimas del citocromo P450 (Barnes y Adcock, 1993).

El efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de otros transportadores de la familia ABC como Mrp4 o Bsep ha sido poco estudiado. Se ha sugerido que los glucocorticoides podrían inducir la expresión de Bsep en hepatocitos de rata *in vitro* (Warskulat et al., 1999), lo que sin embargo ha sido cuestionado por otros autores (Cheng et al., 2007; Gerloff et al., 2002). Por el contrario, en lo que respecta a Mrp4, en nuestro estudio encontramos que su expresión se reducía de forma estadísticamente significativa aunque moderada (-33%), exclusivamente con el tratamiento con dexametasona (Fig. 22B). Sin embargo, este corticoide incrementó los niveles de ARNm de Bsep, mientras que la prednisolona y la budesonida no ejercieron ningún efecto sobre la expresión de ninguna de las dos bombas (Fig. 22C). Por otra parte, los tratamientos con dexametasona y budesonida redujeron drásticamente los niveles de ARNm de Bcrp (-90% y -78%, respectivamente), lo que también se observó, aunque en mucho menor grado, en el caso de la prednisolona (Fig. 22D). En base a los datos bibliográficos disponibles podemos sugerir que el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión del gen *ABCG2* parece ser un proceso dependiente del tejido y del tipo celular (Honorat et al., 2008; Narang et al., 2008; Petropoulos et al., 2011).



**Fig. 22.** Niveles relativos de ARNm de proteínas ABC en tejido hepático de ratas Wistar control (barras negras) y tratadas con los glucocorticoides dexametasona, prednisolona o budesonida (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de hígado control, y son media  $\pm$  EEM de 8 animales por grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de Bonferroni. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para el hígado control fue: 20,1  $\pm$  0,23 para Mrp2 (A); 26,4  $\pm$  0,22 para Mrp4 (B); 18,4  $\pm$  0,21 para Bsep (C) y 25,9  $\pm$  0,18 para Bcrp (D).

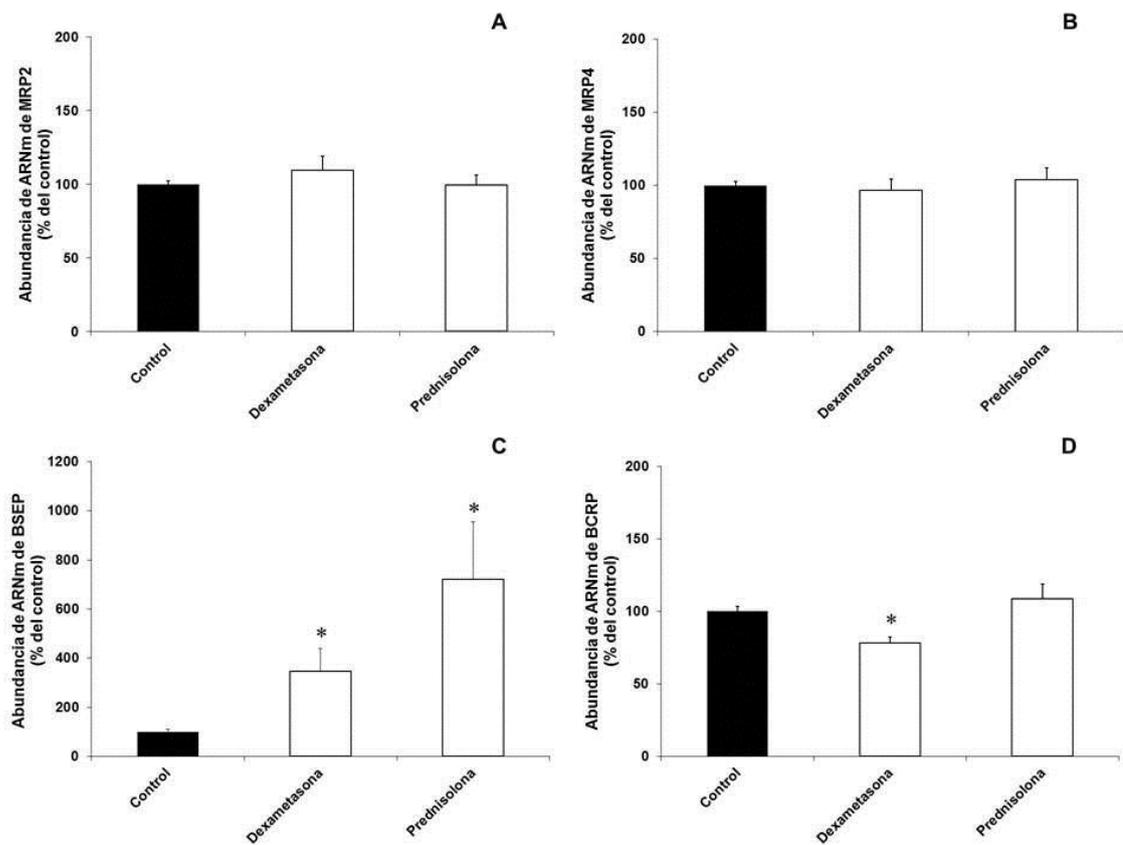
Estos resultados ponen de manifiesto el hecho de que, entre los glucocorticoides utilizados en este estudio, la dexametasona es el que ejerce mayor efecto sobre la expresión de proteínas ABC en hígado de rata. No obstante, este efecto no es común a todas las proteínas ABC estudiadas, ya que, en general, hemos observado una estimulación de la expresión de Mrp2 y Bsep, junto con una represión de la expresión de Bcrp y Mrp4.

#### 4.3.2. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC EN CÉLULAS HepG2

Se ha descrito que, a diferencia de lo que hemos observado que ocurre en hígado de rata, la expresión de la MRP2 humana no se modifica por tratamiento con dexametasona (Nishimura et al., 2006; Pulaski et al., 2005). Por ello decidimos investigar también el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de proteínas ABC humanas, utilizando para ello un modelo experimental *in vitro*, la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2. Las células se incubaron durante 24 h en presencia de 20  $\mu$ M de cada uno de los dos glucocorticoides que más efecto habían mostrado en los experimentos *in vivo*, dexametasona y prednisolona. La baja actividad de la budesonida puede deberse a su eficaz inactivación por parte del hígado. Por ello, decidimos no utilizarla en experimentos con células hepáticas. Los niveles de ARNm de los transportadores ABC analizados en las células HepG2 control, no tratadas, fueron comparables a los encontrados para sus ortólogos en hígado de rata control, salvo en el caso de BSEP, cuya expresión era muy baja en estas células, con un Ct medio de 33,5 (Fig. 23) frente a 18,4 para Bsep en rata (Fig. 22).

De acuerdo con lo observado por otros autores (Nishimura et al., 2006; Pulaski et al., 2005) y a diferencia de lo encontrado en los experimentos con ratas *in vivo*, la incubación con glucocorticoides no modificó los niveles de ARNm de MRP2 (Fig. 23A), ni de MRP4 (Fig. 23B).

Sin embargo, la expresión de BSEP y BCRP sí fue sensible a la dexametasona. Este glucocorticoide indujo cambios significativos en los niveles de ARNm de ambos transportadores, y en el mismo sentido que los observados en el modelo animal. El tratamiento con dexametasona, y más aún con prednisolona, incrementó la expresión de BSEP (+247% y +621%, respectivamente) respecto a las células control (Fig. 23C), aunque se encontró una notable variabilidad en la respuesta a estos agentes entre diferentes cultivos, debida presumiblemente a la muy baja expresión de este transportador en esta línea celular. En el caso de BCRP, el tratamiento con dexametasona redujo moderadamente (-22%) su expresión, mientras que la prednisolona no afectó la expresión del transportador (Fig. 23D).



**Fig. 23.** Niveles relativos de ARNm de proteínas ABC en células de hepatoblastoma humano, HepG2, control (barras negras) y tratadas con los glucocorticoides dexametasona o prednisolona (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de células control (no tratadas) y son media  $\pm$  EEM de 5 cultivos llevados a cabo por duplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de valores apareados. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para las células control fue:  $21,8 \pm 0,32$  para MRP2 (A);  $27,9 \pm 0,28$  para MRP4 (B);  $33,5 \pm 0,66$  para BSEP (C) y  $25,9 \pm 0,39$  para BCRP (D).

Estos resultados ponen de manifiesto que los glucocorticoides desempeñan un papel en la regulación de la expresión hepática de proteínas ABC, que en ocasiones difiere dependiendo de la especie y, probablemente, del modelo de estudio empleado. Sin embargo, se ha observado cierta consistencia en el efecto sobre las proteínas BSEP y BCRP, ya que tanto en el modelo *in vivo* en rata, como *in vitro* en células humanas, los niveles de expresión de BSEP se incrementaban y los de BCRP se reducían por el tratamiento con glucocorticoides.

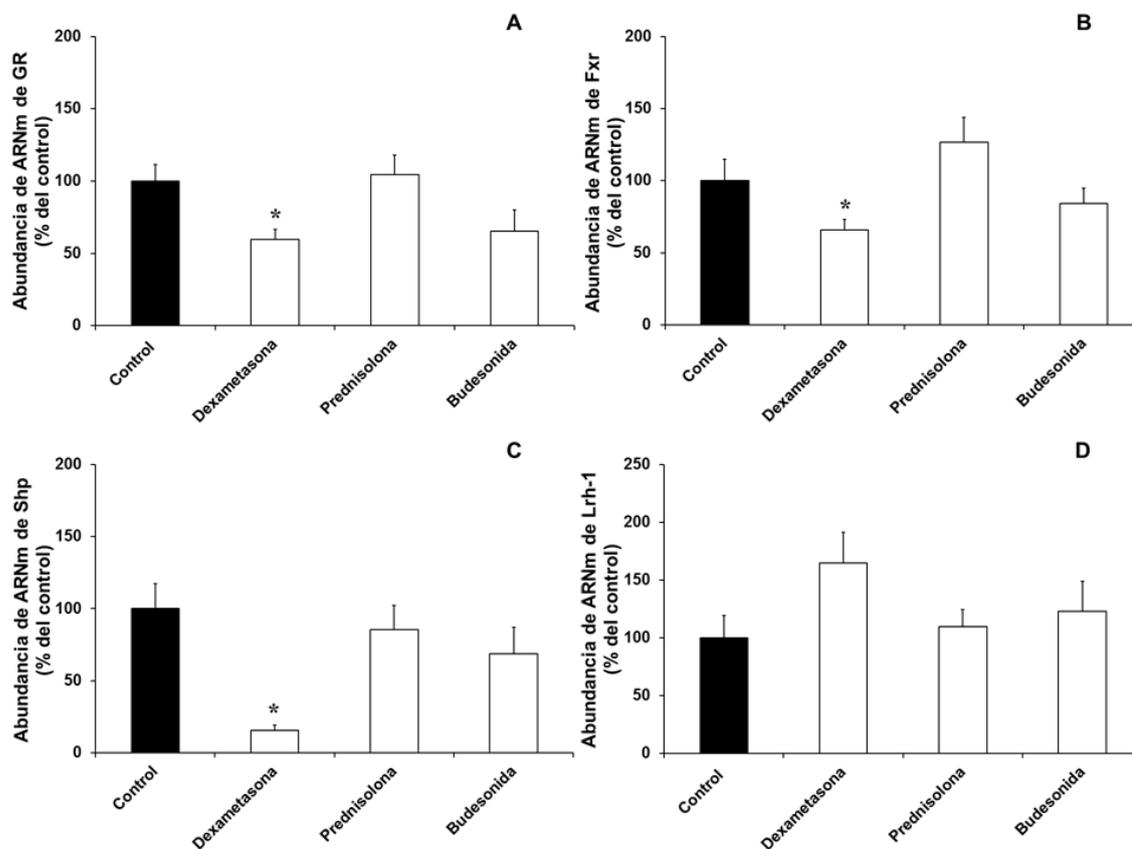
### **4.3.3. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES NUCLEARES EN HÍGADO DE RATA**

Para profundizar en el mecanismo por el que los glucocorticoides regulan la expresión de proteínas ABC, y teniendo en cuenta que son capaces de modular también la expresión de ciertos NRs (Pascussi et al., 2000), decidimos analizar el efecto de estos compuestos sobre la expresión hepática de algunos de estos factores de transcripción.

En primer lugar, nos planteamos la posibilidad de que la administración exógena de glucocorticoides pudiera modificar los niveles de ARNm de su receptor, el GR. La figura 24A muestra una reducción de la expresión del GR en el hígado de las ratas tratadas durante 4 días con dexametasona (-40%), que también se observó con budesonida, aunque en este caso la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. La prednisolona no modificó los niveles de ARNm del GR.

Tanto Bsep como Mrp2 son dianas directas de Fxr, que se inducen cuando se activa este receptor nuclear de ABs (Ananthanarayanan et al., 2001; Kast et al., 2002), mientras que aún no se han identificado elementos de respuesta al GR en las regiones promotoras de estos genes. Por ello decidimos investigar la influencia de los glucocorticoides sobre la expresión de Fxr. Los niveles hepáticos del ARNm de Fxr descendieron en las ratas tratadas con dexametasona (-40%), pero no con los otros dos glucocorticoides (Fig. 24B). Este resultado nos llamó la atención, ya que habíamos observado previamente que Bsep y Mrp2, dianas directas de Fxr, se inducían con el tratamiento con dexametasona, lo que no hacía prever que la expresión de este NR estuviera disminuida.

Se ha descrito que la activación de FXR en el hígado induce la expresión de SHP (del inglés "Small Heterodimer Partner"), que interacciona con LRH-1 ("Liver Receptor Homolog-1") y de esta manera reduce la expresión de la CYP7A1, enzima llave en la síntesis de ABs (Goodwin et al., 2000; Lee y Moore, 2008; Lu et al., 2000). A la vista de lo observado para Fxr, se decidió analizar también la expresión de estos dos NRs, Shp y Lrh-1, en las ratas tratadas con glucocorticoides (Fig. 24C y 24D). Como cabía esperar, puesto que la expresión de Shp depende de la activación de Fxr (Goodwin et al., 2000), los niveles hepáticos de ARNm de Shp se encontraron marcadamente reducidos (-85%) en los animales tratados con dexametasona, pero no con los otros dos glucocorticoides (Fig. 24C). Estos agentes no alteraron significativamente la expresión de Lrh-1 (Fig. 24D).



**Fig. 24.** Niveles relativos de ARNm de receptores nucleares en tejido hepático de ratas Wistar control (barras negras) y tratadas con los glucocorticoides dexametasona, prednisolona o budesonida (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de hígado control, y son media  $\pm$  EEM de 8 animales por grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de Bonferroni. El valor medio de Cts  $\pm$  EEM encontrado para el hígado control fue:  $23,5 \pm 0,27$  para GR (A);  $22,2 \pm 0,35$  para Fxr (B);  $26,4 \pm 0,28$  para Shp (C) y  $21,2 \pm 0,24$  para Lrh-1 (D).

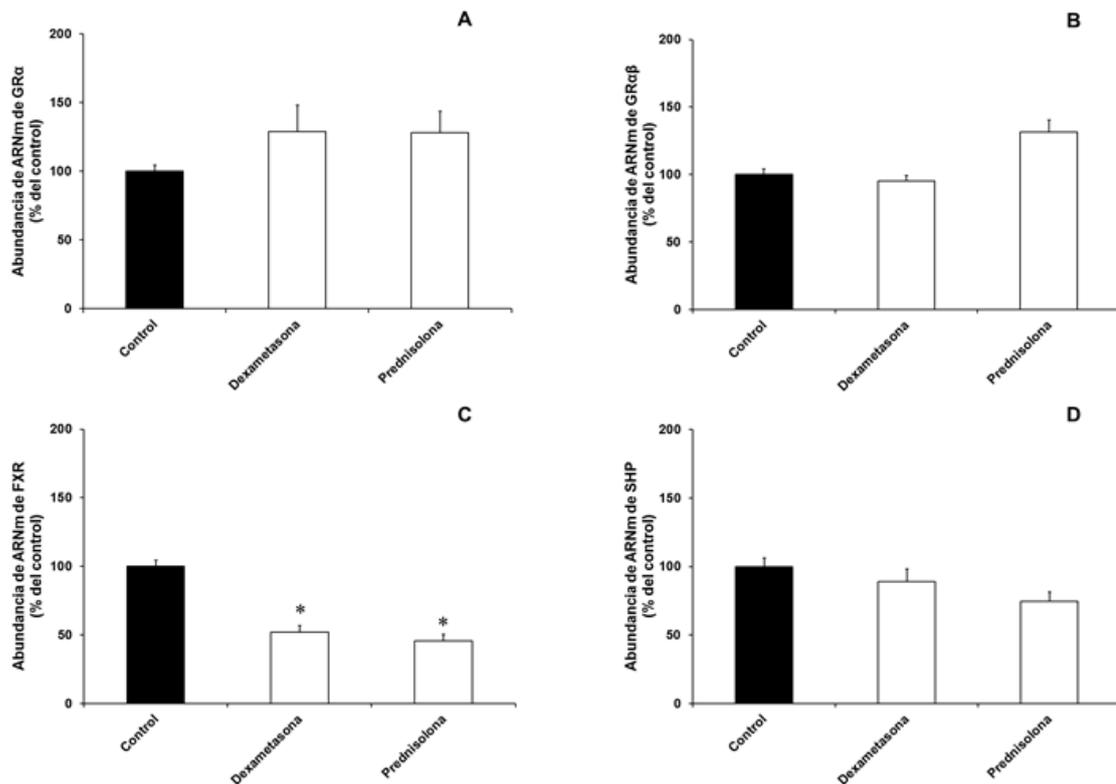
En conjunto estos resultados son interesantes, ya que hasta el momento no se ha descrito que los glucocorticoides sean capaces de modificar la expresión de Fxr. Esto nos llevó a plantearnos investigar si también la vía de señalización de Fxr, y no sólo su expresión hepática, se alteraba por el tratamiento con glucocorticoides. Pero antes decidimos comprobar si el efecto se reproducía también *in vitro* en el modelo de células de hepatoblastoma humano HepG2.

#### 4.3.4. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES NUCLEARES EN CÉLULAS HepG2

En base a los resultados observados en el modelo *in vivo*, se analizaron los niveles de ARNm de los mismos NRs en las células HepG2. El GR presenta dos isoformas en humanos, denominadas GR $\alpha$  y GR $\beta$ , por ello, para la PCR se emplearon una pareja de “primers” que permitía amplificar específicamente la isoforma GR $\alpha$  y otra que amplificaba conjuntamente ambas isoformas (GR $\alpha\beta$ ) (las secuencias de estos oligonucleótidos se detallan en la tabla 2 de Material y Métodos).

A diferencia de lo que se había observado en el modelo *in vivo*, en el que la dexametasona reducía la expresión del GR en hígado de rata, los niveles de expresión de las isoformas del GR en células HepG2 no se modificaron por la presencia durante 24 h en el medio de cultivo de una concentración 20  $\mu$ M de dexametasona o prednisolona (Fig. 25A y 25B).

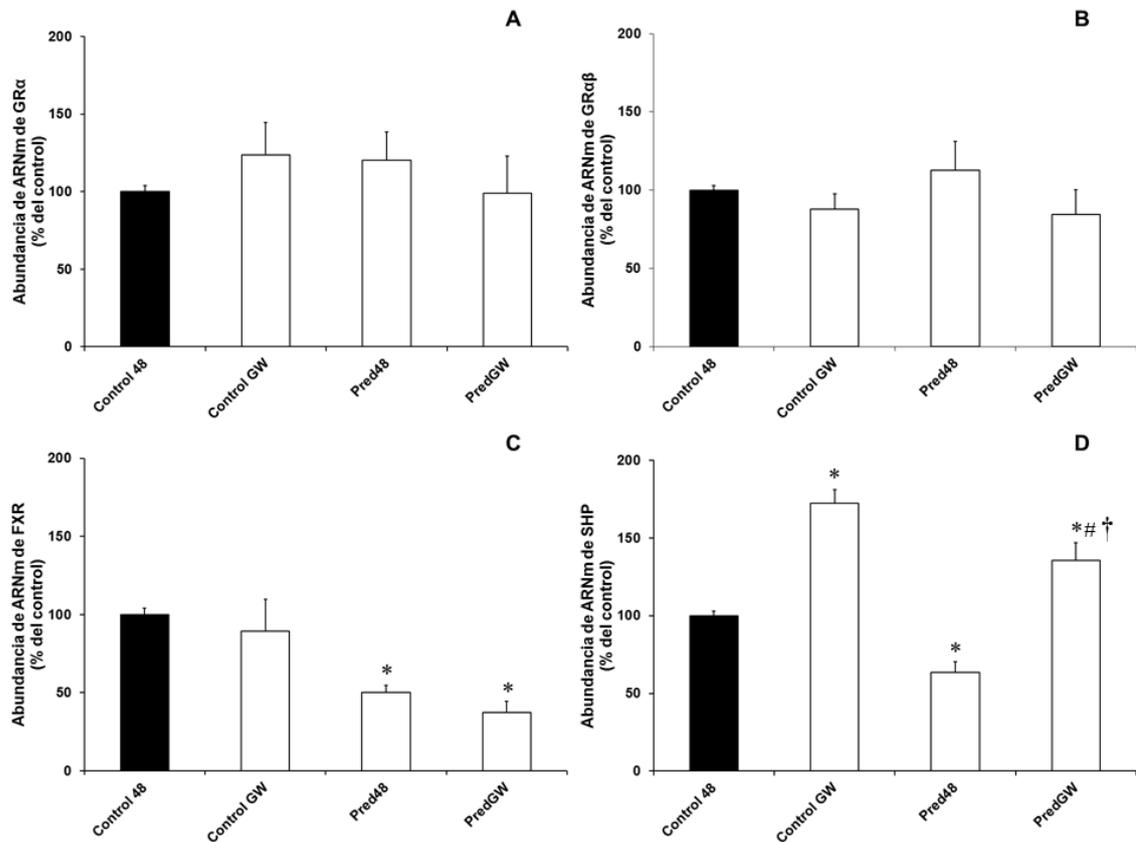
La incubación con dexametasona y prednisolona sí redujo la expresión de FXR (-48% y -55% respectivamente) en estas células (Fig. 25C). Por lo tanto, los glucocorticoides son capaces de reducir los niveles de ARNm del NR de ABs, FXR, en los dos modelos experimentales empleados. Sin embargo, a diferencia de lo observado en hígado de rata, la expresión del gen diana de FXR, SHP, en células HepG2 tratadas con dexametasona sólo se redujo ligeramente y algo más en las tratadas con prednisolona (Fig. 25D), aunque estas caídas no fueron estadísticamente significativas.



**Fig. 25.** Niveles relativos de ARNm de receptores nucleares en células de hepatoblastoma humano HepG2 control (barras negras) y tratadas con los glucocorticoides dexametasona o prednisolona (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de células control, no tratadas, y son media  $\pm$  EEM de 5 cultivos llevados a cabo por duplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de valores apareados. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para las células HepG2 control fue:  $27,2 \pm 0,4$  para GR $\alpha$  (A);  $26,1 \pm 0,4$  para GR $\alpha\beta$  (B);  $28,6 \pm 0,29$  para FXR (C) y  $25,8 \pm 0,15$  para SHP (D).

#### 4.3.5. EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE FXR SOBRE LA EXPRESIÓN DE BOMBAS ABC EN CÉLULAS HepG2 TRATADAS CON GLUCOCORTICOIDES

La reducción de la expresión de los niveles de ARNm de FXR inducida por el tratamiento con glucocorticoides, nos llevó a diseñar una serie de experimentos en los que se cultivaron células HepG2 con prednisolona (20  $\mu$ M) en el medio durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se adicionaba o no un potente agonista sintético de FXR, el compuesto GW4064 (1  $\mu$ M) (Goodwin et al., 2000; Maloney et al., 2000; Sinal et al., 2000) y se prolongaba el cultivo durante otras 24 h. El objetivo de estos ensayos era determinar si la vía de señalización de FXR, inducida por el agonista, se modificaba o no por la presencia de glucocorticoides en el medio de cultivo. Para realizarlos se eligió el tratamiento con prednisolona ya que fue el glucocorticoide que mostró mayor efecto sobre la expresión de FXR y SHP en las células HepG2 (Fig. 25).



**Fig. 26.** Niveles relativos de ARNm de receptores nucleares en células de hepatoblastoma humano HepG2 control (barras negras) y tratadas con el agonista de FXR GW4064 (1  $\mu$ M), prednisolona (20  $\mu$ M) o ambos (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de células control, no tratadas, y son media  $\pm$  EEM de 3 cultivos llevados a cabo por duplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control; #,  $p < 0,05$  comparando con el grupo controlGW; †,  $p < 0,05$  comparando con el grupo prednisolona, mediante el test de Bonferroni. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para las células HepG2 control fue: 26,2  $\pm$  0,4 para GR $\alpha$  (A); 25,1  $\pm$  0,4 para GR $\alpha\beta$  (B); 27,3  $\pm$  0,3 para FXR (C) y 24,7  $\pm$  0,2 para SHP (D).

Al igual que se había observado en células HepG2 tratadas durante 24 h con prednisolona, el tratamiento durante 48 h con este agente no modificó la expresión de las isoformas del GR; como tampoco lo hizo la presencia en el medio del agonista de FXR GW4064 (Fig. 26A y 26B).

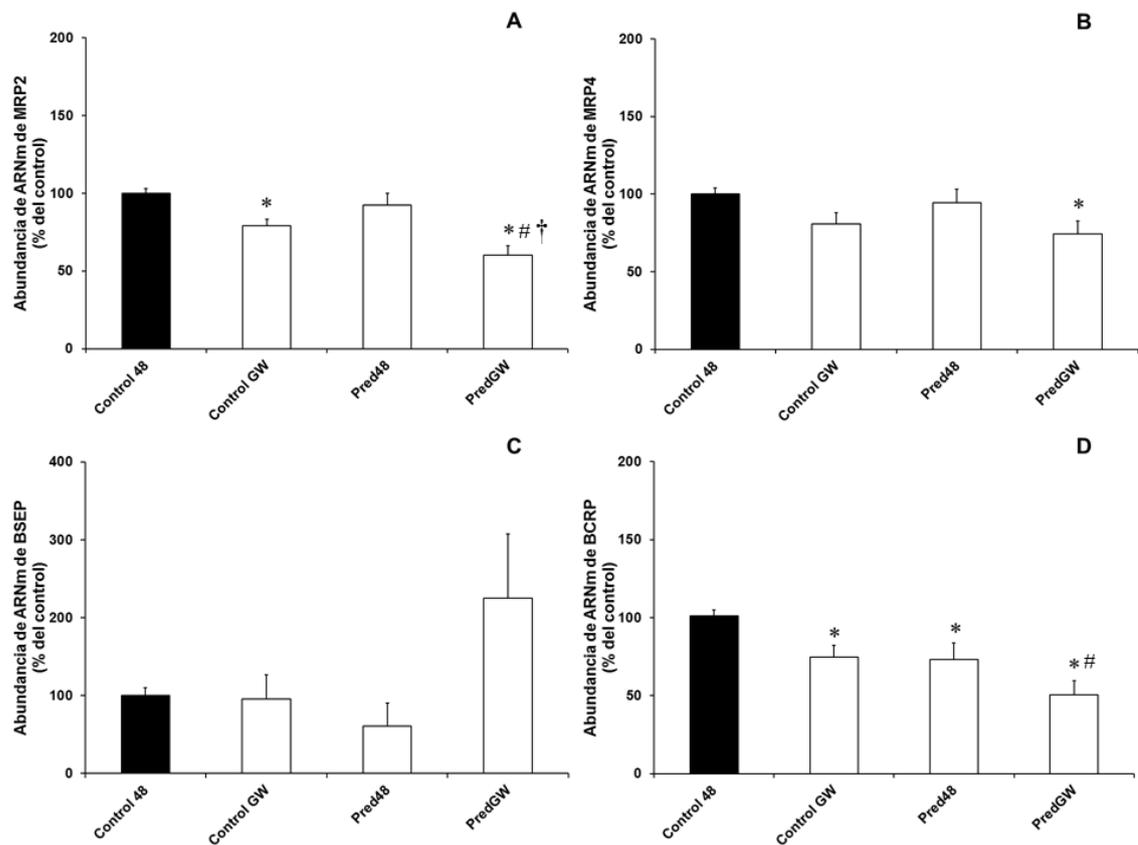
Por el contrario, tras dos días de exposición a prednisolona la expresión de FXR disminuyó aproximadamente un 50% respecto a la encontrada en células control (Fig. 26C), efecto que ya se había observado tras sólo 24 h (Fig. 25C). El tratamiento con GW4064 no modificó significativamente los niveles de ARNm de FXR en células tratadas o no con prednisolona.

La activación de FXR por GW4064 provocó un claro incremento (+72%) en los niveles de ARNm de su gen diana SHP (Fig. 26D), como era de esperar. En células

tratadas 48 h con prednisolona la expresión de SHP se redujo (-37%) significativamente, confirmando la tendencia observada ya tras 24 h de exposición (Fig. 25D). En estas circunstancias, el agonista de FXR siguió siendo capaz de estimular la expresión de SHP. En presencia de prednisolona el aumento fue similar aunque los valores finales de SHP eran inferiores a los encontrados en células control. Probablemente la menor cantidad de FXR en estas células, reducido al 50% por el tratamiento con prednisolona, disminuye los niveles basales de SHP, mientras que la capacidad de estimulación por GW4064 permanece inalterada. En cualquier caso, no parece que los efectos de la prednisolona sobre FXR y SHP estén mediados por cambios en la expresión del GR, que no se modifica en las condiciones ensayadas en este estudio (Fig. 26A y 26B).

En estos experimentos decidimos estudiar también el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de proteínas ABC puesto que, como ya se ha comentado, algunas bombas ABC son dianas de FXR, y se ha descrito que la activación de éste por sus agonistas naturales (los ABs) o sintéticos (como el GW4064) induce la expresión de dichos transportadores (Ananthanarayanan et al., 2001; Kast et al., 2002).

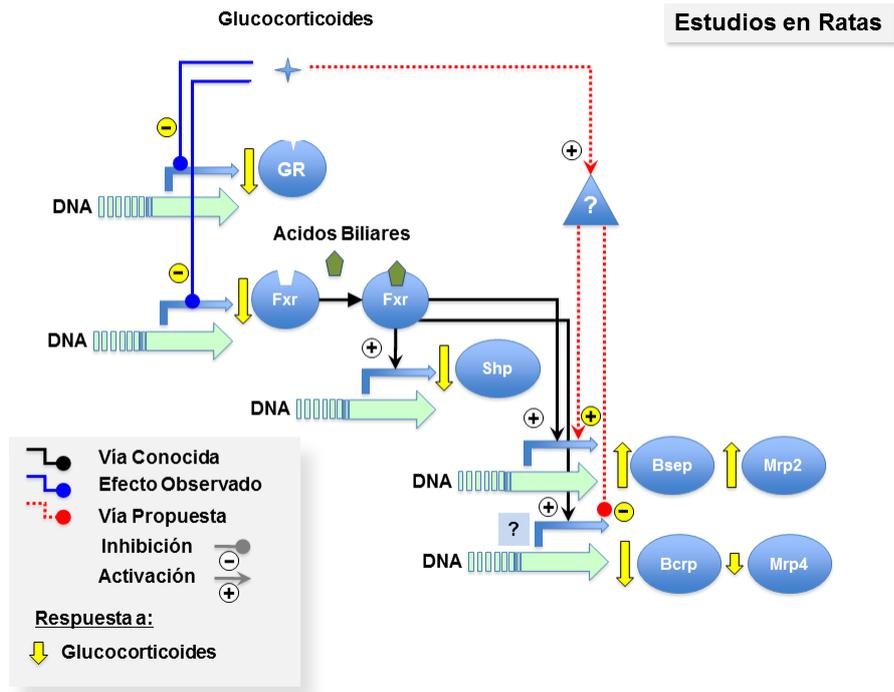
Tras 48 h en presencia de prednisolona, los niveles de ARNm de las proteínas ABC analizadas, con la excepción de BSEP, eran comparables (Fig. 27) a los determinados en los cultivos expuestos sólo 24 h al glucocorticoide (Fig. 23). Mientras que la expresión de MRP2 y MRP4 no se modificó respecto a la de células control (Fig. 27A y 27B) y la de BCRP disminuyó un 25% (Fig. 27D), el tratamiento más prolongado con prednisolona no indujo el incremento en la expresión de BSEP que habíamos observado tras 24 h de incubación (Fig. 23C). Como ya hemos discutido en el apartado 4.3.2. los resultados relativos a BSEP hay que considerarlos con precaución dado los bajos niveles de expresión de esta proteína en células HepG2. De hecho, no se detectó la esperable activación de su expresión por GW4064 pero sí se observó un aumento de expresión cuando se combinaban GW4064 y prednisolona, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 27C).



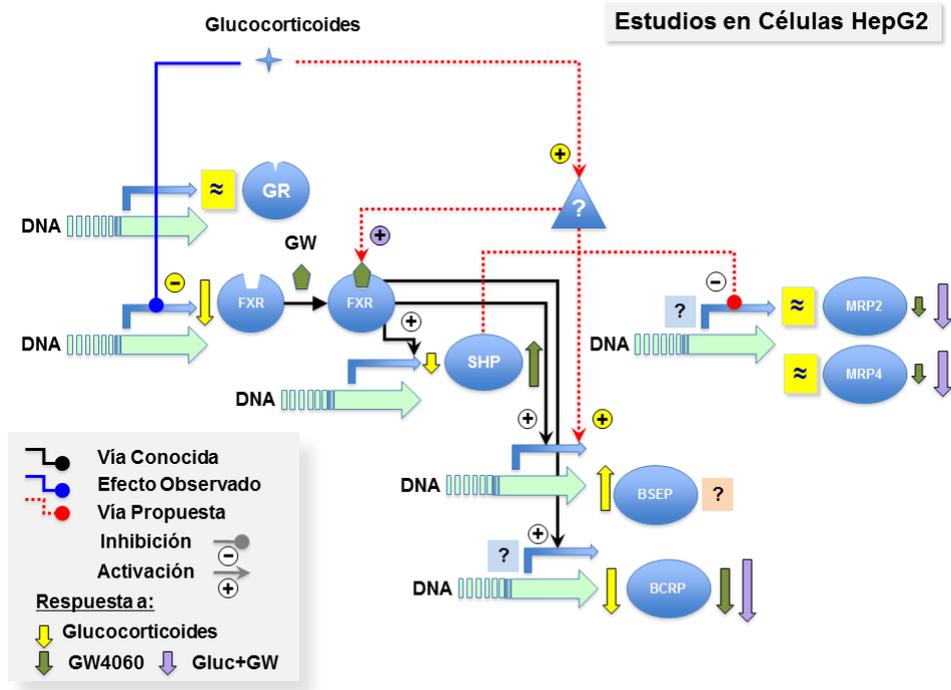
**Fig. 27.** Niveles relativos de ARNm de proteínas ABC en células de hepatoblastoma humano HepG2 control (barras negras) y tratadas con el agonista de FXR GW4064, prednisolona o ambos (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de células control, no tratadas, y son media  $\pm$  EEM de 3 cultivos llevados a cabo por duplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, #,  $p < 0,05$  comparando con el grupo controlGW, †,  $p < 0,05$  comparando con el grupo prednisolona, mediante el test de Bonferroni. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para las células control fue:  $20,7 \pm 0,29$  para MRP2 (A);  $27,9 \pm 0,22$  para MRP4 (B);  $31,1 \pm 0,72$  para BSEP (C) y  $24,6 \pm 0,4$  para BCRP (D).

El agonista de FXR provocó un descenso en los niveles de ARNm de MRP2, MRP4 y BCRP que fue más acusado cuando las células se incubaron con GW4064 más prednisolona (Fig. 27A, 27B y 27D).

En conjunto, los resultados obtenidos tanto en el modelo *in vivo* en rata (Esquema 3), como en los cultivos de células de hepatoblastoma humano (Esquema 4) indican que los glucocorticoides son capaces de reducir significativamente los niveles hepáticos de ARNm del receptor FXR, lo que a su vez podría alterar la vía de señalización mediada por ABs.



**Esquema 3:** Representación esquemática de la posible interacción entre los glucocorticoides y la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas transportadoras ABC en hígado de ratas.



**Esquema 4:** Representación esquemática de la posible interacción entre los glucocorticoides y la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas transportadoras ABC en células de hepatoblastoma humano HepG2.

La reducción en la expresión de este NR inducida por glucocorticoides podría traducirse en una menor expresión de sus genes diana, lo que ocurre en el caso de

SHP pero no, o no en todos los casos para las demás dianas de FXR. La clara inducción de Bsep por glucocorticoides en el hígado de las ratas tratadas, donde su expresión basal es abundante, sugiere que los glucocorticoides modifican la expresión de BSEP de forma alternativa a la mediada por cambios en los niveles de FXR.

Por otra parte, el efecto inhibitor de los glucocorticoides sobre la expresión de BCRP es claro y consistente en los dos modelos experimentales empleados. Queda aún por dilucidar si se trata de un efecto directo o está mediado por FXR (Esquemas 3 y 4). Hasta el momento no se ha descrito la regulación de BCRP por FXR, aunque no sería de extrañar, puesto que recientemente hemos demostrado que esta proteína ABC está implicada en el transporte de ABs fundamentalmente en la placenta (Blazquez et al., 2011) y tendría sentido que su expresión se regulase por los niveles de sus sustratos vía FXR.

Los efectos sobre MRP2 y MRP4 parecen dependientes del modelo, aunque MRP4 presenta una tendencia clara a la represión por glucocorticoides, mientras que MRP2 presenta un comportamiento opuesto en ratas y células humanas. En el esquema 4 se propone que la regulación de la expresión de MRP2 y MRP4 podría realizarse a través de SHP ya que, aunque este efecto represor no ha sido descrito hasta ahora para estas proteínas, se sabe que es el responsable de la inhibición de otras dianas indirectas de FXR, como CYP7A1.

#### 4.4. INTERACCIÓN ENTRE GLUCOCORTICOIDES Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE FXR EN LA HOMEOSTASIS DE LOS ÁCIDOS BILIARES

Además de su implicación en la regulación de proteínas transportadoras de ABs como la BSEP, FXR desempeña un papel central en la regulación de la síntesis de estos esteroides. Como ya hemos indicado anteriormente, se ha descrito que la activación de FXR en el hígado induce la expresión de SHP, un represor transcripcional que a su vez interacciona con el factor de transcripción LRH-1, lo que reduce la expresión de la enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1), llave en la vía “principal” de síntesis de ABs (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000). Sin embargo, el hecho de que los ABs sean capaces de reprimir CYP7A1 en ratones “knock-out” para SHP (Kerr et al., 2002) indica que existen mecanismos adicionales sensibles a los niveles de ABs que reprimen esta enzima. Los receptores nucleares LRH-1 y LXR son dos importantes inductores de los niveles de ARNm de CYP7A1 en roedores (Goodwin et al., 2000; Goodwin et al., 2003; Lee y Moore, 2008), sin embargo, en humanos, LXR reprime la expresión de CYP7A1 (Goodwin et al., 2003).

La enzima clave en la síntesis de ABs a través de la vía ácida o alternativa, la esterol 27-hidroxilasa (CYP27A1), también está regulada por el tándem FXR/SHP. Sin embargo, el efecto represor de los ABs sobre la transcripción del gen *CYP27A1* es menos potente que el que ejercen sobre los promotores de los genes *CYP7A1* y *CYP8B1*, cuyo producto está implicado en la hidroxilación del carbono 12 del anillo esteroideo (Eloranta et al., 2005).

Una vez sintetizados y antes de ser secretados al canalículo biliar, los ABs primarios son conjugados en su cadena lateral con taurina o glicina, lo que incrementa sus propiedades hidrofílicas. Estas reacciones son catalizadas por la enzima BAAT (del inglés “Bile Acid coenzyme A: amino acid N-acyltransferase”) (Falany et al., 1994). Los ABs estimulan FXR, que a su vez activa la transcripción de la enzima BAAT (Pircher et al., 2003).

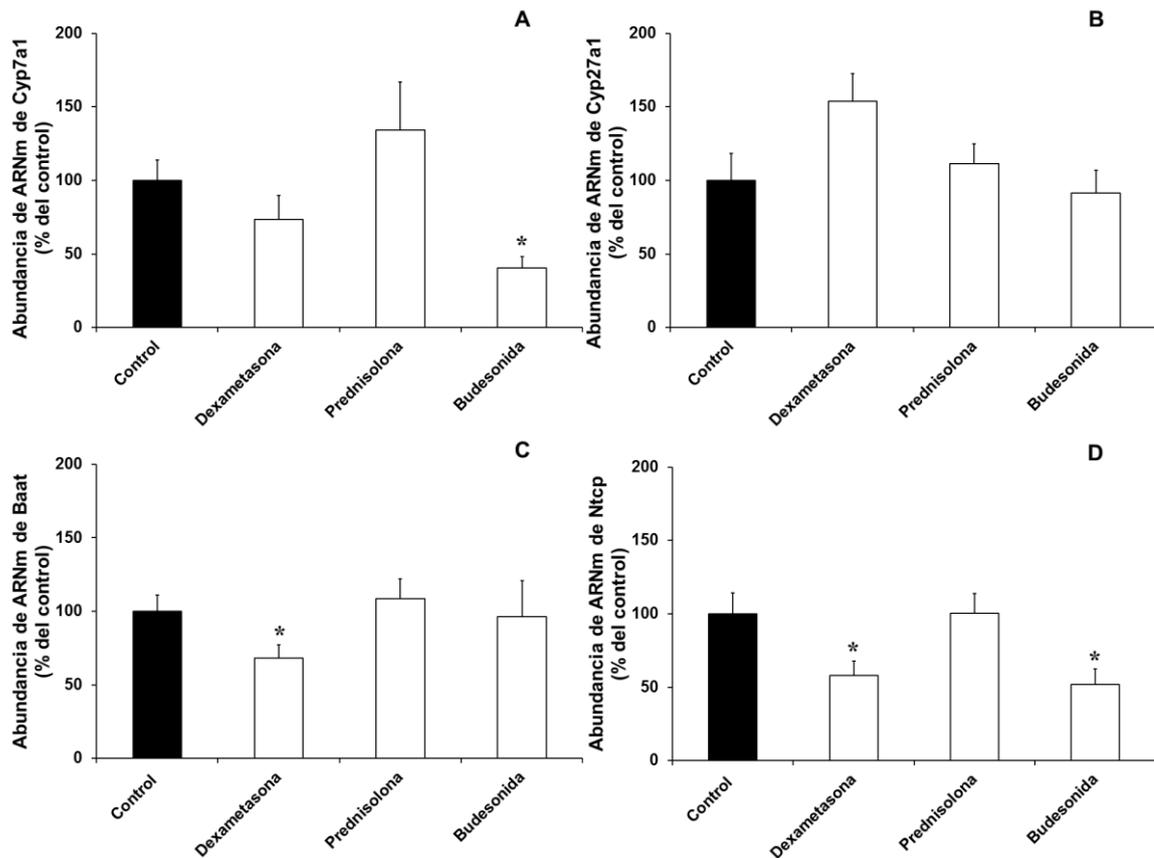
Dado el importante papel del receptor FXR en la homeostasis de los ABs y los resultados descritos en el apartado anterior, decidimos investigar la repercusión del descenso en la expresión de FXR inducido por el tratamiento con glucocorticoides, sobre las enzimas y transportadores implicados en la circulación enterohepática de estos compuestos.

#### 4.4.1. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE ENZIMAS Y TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN LA HOMEOSTASIS DE LOS ACIDOS BILIARES

En primer lugar se analizaron los niveles de ARNm de las enzimas clave en la biosíntesis de ABs, *Cyp7a1* (llave de la vía principal, básica o clásica) y *Cyp27a1* (llave en la vía alternativa o ácida), en hígado de ratas tratadas con glucocorticoides. Como muestra la figura 28A, la expresión de *Cyp7a1* se encontró reducida en los hígados de los animales tratados con dexametasona (-26%) y, sobre todo, con budesonida (-60%). Este resultado no era esperable teniendo en cuenta la marcada reducción en la expresión del represor Shp que habíamos encontrado en estas ratas (Fig. 24C), que debería haberse traducido en una mayor transcripción del gen *Cyp7a1* (ver esquema 5), como de hecho sí se observó en el caso de la *Cyp27a1* en el grupo tratado con dexametasona (Fig. 28B). Esto podría sugerir un efecto inhibitor de los glucocorticoides, probablemente independiente del binomio Fxr/Shp, sobre la vía principal de síntesis de ABs.

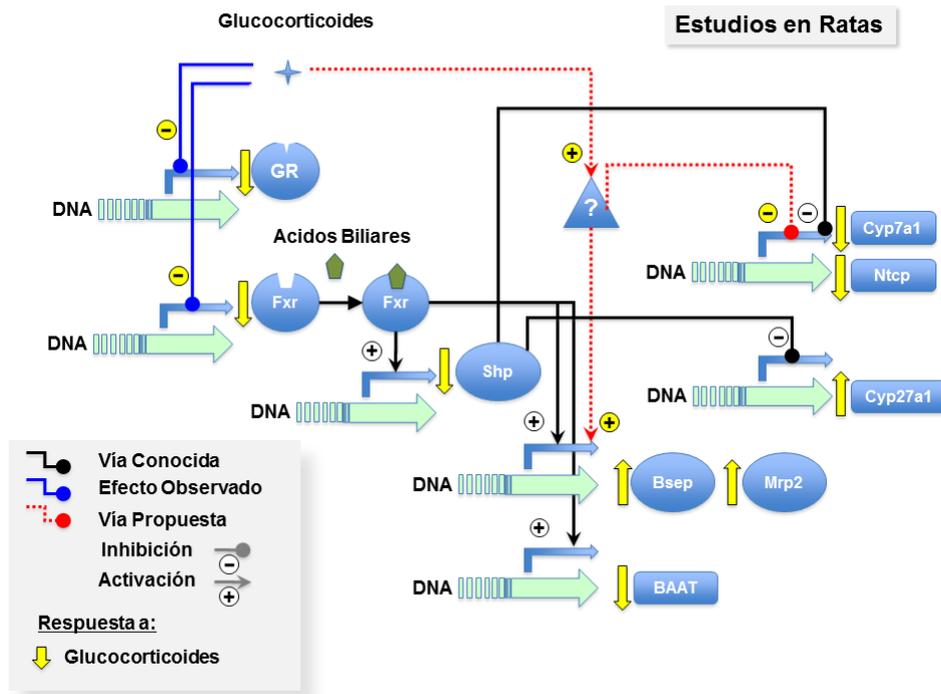
Los niveles hepáticos de ARNm de la enzima Baat, responsable de la conjugación de ABs, se encontraron reducidos en animales tratados con dexametasona, pero no con los otros dos glucocorticoides (Fig. 28C). Puesto que la Baat es una diana directa de Fxr (Pircher et al., 2003), su menor expresión podía deberse a la reducción de Fxr en este grupo (Fig. 24B), como habíamos argumentado previamente para otra de las dianas de Fxr, Shp.

Entre las acciones de FXR sobre la homeostasis de los ABs, destaca el papel represor, mediado por SHP, que ejerce sobre el polipéptido cotransportador de  $\text{Na}^+$ /taurocolato, NTCP (de sus siglas en inglés “ $\text{Na}^+$ /Taurocholate Cotransporting Polypeptide”), el principal transportador sinusoidal encargado de captar ABs conjugados. FXR reprime la expresión hepática de NTCP reduciendo así la captación de ABs por el hepatocito desde la sangre sinusoidal (Denson et al., 2001). En ratas tratadas con dexametasona y budesonida los niveles de ARNm de *Ntcp* eran inferiores a los determinados en hígado control (Fig. 28D), lo que de nuevo, como en el caso de *Cyp7a1*, no corresponde con los bajos niveles de Shp y sugiere la existencia de un efecto inhibitor de los glucocorticoides sobre estas dianas, independiente de Fxr/Shp.



**Fig. 28.** Niveles relativos de ARNm de proteínas implicadas en el metabolismo y transporte de ácidos biliares en tejido hepático de ratas Wistar control (barras negras) y tratadas con los glucocorticoides dexametasona, prednisolona o budesonida (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de hígado control, y son media  $\pm$  EEM de 8 animales por grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de Bonferroni. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para el hígado control fue:  $21,65 \pm 0,17$  para Cyp7a1 (A);  $21,07 \pm 0,30$  para Cyp27a1 (B);  $22,18 \pm 0,28$  para Baat (C),  $19,82 \pm 0,18$  para Ntcp (D).

En conjunto, estos resultados indican que, en hígado de rata, los glucocorticoides son capaces de modular de forma directa o indirecta la homeostasis de ABs a diferentes niveles, alterando la expresión de genes de forma dependiente e independiente de Fxr, como se resume en el esquema 5.

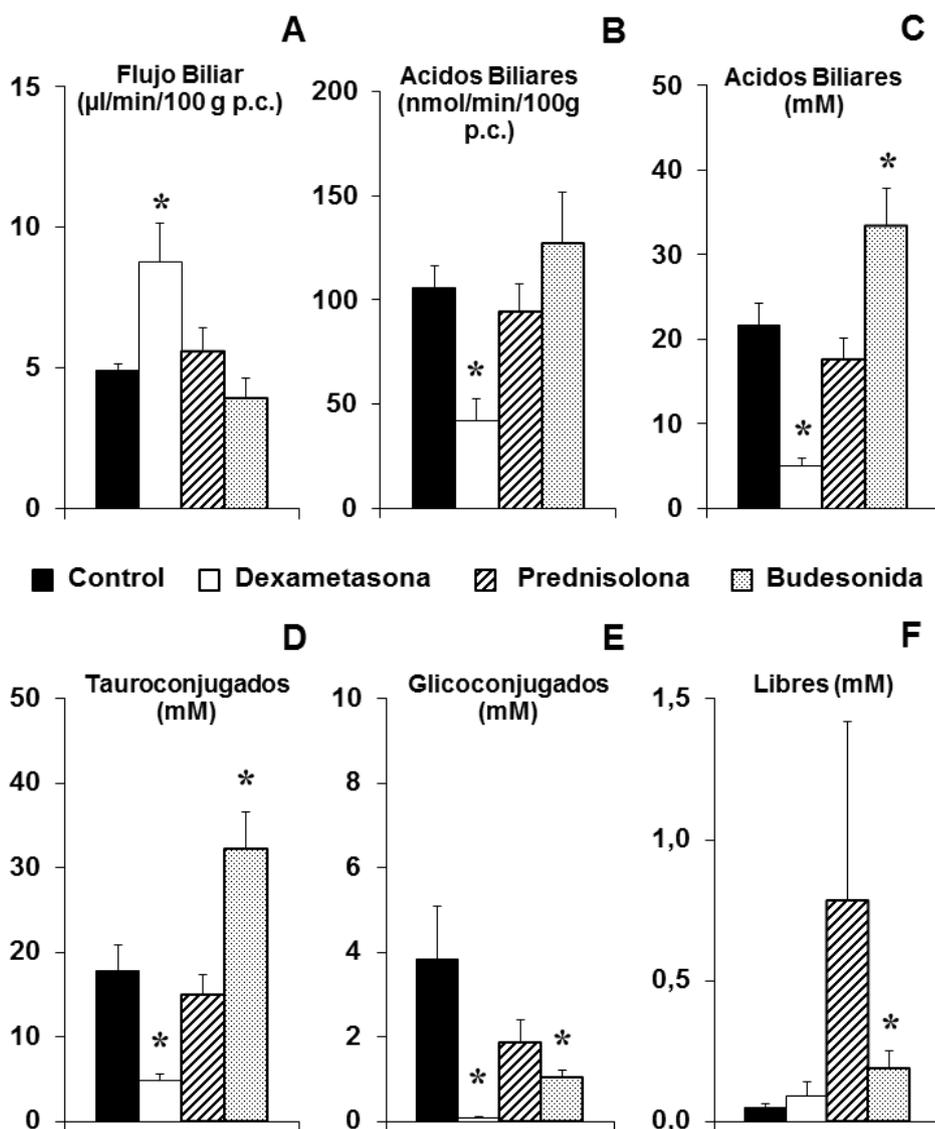


**Esquema 5:** Representación esquemática de la posible interacción entre los glucocorticoides y la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis de los ácidos biliares en hígado de rata.

#### 4.4.2. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS, HEPÁTICOS Y BILIARES DE ÁCIDOS BILIARES EN RATAS

Teniendo en cuenta los cambios que acabamos de describir inducidos por el tratamiento con glucocorticoides en la expresión hepática de enzimas (Cyp7a1, Cyp27a1, Baat), proteínas transportadoras (Bsep, Ntcp, Bcrp) y NRs (Fxr, Shp) implicados en la homeostasis de los ABs, decidimos investigar si estas alteraciones a nivel de ARNm se traducían en cambios en los niveles de ABs en estos animales. Para ello, se obtuvieron muestras de bilis, plasma y tejido hepático de los animales control y tratados, a partir de las cuales se extrajeron los ABs que se analizaron mediante HPLC-MS/MS (apartado 3.2.11.7.).

En la figura 29 se recogen los valores obtenidos para el flujo biliar y la concentración y secreción biliar de ABs en los distintos grupos. El flujo de bilis fue significativamente mayor en las ratas tratadas con dexametasona, con respecto al resto de los grupos (Fig. 29A). Este incremento se acompañó de una importante reducción en la secreción biliar (-60%) (Fig. 29B) y la concentración de ABs totales (-77%) en bilis (Fig. 29C).



**Fig. 29.** Flujo biliar (A), secreción biliar de ácidos biliares (B) y concentración en bilis de ácidos biliares totales (C), tauroconjugados (D), glicoconjugados (E) y libres (F) en ratas control (barras negras) o tratadas durante 4 días con 50 mg/kg p.c./día de dexametasona (barras blancas), prednisolona (barras rayadas) o budesonida (barras punteadas). La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM de 8 animales en cada grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de Bonferroni.

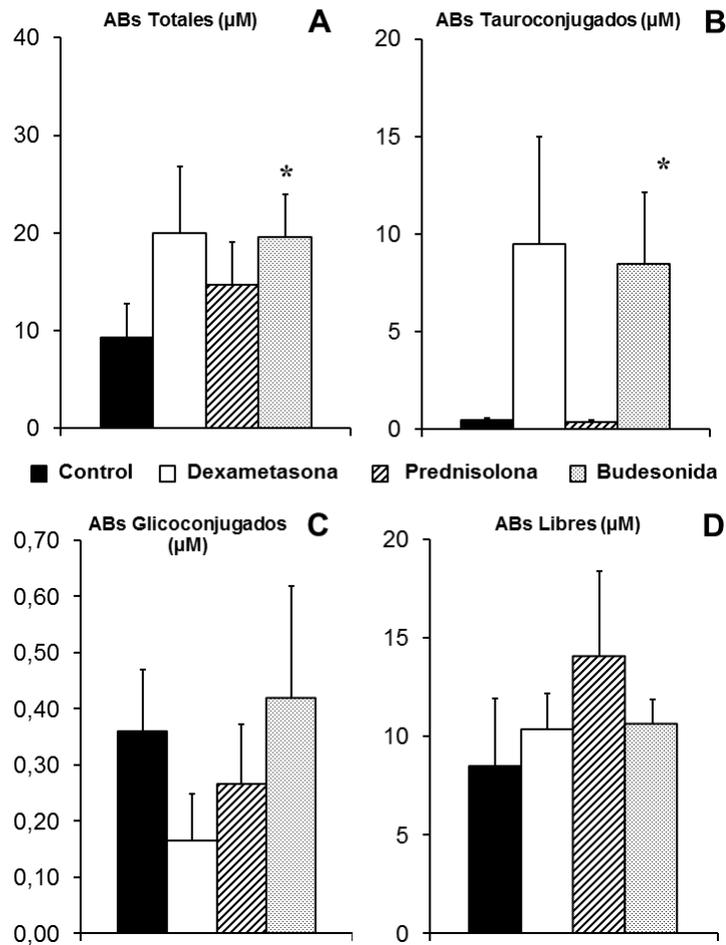
La mayor parte de los ABs encontrados en bilis estaban conjugados con taurina (Fig. 29D), siendo la concentración de ABs glicoconjugados casi 5 veces menor que la de tauroconjugados en ratas control (Fig. 29E). Sólo un pequeño porcentaje (<0,5%) de estos compuestos aparecían libres o no conjugados en bilis (Fig. 29F).

La menor concentración de ABs totales en la bilis de las ratas tratadas con dexametasona se debió a una drástica reducción en la concentración biliar de ABs tanto glicoconjugados como tauroconjugados. El aumento del flujo de bilis en este

grupo, acompañado de la menor concentración biliar de ABs, los principales responsables de la generación del flujo biliar por arrastre osmótico, podría explicarse por la secreción biliar de dexametasona y sus metabolitos, fundamentalmente glucuronados y secretados a través de la Mrp2, que además se encontraba sobreexpresada en estos animales. Esto generaría un gradiente de osmolitos, lo que arrastraría agua y disminuiría la concentración del resto de los componentes de la bilis, entre ellos los ABs. Aunque este hecho es muy probable, la dilución osmótica de la bilis no justificaría por sí sola la menor secreción de ABs encontrada en este grupo (Fig. 29B), que refleja un menor transporte de estas moléculas a bilis. Este hecho no podría deberse a una menor expresión del transportador canalicular, ya que los niveles de ARNm de Bsep estaban elevados en el hígado de animales tratados con glucocorticoides (Fig. 22C). En trabajos previos, nuestro grupo ha demostrado que la secreción a bilis de ciertos esteroides ejerce un efecto trans-inhibidor de BSEP (Vallejo et al., 2006). Esta puede ser la causa de parte de la reducción de la secreción de ABs en ratas tratadas con dexametasona.

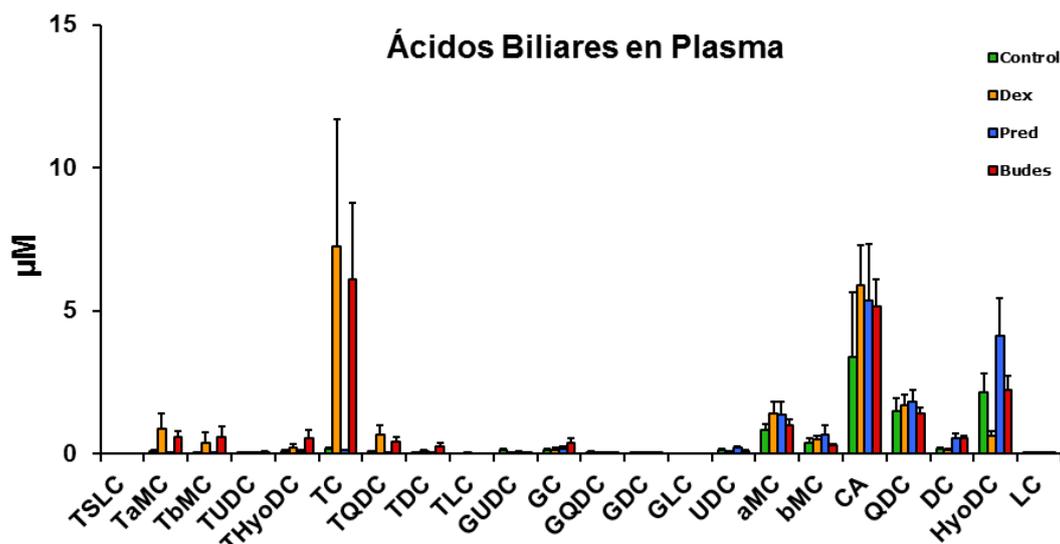
Por otra parte, el tratamiento con prednisolona y budesonida no alteró significativamente ni el flujo biliar ni la secreción biliar de ABs. Sólo con budesonida se encontró una mayor concentración biliar de ABs tauroconjugados (Fig. 29D), que repercutió en un incremento en la concentración de ABs totales (Fig. 29C), a pesar de que los glicoconjugados descendieron significativamente (Fig. 29E). De hecho, la relación entre ABs tauroconjugados/glicoconjugados pasó de ser 4,6 en el grupo control a 30 en los animales tratados con budesonida.

A diferencia de lo que ocurre en la bilis, en donde como acabamos de ver su proporción es muy baja, los ABs libres fueron las especies predominantes en el plasma, llegando a ser el 90% de los ABs totales determinados en los animales control (Fig. 30). El tratamiento con glucocorticoides indujo un incremento en la concentración plasmática de ABs totales (Fig. 30A), que hay que atribuir al marcado aumento en los niveles de ABs tauroconjugados encontrados en algunos animales (aunque no en todos) a los que se administró dexametasona y budesonida (Fig. 30B). No se encontraron cambios estadísticamente significativos para los niveles de ABs glicoconjugados (muy bajos en plasma) (Fig. 30C), ni para los libres (Fig. 30D), aunque la concentración de éstos últimos se elevó moderadamente en las ratas tratadas con prednisolona.



**Fig. 30.** Concentración de ácidos biliares (ABs) totales (A), tauroconjugados (B), glicoconjugados (C) y libres (D) en el plasma de ratas control (barras negras) o tratadas durante 4 días con 50 mg/kg p.c./día de dexametasona (barras blancas), prednisolona (barras rayadas) o budesonida (barras punteadas). La determinación de ABs se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM de 8 animales en cada grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de Bonferroni.

En la figura 31 se muestra el perfil de la concentración de las diferentes especies moleculares de ABs presentes en el plasma de las ratas control y tratadas con los distintos glucocorticoides. Se aprecia que las especies no conjugadas son las predominantes en todos los grupos si bien, como ya hemos visto, los tauroconjugados se incrementaron considerablemente en las ratas tratadas con dexametasona y budesonida. Destaca particularmente el ácido taurocólico (TC) cuya concentración plasmática media aumentó más de 35 veces en estos grupos.

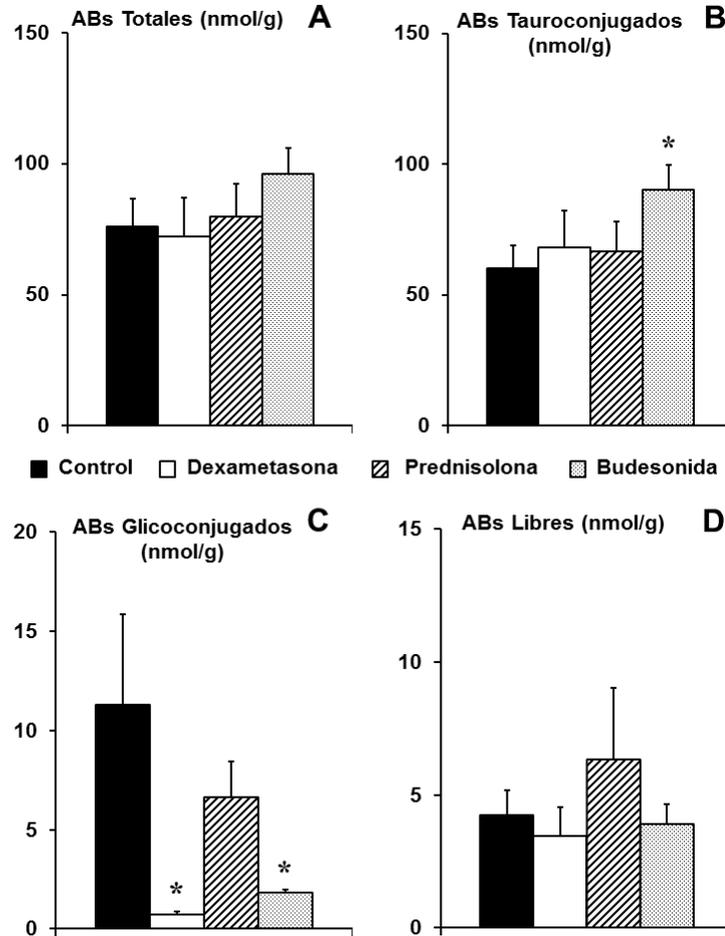


**Fig. 31.** Concentración de las diferentes especies de ácidos biliares en el plasma de ratas control (barras verdes) o tratadas durante 4 días con 50 mg/kg p.c./día de dexametasona (barras amarillas), prednisolona (barras azules) o budesonida (barras rojas). La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM de 8 animales en cada grupo.

En conjunto, los resultados obtenidos para los niveles plasmáticos de ABs indican que el tratamiento con glucocorticoides induce cierto grado de retención de estos compuestos en el compartimento sanguíneo. Aunque existe bastante variabilidad entre los animales dentro de cada grupo, el aumento de ABs tauroconjugados, y especialmente de TC, en las ratas tratadas con dexametasona y budesonida podría ser un reflejo de la menor expresión hepática del transportador sinusoidal Ntcp que habíamos encontrado en ambos grupos (Fig. 28D). Ntcp es el principal responsable de la captación de ABs conjugados por los hepatocitos (Hagenbuch y Dawson, 2004), por lo que la reducción de la expresión de Ntcp inducida por estos dos glucocorticoides, que como ya hemos argumentado no parece que se produzca a través de la vía mediada por FXR, podría explicar la elevación de los niveles plasmáticos de ABs. Por otra parte, se sabe que el paso limitante en la transferencia de ABs desde el plasma hasta la bilis es la secreción canalicular, por lo que la menor secreción biliar de ABs encontrada en el grupo tratado con dexametasona (Fig. 29B) podría contribuir también a la hipercolanemia en estos animales.

Por último, decidimos analizar también el contenido de ABs en tejido hepático, dato que tiene particular interés si tenemos en cuenta que los ABs intrahepáticos son los ligandos naturales de FXR, induciendo su activación y efectos, y habíamos visto que la administración de glucocorticoides induce modificaciones tanto en la expresión de Fxr como en la de varios de sus genes diana. En el hígado control, como ocurría

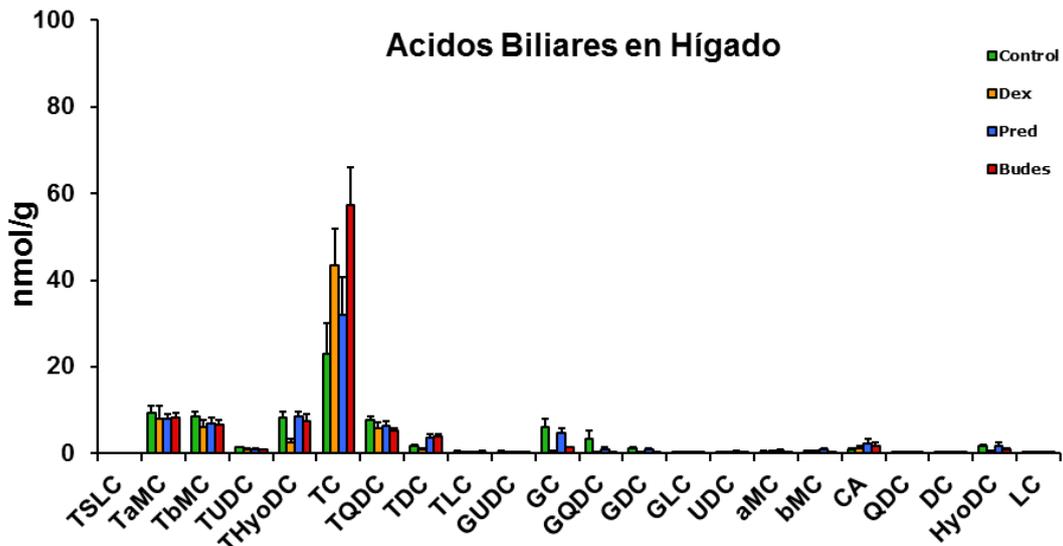
en la bilis, los ABs tauroconjugados son las especies mayoritarias, y suponen casi el 80% del total, seguidos de los glicoconjugados (15%) y de los libres (5%) (Fig. 32).



**Fig. 32.** Contenido de ácidos biliares (ABs) totales (A), tauroconjugados (B), glicoconjugados (C) y libres (D) en hígado de ratas de ratas control (barras negras) o tratadas durante 4 días con 50 mg/kg p.c./día de dexametasona (barras blancas), prednisolona (barras rayadas) o budesonida (barras punteadas). La determinación de ABs se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM de 8 animales en cada grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test de Bonferroni.

El contenido hepático de ABs totales (Fig. 32A), tauroconjugados (Fig. 32B) y libres (Fig. 32D) no se modificó significativamente por el tratamiento con glucocorticoides, con excepción de un moderado incremento (+49%) en la cantidad de tauroconjugados en el grupo tratado con budesonida, lo que ocurriría también en bilis (Fig. 29D). Sin embargo, se observó un importante descenso en los niveles de ABs glicoconjugados (Fig. 32C), sobre todo en animales tratados con dexametasona (-93%) y budesonida (-84%), cambios muy similares a los observados en bilis (Fig.

29E). Cuando se representó de manera individual el contenido hepático de las diferentes especies moleculares de ABs se puso de manifiesto que este descenso en los niveles de ABs glicoconjugados, se debe especialmente los ácidos glicocólico (GC) y glicoquenodesoxicólico (GQDC) (Fig. 33).



**Fig. 33.** Contenido de las diferentes especies de ácidos biliares en tejido hepático (nmol/g de tejido) de ratas de ratas control (barras verdes) o tratadas durante 4 días con 50 mg/kg p.c./día de dexametasona (barras amarillas), prednisolona (barras azules) o budesonida (barras rojas). La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM de 8 animales en cada grupo.

Esta caída en el contenido hepático y biliar de ABs glicoconjugados no puede explicarse por los cambios que experimenta la enzima conjugante de ABs, Baat, para la que habíamos visto una expresión reducida sólo en el hígado de las ratas tratadas con dexametasona, pero no con budesonida (Fig. 28C). Además la Baat conjuga ABs tanto con taurina como con glicina, por lo que la disminución específica de los ABs glicoconjugados es más probable que se deba a cambios en la disponibilidad del aminoácido glicina por cambios en el metabolismo energético en respuesta a la administración de glucocorticoides.

Por otra parte, se ha descrito que los ABs conjugados tienen una capacidad similar a la de los libres para unirse y activar a FXR (Parks et al., 1999), por lo que la reducción en la proporción de glicoconjugados observada en el tejido hepático probablemente no afecte de manera importante a la capacidad del conjunto de ABs para activar a este NR. No hemos encontrado cambios significativos ni en los niveles

intrahepáticos de ABs totales (Fig. 32A), ni en los de los ligandos más potentes de FXR, como el QDC (Fig. 33), que pudieran justificar el hecho de que, a pesar de que la expresión hepática de Fxr se reduce por el tratamiento con glucocorticoides, los niveles de algunas de sus dianas, como Bsep, están incrementados. No hay que descartar, sin embargo, que cambios a más corto plazo en los niveles intrahepatocitarios de ABs hayan puesto en marcha mecanismos compensatorios FXR-dependientes, como sucede cuando se acumulan ABs en situaciones de colestasis (Zollner et al., 2006a), que hayan tenido como resultado la aparente normalización de los niveles intrahepáticos de ABs en el momento que se llevaron a cabo las determinaciones analíticas, a los 5 días de iniciado el tratamiento.

#### 4.4.3. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN HOMEOSTASIS DE ACIDOS BILIARES EN CÉLULAS HepG2

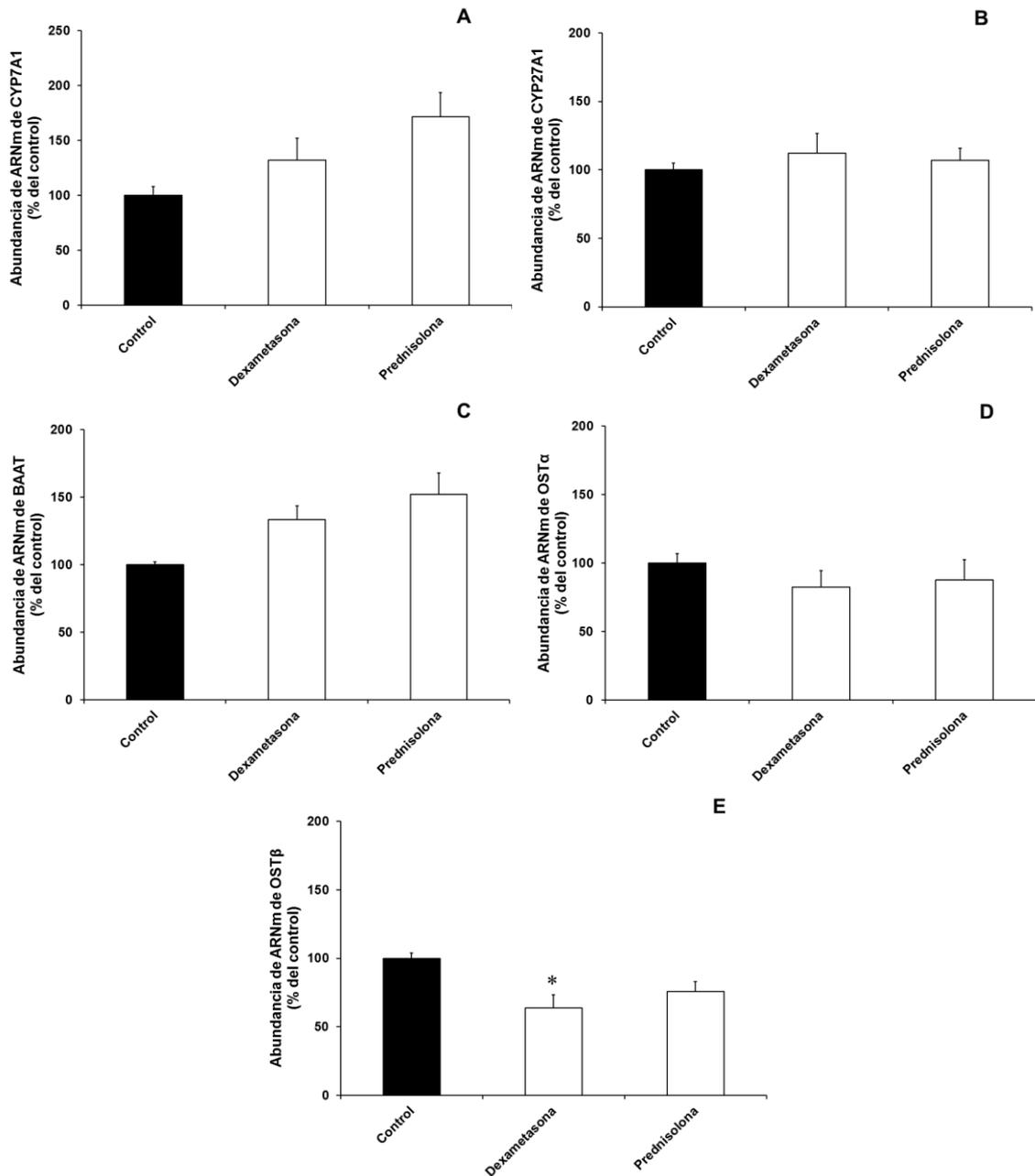
El estudio del efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de genes implicados en la homeostasis de los ABs se extendió también al modelo *in vitro*, en cultivos de células HepG2, en los que ya habíamos confirmado que estos compuestos alteran la expresión y probablemente la vía de señalización del receptor de ABs FXR. En primer lugar las células se expusieron durante 24 h a dexametasona o prednisolona (20  $\mu$ M) y se analizaron los niveles de ARNm de las enzimas claves de la síntesis (CYP7A1 y CYP27A1) y conjugación (BAAT) de ABs. Se determinó también la expresión del transportador NTCP, encontrándose niveles extremadamente bajos en estas células, que impidieron estudiar con fiabilidad los cambios de expresión de esta proteína. En su lugar decidimos determinar la expresión de los transportadores de solutos orgánicos OST $\alpha$  y OST $\beta$ , que sí se expresan en células HepG2 y también transportan ABs. En situaciones de colestasis, cuando los ABs alcanzan niveles elevados en hígado, FXR induce la expresión del heterodímero OST $\alpha$ /OST $\beta$  para permitir la salida de los ABs del hígado a la circulación sistémica y ser posteriormente eliminados en la orina (Zollner et al., 2006b).

La presencia de glucocorticoides en el medio de cultivo durante 24 h no indujo cambios estadísticamente significativos en los niveles de ARNm de las enzimas analizadas (Fig. 34). Sí se observó una tendencia al aumento en la expresión de CYP7A1 (Fig. 34A) y BAAT (Fig. 34C), sobre todo por el tratamiento con prednisolona, mientras que la de CYP27A1 no se modificó (Fig. 34B). Estos cambios no se corresponden con los observados en los hígados de las ratas tratadas durante 4 días, en las que la prednisolona carecía de efecto, y la dexametasona deprimía la expresión de Cyp7a1 y Baat, y estimulaba la de Cyp27a1 (Fig. 28). La existencia de diferencias en la regulación de CYP7A1 entre roedores y humanos ya ha sido descrita (Goodwin et al., 2000; Goodwin et al., 2003; Lee y Moore, 2008).

Por otra parte, otros autores han descrito una inducción en la expresión de la enzima conjugante de ABs Baat por dexametasona en hígado de rata (Chen et al., 2009), similar a la encontrada en nuestros estudios en células HepG2 (Fig. 34C) y opuesto a lo observado en los experimentos *in vivo*.

Tampoco la expresión de OST $\alpha$  y OST $\beta$  se alteró significativamente tras 24 h de exposición a prednisolona (Fig. 34D y 34E). La dexametasona provocó un

descenso de su expresión, que sólo fue significativo en el caso de la isoforma  $\beta$  del heterodímero (-37%) (Fig. 34E).



**Fig. 34.** Niveles relativos de ARNm de proteínas implicadas en la homeostasis de los ABs en células de hepatoblastoma humano, HepG2, control (barras negras) y tratadas con los glucocorticoides dexametasona o prednisolona (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de las células control, no tratadas, y son media  $\pm$  EEM de 5 cultivos llevados a cabo por duplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante test de valores apareados. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para las células control fue:  $33,92 \pm 0,79$  para CYP7A1 (A);  $25,01 \pm 0,26$  para CYP27A1 (B);  $29,84 \pm 0,23$  para BAAT (C),  $26,9 \pm 0,37$  para OST $\alpha$  (D) y  $29,78 \pm 0,41$  para OST $\beta$  (E).

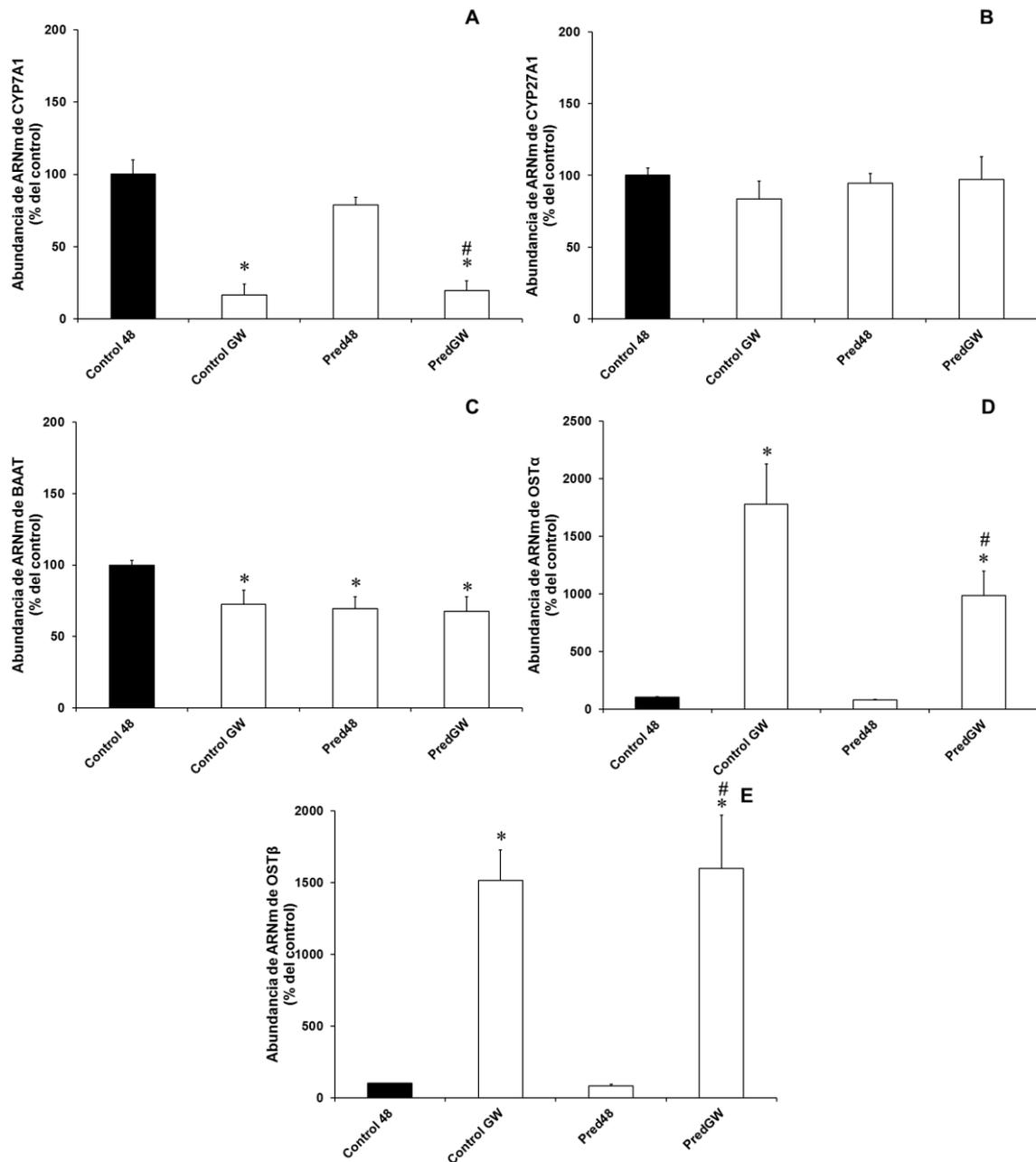
De los cambios observados, sólo el incremento en la expresión de CYP7A1 y la caída en la de los OSTs son consistentes con el descenso de los niveles de FXR encontrado en las células HepG2 tratadas con glucocorticoides (Fig. 25C), ya que la activación de FXR se sabe que induce la represión de CYP7A1 y la estimulación de OST $\alpha$ /OST $\beta$ .

A la vista de estos resultados decidimos analizar también la expresión de estos genes en los cultivos de células HepG2 tratados con prednisolona durante otras 24 h adicionales, en las que se añadía también al medio el agonista sintético de FXR, GW4064 (Fig. 35), para comprobar el efecto del glucocorticoide sobre la respuesta del NR.

Como era de esperar, la expresión de la enzima clave en la vía clásica de síntesis de ABs, CYP7A1, se reprimió un 80% en presencia de GW4064, tanto en células control como expuestas 48 h a prednisolona, aunque ya el tratamiento únicamente con el glucocorticoide redujo la expresión de la enzima un 20% respecto de las células control (Fig. 35A), lo que no se había observado tras 24 h de exposición (Fig. 34A). Sin embargo ninguno de los tratamientos ensayados modificó la expresión de CYP27A1 (Fig. 34B y 35B), lo que es consistente con una menor dependencia de esta enzima del control por FXR (Eloranta et al., 2005).

Los niveles de ARNm de la enzima conjugante de ABs, BAAT, se redujeron también un 26% tras 48 h de incubación con prednisolona (Fig. 35C), a diferencia de nuevo de lo observado tras sólo 24 h de exposición (Fig. 34C). En este caso, la adición GW4064 a las células control no tuvo el efecto esperado de estimulación de la expresión de esta enzima (Esquema 6), que de hecho se redujo significativamente. Cuando se administraron conjuntamente prednisolona y GW4064 se encontró el mismo grado de represión de los niveles de BAAT que cuando se añadieron por separado, indicando que ambos compuestos no parecen tener efectos aditivos sobre la expresión de esta enzima.

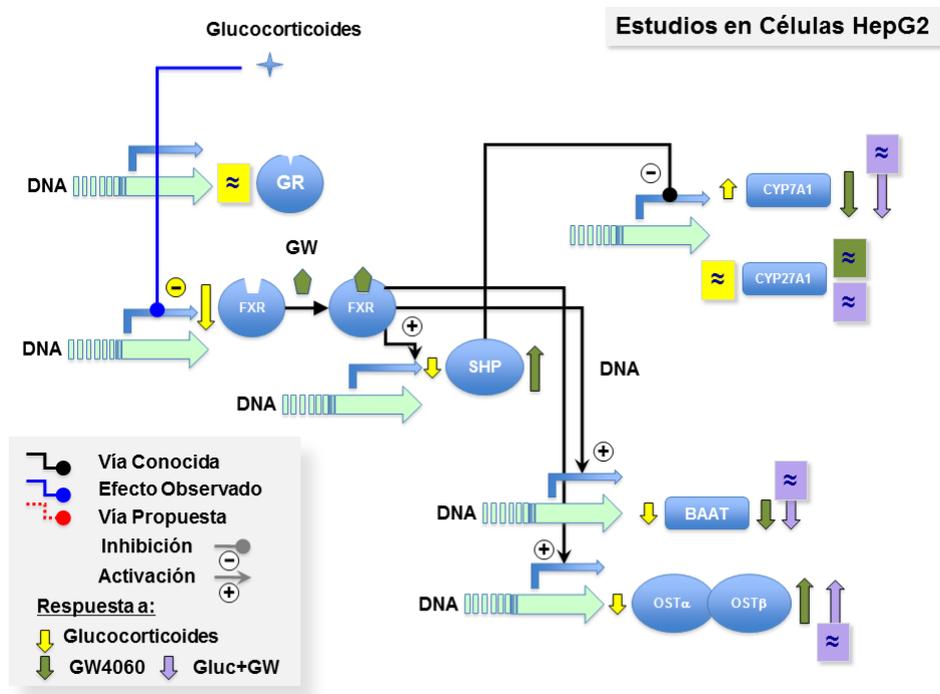
La expresión de las dos isoformas de OST $\alpha$ /OST $\beta$  se indujo marcadamente en células HepG2 control por la exposición a GW4064 (+1680% y +1410%, respectivamente) (Fig. 35D y 35E). Sin embargo, en el caso de OST $\alpha$ , la inducción debida a GW4064 se moderó cuando las células se trataron además con prednisolona (+890%). La prednisolona por sí sola no produjo cambios significativos en la expresión de las OSTs.



**Fig. 35.** Niveles relativos de ARNm de proteínas implicadas en la homeostasis de los ABs en células de hepatoblastoma humano HepG2 control (barras negras) y tratadas con el agonista de FXR GW4064, prednisolona o ambos (barras blancas), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje de las células control, no tratadas, y son media  $\pm$  EEM de 3 cultivos realizados por duplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, #,  $p < 0,05$  comparando con el grupo prednisolona, mediante el test de Bonferroni. El valor medio de ciclo umbral (Ct)  $\pm$  EEM encontrado para las células control fue:  $31,87 \pm 0,96$  para CYP7A1 (A);  $24,62 \pm 0,39$  para CYP27A1 (B);  $29,92 \pm 0,41$  para BAAT (C),  $26,23 \pm 0,54$  para OST $\alpha$  (D) y  $28,67 \pm 0,42$  para OST $\beta$  (E).

En resumen, en el modelo *in vitro* hemos encontrado cambios no muy marcados tras 24 h de exposición a los glucocorticoides, que incluso se revierten al prolongar un día más el tratamiento. La activación de FXR por su ligando GW4064 provocó los cambios esperables (salvo en el caso de la enzima BAAT), al estimular la

expresión de las OSTs y también de SHP (Fig. 26C), cuya sobre-expresión debe ser a su vez responsable de la inhibición de la de CYP7A1. La presencia de glucocorticoides en el medio no bloqueó la inducción de FXR por su ligando, pero sí se tradujo en una menor respuesta en la estimulación de sus dianas, sobre todo de OST $\alpha$ , pero también de SHP, e indirectamente, en una menor represión de CYP7A1. En el esquema 6 se recogen los cambios encontrados en este modelo, que en su mayoría pueden atribuirse a la reducción de la expresión de FXR inducida en células HepG2 por la exposición a glucocorticoides, si bien no se puede descartar que además de los niveles de esta proteína, también su función señalizadora se vea alterada por estos compuestos.



**Esquema 6:** Representación esquemática de la posible interacción entre los glucocorticoides y la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis de los ácidos biliares en células de hepatoblastoma humano HepG2.

#### 4.4.4. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO TRANSFECTADAS CON FXR

Para investigar en mayor profundidad el efecto de los glucocorticoides sobre la vía de señalización del receptor FXR decidimos expresar esta proteína en células de hepatoma humano Alexander o PLC/PRF/5. Estas células presentan unos niveles

basales de expresión de FXR prácticamente inapreciables si los comparamos con los detectados en hígado humano (<0,1%) (Tabla 1). Se llevó a cabo una doble transfección, para introducir la isoforma de FXR más abundante en hígado, la FXR $\alpha$ 2 (que denominaremos FXR $\alpha$ -, ya que es la isoforma que carece de inserto), junto con el NR RXR $\alpha$ , que forma un heterodímero con FXR y con otros NRs del mismo tipo. Esta dimerización es necesaria para que los receptores se unan a sus elementos de respuesta específicos en el promotor de sus genes diana. Las construcciones de FXR $\alpha$ - y RXR $\alpha$  utilizadas fueron obtenidas en nuestro grupo de investigación, como parte de su Tesis Doctoral, por el Ldo. D. Javier Rodríguez Vaquero quién también puso a punto las condiciones de la transfección con lípidos catiónicos empleadas.

**Tabla 1.** Expresión de las proteínas de interés en células Alexander

Gen	% de Hígado Humano
FXR	0,07 $\pm$ 0,03
GR $\alpha$ $\beta$	54,5 $\pm$ 13,4
BSEP	0,006 $\pm$ 0,003
SHP	5,58 $\pm$ 2,26
CYP7A1	ND
CYP27A1	0,07 $\pm$ 0,01
OST $\alpha$	0,74 $\pm$ 0,47
OST $\beta$	20366 $\pm$ 17162
MRP2	22,1 $\pm$ 4,7
MRP4	285 $\pm$ 39
BCRP	18,7 $\pm$ 6,8

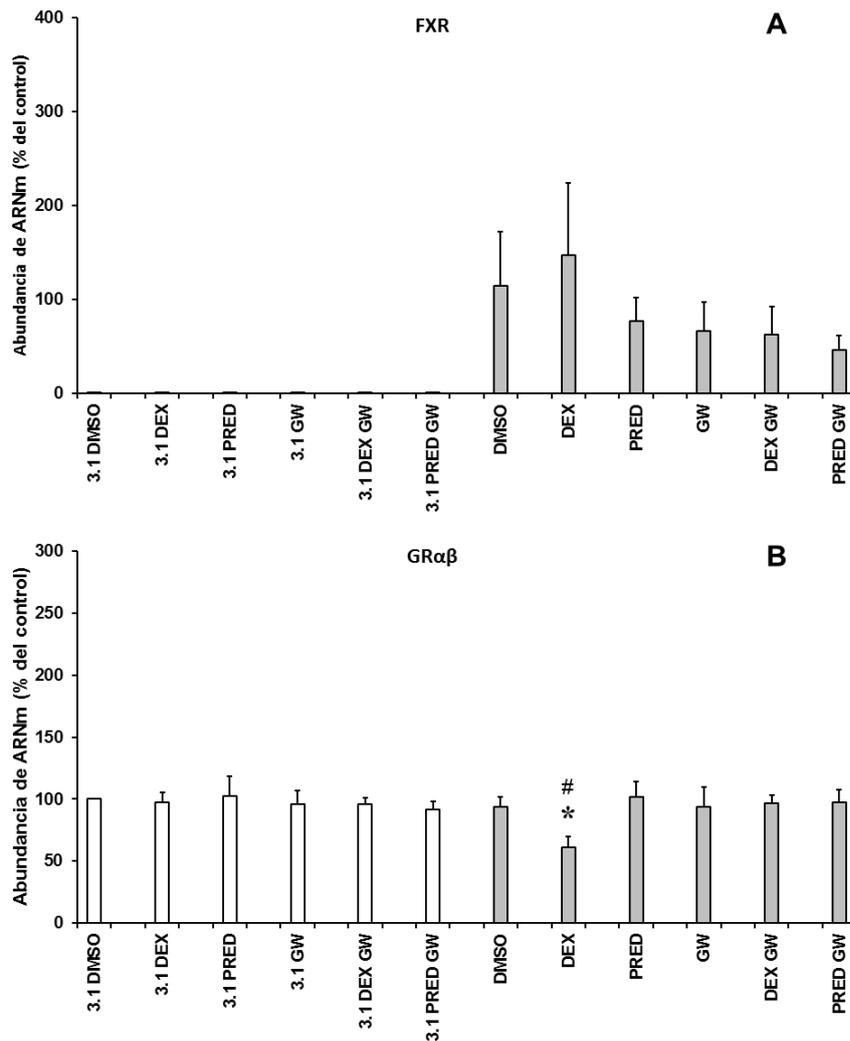
Niveles relativos de ARNm en células Alexander control, transfectadas con el vector vacío 3.1, determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de hígado humano control, y son media  $\pm$  EEM de 3 cultivos. N.D. No detectable (Ct > 40).

Al día siguiente de la transfección, las células cotransfectadas con FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  se expusieron durante 48 h a dexametasona o prednisolona (20  $\mu$ M) en presencia o no del agonista de FXR GW4064 (1  $\mu$ M) durante las últimas 24 h del cultivo. Como controles se utilizaron células transfectadas con el vector vacío 3.1, que

se sometieron a las mismas condiciones experimentales. En la tabla 1 se muestran los niveles basales de expresión de las diferentes proteínas estudiadas en las células control tratadas sólo con el vehículo, DMSO.

En estos cultivos se determinó, en primer lugar, la expresión de FXR para comprobar la eficacia de la transfección. Para evitar posibles interferencias en la PCR del ADN vectorial remanente, tras la retrotranscripción se sometió al ADNc a una digestión con la enzima de restricción *DpnI*, que corta el ADN metilado de origen plasmídico, asegurándonos así de que el FXR amplificado en la PCR correspondía al que se había expresado en las células. Como ya hemos indicado, la expresión de FXR fue prácticamente indetectable en las células transfectadas con el vector vacío 3.1, independientemente del tratamiento aplicado (Fig. 36A, barras blancas). Por el contrario, en las células cotransfectadas con las construcciones de FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  la expresión de FXR era elevada, comparable a la detectada en hígado humano control, aunque variable, debido probablemente a diferencias en la eficacia de transfección entre los distintos experimentos (Fig. 36A, barras grises). El tratamiento con los glucocorticoides y/o GW4064 no modificó significativamente los niveles de FXR.

En estos cultivos se analizó también la expresión del receptor de glucocorticoides. Se emplearon los “primers” diseñados para amplificar conjuntamente ambas isoformas del receptor, GR $\alpha$  y GR $\beta$ . Su expresión en células Alexander control fue algo inferior a la encontrada en hígado (tabla 1) y no se modificó por la transfección de FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$ , ni por la exposición a prednisolona o al ligando de FXR (Fig. 36B). Sólo la dexametasona mostró un moderado efecto inhibitor sobre la expresión del GR en células Alexander que expresaban también FXR (Fig. 36B), al igual que ocurría en los hígados de las ratas tratadas con este glucocorticoide (Fig. 24A).



**Fig. 36.** Niveles relativos de ARNm de FXR (A) y GR $\alpha$  $\beta$  (B) en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con el vector vacío 3.1 (barras blancas) o cotransfectadas con las construcciones de FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  (barras grises) y tratadas o no (DMSO) con GW4064 (GW) y/o los glucocorticoides dexametasona (DEX) o prednisolona (PRED), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje respecto de hígado humano control (A) o de células control (3.1 DMSO) (B), y son media  $\pm$  EEM de 4 cultivos. \*,  $p < 0,05$  comparando con el control 3.1 DMSO; #,  $p < 0,05$  comparando las células transfectadas con FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  con el grupo DMSO, mediante el test de Bonferroni.

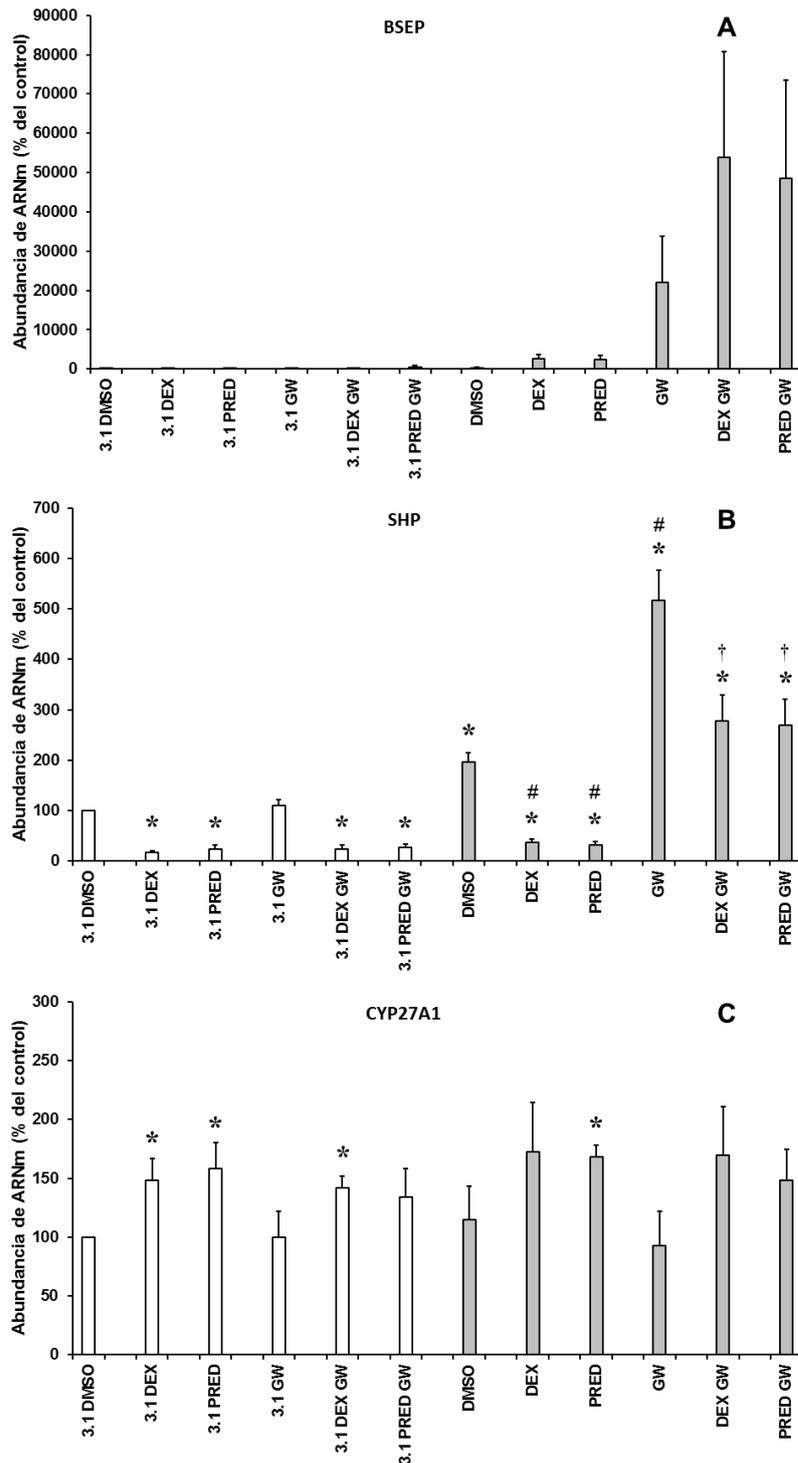
El siguiente paso fue analizar la expresión de algunas dianas de FXR, como BSEP, SHP y las enzimas CYP7A1 y CYP27A1. Los niveles de ARNm de estas proteínas en las células Alexander control fueron muy bajos en comparación con el hígado (Tabla 1), de sólo el 6% para SHP, inferiores al 0,1% para CYP27A1 y al 0,01% para BSEP, e indetectables en el caso de CYP7A1, que no pudimos analizar en estas células.

La transfección con FXR incrementó (+115%) la expresión de la bomba exportadora de sales biliares, BSEP, con respecto de las células transfectadas con el vector vacío, si bien siguió siendo extremadamente baja en comparación con los

niveles hepáticos. En estas condiciones el tratamiento con el agonista GW4064 indujo un incremento del 10.000% en los niveles de ARNm de BSEP, indicando así que el FXR expresado en estas células era funcional (Fig. 37A). La exposición de las células transfectadas con FXR a los glucocorticoides, aún en ausencia de GW4064, determinó una subida de 10 veces en la expresión del transportador. A pesar de la considerable variabilidad de respuesta en los diferentes cultivos, hecho que quizá haya que atribuir a los bajos niveles de expresión de BSEP en estas células (Tabla 1), se observó una tendencia a un efecto aditivo de los glucocorticoides y el agonista de FXR en las células FXR-positivas tratadas con ambos (Fig. 37A).

La expresión de SHP aumentó también (+79%) en las células Alexander transfectadas con FXR, y más cuando este NR se estimuló con GW4064 (Fig. 37B), indicando de nuevo que la proteína expresada era funcional. La incubación con ambos glucocorticoides indujo una marcada reducción (-80%) en los niveles de ARNm de SHP en células que expresaban FXR, como ya habíamos visto en las células HepG2 (Fig. 26D) y en los experimentos *in vivo* (Fig. 24C), y bloqueó en buena medida la respuesta inductora del GW4064. Pero los resultados más interesantes fueron los obtenidos en las células Alexander que no expresaban FXR (Fig. 37B, barras blancas), en las que los glucocorticoides mostraron el mismo efecto inhibitorio sobre los niveles de SHP que en las células transfectadas con FXR, independientemente o no del tratamiento con GW4064 que, como es lógico, carecía de efecto en estas células.

Estos datos sugieren que SHP es sensible a glucocorticoides aún en ausencia de FXR, lo que nos lleva a plantearnos la idea de un posible efecto directo de los glucocorticoides, independiente de FXR, sobre la expresión de este represor transcripcional, que sería antagónico al que ejercen los ABs a través de su receptor FXR (Esquema 7).

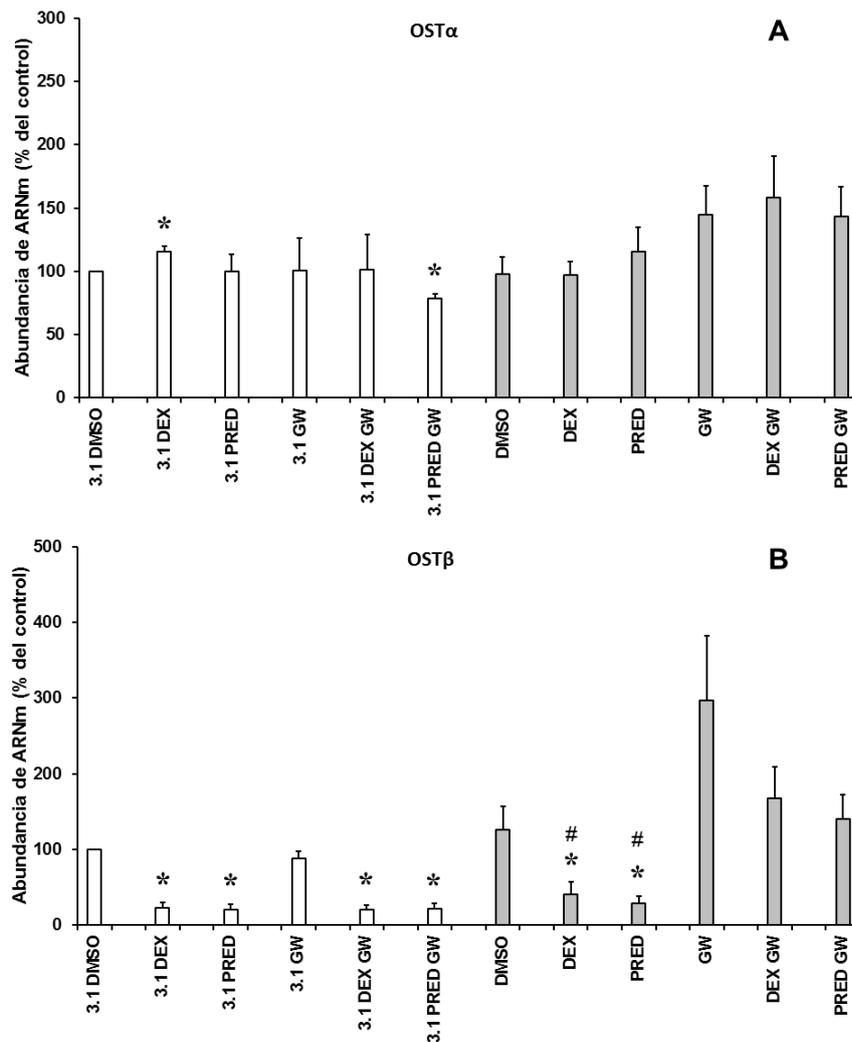


**Fig. 37.** Niveles relativos de ARNm de BSEP (A), SHP (B) y CYP27A1 (C) en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con el vector vacío 3.1 (barras blancas) o cotransfectadas con las construcciones de FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  (barras grises) y tratadas o no (DMSO) con GW4064 (GW) y/o los glucocorticoides dexametasona (DEX) o prednisolona (PRED), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje de células control (3.1 DMSO), y son media  $\pm$  EEM de 4 cultivos. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo 3.1.DMSO; #,  $p < 0,05$  comparando las células transfectadas con FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  con el grupo DMSO; †,  $p < 0,05$  comparando los grupos DEX GW y PRED GW con el grupo GW mediante el test de Bonferroni.

SHP controla la síntesis de ABs inhibiendo la transcripción de las enzimas llave de la misma, CYP7A1 y CYP27A1. Como ya hemos señalado, los niveles de estas enzimas eran muy bajos (indetectables en el caso de CYP7A1) en células Alexander. Para CYP27A1 se observó una tendencia a aumentar sus niveles de ARNm en las células expuestas a glucocorticoides (Fig. 37C), lo que estaría de acuerdo con el descenso en la expresión de SHP (Fig. 37B).

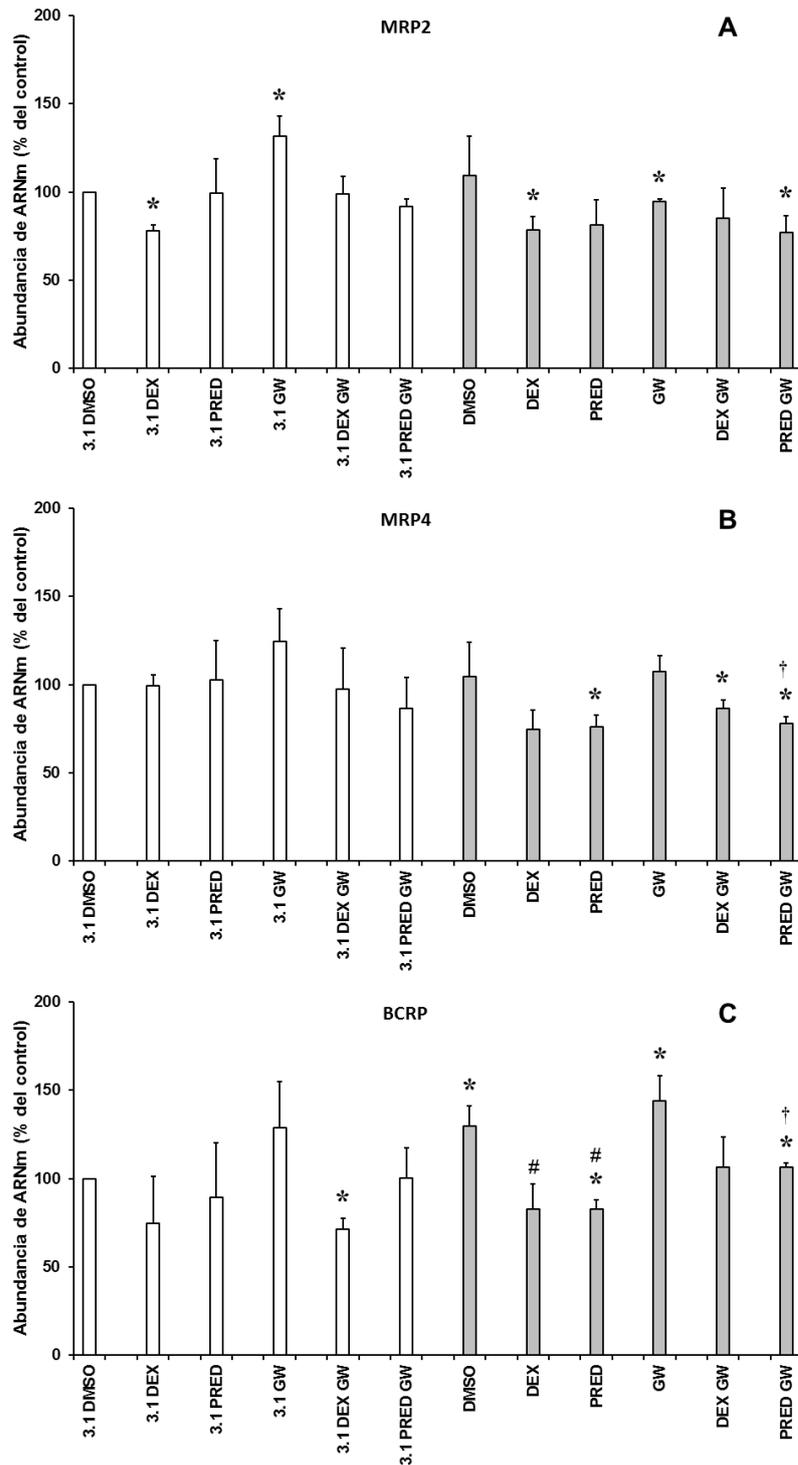
Analizamos también en estos cultivos la expresión del heterodímero OST $\alpha$ /OST $\beta$ , proteínas diana de FXR cuya inducción por GW4064 en células HepG2 se bloqueaba en cierto grado por la presencia de prednisolona (Fig. 35D). En células Alexander control la expresión de OST $\alpha$  era muy baja (<1%) respecto a la encontrada en hígado humano (Tabla 1) y sus niveles apenas experimentaron modificaciones significativas en las diferentes condiciones experimentales ensayadas (Fig. 38A). Sin embargo, de todas las proteínas analizadas en células Alexander control, OST $\beta$  era la que presentaba mayores niveles de expresión en comparación con el hígado (Tabla 1), que no se modificaron por la cotransfección con FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  (Fig. 38B). El tratamiento con dexametasona y prednisolona reprimió la expresión (-65% y -75%, respectivamente) de OST $\beta$  en las células que expresaban FXR y redujo también la respuesta a la estimulación por GW4064 (Fig. 38B, barras grises). De igual modo que en el caso de SHP, los glucocorticoides fueron capaces de reprimir también la expresión de OST $\beta$  (-79%) en células Alexander carentes de FXR (Fig. 38B, barras blancas). Esto indica que estos compuestos son capaces de inhibir la expresión de este transportador independientemente de FXR, lo que de nuevo sería un efecto antagonista al ejercido por FXR sobre esta diana (Esquema 7).

Por último, analizamos también la expresión de proteínas ABC en células Alexander. En condiciones basales era en torno al 20% de la detectada en hígado humano control para MRP2 y BCRP, y casi 3 veces más alta que la hepática en el caso de MRP4 (Tabla 1), y no se modificó por la cotransfección con FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  (Fig. 39), salvo un ligero incremento (+37%) en el caso de BCRP (Fig. 39C).



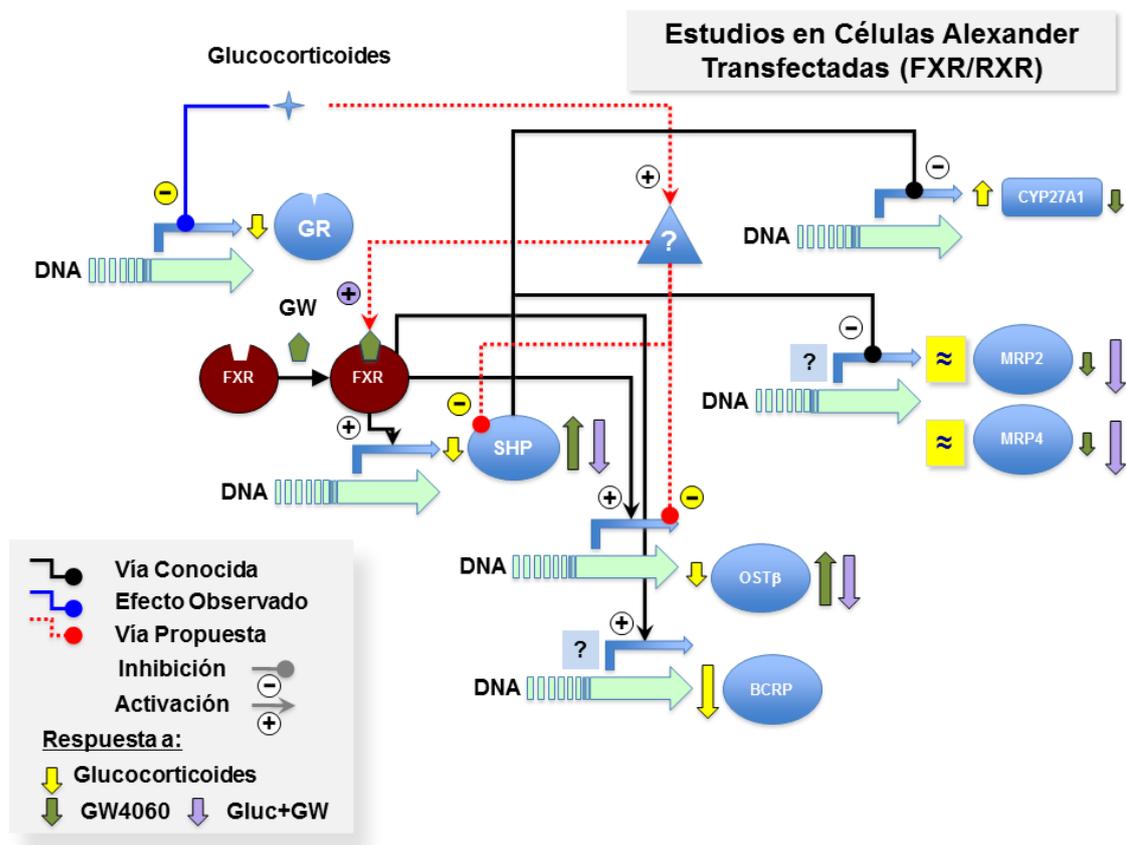
**Fig. 38.** Niveles relativos de ARNm de OST $\alpha$  (A) y OST $\beta$  (B) en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con el vector vacío 3.1 (barras blancas) o cotransfectadas con las construcciones de FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  (barras grises) y tratadas o no (DMSO) con GW4064 (GW) y/o los glucocorticoides dexametasona (DEX) o prednisolona (PRED), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje de células control (3.1 DMSO), y son media  $\pm$  EEM de 4 cultivos. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo 3.1.DMSO; #,  $p < 0,05$  comparando las células transfectadas con FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  con el grupo DMSO mediante el test de Bonferroni.

La incubación con glucocorticoides no produjo cambios marcados en la expresión de MRP2 y MRP4 en las células Alexander de hepatoma humano (Fig. 39A y 39B), como tampoco lo había hecho en células HepG2 (Fig. 23 y Fig. 27). En el caso de BCRP, se observó un efecto inhibitor de los glucocorticoides, más claro cuando las células expresaban FXR (Fig. 39C, barras grises), lo que coincide con lo descrito para esta proteína transportadora en el apartado anterior.



**Fig. 39.** Niveles relativos de ARNm de MRP2 (A), MRP4 (B) y BCRP (C) en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con el vector vacío 3.1 (barras blancas) o cotransfectadas con las construcciones de FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  (barras grises) y tratadas o no (DMSO) con GW4064 (GW) y/o los glucocorticoides dexametasona (DEX) o prednisolona (PRED), determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como porcentaje de células control (3.1 DMSO), y son media  $\pm$  EEM de 4 cultivos. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo 3.1.DMSO; #,  $p < 0,05$  comparando las células transfectadas con FXR $\alpha$ -/RXR $\alpha$  con el grupo DMSO; †,  $p < 0,05$  comparando los grupos DEX GW y PRED GW con el grupo GW, mediante el test de Bonferroni.

En resumen, en células de hepatoma humano Alexander, que no expresan FXR endógeno, la transfección con FXR $\alpha$ -RXR $\alpha$  permitió identificar efectos de los glucocorticoides sobre la expresión de diferentes proteínas relacionadas con la homeostasis de los ABs y la función hepatobiliar (Esquema 7). En algunos casos los glucocorticoides tuvieron efectos agonistas a los mediados por FXR, por ejemplo la inducción de la expresión de BSEP (Fig. 37A), mientras que en otros su efecto fue antagonista, como ocurrió para SHP y OST $\beta$ , cuya expresión se estimula por la activación de FXR con GW4064 y se reprime por el tratamiento con dexametasona y prednisolona (Fig. 37B y 38B). Hay que destacar que este efecto inhibitorio parece ser FXR-independiente, ya que tiene lugar también en las células que no expresan FXR.

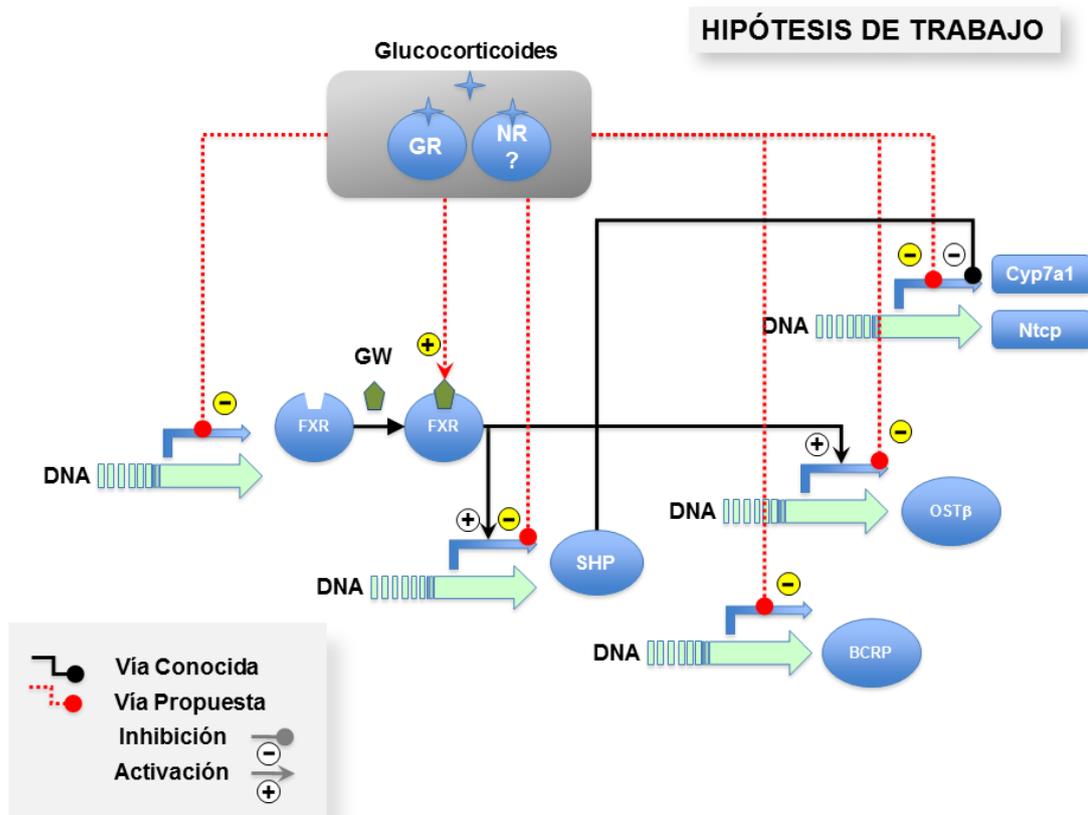


**Esquema 7:** Representación esquemática de la posible interacción entre los glucocorticoides y la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis de los ácidos biliares en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con las construcciones FXR $\alpha$ -RXR.

Además de por FXR, se ha descrito la regulación de la expresión de SHP por varios NRs y factores de transcripción, incluyendo LXR $\alpha$ , LRH-1, PXR, PPAR $\gamma$ , HNF4 $\alpha$ , SF-1 (Steroidogenic Factor-1), el receptor de estrógenos ER $\alpha$ , SREBP-1c, c-

jun, y otros (Zhang et al., 2011), pero no hemos encontrado en la literatura referencia a un papel de los glucocorticoides o su receptor GR, en dicha regulación. Al contrario, sí se sabe que el GR es una diana de SHP, que ejerce sobre él, al igual que sobre otros NRs, su efecto represor (Borgius et al., 2002).

Aunque FXR es también el principal regulador de la expresión de OST $\alpha$ /OST $\beta$ , parece que otros factores de transcripción podrían estar también implicados, incluyendo el propio SHP, LRH-1, LXR o PXR (Ballatori et al., 2009). Concretamente para PXR se ha descrito que su activación por un ligando específico provoca en ratones una represión en la expresión de OSTs (Teng y Piquette-Miller, 2007). Puesto que se sabe que algunos efectos de la dexametasona pueden estar mediados por la activación de PXR (Ma et al., 2008), podría ser interesante investigar más a fondo el papel de este NR de xenobióticos en el efecto inhibitor inducido por glucocorticoides sobre la expresión de OST $\beta$  y SHP en ausencia de FXR.



**Esquema 8:** Representación esquemática de la posible interacción entre los glucocorticoides y la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis de los ácidos biliares.

En resumen, los resultados de nuestro estudio en diferentes modelos experimentales ponen de manifiesto la existencia de interacciones, hasta ahora no descritas, entre las vías de señalización celular activadas por glucocorticoides y la del receptor nuclear de ABs FXR en el hígado (Esquema 8). La expresión hepática de FXR se reduce en respuesta al tratamiento con glucocorticoides, hecho que podría justificar la menor respuesta a la activación de FXR por sus ligandos. Además, sobre algunos genes diana de FXR se han encontrado efectos antagónicos a los inducidos por éste receptor, que no es probable que estén mediados por él. Tanto el mecanismo de la inhibición de la expresión de FXR por glucocorticoides, como los implicados en los efectos agonistas y antagonistas de estos esteroides sobre los genes diana de FXR permanecen aún por dilucidar y serán objeto de investigación futura por parte de nuestro grupo.





# 5

## CONCLUSIONES

---



### **Conclusiones derivadas del objetivo 1:**

1. Los ácidos biliares son capaces de alcanzar el núcleo de los hepatocitos incluso en ausencia de ayuda por parte de proteínas y estructuras extranucleares.
2. Aunque los niveles intranucleares de ácidos biliares dependen de su concentración intracelular, la existencia de diferencias entre distintas moléculas orgánicas de forma independiente del tamaño y de la carga eléctrica sugiere que, además de la difusión desde el citoplasma, debe haber otros mecanismos que determinen su contenido nuclear total.
3. Los ácidos biliares no se distribuyen de forma homogénea dentro del núcleo de los hepatocitos, sino que se concentran en determinadas regiones que son transcripcionalmente activas y en las que se co-localizan específicamente con su receptor nuclear, el FXR.

### **Conclusiones derivadas del objetivo 2:**

4. La proteína MRP2, responsable del transporte de bilirrubina conjugada y otros aniones orgánicos a través de la membrana canalicular, también se localiza en el sistema membranoso formado por la envuelta nuclear externa y el retículo endoplásmico de hepatocitos de rata.
5. La proteína MRP2 localizada en el compartimento perinuclear se encuentra glicosilada y madura. En situaciones experimentales en las que la expresión hepática de MRP2 se modifica, como la colestasis obstructiva y tras el tratamiento de los animales con dexametasona o cisplatino, se producen cambios paralelos en la abundancia de proteína MRP2 perinuclear.
6. La MRP2 perinuclear se localiza en las mismas estructuras membranosas que la enzima conjugante de bilirrubina UDP-glucuronil transferasa 1A1. Esto sugiere que el papel de MRP2 en esta membrana podría ser el transporte de derivados conjugados de bilirrubina y otros compuestos potencialmente tóxicos desde el interior de este compartimento hacia el citosol, para su posterior secreción canalicular.

### **Conclusiones derivadas de los objetivos 3 y 4:**

7. El tratamiento con glucocorticoides reduce la expresión hepática del receptor nuclear de ácidos biliares FXR tanto *in vivo*, en hígado de rata, como *in vitro*, en células hepáticas de origen humano. Esta puede ser la causa de la menor respuesta a la activación de FXR, por sus agonistas, que se observa en

presencia de glucocorticoides, si bien no se puede descartar una interacción directa de estas moléculas con alguno de los integrantes de la vía de señalización de FXR.

8. El tratamiento con glucocorticoides modifica la expresión hepática de enzimas responsables de la síntesis y conjugación de ácidos biliares, y de transportadores tanto sinusoidales como canaliculares implicados en su transporte hepatobiliar, lo que concuerda con los cambios en la circulación enterohepática de ácidos biliares observados en animales tratados con estos compuestos.
9. Los glucocorticoides presentan efectos agonistas a los de los ácidos biliares y otros ligandos de FXR sobre ciertos genes diana de este receptor nuclear, mientras que sobre otros poseen efectos antagonistas. Lo que sugiere que los glucocorticoides pueden ejercer un efecto independiente de FXR sobre algunos los genes diana de este receptor nuclear, como el transportador OST $\beta$  y el represor transcripcional SHP.





# 6

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Adachi M, Sampath J, Lan LB, Sun D, Hargrove P, Flatley R, Tatum A, Edwards MZ, Wezeman M, Matherly L, Drake R y Schuetz J (2002) Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem* 277(41):38998-39004.
- Aebi UP, N Jarnik, M (1992) Structure and function of the nuclear pore complex, a supramolecular machine mediating molecular trafficking across the nuclear envelope. *Verh Dtsch Zool Ges* 85:285-296.
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H y Sugiyama Y (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511(1):7-16.
- Albrecht C y Vitorro E (2007) The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch* 453(5):581-589.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V y Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58(23):5337-5339.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ y Suchy FJ (2001) Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 276(31):28857-28865.
- Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongelard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S y Bouvet P (2006) Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *Embo J* 25(8):1669-1679.
- Aranda A y Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81(3):1269-1304.
- Arias IM, Popper H, Schachter D y Shafritz DA (1982) The liver. Biology and pathology, pp 192-198, Raven Press, New York.
- Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gerceker F, van Vliet EA, Scheffer GL, Scheper RJ, van der Valk P, Baayen JC y Troost D (2004) Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45(5):441-451.
- Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG, Massobrio M, Genta F, Danese S, Arisio R, Scheper RJ, Kool M, Scheffer GL, Willemse PH, van der Zee AG y Suurmeijer AJ (1999) Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 5(10):2798-2805.
- Babakhanian K, Bendayan M y Bendayan R (2007) Localization of P-glycoprotein at the nuclear envelope of rat brain cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361(2):301-306.
- Ballatori N, Li N, Fang F, Boyer JL, Christian WV y Hammond CL (2009) OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Front Biosci* 14:2829-2844.
- Barnes PJ y Adcock I (1993) Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 14(12):436-441.
- Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W y van der Graaf WT (2004) The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* 40(14):2064-2070.

- Beck IM, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G y De Bosscher K (2009) Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev* 30(7):830-882.
- Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR y Kruh GD (1998) Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J Natl Cancer Inst* 90(22):1735-1741.
- Belinsky MG, Chen ZS, Shchavezleva I, Zeng H y Kruh GD (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* 62(21):6172-6177.
- Belinsky MG y Kruh GD (1999) MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br J Cancer* 80(9):1342-1349.
- Benz C, Angermuller S, Tox U, Kloters-Plachky P, Riedel HD, Sauer P, Stremmel W y Stiehl A (1998) Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol* 28(1):99-106.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R y Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290(5497):1771-1775.
- Bergen AA, Plomp AS, Hu X, de Jong PT y Gorgels TG (2007) ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflugers Arch* 453(5):685-691.
- Berger J, Albet S, Bentejac M, Netik A, Holzinger A, Roscher AA, Bugaut M y Forss-Petter S (1999) The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *Eur J Biochem* 265(2):719-727.
- Berry MN, Edward SAM y Barritt GJ (1991) *Isolated hepatocytes: preparation, properties and applications*. Elsevier, Amsterdam.
- Berry MN y Friend DS (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43(3):506-520.
- Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G y Dombrowski F (2001) Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33(5):1206-1216.
- Bishop-Bailey D, Walsh DT y Warner TD (2004) Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10):3668-3673.
- Bjorkhem I (1992) Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J Lipid Res* 33(4):455-471.
- Blazquez AM, Briz O, Romero MR, Rosales R, Monte MJ, Vaquero J, Macias RI, Cassio D y Marin JJ (2011) Characterization of the Role of ABCG2 as a Bile Acid Transporter in Liver and Placenta. *Mol Pharmacol*.
- Blumberg B y Evans RM (1998) Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev* 12(20):3149-3155.
- Blumberg B, Sabbagh W, Jr., Juguilon H, Bolado J, Jr., van Meter CM, Ong ES y Evans RM (1998) SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 12(20):3195-3205.

- Bonner WM (1975) Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. *J Cell Biol* 64(2):421-430.
- Borgius LJ, Steffensen KR, Gustafsson JA y Treuter E (2002) Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *J Biol Chem* 277(51):49761-49766.
- Bretscher A, Chambers D, Nguyen R y Reczek D (2000) ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:113-143.
- Briz O, Cassio D, Blazquez AG, Grosse B, Serrano MA y Marin JJ (2007) Characterization of WIF-B9/R cells as an in vitro model with hepatocyte-like polarity and enhanced expression of canalicular ABC transporters involved in phase III of hepatic detoxification. *Toxicology* 232(1-2):24-36.
- Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H y Marin JJ (2002) Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chlorocholyglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol* 61(4):853-860.
- Bronger H, Konig J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D y Nies AT (2005) ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* 65(24):11419-11428.
- Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T y Keppler D (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 271(25):15091-15098.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ y Thompson RJ (2002) The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123(5):1649-1658.
- Campana G, Pasini P, Roda A y Spampinato S (2005) Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: role of the farnesoid X receptor. *Biochem Pharmacol* 69(12):1755-1763.
- Cao J, Stieger B, Meier PJ y Vore M (2002) Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(3):G757-766.
- Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F y Staels B (2006) The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* 281(16):11039-11049.
- Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho MT y Lamond AI (1992) Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* 117(1):1-14.
- Clawson GA, Blankenship LJ, Rhame JG y Wilkinson DS (1992) Nuclear enlargement induced by hepatocarcinogens alters ploidy. *Cancer Res* 52(5):1304-1308.
- Coleman JP, Kirby LC y Klein RA (1995) Synthesis and characterization of novel analogs of conjugated bile acids containing reversed amide bonds. *J Lipid Res* 36(4):901-910.
- Combettes L, Berthon B y Claret M (1992) Tauroolithocholate-induced Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J* 287 ( Pt 3):891-896.

- Conti E y Izaurralde E (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* 13(3):310-319.
- Conti E, Muller CW y Stewart M (2006) Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol* 16(2):237-244.
- Cook PR (2002) Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nat Genet* 32(3):347-352.
- Costarelli V y Sanders TA (2002) Plasma deoxycholic acid concentration is elevated in postmenopausal women with newly diagnosed breast cancer. *Eur J Clin Nutr* 56(9):925-927.
- Courtois A, Payen L, Guillouzo A y Fardel O (1999a) Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *FEBS Lett* 459(3):381-385.
- Courtois A, Payen L, Vernhet L, Morel F, Guillouzo A y Fardel O (1999b) Differential regulation of canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) expression by the chemopreventive agent oltipraz in primary rat hepatocytes and in rat liver. *Carcinogenesis* 20(12):2327-2330.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH y Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274(1 Pt 1):G157-169.
- Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I y Keppler D (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55(5):929-937.
- Chan LM, Lowes S y Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 21(1):25-51.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM y Mangelsdorf DJ (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294(5548):1866-1870.
- Chen BC, Kuo KK, Chen KY, Liu CH, Tsai LY, Hsu HK y Hsu C (2009) Retinoid X receptor alpha participation in dexamethasone-induced rat bile acid coenzyme A-amino acid N-acyltransferase expression in septic liver. *Shock* 32(2):164-171.
- Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E y Kruh GD (2005) Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* 67(2):545-557.
- Chen ZS, Kawabe T, Ono M, Aoki S, Sumizawa T, Furukawa T, Uchiumi T, Wada M, Kuwano M y Akiyama SI (1999) Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol Pharmacol* 56(6):1219-1228.
- Chen ZS, Lee K y Kruh GD (2001) Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276(36):33747-33754.
- Cheng X, Buckley D y Klaassen CD (2007) Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression. *Biochem Pharmacol* 74(11):1665-1676.
- Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR y Klaassen CD (2002) Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction

- of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 300(1):97-104.
- Chiang JY (2002) Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* 23(4):443-463.
- Chook YM y Blobel G (2001) Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11(6):703-715.
- Chrousos GP y Kino T (2005) Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* 2005(304):pe48.
- Chu XY, Strauss JR, Mariano MA, Li J, Newton DJ, Cai X, Wang RW, Yabut J, Hartley DP, Evans DC y Evers R (2006) Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2). *J Pharmacol Exp Ther* 317(2):579-589.
- D'Angelo MA y Hetzer MW (2006) The role of the nuclear envelope in cellular organization. *Cell Mol Life Sci* 63(3):316-332.
- Davies TH, Ning YM y Sanchez ER (2002) A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem* 277(7):4597-4600.
- Davis LI (1995) The nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 64:865-896.
- Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV y Ballatori N (2005) The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 280(8):6960-6968.
- Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L y Goldman RD (2008) Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 22(7):832-853.
- Deleze G, Paumgartner G, Karlaganis G, Giger W, Reinhard M y Sidiropoulos D (1978) Bile acid pattern in human amniotic fluid. *Eur J Clin Invest* 8(1):41-45.
- Demeule M, Brossard M y Beliveau R (1999) Cisplatin induces renal expression of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter. *Am J Physiol* 277(6 Pt 2):F832-840.
- Denk GU, Soroka CJ, Takeyama Y, Chen WS, Schuetz JD y Boyer JL (2004) Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol* 40(4):585-591.
- Denson LA, Bohan A, Held MA y Boyer JL (2002) Organ-specific alterations in RAR alpha:RXR alpha abundance regulate rat Mrp2 (Abcc2) expression in obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 123(2):599-607.
- Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ y Karpen SJ (2001) The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121(1):140-147.
- Dhar S, Nygren P, Liminga G, Sundstrom C, de la Torre M, Nilsson K y Larsson R (1998) Relationship between cytotoxic drug response patterns and activity of drug efflux transporters mediating multidrug resistance. *Eur J Pharmacol* 346(2-3):315-322.
- Dietrich CG, Geier A, Salein N, Lammert F, Roeb E, Oude Elferink RP, Matern S y Gartung C (2004) Consequences of bile duct obstruction on intestinal expression and function of multidrug resistance-associated protein 2. *Gastroenterology* 126(4):1044-1053.

- Dingwall C, Sharnick SV y Laskey RA (1982) A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* 30(2):449-458.
- Dombrowski F, Kubitz R, Chittattu A, Wettstein M, Saha N y Haussinger D (2000) Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J* 348 Pt 1:183-188.
- Donner MG y Keppler D (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34(2):351-359.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK y Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15665-15670.
- Draheim V, Reichel A, Weitschies W y Moenning U (2010) N-glycosylation of ABC transporters is associated with functional activity in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Eur J Pharm Sci* 41(2):201-209.
- Dreger M, Bengtsson L, Schoneberg T, Otto H y Hucho F (2001) Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(21):11943-11948.
- Dubin IN y Johnson FB (1954) Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore)* 33(3):155-197.
- El-Mir MY, Badia MD, Luengo N, Monte MJ y Marin JJ (2001) Increased levels of typically fetal bile acid species in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)* 100(5):499-508.
- Eloranta JJ, Meier PJ y Kullak-Ublick GA (2005) Coordinate transcriptional regulation of transport and metabolism. *Methods Enzymol* 400:511-530.
- Ellgaard L, Molinari M y Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286(5446):1882-1888.
- Enss K, Danker T, Schlune A, Buchholz I y Oberleithner H (2003) Passive transport of macromolecules through *Xenopus laevis* nuclear envelope. *J Membr Biol* 196(3):147-155.
- Erlinger S (1982) Does Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-atpase have any role in bile secretion? *Am J Physiol* 243(4):G243-247.
- Evans WH (1980) A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta* 604(1):27-64.
- Fahrenkrog B y Aebi U (2003) The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(10):757-766.
- Fahrenkrog B, Aris JP, Hurt EC, Pante N y Aebi U (2000) Comparative spatial localization of protein-A-tagged and authentic yeast nuclear pore complex proteins by immunogold electron microscopy. *J Struct Biol* 129(2-3):295-305.
- Fakan S (1994) Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol* 4(3):86-90.
- Falany CN, Johnson MR, Barnes S y Diasio RB (1994) Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem* 269(30):19375-19379.

- Feller N, Kuiper CM, Lankelma J, Ruhdal JK, Scheper RJ, Pinedo HM y Broxterman HJ (1995) Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. *Br J Cancer* 72(3):543-549.
- Fernandez SB, Hollo Z, Kern A, Bakos E, Fischer PA, Borst P y Evers R (2002) Role of the N-terminal transmembrane region of the multidrug resistance protein MRP2 in routing to the apical membrane in MDCKII cells. *J Biol Chem* 277(34):31048-31055.
- Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, Lammert F, Stieger B, Meier PJ, Zatloukal K, Denk H y Trauner M (2001) Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* 121(1):170-183.
- Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH y Reedijk J (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24(3):707-713.
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ y Scheper RJ (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 148(4):1237-1247.
- Forman BM (2005) Are those phospholipids in your pocket? *Cell Metab* 1(3):153-155.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M y Mattaj IW (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90(6):1051-1060.
- Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W y Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol* 157(5):1575-1580.
- Fu XD y Maniatis T (1990) Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343(6257):437-441.
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M y Nishida E (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390(6657):308-311.
- Gao M, Yamazaki M, Loe DW, Westlake CJ, Grant CE, Cole SP y Deeley RG (1998) Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4. *J Biol Chem* 273(17):10733-10740.
- Gatmaitan ZC y Arias IM (1993) Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol* 24:77-97.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG y Trauner M (2007) Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773(3):283-308.
- Gerk PM y Vore M (2002) Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 302(2):407-415.
- Gerloff T, Geier A, Roots I, Meier PJ y Gartung C (2002) Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. *Eur J Biochem* 269(14):3495-3503.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF y Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273(16):10046-10050.

- Gerlyng P, Stokke T, Huitfeldt HS, Stenersen T, Danielsen HE, Grotmol T y Seglen PO (1992) Analytical methods for the study of liver cell proliferation. *Cytometry* 13(4):404-415.
- Giguere V (2002) To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab* 13(5):220-225.
- Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T y Bergeron JJ (2006) Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 127(6):1265-1281.
- Goodwin B, Hodgson E y Liddle C (1999) The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* 56(6):1329-1339.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM y Kliewer SA (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6(3):517-526.
- Goodwin B, Watson MA, Kim H, Miao J, Kemper JK y Kliewer SA (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 17(3):386-394.
- Gorlich D y Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607-660.
- Grad I y Picard D (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 275(1-2):2-12.
- Gronemeyer H, Gustafsson JA y Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3(11):950-964.
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK y Wilson KL (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):21-31.
- Gumucio JJ (1983) Functional and anatomic heterogeneity in the liver acinus: impact on transport. *Am J Physiol* 244(6):G578-582.
- Guo GL, Santamarina-Fojo S, Akiyama TE, Amar MJ, Paigen BJ, Brewer B, Jr. y Gonzalez FJ (2006) Effects of FXR in foam-cell formation and atherosclerosis development. *Biochim Biophys Acta* 1761(12):1401-1409.
- Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG y Kruh GD (2003) MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem* 278(32):29509-29514.
- Hagenbuch B y Dawson P (2004) The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 447(5):566-570.
- Hagenbuch B y Meier PJ (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93(3):1326-1331.
- Hagenbuch N, Reichel C, Stieger B, Cattori V, Fattinger KE, Landmann L, Meier PJ y Kullak-Ublick GA (2001) Effect of phenobarbital on the expression of bile salt and organic anion transporters of rat liver. *J Hepatol* 34(6):881-887.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG y Cole SP (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 5(1):21-53.

- Harris MJ, Kuwano M, Webb M y Board PG (2001) Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *J Biol Chem* 276(24):20876-20881.
- Hartley JL, Temple GF y Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10(11):1788-1795.
- Hegedus T, Sessler T, Scott R, Thelin W, Bakos E, Varadi A, Szabo K, Homolya L, Milgram SL y Sarkadi B (2003) C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 302(3):454-461.
- Hendrikse NH (2000) Monitoring interactions at ATP-dependent drug efflux pumps. *Curr Pharm Des* 6(16):1653-1668.
- Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, Sugimachi K y Kuwano M (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 6(6):2401-2407.
- Hinshaw JE, Carragher BO y Milligan RA (1992) Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 69(7):1133-1141.
- Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H y Sugiyama Y (2000) ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem* 275(4):2905-2910.
- Hoffmann K, Gastens AM, Volk HA y Loscher W (2006) Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsy Res* 69(1):1-14.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M y Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3473-3478.
- Hofmann AF (1994) Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents, in *The intestinal component of the enterohepatic circulation and the integrated system* (Johnson LR ed) pp 1845-1865, Raven Press, New York.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG y Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318(6047):635-641.
- Honorat M, Mesnier A, Di Pietro A, Lin V, Cohen P, Dumontet C y Payen L (2008) Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375(3):308-314.
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ, Borst P, Pinedo HM y Jansen G (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 59(11):2532-2535.
- Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchavezleva I, Belinsky MG y Kruh GD (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 64(14):4927-4930.
- Hosokawa S, Tagaya O, Mikami T, Nozaki Y, Kawaguchi A, Yamatsu K y Shamoto M (1992) A new rat mutant with chronic conjugated hyperbilirubinemia and renal glomerular lesions. *Lab Anim Sci* 42(1):27-34.

- Houten SM, Watanabe M y Auwerx J (2006) Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 25(7):1419-1425.
- Howard WR, Pospisil JA, Njolito E y Noonan DJ (2000) Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 163(2):195-202.
- Hozak P, Hassan AB, Jackson DA y Cook PR (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell* 73(2):361-373.
- Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, de Pedro N, Royo I, Blevins RA, Pelaez F, Wright SD y Cui J (2003) Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem* 278(51):51085-51090.
- Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X y Moore DD (2006) Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 312(5771):233-236.
- Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupar MJ, Gunyuzlu PL, Haws TF, Kassam A, Powell F, Hollis GF, Young PR, Mukherjee R y Burn TC (2002) Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290(1-2):35-43.
- Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Kawanaka K, Tabata I, Higuchi M, Tange T, Yamamoto TT y Ezaki O (1997) Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1):E37-45.
- Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T y Sugimoto Y (2003) Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* 64(3):610-618.
- Imanaka T, Aihara K, Takano T, Yamashita A, Sato R, Suzuki Y, Yokota S y Osumi T (1999) Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *J Biol Chem* 274(17):11968-11976.
- Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ y Kliewer SA (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2(4):217-225.
- Issemann I, Prince RA, Tugwood JD y Green S (1993) The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrates hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol* 11(1):37-47.
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T y Sugiyama Y (1997) Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol* 272(1 Pt 1):G16-22.
- Izukura M, Hashimoto T, Gomez G, Uchida T, Greeley GH, Jr. y Thompson JC (1991) Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas* 6(4):427-432.
- Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ y Cook PR (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J* 12(3):1059-1065.
- Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ y Cook PR (1994) Sites in human nuclei where damage induced by ultraviolet light is repaired: localization relative to transcription sites and

- concentrations of proliferating cell nuclear antigen and the tumour suppressor protein, p53. *J Cell Sci* 107 ( Pt 7):1753-1760.
- Jansen PL, Peters WH y Lamers WH (1985) Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. *Hepatology* 5(4):573-579.
- Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L y van Veen HW (2005) Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* 385(Pt 2):419-426.
- Jedlitschky G y Keppler D (2002) Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates. *Vitam Horm* 64:153-184.
- Johnson DR y Klaassen CD (2002) Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways. *Toxicol Sci* 67(2):182-189.
- Jones BR, Li W, Cao J, Hoffman TA, Gerk PM y Vore M (2005) The role of protein synthesis and degradation in the post-transcriptional regulation of rat multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2, Abcc2). *Mol Pharmacol* 68(3):701-710.
- Jung D, Mangelsdorf DJ y Meyer UA (2006) Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 281(28):19081-19091.
- Jung D, Podvinec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ y Kullak-Ublick GA (2002) Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* 122(7):1954-1966.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD y Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39(3 Pt 2):499-509.
- Kallen J, Schlaeppli JM, Bitsch F, Delhon I y Fournier B (2004) Crystal structure of the human RORalpha Ligand binding domain in complex with cholesterol sulfate at 2.2 Å. *J Biol Chem* 279(14):14033-14038.
- Kamijo K, Taketani S, Yokota S, Osumi T y Hashimoto T (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem* 265(8):4534-4540.
- Karpen SJ (2002) Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* 36(6):832-850.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R y Keppler D (1996) Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23(5):1061-1066.
- Kartner N, Riordan JR y Ling V (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221(4617):1285-1288.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM y Edwards PA (2002) Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277(4):2908-2915.
- Kauffmann HM, Keppler D, Gant TW y Schrenk D (1998) Induction of hepatic mrp2 (cmrp/cmcoat) gene expression in nonhuman primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Arch Toxicol* 72(12):763-768.
- Kauffmann HM, Keppler D, Kartenbeck J y Schrenk D (1997) Induction of cMrp/cMoat gene expression by cisplatin, 2-acetylaminofluorene, or cycloheximide in rat hepatocytes. *Hepatology* 26(4):980-985.

- Kauffmann HM y Schrenk D (1998) Sequence analysis and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 245(2):325-331.
- Kaufmann SH y Shaper JH (1984) A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl cross-linking reagent tetrathionate. Polypeptides of the internal nuclear matrix. *Exp Cell Res* 155(2):477-495.
- Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S y Kuwano M (1999) Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett* 456(2):327-331.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y y Fujino M (2003) A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278(11):9435-9440.
- Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M y Keppler D (2000) Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 32(6):1317-1328.
- Keppler D y Kartenbeck J (1996) The canalicular conjugate export pump encoded by the cmrp/cmcoat gene. *Prog Liver Dis* 14:55-67.
- Keppler D y Konig J (1997) Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *Faseb J* 11(7):509-516.
- Kerr TA, Saeki S, Schneider M, Schaefer K, Berdy S, Redder T, Shan B, Russell DW y Schwarz M (2002) Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. *Dev Cell* 2(6):713-720.
- Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S y Tsukita S (2002) Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* 31(3):320-325.
- Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM y Gonzalez FJ (2007) Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28(5):940-946.
- Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA y Chrousos GP (2009) Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 381(4):671-675.
- Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA y Sugiyama Y (1998) cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett* 433(1-2):149-152.
- Klaassen CD (1974) Bile flow and composition during bile acid depletion and administration. *Can J Physiol Pharmacol* 52(2):334-348.
- Kliewer SA, Lehmann JM y Willson TM (1999) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284(5415):757-760.
- Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T y Lehmann JM (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92(1):73-82.

- Kocher O, Comella N, Gilchrist A, Pal R, Tognazzi K, Brown LF y Knoll JH (1999) PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein. *Lab Invest* 79(9):1161-1170.
- Kocher O, Pal R, Roberts M, Cirovic C y Gilchrist A (2003) Targeted disruption of the PDZK1 gene by homologous recombination. *Mol Cell Biol* 23(4):1175-1180.
- Kojima H, Nies AT, König J, Hagmann W, Spring H, Uemura M, Fukui H y Keppler D (2003) Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 39(5):693-702.
- Kok T, Hulzebos CV, Wolters H, Havinga R, Agellon LB, Stellaard F, Shan B, Schwarz M y Kuipers F (2003) Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J Biol Chem* 278(43):41930-41937.
- König J, Hartel M, Nies AT, Martignoni ME, Guo J, Buchler MW, Friess H y Keppler D (2005) Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* 115(3):359-367.
- König J NA, Cui Y, Keppler D (2003) *MRP2, the apical export pump for anionic conjugates.*, London.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I y Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461(2):377-394.
- Konno T, Ebihara T, Hisaeda K, Uchiumi T, Nakamura T, Shirakusa T, Kuwano M y Wada M (2003) Identification of domains participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *J Biol Chem* 278(25):22908-22917.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F y Borst P (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57(16):3537-3547.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F y Borst P (1999) MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12):6914-6919.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP y Schuetz JD (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279(23):24218-24225.
- Kruh GD y Belinsky MG (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22(47):7537-7552.
- Kubitz R, D'Urso D, Keppler D y Haussinger D (1997) Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* 113(5):1438-1442.
- Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick G y Haussinger D (2001) Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 34(2):340-350.

- Kubitz R, Warskulat U, Schmitt M y Haussinger D (1999a) Dexamethasone- and osmolarity-dependent expression of the multidrug-resistance protein 2 in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 340 ( Pt 3):585-591.
- Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U y Haussinger D (1999b) Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 116(2):401-410.
- Kullak-Ublick GA, Baretton GB, Oswald M, Renner EL, Paumgartner G y Beuers U (2002) Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 23(1):78-82.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ y Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120(2):525-533.
- Kusuhara H y Sugiyama Y (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* 453(5):735-744.
- Labarca C y Paigen K (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102(2):344-352.
- Laguri C, Gilquin B, Wolff N, Romi-Lebrun R, Courchay K, Callebaut I, Worman HJ y Zinn-Justin S (2001) Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure* 9(6):503-511.
- Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W y Schmitz G (2003) Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 49(2):230-238.
- Lavoie C y Paiement J (2008) Topology of molecular machines of the endoplasmic reticulum: a compilation of proteomics and cytological data. *Histochem Cell Biol* 129(2):117-128.
- Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A, Setchell KD, Kramer W y Boyer JL (2001) Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 121(6):1473-1484.
- Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L y Schekman R (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:87-123.
- Lee YK y Moore DD (2008) Liver receptor homolog-1, an emerging metabolic modulator. *Front Biosci* 13:5950-5958.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F y Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89(1):147-191.
- Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC y Staels B (2006) Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 116(3):571-580.
- Lester R (1983) Introduction. Bile acid metabolism in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2(2):335-336.
- Leuschner M, Guldutuna S, You T, Hubner K, Bhatti S y Leuschner U (1996) Ursodeoxycholic acid and prednisolone versus ursodeoxycholic acid and placebo in the treatment of early stages of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 25(1):49-57.
- Lew JL, Zhao A, Yu J, Huang L, De Pedro N, Pelaez F, Wright SD y Cui J (2004) The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem* 279(10):8856-8861.

- Li J, Pircher PC, Schulman IG y Westin SK (2005) Regulation of complement C3 expression by the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem* 280(9):7427-7434.
- Li Y, Lambert MH y Xu HE (2003) Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* 11(7):741-746.
- Lisby M, Mortensen UH y Rothstein R (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* 5(6):572-577.
- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH y Bates SE (2000) The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113 ( Pt 11):2011-2021.
- Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, MacKenzie KI, Mansfield TA, Kliewer SA, Goodwin B y Jones SA (2003) Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest* 112(11):1678-1687.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.
- Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J y Mangelsdorf DJ (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6(3):507-515.
- Ma X, Idle JR y Gonzalez FJ (2008) The pregnane X receptor: from bench to bedside. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4(7):895-908.
- Macara IG (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(4):570-594, table of contents.
- Maciejczyk A, Jagoda E, Wysocka T, Matkowski R, Gyorffy B, Lage H y Surowiak P (2011) ABCC2 (MRP2, cMOAT) Localized in the Nuclear Envelope of Breast Carcinoma Cells Correlates with Poor Clinical Outcome. *Pathol Oncol Res*.
- Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ y Stieger B (2000) Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* 57(3):634-641.
- Madrid AS y Weis K (2006) Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* 115(2):98-109.
- Magnani E, Bartling L y Hake S (2006) From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC Mol Biol* 7:46.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ y Shan B (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284(5418):1362-1365.
- Malatesta M, Zancanaro C, Martin TE, Chan EK, Amalric F, Luhrmann R, Vogel P y Fakan S (1994) Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. *Eur J Cell Biol* 65(1):82-93.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ y Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61(8):3458-3464.
- Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA y Willson TM (2000) Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem* 43(16):2971-2974.

- Mangelsdorf DJ y Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83(6):841-850.
- Margalit A, Brachner A, Gotzmann J, Foisner R y Gruenbaum Y (2007) Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol* 17(4):202-208.
- Marin JJ, Barbero ER, Herrera MC, Taberner A y Monte MJ (1993) Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* 18(5):1182-1192.
- Marin JJ, Bravo P, el-Mir MY y Serrano MA (1995) ATP-dependent bile acid transport across microvillous membrane of human term trophoblast. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):G685-694.
- Marin JJ, Romero MR y Briz O (2010) Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem* 17(8):709-740.
- Marin JJ, Serrano MA, el-Mir MY, Eleno N y Boyd CA (1990) Bile acid transport by basal membrane vesicles of human term placental trophoblast. *Gastroenterology* 99(5):1431-1438.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL y Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87(1):206-210.
- Marschall HU, Wagner M, Bodin K, Zollner G, Fickert P, Gumhold J, Silbert D, Fuchsbichler A, Sjoval J y Trauner M (2006) Fxr(-/-) mice adapt to biliary obstruction by enhanced phase I detoxification and renal elimination of bile acids. *J Lipid Res* 47(3):582-592.
- Marshall NJ, Goodwin CJ y Holt SJ (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5(2):69-84.
- Matera AG y Ward DC (1993) Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J Cell Biol* 121(4):715-727.
- Matunis MJ (2006) Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes. *Methods* 39(4):277-283.
- Maul GG (1977) The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution. *Int Rev Cytol Suppl*(6):75-186.
- Mayer R, Kartenbeck J, Buchler M, Jedlitschky G, Leier I y Keppler D (1995) Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol* 131(1):137-150.
- McAleer MA, Breen MA, White NL y Matthews N (1999) pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 274(33):23541-23548.
- Meier PJ (1988) Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 8(4):293-307.
- Mendoza ME, Monte MJ, El-Mir MY, Badia MD y Marin JJ (2002) Changes in the pattern of bile acids in the nuclei of rat liver cells during hepatocarcinogenesis. *Clin Sci (Lond)* 102(2):143-150.
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E y Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7(8):766-772.

- Meyer U, Costantino G, Macchiarulo A y Pellicciari R (2005) Is antagonism of E/Z-guggulsterone at the farnesoid X receptor mediated by a noncanonical binding site? A molecular modeling study. *J Med Chem* 48(22):6948-6955.
- Miller DS, Nobmann SN, Gutmann H, Toeroek M, Drewe J y Fricker G (2000) Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol* 58(6):1357-1367.
- Misra S, Ujhazy P, Gatmaitan Z, Varticovski L y Arias IM (1998) The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J Biol Chem* 273(41):26638-26644.
- Misteli T (2000) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113 ( Pt 11):1841-1849.
- Misteli T (2001) The concept of self-organization in cellular architecture. *J Cell Biol* 155(2):181-185.
- Misteli T (2007) Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128(4):787-800.
- Mitchison HC, Palmer JM, Bassendine MF, Watson AJ, Record CO y James OF (1992) A controlled trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis. Three-year results. *J Hepatol* 15(3):336-344.
- Mongelard F y Bouvet P (2007) Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* 17(2):80-86.
- Monneron A y Bernhard W (1969) Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* 27(3):266-288.
- Monte JM, Barbero ER, Villanueva GR, Serrano MA y Marin JJ (1996) Role of rate-limiting enzymes of nucleotide metabolism in taurocholate-induced DNA synthesis inhibition. *J Hepatol* 25(2):191-199.
- Monte MJ, Marin JJ, Antelo A y Vazquez-Tato J (2009) Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15(7):804-816.
- Monte MJ, Martinez-Diez MC, El-Mir MY, Mendoza ME, Bravo P, Bachs O y Marin JJ (2002) Changes in the pool of bile acids in hepatocyte nuclei during rat liver regeneration. *J Hepatol* 36(4):534-542.
- Mosammamarast N y Pemberton LF (2004) Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol* 14(10):547-556.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL y Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361(6414):726-730.
- Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Crocenzi F, Roma MG y Vore M (2002) Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* 35(6):1409-1419.
- Muirhead KA, Kloszewski ED, Antell LA y Griswold DE (1985) Identification of live cells for flow cytometric analysis of lymphoid subset proliferation in low viability populations. *J Immunol Methods* 77(1):77-86.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.

- Nader N, Chrousos GP y Kino T (2009) Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J* 23(5):1572-1583.
- Nagy L y Schwabe JW (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 29(6):317-324.
- Nakamura H, Morita T y Sato C (1986) Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res* 165(2):291-297.
- Nakayasu H y Berezney R (1989) Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol* 108(1):1-11.
- Narang VS, Fraga C, Kumar N, Shen J, Throm S, Stewart CF y Waters CM (2008) Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *Am J Physiol Cell Physiol* 295(2):C440-450.
- Nathanson MH y Boyer JL (1991) Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14(3):551-566.
- Nezasa K, Tian X, Zamek-Gliszczynski MJ, Patel NJ, Raub TJ y Brouwer KL (2006) Altered hepatobiliary disposition of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein in Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) knockout mice. *Drug Metab Dispos* 34(4):718-723.
- Nies AT, Jedlitschky G, Konig J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP y Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129(2):349-360.
- Nies AT y Keppler D (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453(5):643-659.
- Nies AT, Konig J, Cui Y, Brom M, Spring H y Keppler D (2002) Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur J Biochem* 269(7):1866-1876.
- Nies AT, Konig J, Pfannschmidt M, Klar E, Hofmann WJ y Keppler D (2001) Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 94(4):492-499.
- Nishimura M, Koeda A, Suzuki E, Kawano Y, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S y Naito S (2006) Regulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 21(4):297-307.
- Noe J, Stieger B y Meier PJ (2002) Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 123(5):1659-1666.
- Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM y Cidlowski JA (1999) The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274(39):27857-27866.
- Ochs RL, Stein TW, Jr. y Tan EM (1994) Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *J Cell Sci* 107 ( Pt 2):385-399.
- Oswald M, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G y Beuers U (2001) Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis. *Liver* 21(4):247-253.
- Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hoefler M, Haubold B, Rimmel B, Voss H, Kaiser C, Albers M, Cheruvallath Z, Jackson D, Casari G, Koegl M, Paabo S, Mous J, Kremoser

- C y Deuschle U (2003) Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol* 23(3):864-872.
- Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189(4206):867.
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD y Lehmann JM (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284(5418):1365-1368.
- Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P y Vilarem MJ (2000) Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* 58(2):361-372.
- Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, Lovelace E, Rutherford AV y Willingham MC (1988) A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12):4486-4490.
- Patel H, Truant R, Rachubinski RA y Capone JP (2005) Activity and subcellular compartmentalization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha are altered by the centrosome-associated protein CAP350. *J Cell Sci* 118(Pt 1):175-186.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P y Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271(5252):1126-1128.
- Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F y Oude Elferink RP (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 25(6):1539-1542.
- Paulusma CC, Kothe MJ, Bakker CT, Bosma PJ, van Bokhoven I, van Marle J, Bolder U, Tytgat GN y Oude Elferink RP (2000) Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* 31(3):684-693.
- Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P y Oude Elferink RP (1999) Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 338 ( Pt 2):393-401.
- Payen L, Courtois A, Loewert M, Guillouzo A y Fardel O (2001) Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary hepatocytes exposed to sulforaphane. *Biochem Biophys Res Commun* 282(1):257-263.
- Pemberton LF y Paschal BM (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6(3):187-198.
- Peters R (1986) Fluorescence microphotolysis to measure nucleocytoplasmic transport and intracellular mobility. *Biochimica et Biophysica Acta* 864(3-4):305-359.
- Petropoulos S, Gibb W y Matthews SG (2011) Glucocorticoid regulation of placental breast cancer resistance protein (Bcrp1) in the mouse. *Reprod Sci* 18(7):631-639.
- Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG y Westin SK (2003) Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem* 278(30):27703-27711.

- Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y y Murphy PJ (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40:41-58.
- Pulaski L, Kania K, Ratajewski M, Uchiumi T, Kuwano M y Bartosz G (2005) Differential regulation of the human MRP2 and MRP3 gene expression by glucocorticoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96(3-4):229-234.
- Qiao L, Han SI, Fang Y, Park JS, Gupta S, Gilfor D, Amorino G, Valerie K, Sealy L, Engelhardt JF, Grant S, Hylemon PB y Dent P (2003) Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol* 23(9):3052-3066.
- Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E y Mackenzie PI (1999) Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 31(4):817-899.
- Radomska-Pandya A, Pokrovskaya ID, Xu J, Little JM, Jude AR, Kurten RC y Czernik PJ (2002) Nuclear UDP-glucuronosyltransferases: identification of UGT2B7 and UGT1A6 in human liver nuclear membranes. *Arch Biochem Biophys* 399(1):37-48.
- Raju U, Levitz M y Javitt NB (1990) Bile acids in human breast cyst fluid: the identification of lithocholic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 70(4):1030-1034.
- Rappaport AM (1973) The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 6(2):212-228.
- Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Pikkarainen P, Nuutinen H y Farkkila M (2005) Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: a three-year randomized trial. *Hepatology* 41(4):747-752.
- Ridlon JM, Kang DJ y Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47(2):241-259.
- Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF y Keppler D (2006) Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(4):G640-649.
- Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R y Fiorucci S (2006) The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol* 70(4):1164-1173.
- Robey RW, Medina-Perez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, Senderowicz AM, Ross DD y Bates SE (2001) Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 7(1):145-152.
- Roelofsen H, Soroka CJ, Keppler D y Boyer JL (1998) Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J Cell Sci* 111 ( Pt 8):1137-1145.
- Romisch K (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:435-456.
- Roncero C, Ventura JJ, Sanchez A, Bois-Joyeux B, Mesa ML, Thomassin H, Danan JL, Benito M y Fabregat I (1998) Phorbol esters down-regulate alpha-fetoprotein gene expression without affecting growth in fetal hepatocytes in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1402(2):151-164.
- Rost D, Kartenbeck J y Keppler D (1999) Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* 29(3):814-821.

- Rost D, Konig J, Weiss G, Klar E, Stremmel W y Keppler D (2001) Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* 121(5):1203-1208.
- Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y y Chait BT (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148(4):635-651.
- Rout MP y Blobel G (1993) Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 123(4):771-783.
- Ruddock LW y Molinari M (2006) N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* 119(Pt 21):4373-4380.
- Ruetz S y Gros P (1994) Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. *Cell* 77(7):1071-1081.
- Sandusky GE, Mintze KS, Pratt SE y Dantzig AH (2002) Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays. *Histopathology* 41(1):65-74.
- Schacke H, Docke WD y Asadullah K (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96(1):23-43.
- Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, Storkel S, Thon WF y Keppler D (1999) Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 10(6):1159-1169.
- Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W y Keppler D (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 8(8):1213-1221.
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JM, Pijnenborg AC, Bosman DK, Elferink RP, van der Valk P, Borst P y Scheper RJ (2002) Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* 82(2):193-201.
- Schote AB, Turner JD, Schiltz J y Muller CP (2007) Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. *Mol Immunol* 44(6):1436-1445.
- Schteingart CD, Eming SA, Ton-Nu HT, Crombie DL y Hofmann AF (1992) Synthesis, structure and transport properties of fluorescent derivatives of conjugated bile acids, in *Bile Acids and Hepatobiliary System* (Paumgartner G, Gerok W y Stiel A eds) pp 177-183, Kluwer Academic, Dordrecht, Germany.
- Schuetz EG, Beck WT y Schuetz JD (1996) Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 49(2):311-318.
- Schulz M, Schneider S, Lottspeich F, Renkawitz R y Eggert M (2001) Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* 280(2):476-480.
- Sellinger M, Barrett C, Malle P, Gordon ER y Boyer JL (1990) Cryptic Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in rat liver canalicular plasma membranes: evidence for its basolateral origin. *Hepatology* 11(2):223-229.
- Semple RK, Chatterjee VK y O'Rahilly S (2006) PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 116(3):581-589.

- Serrano MA, Macias RI, Briz O, Monte MJ, Blazquez AG, Williamson C, Kubitz R y Marin JJ (2007) Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28(2-3):107-117.
- Setchell KD, Rodrigues CM, Clerici C, Solinas A, Morelli A, Gartung C y Boyer J (1997) Bile acid concentrations in human and rat liver tissue and in hepatocyte nuclei. *Gastroenterology* 112(1):226-235.
- Shahin V, Danker T, Enss K, Ossig R y Oberleithner H (2001) Evidence for Ca<sup>2+</sup>- and ATP-sensitive peripheral channels in nuclear pore complexes. *Faseb J* 15(11):1895-1901.
- Sherman IA y Fisher MM (1986) Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy. *Hepatology* 6(3):444-449.
- Shibatani T, David LL, McCormack AL, Frueh K y Skach WR (2005) Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry* 44(16):5982-5992.
- Shoda J, Kano M, Oda K, Kamiya J, Nimura Y, Suzuki H, Sugiyama Y, Miyazaki H, Todoroki T, Stengelin S, Kramer W, Matsuzaki Y y Tanaka N (2001) The expression levels of plasma membrane transporters in the cholestatic liver of patients undergoing biliary drainage and their association with the impairment of biliary secretory function. *Am J Gastroenterol* 96(12):3368-3378.
- Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G y Gonzalez FJ (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102(6):731-744.
- Sitia R y Braakman I (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426(6968):891-894.
- Smirlis D, Muangmoonchai R, Edwards M, Phillips IR y Shephard EA (2001) Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics. *J Biol Chem* 276(16):12822-12826.
- Solakidi S, Psarra AM y Sekeris CE (2007) Differential distribution of glucocorticoid and estrogen receptor isoforms: localization of GRbeta and ERalpha in nucleoli and GRalpha and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7(3):240-245.
- Song KH, Li T, Owsley E, Strom S y Chiang JY (2009) Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression. *Hepatology* 49(1):297-305.
- Sonoda J, Pei L y Evans RM (2008) Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 582(1):2-9.
- Spector DL (1993) Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu Rev Cell Biol* 9:265-315.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ y Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(4):R1495-1503.
- Stade K, Ford CS, Guthrie C y Weis K (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90(6):1041-1050.

- Stedman C, Liddle C, Coulter S, Sonoda J, Alvarez JG, Evans RM y Downes M (2006) Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11323-11328.
- Stewart M, Baker RP, Bayliss R, Clayton L, Grant RP, Littlewood T y Matsuura Y (2001) Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett* 498(2-3):145-149.
- Stockel B, Konig J, Nies AT, Cui Y, Brom M y Keppler D (2000) Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem* 267(5):1347-1358.
- Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D y Aebi U (2003) Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol* 328(1):119-130.
- Stoffler D, Goldie KN, Feja B y Aebi U (1999) Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol* 287(4):741-752.
- Storck S, Shukla M, Dimitrov S y Bouvet P (2007) Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases. *Subcell Biochem* 41:125-144.
- Strambio-de-Castilla C, Blobel G y Rout MP (1999) Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior. *J Cell Biol* 144(5):839-855.
- Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P y Negishi M (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem* 274(10):6043-6046.
- Sumanasekera WK, Tien ES, Turpey R, Vanden Heuvel JP y Perdew GH (2003) Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor alpha is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2. *J Biol Chem* 278(7):4467-4473.
- Surowiak P, Materna V, Kaplenko I, Spaczynski M, Dolinska-Krajewska B, Gebarowska E, Dietel M, Zabel M y Lage H (2006) ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. *Clin Cancer Res* 12(23):7149-7158.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ y Nagy L (2004) Retinoid X receptors: Exploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2:S126-143.
- Sztul ES, Biemesderfer D, Caplan MJ, Kashgarian M y Boyer JL (1987) Localization of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit to the sinusoidal and lateral but not canalicular membranes of rat hepatocytes. *J Cell Biol* 104(5):1239-1248.
- Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjoström B, Lundgren B y Artursson P (2001) Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 299(1):164-170.
- Takikawa H, Sano N, Narita T, Uchida Y, Yamanaka M, Horie T, Mikami T y Tagaya O (1991) Biliary excretion of bile acid conjugates in a hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rat. *Hepatology* 14(2):352-360.

- Tanaka T, Uchiumi T, Hinoshita E, Inokuchi A, Toh S, Wada M, Takano H, Kohno K y Kuwano M (1999) The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* 30(6):1507-1512.
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S y Kuwano M (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 56(18):4124-4129.
- Teng S y Piquette-Miller M (2007) Hepatoprotective role of PXR activation and MRP3 in cholic acid-induced cholestasis. *Br J Pharmacol* 151(3):367-376.
- Tian Q, Zhang J, Tan TM, Chan E, Duan W, Chan SY, Boelsterli UA, Ho PC, Yang H, Bian JS, Huang M, Zhu YZ, Xiong W, Li X y Zhou S (2005) Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins. *Pharm Res* 22(11):1837-1853.
- Timsit YE y Negishi M (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72(3):231-246.
- Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S y Kuwano M (1999) Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet* 64(3):739-746.
- Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, Suchy FJ, Keppler D y Boyer JL (1997) The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113(1):255-264.
- Trauner M y Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83(2):633-671.
- Tretter V, Altmann F y Marz L (1991) Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem* 199(3):647-652.
- Turncliff RZ, Meier PJ y Brouwer KL (2004) Effect of dexamethasone treatment on the expression and function of transport proteins in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 32(8):834-839.
- Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ y Marin JJ (2006) Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* 44(6):1150-1157.
- van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ y Russel FG (2002) The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 13(3):595-603.
- van Raalte DH, Ouwens DM y Diamant M (2009) Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur J Clin Invest* 39(2):81-93.
- van Vliet EA, Redeker S, Aronica E, Edelbroek PM y Gorter JA (2005) Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia* 46(10):1569-1580.
- Vlaming ML, Mohrmann K, Wagenaar E, de Waart DR, Elferink RP, Lagas JS, van Tellingen O, Vainchtein LD, Rosing H, Beijnen JH, Schellens JH y Schinkel AH (2006) Carcinogen

- and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 318(1):319-327.
- Volk EL, Rohde K, Rhee M, McGuire JJ, Doyle LA, Ross DD y Schneider E (2000) Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res* 60(13):3514-3521.
- Volk EL y Schneider E (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 63(17):5538-5543.
- Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL y Muller M (1998) Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 28(6):1637-1644.
- Wacher VJ, Silverman JA, Zhang Y y Benet LZ (1998) Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci* 87(11):1322-1330.
- Wagner M, Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Silbert D, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Guo GL, Schuetz JD, Gonzalez FJ, Marschall HU, Denk H y Trauner M (2003) Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* 125(3):825-838.
- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC y Forman BM (1999) Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 3(5):543-553.
- Wang L, Lee YK, Bundman D, Han Y, Thevananther S, Kim CS, Chua SS, Wei P, Heyman RA, Karin M y Moore DD (2002) Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev Cell* 2(6):721-731.
- Wansink DG, Schul W, van der Kraan I, van Steensel B, van Driel R y de Jong L (1993) Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol* 122(2):283-293.
- Warskulat U, Kubitz R, Wettstein M, Stieger B, Meier PJ y Haussinger D (1999) Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. *Biol Chem* 380(11):1273-1279.
- Watanabe N, Tsukada N, Smith CR y Phillips MJ (1991) Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol* 113(5):1069-1080.
- Weinman SA y Maglova LM (1994) Free concentrations of intracellular fluorescent anions determined by cytoplasmic dialysis of isolated hepatocytes. *Am J Physiol* 267(5 Pt 1):G922-931.
- Weis K (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112(4):441-451.
- Wente SR (2000) Gatekeepers of the nucleus. *Science* 288(5470):1374-1377.
- Westlake CJ, Cole SP y Deeley RG (2005) Role of the NH2-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol Biol Cell* 16(5):2483-2492.
- Wielandt AM, Vollrath V, Manzano M, Miranda S, Accatino L y Chianale J (1999) Induction of the multispecific organic anion transporter (cMoat/mrp2) gene and biliary glutathione secretion by the herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in the mouse liver. *Biochem J* 341 ( Pt 1):105-111.

- Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J y Borst P (2000) Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7476-7481.
- Wittenburg H y Carey MC (2002) Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J Clin Invest* 110(5):605-609.
- Xu J, Liu Y, Yang Y, Bates S y Zhang JT (2004) Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* 279(19):19781-19789.
- Yamada T, Arai T, Nagino M, Oda K, Shoda J, Suzuki H, Sugiyama Y y Nimura Y (2005) Impaired expression of hepatic multidrug resistance protein 2 is associated with posthepatectomy hyperbilirubinemia in patients with biliary cancer. *Langenbecks Arch Surg* 390(5):421-429.
- Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD y Huang W (2007) Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 67(3):863-867.
- Yang Q, Rout MP y Akey CW (1998) Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* 1(2):223-234.
- Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y y Ding M (2007) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 860(1):10-17.
- Yu C, Wang F, Jin C, Huang X y McKeehan WL (2005) Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids. *J Biol Chem* 280(18):17707-17714.
- Zaman GJ, Versantvoort CH, Smit JJ, Eijdemans EW, de Haas M, Smith AJ, Broxterman HJ, Mulder NH, de Vries EG, Baas F y et al. (1993) Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Res* 53(8):1747-1750.
- Zarubica A, Trompier D y Chimini G (2007) ABCA1, from pathology to membrane function. *Pflugers Arch* 453(5):569-579.
- Zavacki AM, Lehmann JM, Seol W, Willson TM, Kliewer SA y Moore DD (1997) Activation of the orphan receptor RIP14 by retinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15):7909-7914.
- Zeng H, Liu G, Rea PA y Kruh GD (2000) Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res* 60(17):4779-4784.
- Zhang J, Tian Q, Yung Chan S, Chuen Li S, Zhou S, Duan W y Zhu YZ (2005) Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev* 37(4):611-703.
- Zhang Y, Hagedorn CH y Wang L (2011) Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1812(8):893-908.
- Zhang Y, Han H, Elmquist WF y Miller DW (2000) Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 876(1-2):148-153.

- Zhang Y, Kast-Woelbern HR y Edwards PA (2003) Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* 278(1):104-110.
- Zhang Y, Schuetz JD, Elmquist WF y Miller DW (2004) Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311(2):449-455.
- Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, Zatloukal K y Trauner M (2001) Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 33(3):633-646.
- Zollner G, Marschall HU, Wagner M y Trauner M (2006a) Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 3(3):231-251.
- Zollner G y Trauner M (2009) Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol* 156(1):7-27.
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Zatloukal K, Denk H y Trauner M (2005) Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 25(2):367-379.
- Zollner G, Wagner M, Moustafa T, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, Fuchsbichler A, Halilbasic E, Denk H, Marschall HU y Trauner M (2006b) Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(5):G923-932.

