



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. María Cecilia Rauch

Instituto de Bioquímica y Microbiología

Facultad de Ciencias

**EXPRESIÓN DE FKBP12 Y FKBP19 EN CÉLULAS
PANCREÁTICAS INS-1E TRATADAS CON TACROLIMUS.**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

RODRIGO ESTEBAN SANDOVAL CONTRERAS

VALDIVIA – CHILE

2013

A la memoria de Boris Andrade.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi profesora Cecilia Rauch por todo su apoyo en este largo camino. Básicamente por darme la confianza y la independencia para desenvolverme en el laboratorio, pienso yo, una de las herramientas más importantes para un profesional de nuestro tipo.

En forma especial quiero agradecer a los otros dos profesores de mi comisión. Al profesor Alejandro Claude por toda su experiencia aportada en los momentos de incertidumbre al inicio de mi trabajo. La profesora Angara Zambrano que además de su simpatía nos brindó un espacio para trabajar cuando no lo teníamos. Finalmente al profesor Alejandro Yañez quien no tuvo problemas por poner todos sus recursos a nuestra disposición, además de uno que otro consejo.

A los innumerables que me aportaron en mi desarrollo como profesional sin esperar algo a cambio: Alejandro SM, Joel A, Paty Z, Alejandro B, Lerchu, Felipe B, Romi B, Victor O, y Sharin. Hoy en día destacan en sus labores.

Finalmente a todos los que me acompañan día a día: Las excelentes personas de mi laboratorio, que hacen que el clima de trabajo sea más agradable aún. A la brillante Luz que aportó directamente en mi trabajo. Mis amigos de Pregrado que aún no pierden la fe en mí, mi amada Alejandra con su belleza que sólo es superada por su inteligencia, y todos los demás que al menos una vez al día me refregaban en la cara que debía titularme.

Agradecimiento especial a mis Padres que se partieron la espalda para que pudiera estar aquí. Mi mayor alegría será la satisfacción de ustedes.

Esta tesis fue financiada por los proyectos: Proyectos DID-UACH S-2007-66 y S-2012-58 (Dr. Maria Cecilia Rauch) y Proyecto FONDECYT 1090694 (Dr. Alejandro Yañez)

INDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Drogas inmunosupresoras.....	3
2.1.1 Tacrolimus y Ciclosporina A: Inhibidores de Calcineurina	3
2.1.2 Efectos secundarios del tratamiento con FK506, Diabetes.	6
2.2. Vía secretoria de proteínas	9
2.2.1 Brefeldina A	12
2.3. Inmunofilinas: Receptores de Tacrolimus (FK506)	13
2.3.1 Clasificación de inmunofilinas (FKBP)	13
2.3.2 Rol biológico de las inmunofilinas.....	17
2.3.3 FKBP12 y FKBP19 (FKBP11)	18
2.4. Propuesta de trabajo	20
2.4.1 Hipótesis de trabajo.....	21
2.4.2 Objetivos generales.....	21
2.4.3 Objetivos específicos	22
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. Materiales	23
3.1.1. Material biológico.....	23
3.1.1.1 Cultivo celular.....	23
3.1.1.2. Inmunohistoquímica	24

3.1.2. Reactivos	24
3.1.3. Equipos.....	26
3.2. MÉTODOS	27
3.2.1. Cultivo celular	27
3.2.2. Estimulación de las células	28
3.2.3. Extracción de proteínas totales	29
3.2.4. Separación de proteínas por PAGE-SDS	29
3.2.5. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	30
3.2.6. Inmunodetección por Western blot	31
3.2.7. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	31
3.2.8. Extracción de RNA	32
3.2.9. Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a transcripción reversa (RT-PCR).....	33
3.2.10. Inmunohistoquímica en tejido.....	34
3.2.11. Análisis densitométrico	36
3.2.12. Análisis estadístico.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Efecto de Tacrolimus sobre la expresión génica de Inmunofilinas en línea celular de linfocitos T.....	37
4.1.1. Efecto de Tacrolimus en los niveles proteicos de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en línea celular de linfocitos T	40
4.2. Efecto de Tacrolimus en la expresión génica y proteica de insulina en la línea celular pancreática INS-1E.....	43

4.3. Localización de FKBP12 y GBF-1 bajo el tratamiento con Tacrolimus en la línea celular pancreática INS-1E.....	46
4.3.1. Localización de FKBP12 e Insulina bajo el tratamiento con Tacrolimus en células INS-1E.....	51
4.4. Efecto de Tacrolimus sobre la expresión génica de ambas inmunofilinas	55
4.4.1. Efecto de Tacrolimus sobre los niveles proteicos de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11).....	58
4.5. Secreción de FKBP12 por células INS-1E.....	61
4.6. Expresión de Inmunofilinas bajo diabetes inducida en ratas	64
4.6.1. Expresión de Inmunofilinas en páncreas humano diabético.....	68
5. DISCUSIÓN.....	71
6. REFERENCIAS	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo inmunosupresor mediado por inmunofilinas.....	5
Figura 2. Dominios estructurales de inmunofilinas humanas.....	16
Figura 3. Efecto de Tacrolimus en la expresión de FKBP12 y.....	38
FKBP19 (FKBP11) en células Jurkat.	
Figura 4. Efecto de la droga Tacrolimus sobre las inmunofilinas.....	41
12 y 19 (FKBP11) en la línea celular Jurkat.	
Figura 5. Efecto de Tacrolimus en la expresión de insulina.....	44
Figura 6. Detección de FKBP12 y GBF1 mediante inmunofluorescencia.....	47
indirecta en células INS-1E tratadas con BFA y FK506.	
Figura 7. Detección de FKBP12 e Insulina mediante inmunofluorescencia.....	52
indirecta en células INS-1E tratadas con BFA y FK506.	
Figura 8. Efecto de Tacrolimus sobre la expresión génica de FKBP12.....	56
y FKBP19 (FKBP11).	
Figura 9. Efecto de Tacrolimus sobre los niveles proteicos de FKBP12.....	59
y FKBP19 (FKBP11).	
Figura 10. Secreción de FKBP12 al medio extracelular.....	62
Figura 11. Detección de insulina en tejido pancreático de ratas.....	65
normales y diabéticas.	
Figura 12. Determinación de la localización y expresión de FKBP12.....	66
mediante inmunohistoquímica en ratas diabéticas.	
Figura 13. Determinación de la localización y expresión de FKBP19.....	67

(FKBP11) mediante inmunohistoquímica en ratas diabéticas.

Figura 14. Identificación de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en páncreas..... 69

humano en condición de diabetes tipo I.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARF	Factor de ribosilación de ADP
BFA	Brefeldina A
BIG	GEF inhibido por BFA
BSA	Albúmina sérica de bovino
COP	Proteína de revestimiento
CsA	Ciclosporina A
CyPs	Ciclofilinas
DAG	Diacilglicerol
DCB	Dominio de dimerización y unión de ciclofilinas
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERES	Sitios de salida del retículo endoplasmático
ERGIC	Compartimento intermedio RE-Golgi
FKBP	Proteína de unión a FK506
FKBP12	Proteína de unión a FK506 de 12 kDa
FKBP19	Proteína de unión a FK506 de 19 kDa
GBF-1	GEF golgi-específico resistente a BFA 1
GEF	Factor intercambiador de GTP
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IL-2	Interleuquina 2
Io	Ionomicina
KRB	Tampón bicarbonato Krebs-Ringer

NF-AT	Factor nuclear de células T activadas
PBS	Tampon fosfato salino
PKC	Proteína quinasa C
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PPiase	Peptidil-prolil isomerasa
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno
RE	Reticulo endoplasmático
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena
RyR2	Receptor de rianodina 2
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes
Sec7d	Dominio sec7
SFB	Suero fetal bovino
STZ	Estreptozotocina
TCR	Receptor de células T
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
TGN	Red del trans Golgi
TPR	Repeticiones de tetratricopéptidos
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tritón X-100	Ocil fenoxi polietoxietanol
VTC	Cúmulos vesículo-tubulares

1. RESUMEN

Tacrolimus (FK506) es uno de los fármacos inmunosupresores anticalcineurínicos más utilizados. Éste inhibe la activación de las células T al bloquear la actividad de Calcineurina. Hallazgos recientes han demostrado que Tacrolimus además inhibe la secreción de IL-2 en linfocitos T e insulina en células β -pancreáticas, sugiriendo un mecanismo de acción alternativo de este fármaco que podrían explicar sus efectos secundarios asociados.

El desarrollo de diabetes es uno de los efectos secundarios más comunes en pacientes tratados con FK506, producto de una disminución en la secreción de la hormona insulina. La investigación llevada a cabo en nuestro laboratorio ha despertado nuestro interés en FKBP12 y FKBP19 (FKBP11), integrantes de un amplio grupo de proteínas denominadas inmunofilinas que participan en el plegamiento de proteínas y comparten un dominio estructural (FKBP) reconocido por Tacrolimus. Por tanto, el objetivo de este estudio fue comparar los niveles de expresión de ambas inmunofilinas en células INS-1E tratadas con FK506 y el inhibidor de la secreción proteica BFA.

El tratamiento tanto con Tacrolimus como BFA reveló que sólo FKBP12 se vio incrementada a nivel proteico, FKBP19 en cambio disminuye. Así mismo, se ve afectada la distribución celular de GBF-1, un factor intercambiador de GTP que participa en la formación de vesículas secretorias, brindando nuevos antecedentes que avalan el efecto de Tacrolimus sobre la secreción proteica. Además se demostró un incremento de los niveles de ambas inmunofilinas en tejido pancreático a partir de un modelo de ratas diabéticas.

1.1 SUMMARY

Tacrolimus (FK506) is one of the most commonly used anti-calcineurinic immunosuppressant drugs. This inhibits the activation of T cells by blocking the activity of calcineurin. Recent findings have shown that Tacrolimus also inhibits the secretion of IL-2 on T cells and insulin in pancreatic β cells, suggesting an alternative mechanism of action of this drug that might explain their associated side effects.

The development of Diabetes is one of the most common side effects in patients treated with FK506, due to a decrease in the secretion of the hormone insulin. Research in our laboratory aroused interest in FKBP12 and FKBP19, members of a large group of proteins called immunophilins involved in protein folding and share a structural domain (FKBP) recognized by Tacrolimus. Therefore, the expression levels of both immunophilins in INS- 1E cells treated with FK506 was evaluated and compared with the effect of the secretory pathway inhibitor, BFA, to find new information of the effect by this immunosuppressive drug on the secretory pathway.

Treatment with either Tacrolimus or BFA revealed that only FKBP12 was increased at the protein level, whereas FKBP19 decreases. Likewise, is affected the cellular distribution of GBF-1, a GTP exchanger factor involved in the formation of secretory vesicles, providing new information that support the Tacrolimus effect on protein secretion. Moreover, an increased level of both immunophilins in pancreatic tissue from a diabetic rat model was demonstrated.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Drogas inmunosupresoras

Actualmente, el uso de fármacos inmunosupresores representa la mejor opción tanto para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como para la prevención del rechazo de órganos trasplantados. Esta clase de drogas interfieren con la activación de linfocitos T, responsables de coordinar la respuesta inmune celular. Los diferentes tipos de inmunosupresores, asociados con alguna vía de activación del sistema inmune, presentan distintos mecanismos de acción (Handschumacher et al., 1984; Siekierka et al., 1989a; Harrison y Stein, 1990). La mayoría converge en la disminución de la liberación de interleuquina 2 (IL-2), una citoquina que activa e induce la proliferación de linfocitos (Gillis et al., 1978; Smith et al., 1980). Debido a su efecto terapéutico, ha ido en aumento la utilización de los inmunosupresores denominados anticalcineurínicos (Tacrolimus y Ciclosporina A).

2.1.1 Tacrolimus y Ciclosporina A: Inhibidores de Calcineurina

Tacrolimus (FK506) y Ciclosporina A (CsA) son los fármacos inmunosupresores anticalcineurínicos más utilizados. Ambos fármacos inhiben la activación de las células T; sin embargo, su acción se encuentra asociada a efectos secundarios no deseados. Actualmente, se conoce que parte del mecanismo inmunosupresor de estas drogas consiste en la inhibición de la actividad fosfatasa de Calcineurina (Fruman et al., 1992).

Calcineurina es una serina-treonina fosfatasa heterodimérica, con actividad dependiente de calmodulina y Ca^{+2} , que participa en la translocación del factor nuclear de células T activadas (NF-AT) hacia el núcleo, iniciando así la transcripción de citoquinas que conducen a la respuesta inmune (Shaw et al., 1988). Para ejercer el efecto inmunosupresor, CsA y FK506 deben unirse a sus respectivos receptores intracelulares, una gran familia de proteínas constituidas por las ciclofilinas (CyPs) (Handschumacher et al., 1984) y las inmunofilinas o proteínas de unión a FK506 (FKBP, por su sigla del inglés *FK506 Binding Protein*) (Bierer et al., 1990; Schreiber, 1991). De esta manera el complejo droga-receptor, ya sea CsA-ciclofilina o FK506-inmunofilina, se une a Calcineurina e inhibe competitivamente su actividad (Figura 1) (Schreiber, 1991; Liu et al., 1991). Consecuentemente, la subunidad citosólica del factor de transcripción NF-AT no es desfosforilada, siendo incapaz de translocar al núcleo e interactuar con las regiones promotoras de numerosos genes de citoquinas. Así, se reprime la transcripción de IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF- α , IFN, entre otras, impidiendo el desarrollo de la respuesta inmune celular (Reem et al., 1983; Elliott et al., 1984; Tocci et al., 1989). Sin embargo, a pesar de estas semejanzas, se ha demostrado que el efecto inmunosupresor de FK506 es 10-100 veces más potente que el de CsA en la inhibición de la proliferación y producción de IL-2 por linfocitos T *in vitro* (Sawada et al., 1987).

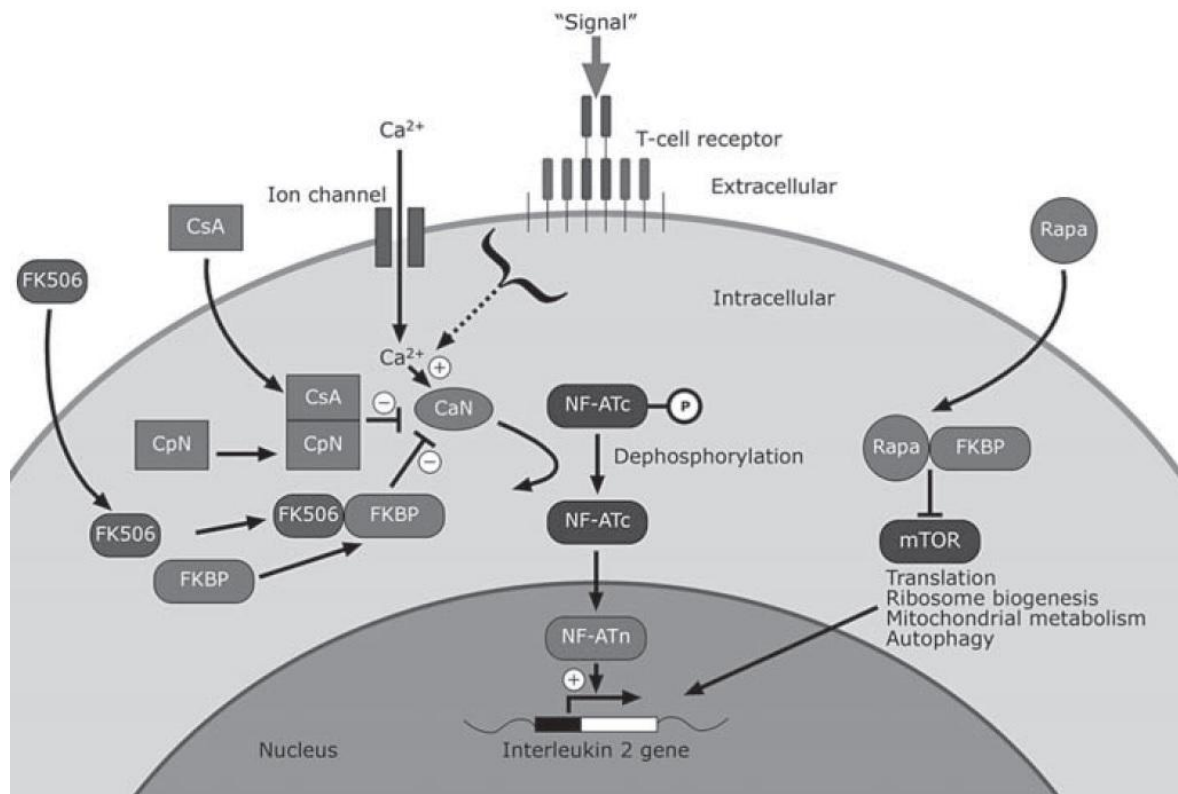


Figura 1. Mecanismo inmunosupresor mediado por inmunofilinas. La vía de transducción asociada al complejo receptor de células T / CD3 induce la activación de PKC y un incremento del Calcio intracelular, seguido de la activación de enzimas dependientes de calmodulina como Calcineurina. Calcineurina es un blanco directo del complejo CsA-ciclofilina y FK506-inmunofilina (FKBP-12), de esta manera la activación de células T a través de la desfosforilación de p-NF-AT es inhibida. Rapamicina en cambio, forma un complejo con FKBP-12 y se une directamente a mTOR, esta interacción resulta en la inhibición de la respuesta proliferativa de células T mediadas por la cascada de transducción de mTOR (Kang et al., 2008).

La unión de antígenos específicos a los receptores de superficie de los linfocitos T estimula la secreción de IL-2 (Meuer et al., 1984; Nishizuka, 1984), una respuesta asociada con el aumento de los niveles de Calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Maino et al., 1974; Nishizuka, 1984). PKC es una proteína dependiente de Calcio y diacilglicerol (DAG), quien en su forma activa transloca desde el citosol a la membrana y está involucrada en la fosforilación de proteínas de membrana. Variados antecedentes demuestran la activación de PKC en la cascada de señalización producto de la formación del complejo receptor de células T – CD3 (complejo TCR/CD3) que lleva a la activación de células T e inducen la producción de IL-2 (Altman et al., 1990; Nishizuka, 1995; Baier-Bitterlich et al., 1996). De esta manera el uso de phorbol myristate acetate (PMA), un análogo estructural de DAG, en conjunto con ionóforos de calcio como ionomicina (Io) en linfocitos T, promueven su proliferación y secreción de IL-2 (Truneh et al., 1985).

2.1.2 Efectos secundarios del tratamiento con FK506, Diabetes.

El papel de determinados miembros de la familia de las inmunofilinas (FKBPs) en el proceso de secreción proteica, sumado a las múltiples funciones de esta familia de proteínas, sugiere que la interacción de FK506 con éstas podría alterar otras vías que conducen a la modificación de diferentes procesos dentro de la célula. De hecho, se ha demostrado ampliamente que el tratamiento con FK506 y CsA no sólo desencadena la supresión de la respuesta inmune, sino que en la mayoría de los pacientes transplantados también es capaz de inducir una serie de efectos secundarios no deseados, entre los que destacan diabetes mellitus (Drachenberg et al., 1999),

nefrotoxicidad (Bennett et al., 1996; Myers et al., 1984), y neurotoxicidad (Wijdicks et al., 1995; Jain et al., 2000). Sin embargo, esta serie de efectos no deseados no pueden ser explicados a partir del mecanismo de acción canónico por la inhibición de la transcripción de IL-2.

La frecuencia del desarrollo de diabetes producto de la terapia post-transplante es significativamente mayor cuando se usa FK506 en comparación con ciclosporina (Hoitsma y Hilbrands, 2006). La causa predominante de la diabetes post-transplante es la resistencia periférica a la acción de la hormona insulina; no obstante, también se ha observado un importante efecto de los fármacos inmunosupresores sobre las células β pancreáticas y, específicamente, sobre la secreción de insulina (Ricordi et al., 1991; Strasser et al., 1992; Ishizuka et al., 1993; Paty et al., 2002; Penfornis and Kury-Paulin, 2006). Como consecuencia, la hiperglicemia aparece como uno de los efectos secundarios más importantes en los pacientes tratados con FK506. La disminución de los niveles de mRNA de insulina, del contenido total de insulina, y de la liberación de insulina, son los efectos descritos de esta droga al ser utilizada en diversos modelos experimentales que involucran líneas celulares o islotes pancreáticos aislados de humano y rata (Redmon et al., 1996; Paty et al., 2002; Polastri et al., 2002; Oetjen et al., 2003).

Glucosa es el mayor regulador extracelular de la transcripción del gen de insulina (Docherty y Clark, 1994), y tiene la capacidad de depolarizar las células β y así incrementar la concentración de calcio libre intracelular, gatillante final para el proceso de secreción de los gránulos que contienen la hormona (German et al., 1990). Puesto que Calcineurina es una fosfatasa dependiente de Calcio-calmodulina (Clipstone y

Crabtree, 1992), su actividad debería ser influenciada por glucosa. Un estudio en islotes pancreáticos aislados de ratón muestra que al aumentar la concentración de glucosa de 5 a 20 mM durante 90 minutos en el medio de cultivo, la actividad fosfatasa de Calcineurina se incrementa aproximadamente 5 veces (Oetjen et al., 2003). En este mismo estudio se demostró que FK506 y CsA tienen la capacidad de inhibir la transcripción del gen de insulina en períodos de incubación de 7 horas, con valores de IC_{50} similares a los utilizados para bloquear Calcineurina en islotes normales. De acuerdo a los autores, FK506 y CsA suprimirían la transcripción del gen de insulina a través de la inhibición de Calcineurina, sugiriendo que la actividad fosfatasa de esta proteína desempeña un papel esencial en la señalización de glucosa hacia el gen de insulina en islotes maduros normales. De forma interesante, la expresión del gen de insulina requeriría la activación (desfosforilación) de NF-AT mediante Calcineurina (Lawrence et al., 2001). Las proteínas NF-AT corresponden a una familia de factores de transcripción involucradas en la respuesta inmune, y hasta entonces, no guardaban relación con células β pancreáticas. Sin embargo, aún no queda establecido cuál isoforma de esta gran familia de proteínas es representativa en células β .

La liberación de insulina inducida por glucosa en células β pancreáticas ha sido ampliamente estudiada (Henquin, 2000; Straub y Sharp, 2002). Sin embargo, el efecto de FK506 sobre la secreción de insulina dependiente de glucosa no ha sido examinado en detalle. Se ha reportado que FK506 en bajas dosis bloquea la secreción de insulina inducida por glucosa, sin afectar el contenido celular de insulina. Este efecto inhibitorio de FK506 es el resultado de una disminución en la velocidad de la glicólisis y una baja en la producción de ATP, debido a la disminución en la actividad de la enzima

glucoquinasa (Radu et al., 2005). En nuestro laboratorio se ha demostrado que FK506 bloquea la secreción de IL-2 e insulina, en forma similar al efecto del inhibidor de secreción proteica, Brefeldina A (BFA) (Rauch et al., 2009). Así, se determinó un aumento de la cantidad intracelular y una disminución en la cantidad secretada de insulina en células MIN6 (línea celular pancreática de ratón) e IL-2 en células Jurkat (línea celular de linfocitos T de humanos) en cultivo, luego de ser tratadas con la droga inmunosupresora por 4 y 24 horas, respectivamente (Rauch et al., 2009). EL bloqueo de FK506 sobre la vía secretoria sugiere que esta acumulación intracelular de IL-2 (en linfocitos T) y de insulina (en células β pancreáticas) contribuiría en forma más tardía con la inhibición de la expresión de estos genes.

2.2. Vía secretoria de proteínas

El retículo endoplasmático (RE) es un amplio organelo celular constituido por muchos subdominios, incluyendo el retículo endoplasmático rugoso (Levine y Rabouille, 2005), donde son sintetizadas las proteínas que necesitan ser secretadas hacia el medio extracelular y la mayor parte de las proteínas de transmembrana. Mediante un coordinado sistema de vesículas, estas proteínas recientemente sintetizadas son transportadas al complejo de Golgi, donde se llevan a cabo los procesos de modificación y distribución de estas macromoléculas. Ambos organelos representan los pilares de la vía secretoria.

La modificación y secreción de proteínas recientemente sintetizadas requiere la compleja coordinación de un gran número de proteínas y factores auxiliares, además de vías de transporte dinámicas y bidireccionales que interconectan todo el sistema

vacuolar central en las células eucarióticas (Rothman y Orci, 1996). Las proteínas nacientes son translocadas hacia el lumen del RE, donde son seleccionadas y transportadas a través de sitios especializados denominados ERES (*ER exit sites*) hacia cúmulos vesículo-tubulares (VTCs; Fromme y Schekman, 2005; Tang et al., 2005). Inmediatamente después de la formación de estas estructuras, éstas se movilizan a través de microtúbulos hacia el complejo de Golgi, donde se congregan para formar el llamado compartimiento intermedio o ERGIC (*ER-Golgi Intermediate Compartment*; Appenzeller-Herzog y Hauri, 2006). Las proteínas de secreción comienzan un recorrido a través de las cisternas del Golgi desde la región *cis* a la *trans* donde serán modificadas enzimáticamente. Este progreso hacia el trans-Golgi es impulsado por el nacimiento de nuevas cisternas en la región *cis* del Golgi, proceso conocido como maduración de las cisternas (Glick y Malhotra, 1998; Losev et al., 2006). Una vez en el trans-Golgi (TGN o *Trans-Golgi Network*) las proteínas de secreción son distribuidas hacia su destino final, incluyendo los endosomas, la membrana plasmática, los lisosomas o los gránulos secretorios. Cabe mencionar que este transporte anterógrado se encuentra equilibrado por uno retrógrado, responsable del reciclaje (Dean y Pelham, 1990).

La formación de vesículas necesarias para el tráfico intracelular de proteínas depende del reclutamiento de complejos proteicos citosólicos o “mantos” proteicos (COPs o coat proteins) a regiones específicas de las membranas del Golgi y RE. El reclutamiento de estos complejos proteicos es controlado por pequeñas GTPasas denominadas ARFs (*ADP Ribosylation Factors*), pertenecientes a la familia de proteínas que tiene la capacidad de unirse a GTP o GDP. Comúnmente, se encuentran inactivas

en el citosol en la forma unida a GDP. El intercambio de GDP por GTP, proceso necesario para la activación de ARFs, es regulado por factores de intercambio de GTP (Donaldson et al., 1992; Randazzo et al., 1993), conocidos como GEFs (GTP Exchange Factors). GBF1 es un GEF localizado en ERGIC y la región cis del Golgi (Kawamoto et al., 2002; Zhao et al., 2006), que participa en el transporte de proteínas nacientes desde el RE al Golgi, por ende este factor intercambiador de GTP cumple un rol crítico para el correcto funcionamiento de la vía secretoria a diferencia de otros GEFs como BIG1 y BIG2 que se localizan en regiones distales del Golgi (Yamaji et al., 2000; Zhao et al., 2002; Shin et al., 2004). Todos los miembros de la familia GEFs poseen un dominio común de aproximadamente 170 aminoácidos, denominado dominio Sec7 o Sec7d (Jackson y Casanova, 2000). Interesantemente, esta región concentra la actividad catalítica GEF, puesto que este fragmento por sí solo tiene los elementos necesarios para catalizar el intercambio de GDP por GTP en ARFs *in vitro* (Sata et al., 1998). Además del dominio sec7 se ha demostrado que ciertos factores intercambiadores de GTP poseen homología en cinco dominios no-catalíticos (Mouratou et al., 2005) y un dominio DCB (*Dimerization and Cyclophilin Binding*; Ramaen et al., 2007). Este último dominio desempeña un papel clave en la dimerización y unión a ciclofilinas/inmunofilinas, y fue reportado por primera vez en un GEF de la especie *Arabidopsis thaliana* denominado GNOM (Grebe et al., 2000; Donaldson y Jackson., 2000).

2.2.1 Brefeldina A

Brefeldina A (BFA) es una lactona heterocíclica de origen fúngico que bloquea la secreción de proteínas (Misumi et al., 1986) e induce cambios rápidos y profundos en la morfología de muchos organelos relacionados con la vía secretoria. En la mayoría de los tipos celulares, BFA causa un desensamblaje del complejo de Golgi y una redistribución de las enzimas residentes de éste hacia el retículo endoplasmático (Klausner et al., 1992; Pelham, 1991). El intercambio de GDP por GTP ocurrido en ARFs se ve fuertemente interrumpido por la presencia de BFA, ya que esta droga se une específicamente y estabiliza el complejo ARF-GDP-GEF (Mansour et al., 1999; Peyroche et al., 1999). De este modo, la GTPasa ARF se conserva en su forma inactiva unida a GDP y es incapaz de asociarse a las membranas del Golgi. El ciclo de activación de ARF y los eventos subsiguientes, que incluyen el reclutamiento de COPs y la formación de vesículas secretorias, se inhiben por la acción de Brefeldina A.

A pesar del dramático efecto de BFA sobre el Golgi, existen GEFs que no se ven afectados por esta droga, o bien cuando son sobreexpresados pueden conferir resistencia a células sensibles a BFA, como es el caso de GBF1 (Claude et al., 1999). La clave se encuentra en el motivo 2 del dominio Sec7, una región cercana a un residuo de glutamato esencial para la actividad GEF. Específicamente, el cambio de dos aminoácidos en esta región, FA por YS, puede transformar un GEF resistente a uno sensible a BFA, y viceversa (Peyroche et al., 1999). Estudios posteriores demostraron que estos residuos del motivo 2 son esenciales para la entrada de BFA al sitio activo del GEF (Renault et al., 2002).

2.3. Inmunofilinas: Receptores de Tacrolimus (FK506)

Las ciclofilinas e inmunofilinas tienen actividad chaperona, es decir, participan en los procesos de plegamiento de las proteínas nacientes. Ambas familias de receptores de drogas inmunosupresoras poseen una actividad enzimática capaz de catalizar la isomerización de péptidos de prolina (Xaa-Pro) entre la conformación *cis* y *trans*, acelerando el plegamiento de proteínas (Fischer et al., 1989; Harding et al., 1989; Siekierka et al., 1989a; Takahashi et al., 1989). Cuando FK506 o CsA forman el complejo con su respectivo receptor, bastan concentraciones muy pequeñas para inhibir completamente la actividad catalítica *in vitro*; sin embargo, no hay evidencia de que la pérdida de la actividad peptidil prolil isomerasa (PPIasa o rotamasa) esté asociada con la inmunosupresión.

2.3.1 Clasificación de inmunofilinas (FKBP)

Como se mencionó previamente, las inmunofilinas (FKBPs) son una numerosa familia de proteínas intracelulares, y se denominan con un número de acuerdo a su masa molecular. Todos los miembros de esta familia presentan uno o varios dominios FKBP (o dominio PPIasa), región donde reside la actividad catalítica de estas proteínas similar al de las ciclofilinas, pero muy diferente a partir de su secuencia genómica (Maki et al., 1990; Siekierka et al., 1990). En mamíferos, las inmunofilinas se clasifican en cuatro subgrupos. Además de las FKBP's citoplasmáticas, existen las inmunofilinas nucleares, de dominio TPR, y de vía secretoria. FKBP12 y FKBP12.6 constituyen el grupo de inmunofilinas citoplasmáticas (Standaert et al., 1990; Arakawa et al., 1994) y

se caracterizan por poseer sólo un dominio FKBP quien representa la totalidad de estas dos proteínas. FKBP25 y FKBP135 son dos FKBP nucleares (Jin et al., 1992; Ishikawa et al., 1998) que contienen dominios N-terminales de función desconocida y una o más secuencias de localización nuclear. Las FKBP de dominio TPR corresponden a FKBP36, FKBP37, FKBP38, FKBP51 y FKBP52 y contienen dos o tres dominios FKBP y repeticiones de tetratricopéptidos (TPRs) dentro del dominio FKBP C-terminal (Meng et al., 1998; Kuzhandaivelu et al., 1996; Lam et al., 1995b; Nair et al., 1997; Peattie et al., 1992). El grupo más grande de inmunofilinas humanas corresponde al de clase secretoria, que comprende a FKBP13 (Jin et al., 1991), FKBP11 (FKBP19) (Rulten et al., 2006), FKBP22 (Patterson et al., 2002), dos variantes de FKBP23 por empalme alternativo (Nakamura et al., 1998), FKBP60 (Shadidy et al., 1999) y FKBP65 (Patterson et al., 2002). Las inmunofilinas de la vía secretoria son distinguibles de otras clases de FKBP por presentar extremos N-terminales ricos en leucina, péptidos señal (*cleavable signal peptides*), y señales de retención en el retículo endoplasmático (*ER-retention motifs*) en el extremo C-terminal, que en la mayoría de los casos son una variante del motivo canónico KDEL (Munro y Pelham, 1987). El dominio PPlasa de esta clase de proteínas puede ser identificado por la presencia de dos residuos de cisteína que eventualmente formarán un puente disulfuro en el entorno oxidante del RE, estabilizando la estructura terciaria del dominio PPlasa (Jin et al., 1991). Otra característica típica de este grupo de inmunofilinas es la presencia de dos aminoácidos básicos ubicados cuatro residuos río abajo del segundo residuo de cisteína, y una prolina altamente conservada encontrada cinco residuos río arriba (Rulten et al., 2006).

En humanos básicamente se han descrito 15 miembros de FKBP's (Figura 2) con diferentes funciones asociadas (Galat, 2003; Rulten et al., 2006). La primera isoforma descrita fue FKBP12, una forma citosólica expresada abundantemente en diversos tejidos (Harding et al., 1989, Siekierka et al., 1989b), pero particularmente enriquecida en el cerebro (Steiner et al., 1992; Snyder et al., 1998). FKBP12.6 es una inmunofilina altamente similar a FKBP12 y posee un 85% de identidad con ésta. (Sewell et al., 1994). FKBP12.6 es considerada un regulador funcional del receptor de rianodina 2 (RyR2), involucrado en el flujo de Ca^{2+} , y por ende se postula que cumple un papel fisiológico en la excitación-contracción del músculo cardíaco y liso (Lam et al., 1995a; Ji et al., 2004), y un discutido papel respecto a la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Noguchi et al., 2008; Chen et al., 2010).

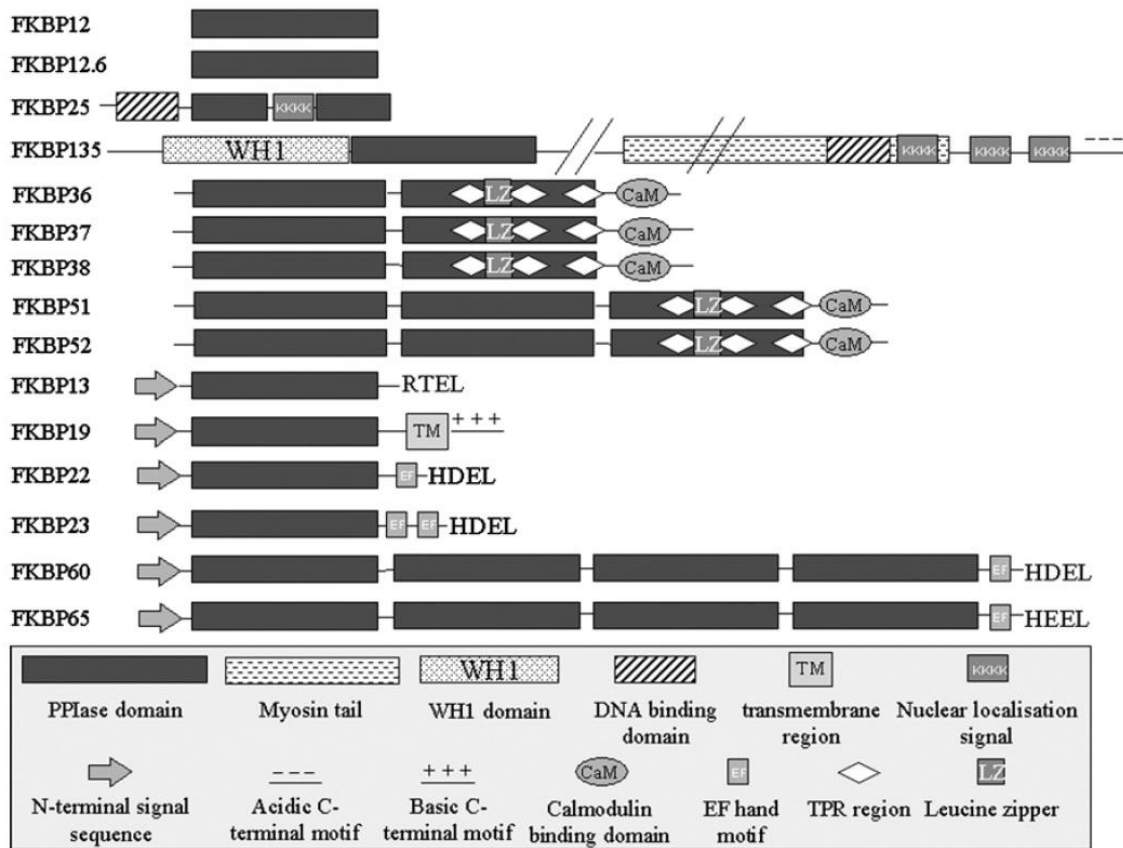


Figura 2. Dominios estructurales de inmunofilinas humanas. La figura detalla la estructura de las 15 inmunofilinas descritas en humanos. Todas comparten el dominio PPIasa (PPIase domain) que concentra la actividad catalítica de estas proteínas (Rulten et al., 2006).

2.3.2 Rol biológico de las inmunofilinas

El extenso grupo de inmunofilinas está constituido por diversos miembros, muchos de ellos con roles descritos ampliamente, fundamentales para el funcionamiento correcto de la célula. La inmunofilina de dominio TPR, FKBP52, se ha descrito como un participante activo en el control de la beta toxicidad en la enfermedad de Alzheimer (Sanokawa-Akakura et al., 2010). Las inmunofilinas de vía secretoria, FKBP13 y FKBP65, se localizan en el RE y participan en el plegamiento de las proteínas, siendo piezas importantes del tráfico intracelular. Se ha reportado que la expresión de FKBP13 aumenta frente a la acumulación de proteínas mal plegadas (Bush et al., 1994), incluso una participación de esta inmunofilina en el tráfico vesicular. Ensayos de inmunoprecipitación han revelado la interacción entre FKBP13 y el GEF BIG1, influenciando posiblemente la activación de ARF (Padilla et al., 2003). FKBP65 en cambio, se asocia específicamente con una proteína de matriz extracelular llamada Tropoelastina a lo largo de su transporte por la vía secretoria (Davis et al., 1998). Sorprendentemente, esta interacción ocurre específicamente durante el crecimiento y desarrollo de tejidos, no así en tejidos adultos (Patterson et al., 2000). Otra inmunofilina de relevancia es FKBP25, una proteína nuclear que se asocia con la proteína caseína quinasa II y nucleolina (Jin y Burakoff, 1993). Caseína quinasa II participa en la fosforilación de distintos sustratos, citosólicos y nucleares, involucrados en el crecimiento celular. Se cree que FKBP25 podría regular estas funciones, tales como la biogénesis ribosomal influenciada por la fosforilación de nucleolina (Jin y Burakoff, 1993)

2.3.3 FKBP12 y FKBP19 (FKBP11)

Hasta hace algunos años, la investigación en el campo de las inmunofilinas estaba mayoritariamente enfocada en su función como receptores de fármacos inmunosupresores. Si bien el mecanismo de acción de FK506 unido a FKBP12 está ampliamente descrito en relación a su efecto terapéutico, los efectos secundarios producto del uso de este fármaco no se explican por el mecanismo canónico mediante la inhibición de la transcripción de IL-2 y otras interleuquinas pro-inflamatorias. Uno de los efectos secundarios más comunes producto del tratamiento con FK506 es la diabetes. El desarrollo de esta enfermedad, ya sea por un bloqueo en la secreción de insulina, o una sobreproducción como consecuencia de la resistencia periférica a insulina, pueden resultar en la acumulación de esta hormona al interior de la célula y un eventual aumento de proteínas mal plegadas. Para llegar a entender los mecanismos involucrados en este efecto no deseado, nuestra búsqueda nos ha llevado a centrarnos particularmente en dos inmunofilinas: FKBP12 y FKBP19 (FKBP11). Actualmente, dada su actividad PPIasa y su conservación en diferentes especies, esta inmensa familia de proteínas es considerada como versátil, asociándose a funciones fisiológicas de suma importancia.

FKBP12 fue la primera inmunofilina descrita, reconocida por ser la FKBP citoplasmática más abundante y presente en variados tejidos. FK506 debe unirse a esta isoforma para ejercer su efecto inhibitorio sobre la actividad de Calcineurina y desencadenar el efecto inmunosupresor (Harding et al., 1989, Siekierka et al., 1989b). Entre los antecedentes mencionados, FKBP12 se encuentra estrechamente asociada a receptores de rianodina 1 (Collins 1991; Brillantes et al., 1994), siendo capaz de regular

la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, del mismo modo que FKBP12.6 estabiliza la liberación de calcio a partir de los receptores de rianodina 2 que por cierto participan en la regulación de la liberación de insulina producto de la modulación de calcio en células beta pancreáticas (Noguchi et al., 2008; Chen et al., 2010). A nivel neuronal, esta inmunofilina se asocia con la neuro-regeneración luego de una lesión (Lyons et al., 1995; Brecht et al., 2003) y también con la enfermedad de Parkinson, donde se ha observado que la actividad PPIasa de FKBP12 acelera la agregación de α -Sinucleína (Gerard et al., 2010). La actividad PPIasa de FKBP12 también se ha visto involucrada en la depalmitoilación de la GTPasa H-Ras, regulando el tráfico entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática (Ahearn et al., 2011).

FKBP19 (FKBP11) en cambio, es una inmunofilina de la clase secretoria, encontrada exclusivamente en vertebrados. Esta inmunofilina se expresa abundantemente en el páncreas y otros tejidos secretorios, como estómago, glándula pituitaria, glándulas salivales y nódulos linfáticos (Rulten et al., 2006). Esta FKBP, al igual que otras inmunofilinas de la vía secretoria, posee residuos de cisteína conservados que forman un puente disulfuro. Sin embargo, la región C-terminal de FKBP19 (FKBP11) difiere de otras FKBP de la vía secretoria puesto que carece de un motivo de unión a calcio llamado mano EF (*EF-hand*) que es característico de muchas FKBP secretorias; además, contiene un putativo dominio de transmembrana seguido de un dominio básico rico en lisinas (Rulten et al., 2006), análogo al motivo di-lisina encontrado en proteínas de membrana del RE (Teasdale y Jackson 1996). Sin embargo, esta proteína carece de un motivo de retención en RE (ER-retention tag),

presumiblemente porque FKBP19 (FKBP11) no permanece en el RE como las otras FKBP secretorias, y es transportada a otro compartimiento celular.

2.4. Propuesta de trabajo

Se ha demostrado que FKBP19 (FKBP11) es una proteína abundante en tejidos secretorios, altamente expresada en páncreas. Por consiguiente, resulta interesante investigar un rol especial de esta inmunofilina respecto al tráfico de proteínas en células pancreáticas, más aún si los datos muestran un efecto inhibitorio de FK506 en la secreción de insulina (Rauch et al., 2009). Por otra parte, FKBP12 muestra una versatilidad de funciones. Así, el tratamiento con FK506 podría generar una acumulación intracelular de proteínas y el bloqueo de la actividad PPIasa, de esta manera, FKBP12 se muestra como un factor crítico para el correcto funcionamiento de la célula y un foco interesante de estudio.

Los antecedentes expuestos entregan evidencia de que el fármaco inmunosupresor FK506 interfiere con la secreción de proteínas. Sin embargo este efecto no guarda ninguna relación con el mecanismo inmunosupresor canónico descrito. Por el contrario, los efectos secundarios producidos por el tratamiento con FK506 podrían explicarse por un mecanismo de acción alternativo, en el cual tendrían un rol importante las inmunofilinas, receptores intracelulares de FK506. En nuestro laboratorio se propone que una expresión diferencial de estas proteínas en distintos tejidos, podrían correlacionarse con los diversos efectos secundarios del fármaco. Para demostrar esto, nos enfocamos al estudio de la diabetes, debido a que corresponde al efecto secundario más común de FK506. Esta tesis se basa en el estudio de la

expresión de dos inmunofilinas aparentemente importantes en células β -pancreáticas: FKBP12 y FKBP19 (FKBP11), puesto que la actividad PPIasa de estas proteínas podría cumplir un papel fundamental frente a un bloqueo de la vía secretoria. De esta manera, este trabajo contempla una comparación de los niveles de expresión de ambas inmunofilinas en células tratadas con FK506 y en condición de diabetes, a modo de establecer un nexo entre la diabetes producida por el tratamiento inmunosupresor y la condición de diabetes inducida por estreptozotocina.

2.4.1 Hipótesis de trabajo

El fármaco inmunosupresor Tacrolimus (FK506) ejerce un bloqueo de la secreción de proteínas, por lo que promueve el aumento de los niveles celulares de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11), proteínas de importancia en la secreción proteica, en células beta pancreáticas.

2.4.2 Objetivos generales

Analizar los niveles intracelulares de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en líneas celulares de linfocitos (Jurkat) y β -pancreáticas (INS-1E) en respuesta al tratamiento con Tacrolimus, y correlacionarlos con la variación de los niveles de FKBP12 y FKBP19 (FKBP 11) por efecto de Brefeldina A, como evidencia del bloqueo de la vía secretoria de proteínas.

2.4.3 Objetivos específicos

1. Demostrar el aumento de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en respuesta al tratamiento con Tacrolimus en la línea linfocitaria Jurkat, como control de un blanco tradicional de fármacos inmunosupresores.
2. Estudiar la acumulación de insulina intracelular en presencia de Tacrolimus como evidencia del bloqueo de la secreción de proteínas en la línea celular pancreática INS-1E.
3. Analizar el aumento de los niveles de inmunofilinas 12 y 19 (FKBP11) en línea celular pancreática INS-1E tratadas con Tacrolimus.
4. Evaluar la expresión de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en tejido pancreático en condición de diabetes inducida por estreptozotocina.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

3.1.1.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea β -pancreática clonal INS-1E reconocida como un modelo fisiológico adecuado, empleado por muchos investigadores. Esta línea fue derivada de células INS-1, una línea de naturaleza no clonal, heterogénea y poco estable. Las células INS-1E se caracterizan por su contenido de insulina, su respuesta secretoria ante glucosa, y una adecuada proliferación (Janjic et al., 1999).

Se utilizó la línea inmortalizada de linfocitos T Jurkat obtenida originalmente de la sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia (Schneider et al., 1977). Esta línea ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la leucemia, señalización de células T, modelos de infección viral como VIH dada su alta expresión de receptores de quimioquinas. Derivados de estas células son útiles en ciencia dado que producen grandes cantidades de interleuquina 2 al ser estimuladas con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Moretta et al., 1985)

3.1.1.2. Inmunohistoquímica

Los cortes de tejidos fueron gentileza del proyecto FONDECYT 1090694 y DID UACH 5-2012-58 y se obtuvieron de la siguiente manera: Tejidos de ratas normales no diabéticas o diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) y tejidos de autopsias de pacientes humanos no diabéticos o en condición de Diabetes mellitus tipo I fueron fijados en Bouin e incluidos en parafina, y se obtuvieron cortes seriados de 7 micras de espesor.

3.1.2. Reactivos

De **Sigma-Aldrich** se obtuvo Brefeldina A 100 μ M

De **Tecoland Labs** se obtuvo Tacrolimus 10 mg/ml

De **Aldrich Chemicals (Milwaukee,WI, USA)** se obtuvo DMSO

De **Biological Industries (Beit Haemek Kibbnitz, Israel)** se obtuvo; medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con F12 (DMEM F-12), y Antibiotico/Antifungico (Penicilina 10000 u/ml, Estreptomina 10mg/ml y Anfotericina 0,025mg/ml).

De **Promega Corporation (Madison, WI, USA)** se obtuvo; Go Taq Green Master Mix, RQ1 RNase-Free DNase, Oligo(dt) 15 Primer, set de Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs), Twen 20, Tris base, glicina, Bisacrilamida, agarosa.

De **Invitrogen** se obtuvo RNase OUTTM, SuperScriptTM II Reverse Transcriptase, SYBR Safe DNA gel stain 400U/U.

De **BioLabs Inc. (New England)** se obtuvo; 100 bp DNA Ladder, Buffer de carga 6X, Estándar proteínas 7-175 kDa.

De **Thermo Scientific** se obtuvo; Pierce[®] ECL Wester Blotting Substrate, agua libre de nucleasas grado biología molecular, Suero fetal bovino.

De **Merck & Co, Inc. (Darmstadt, Germany)** se obtuvo; TEMED, Metanol, Acrilamida, Etanol absoluto, isopropanol, acetona, cloruro de sodio, cloroformo.

De **Sigma Chemical CO (st. Louis, MO, USA)** se obtuvo; poli-lisina, PMA, Tritón X-100, 2-mercaptoetanol, PMSF.

De **Gibco Laboratories Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)** se obtuvo reactivo TRIZOL, persulfato de amonio (PSA), tripsina 2,5% 10X, L-glutamina 200mM.

De **United Stated Biological (Swampscott, MA, USA)** se obtuvo; SDS, EDTA, Albumina de suero bovino.

De **DAKO (Carpintería, CA, USA)**, se adquirió el medio de montaje para fluorescencia y el kit ICQ LSAB plus.

De **Molecular Probes (Eugene, OR, USA)**, se adquirió anticuerpos anti IgG de Rabbit conjugado a Alexa fluor 488 y 594, Mouse conjugado a Alexa fluor 488 y 594 y Goat conjugado a Alexa fluor 488.

De **Santa Cruz Biotechnology**, se obtuvieron los siguientes anticuerpos: IgG de Goat anti-FKBP19 (FKBP11), IgG de Rabbit anti-insulin, IgG de Mouse anti- β actina y

los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, anti-IgG de Mouse, anti-IgG de Rabbit y anti-IgG de Goat y de **Abnova** se obtuvo; IgG de Mouse anti-FKBP12.

De **Integrated DNA Technologies** se obtuvieron los siguientes partidores:

hFredFKBP12 (260 pb) F 5'-CAC CGG GAT GCT TGA AGA TGG AAA-3'

R 5'-GAG GCC ATT CCT GTC ATT CCA GTT-3'

hFredFKBP19(165 pb) F 5'-TAC ACG GGA AGC TTG GTA GAT GGA-3'

R 5'-GGC CAA GTG AGA AGG AAT GAT TGC-3'

β -act RS (295 pb) F 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TC-3'

R 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CC-3'

Insulin(263 pb) F 5'- GCT CTC TAC CTG GTG TGT GG -3'

R 5'- GTT TTA TTC ATT GCA GAG GG -3'

3.1.3. Equipos

Finalmente los equipos utilizados fueron los siguientes: Termociclador Mastercycler[®] personal Eppendorf, espectrofotómetro evolution 60 Thermo Scientific, centrifuga 5810R Eppendorf, Refrigerador Consul, Freezer -20, Freezer -80 ULT Freezer TCL, fuente de poder PowerPac[™] Basic Biorad, Sistema de electroforesis Biorad, cámara de flujo laminar Labgard Class II Biological Safety Cabinet Nuaire, Microscopio Olympus CKX41, Incubador Nuaire CO2 Air-JAcketed Incubator, Baño

termorregulado Memmert Cientec, vortex Maxi Mix II Cientec, pHmetro Inolab pH720, pesa analítica RADWAG® AS 220/C/2, sonicador MISONIX XL-2000.

Para visualizar los geles de agarosa se usó el equipo INGENIUS de Syngene, para visualizar las membranas PVDF se usó el equipo ULTRA-LUM de ΩMEGA, para cuantificar proteínas se usó NanoDrop 2000 de Thermo Scientific, y para visualizar las muestras de inmunofluorescencia se usó el microscopio invertido Olympus FLUOVIEW FV1000 2.0.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivo celular

Células INS-1E fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo CO₂ 5 % en medio completo compuesto de RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (SFB) 5 %, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 50 μM, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 μg/mL. Los pasajes se realizaron una vez a la semana mediante un tratamiento suave con tripsina en T-flasks 25 cm² (BD Falcon™).

La línea celular en suspensión Jurkat j77 fue cultivada en medio RPMI 1640, suplementado con SFB 10 %, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 μg/mL, y glutamina 5 mM a 37°C y 5 % de CO₂/O₂ en T-flasks 75 cm² BD Falcon™.

3.2.2. Estimulación de las células

Células INS-1E se cultivaron hasta una confluencia de 95 % en placas de 6 pocillos, luego se eliminó el medio de cultivo y se lavó tres veces con HEPES-balanced Krebs–Ringer bicarbonate buffer (NaCl 115 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 2,5 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4) conteniendo 0,1 % de albumina de suero bovino (KRB buffer). Finalmente las células fueron incubadas con este mismo buffer durante 2 horas a 37°C. Transcurrido este periodo se removió el sobrenadante y se procedió con la estimulación con glucosa y tratamiento con drogas.

Tres pocillos fueron incubados a una concentración de glucosa de 4,5 g/L (alta glucosa) y los otros tres a 1 g/L (baja glucosa). De esta manera se trató las células con Tacrolimus 100 ng/mL y Brefeldina A 5 µM en ambas condiciones de glucosa. El tercer pocillo se utilizó como control donde se agregó DMSO. El tratamiento se extendió por 4 horas dónde se procedió a la extracción de proteínas y RNA.

Células Jurkat j77 fueron estimuladas tratando 10⁶ células con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 25 ng/ml e Ionomicina 100 µM durante 1 hora. Posteriormente se trató con Tacrolimus 100 ng/mL y Brefeldina A 5 µM durante 23 horas. Como control de estos ensayos se empleo DMSO en lugar de las drogas. Finalmente las células fueron recolectadas por centrifugación para la extracción de proteínas y RNA (Rauch et al., 2009).

El medio de cultivo correspondiente a la incubación de cada tratamiento fue recuperado. Inmediatamente se sedimentaron restos celulares centrifugando a 16000 g durante 20 minutos y 4°C y se concentraron las proteínas de esta fracción extracelular.

Para ello se mezcló 4 partes de acetona más 1 parte de la fracción extracelular y se incubó por 12 horas a -80°C , luego se centrifugó a 6000 g por 25 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante, y el pellet blanco con las proteínas fue resuspendido con 100 μl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Posteriormente se cuantificaron las proteínas presentes usando el equipo NanoDrop.

3.2.3. Extracción de proteínas totales

El cultivo se lavó con PBS 1X (pH 7,4) al término del tratamiento. Posteriormente fue lisado directamente en la placa con 40 μL de buffer de lisis (Tris/HCl 50 mM [pH 7,5], EDTA 1,0 mM, EGTA 10 mM, NaF 25 mM, NaVO_4 2,0 mM, DTT 25 mM, e inhibidores de proteasas 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 1 mM), Los lisados fueron sometidos a sonicación por unos segundos y luego fueron centrifugados a 13000 g a 4°C por 20 minutos para separar el sobrenadante que contiene la fracción con proteínas. Finalmente los extractos se cuantificaron midiendo su absorbancia a 280 nm usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

3.2.4. Separación de proteínas por PAGE-SDS

La separación electroforética de las proteínas fue realizada en geles de poliacrilamida al 12%, los pocillos fueron cargados con 50 μg de proteínas totales en el

caso de extractos celulares y 100 µg para las proteínas presentes en el sobrenadante (medio extracelular). Las muestras fueron mezcladas con tampón de muestra 5X (Tris 500 mM pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 700 mM, tironina 0,8 mg/mL). Las muestras se separaron mediante la aplicación de un potencial de 70 mV, en buffer Tris-Glicina (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM y SDS 0,1 %).

3.2.5. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Una vez que las proteínas fueron separadas se procedió a la transferencia desde el gel hacia una membrana de PVDF. Primero se activó ésta con metanol por 10 segundos. Se montó el equipo de electrotransferencia y entre el cátodo y el ánodo se dispusieron, embebidos en buffer de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1% y metanol 20%), esponja, papel filtro, gel, la membrana de PVDF, papel filtro y esponja. Este "Sandwich" se dispuso en la cámara de transferencia cubierta de buffer teniendo siempre la precaución que el gel con las proteínas quede del lado del cátodo y la membrana quede hacia el ánodo. La transferencia se realizó a 300 mA por 99 minutos.

3.2.6. Inmunodetección por Western blot

Para el análisis de Western Blot las membranas de PVDF fueron retiradas del sistema de electrotransferencia, se bloquearon con 10 mL de solución de bloqueo (Tween 20 0,3 %, leche descremada 5% en PBS 1X) durante 1 ó 2 horas en agitación a temperatura ambiente, posteriormente las membranas fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario a una dilución de 1:1000 para FKBP12 y β -actina y 1:500 para FKBP19 (FKBP11) a 4°C, al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 20 0,05 % en agitación a temperatura ambiente, para luego realizar la incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1:2500 para anti IgG de Conejo y Cabra; 1:3500 para anti IgG de Ratón) por 2 horas en agitación a 4°C. Finalmente las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 0,05 %.

Para revelar las membranas se utilizó luminol (Pierce ECL Western Blotting Substrate) como sustrato para la reacción de quimioluminiscencia. Se mezcló partes iguales de luminol y buffer peróxido y se adicionó directamente a la membrana. Mediante el equipo ULTRA-LUM se detectó la señal quimioluminiscente exponiendo la membrana de PVDF entre 1 y 15 minutos.

3.2.7. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos, previamente cubiertos con Poli-L-lisina 0,001 %. Posterior al tratamiento de las células se removió el medio de cultivo, se lavó con PBS 1X y las células se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10

minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron y se bloquearon durante 30 minutos con solución de bloqueo (BSA 1%, leche descremada 5%, PBS 1X) y Tritón X-100 0,3%. Luego las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos 1:100 en la misma solución de bloqueo durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:300 en solución de bloqueo (anti IgG de Conejo conjugado con Alexa fluor 488 o 594 o anti IgG de Ratón conjugado con Alexa fluor 594 o anti IgG de Cabra conjugado con Alexa fluor 488 según fue necesario). Luego de lavar con PBS 1X (3 veces por 10 minutos), las muestras se montaron con medio de montaje de fluorescencia, y fueron visualizadas y fotografiadas con microscopio confocal invertido.

3.2.8. Extracción de RNA

Para la obtención de RNA se utilizó el método de extracción de RNA total basado en el uso de fenol en mezcla con tiocianato de guanidino (Chomczynski y Sacchi, 1987) con algunas modificaciones.

Las células en monocapa cultivadas en placas de 35 mm se homogenizaron directamente con 1 mL Reactivo TRIZOL (1 mL por 10 cm² de superficie con células), y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se recolectó el homogenizado en un tubo y se adicionó 0,2 mL de cloroformo, la suspensión se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente,

la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó el RNA con 0,5 mL de isopropanol frío, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. Para remover los restos de isopropanol el pellet se lavó con etanol 75 % frío, se mezcló con vortex y se centrifugó a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Finalmente el pellet (RNA total) se dejó secar y, se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas. El RNA total fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

3.2.9. Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a transcripción reversa (RT-PCR).

Para la transcripción reversa, se utilizó 2 µg de RNA total, 0,5 µg de Oligo dT, 1 µL de dNTP mix 10 mM y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 12 µL. La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Luego se agregó 4 µL de 5X First-Strand Buffer (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, pH 8,3), 2 µL DTT 0,1 M, 1 µl de RNaseOut 40 U/ µL, y se incubó a 42°C por 2 minutos. Finalmente se adicionó 1 µL (200 U) de la enzima SuperScript™ II RT, se mezcló bien, y se incubó a 42°C por 50 minutos. La reacción se inactivó a 70°C por 15 minutos.

La amplificación fue desarrollada en un termociclador Mastercycler® personal Eppendorf de la siguiente manera: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos para la denaturación a 94°C, 30 segundos a 55°C para la temperatura de alineamiento y 30

segundos a 72°C para la extensión. 10 minutos a 72°C para la extensión del producto final.

Cada reacción de amplificación se llevó a cabo con el producto PCR Master Mix (Promega): *Taq* DNA polimerasa 25 U/mL, dATP 200 µM, dGTP 200 µM, dCTP 200 µM, dTTP 200 µM, y MgCl₂ 1,5 mM. Se agregó al mix 1 µL de cDNA, 0,5 µM de cada partidor y agua de biología molecular para un volumen final de 15 µL.

Los productos de amplificación obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa al 2 % y fueron visualizados por tinción con SYBR Safe (Invitrogen). Como control de carga se realizó la amplificación usando los partidores para beta-actina. Como control de la reacción se utilizó agua en lugar del templado.

3.2.10. Inmunohistoquímica en tejido

El análisis de inmunohistoquímica se realizó sobre cortes de páncreas de ratas (normales y/o diabéticas) fijados en Bouin e incluidos en parafina. Para la inmunodetección, y siguiendo las instrucciones del proveedor, se utilizó el *kit* "ICQ LSAB plus" de acuerdo a Hsu *et al.* (1981). Primero, el tejido fue desparafinado, con incubaciones sucesivas de 5 min cada una, en xilol (dos veces), etanol 100% (dos veces y dejando secar al aire entre cada incubación), etanol 95%, etanol 80% y agua destilada. La muestra sumergida en agua destilada fue incubada en microondas hasta el primer indicio de ebullición, y posteriormente incubada a temperatura ambiente

durante 5 minutos. El corte se lavó con agua destilada fría y se procedió a la eliminación de la peroxidasa endógena, mediante incubación durante 5 minutos en una solución acuosa de H₂O₂ al 3%. Luego, la muestra se lavó con agua varias veces y se incubó 5 min en PBS 1X. Posteriormente, se procedió al bloqueo y permeabilización de la muestra, utilizando una solución compuesta por BSA 1% y Tritón X-100 0,5%, en PBS 1X, durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después, la muestra fue incubada toda la noche con el anticuerpo primario (anti-FKBP12 y anti-FKBP19 (FKBP11) bajo cámara húmeda a 4°C. Una vez finalizada esta etapa, la muestra se lavó tres veces durante 10 min con PBS 1X y se adicionó el anticuerpo secundario provisto por el *kit* (anti-IgG de conejo-ratón-cabra conjugado a biotina) y se incubó durante 20 min. Luego, la muestra fue lavada con PBS 1X, se incubó con una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa por otros 20 min y se reveló con una solución de DAB (ambas soluciones aportadas por el kit). Luego, la muestra fue deshidratada mediante incubaciones en las soluciones de alcohol utilizadas para desparafinizar, pero en sentido contrario, es decir, desde la menos concentrada a la más concentrada, incubando 15 segundos en cada una y realizando incubaciones de 5 minutos en las soluciones de xilol. Para el montaje final, se agregó una gota de medio de montaje citohistológico (bálsamo de Canadá).

3.2.11. Análisis densitométrico

El análisis densitométrico para Western blot y RT-PCR se realizó mediante el programa imageJ. La imagen digital obtenida de ambos métodos fue procesada para invertir colores y eliminación del background. Las bandas fueron delimitadas simultáneamente para ser comparadas bajo la misma área. La intensidad de las bandas fue expresada como curvas basadas en el pixelaje de éstas. Los valores se obtuvieron como una medida del área bajo la curva de cada una de las bandas. Finalmente se estableció la razón de cada valor con los obtenidos para β -actina para normalizar los datos.

3.2.12. Análisis estadístico

Los datos de todas las gráficas fueron presentados como promedio \pm desviación estándar. Se utilizó como nivel de significancia un $P < 0,05$. Las posibles diferencias estadísticas entre dos grupos fueron evaluadas usando la prueba t student a través del programa Sigma Plot 11.0.

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de Tacrolimus sobre la expresión génica de Inmunofilinas en línea celular de linfocitos T

Como se ha mencionado antes, FKBP12 actúa como el receptor citosólico del fármaco inmunosupresor Tacrolimus, una vez unido es capaz de bloquear la actividad de Calcineurina y desencadenar una cascada de eventos que terminan por inhibir la transcripción de citoquinas en los linfocitos T, como interleuquina 2 (IL-2). Previamente en nuestro laboratorio se ha trabajado con la línea celular de linfocitos T Jurkat j77, dónde se hicieron interesantes aportes referentes al efecto de Tacrolimus a nivel secretorio sobre IL-2 (Rauch et al., 2009). En linfocitos sólo se ha descrito la presencia de FKBP12, pero no hay información sobre la expresión de FKBP19. Por otro lado, se desconoce el efecto de FK506 sobre la expresión de inmunofilinas en estas células claves para la respuesta inmune. Es importante mencionar que inicialmente FKBP19 fue denominada así debido a su tamaño (19 kDa), pero que actualmente también se denomina FKBP11.

La **Figura 3** muestra el resultado de un RT-PCR (**Figura 3A**) de células Jurkat estimuladas con PMA e Ionomicina bajo tratamientos con las drogas BFA y Tacrolimus. Los resultados del análisis densitométrico a partir del RT-PCR (**Figura 3B y C**) no muestran variaciones en la expresión de FKBP12 en ninguno de los tratamientos. Interesantemente, FKBP19 (FKBP11) se ve sobreexpresada al estar en presencia del inhibidor de la secreción proteica Brefeldina A (**Figura 3C**).

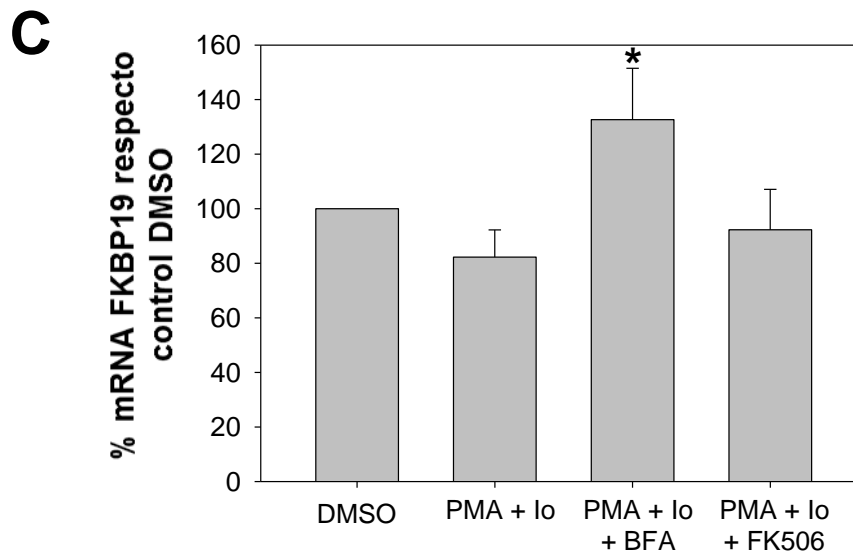
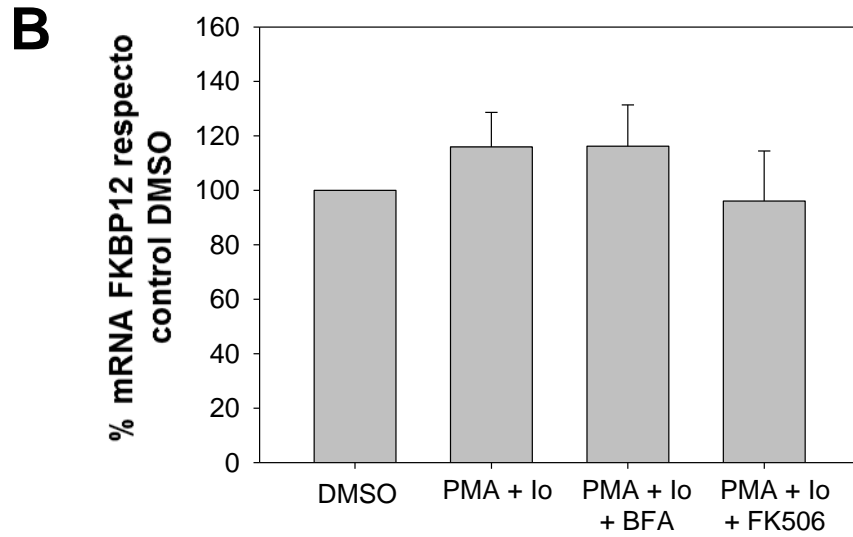
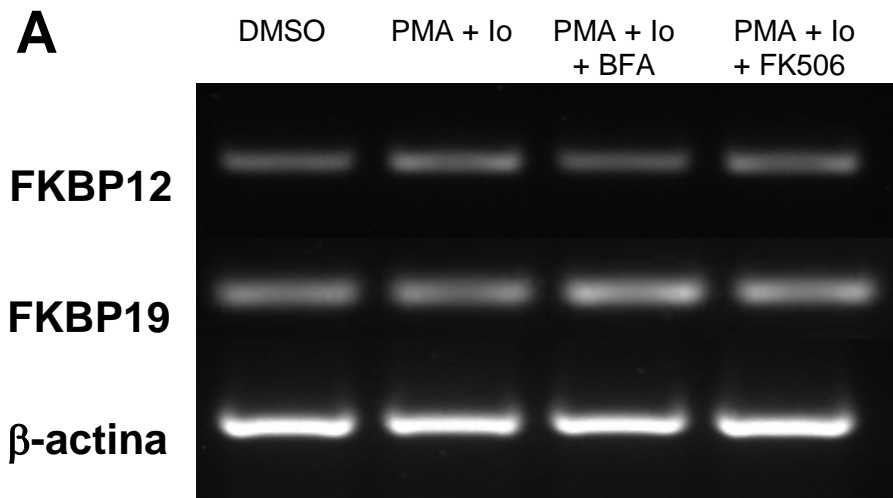


Figura 3. Efecto de Tacrolimus en la expresión de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en células Jurkat. Células Jurkat fueron estimuladas con PMA e Ionomicina (Io), luego de 2 horas, se adicionó Tacrolimus. Después de 24 horas post-estimulación las células fueron separadas del medio de cultivo. Se extrajo el RNA total de estas células, y mediante RT-PCR se detectó FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) (panel A). El panel B y C muestran los análisis densitométricos del RT-PCR de inmunofilina 12 e inmunofilina 19, respectivamente. Esta figura es representativa de 3 experimentos. (*) representa $p < 0,05$ respecto a PMA. Los datos fueron normalizados con β -actina.

4.1.1. Efecto de Tacrolimus en los niveles proteicos de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en línea celular de linfocitos T

Los análisis semi cuantitativos de expresión génica de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) no mostraron resultados concluyentes. Si bien no se aprecia un efecto estadísticamente significativo producto del tratamiento con las diferentes drogas a nivel génico, resta dilucidar si la estimulación con PMA e Ionomicina o el tratamiento con Tacrolimus y BFA es capaz de afectar las inmunofilinas en estudio a nivel proteico en la línea celular de linfocitos T Jurkat j77.

La **Figura 4** muestra el análisis mediante Western Blot (**Figura 4A**) de células Jurkat estimuladas con PMA e Ionomicina bajo tratamientos con las drogas BFA y Tacrolimus. El tratamiento con PMA+Io muestra un aumento en la inmunodetección para ambas proteínas respecto al control sin estimular (**Figura 4B y C**). La señal inmunoreactiva de FKBP12 se ve aumentada en presencia de las drogas FK506 – BFA (**Figura 4B**), sin embargo, FKBP19 (FKBP11) sufre una disminución de sus niveles proteicos al ser tratada la célula con FK506 (**Figura 4C**). No se aprecian efectos de BFA sobre FKBP19 (FKBP11) que pudieran correlacionarse con el aumento de la expresión génica de esta inmunofilina observado en la **Figura 3C**.

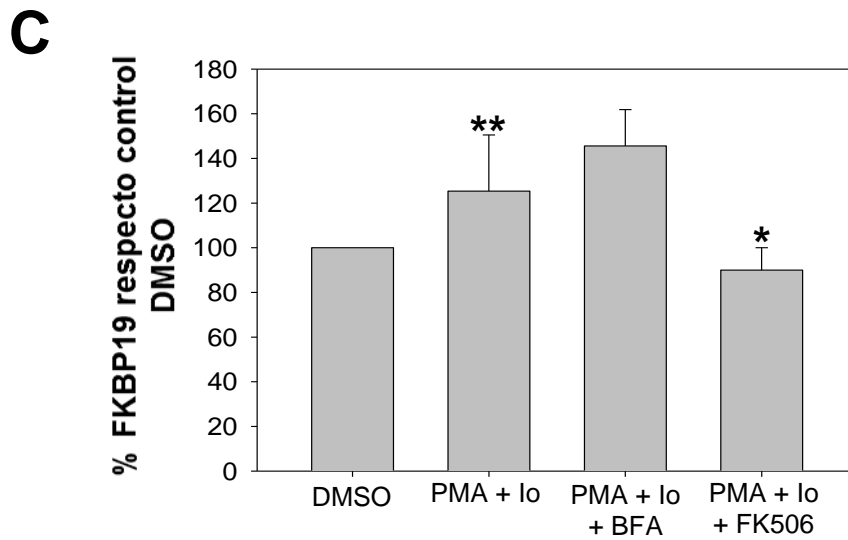
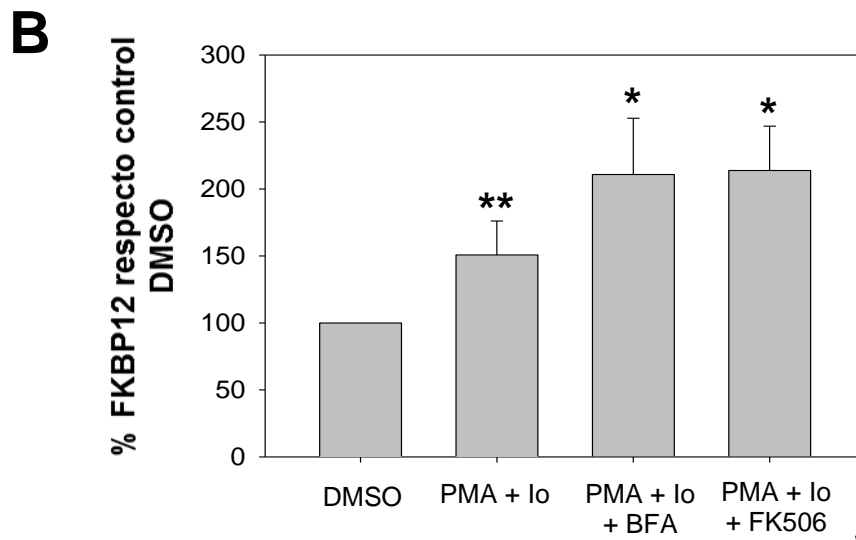
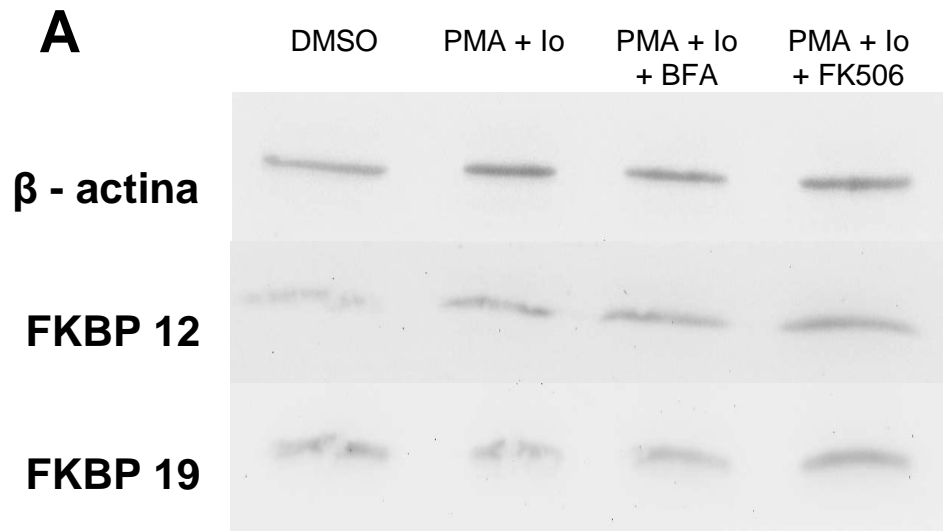


Figura 4. Efecto de la droga Tacrolimus sobre las inmunofilinas 12 y 19 (FKBP11) en la línea celular Jurkat. Se procedió con las células Jurkat al igual que en el ensayo anterior. Se estimuló su proliferación con una combinación de PMA e Ionomicina y luego de dos horas fueron tratadas con Tacrolimus y Brefeldina A de forma separada. Al cabo de 24 horas desde el inicio de la estimulación se separaron las células del medio de cultivo mediante centrifugación y se realizó la extracción de proteínas de dichas células. Mediante Western blot se analizaron los niveles de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) para comparar los diferentes tratamientos (A). En los paneles B y C se observan los resultados del análisis densitométrico de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11), respectivamente. Esta figura es representativa de 3 experimentos. (**) representa $p < 0,05$ respecto al control DMSO. (*) representa $p < 0,05$ respecto a PMA. Los datos fueron normalizados con β -actina.

4.2. Efecto de Tacrolimus en la expresión génica y proteica de insulina en la línea celular pancreática INS-1E

De acuerdo a los últimos trabajos desarrollados en nuestro laboratorio, Tacrolimus no sólo bloquea IL-2 e insulina a nivel transcripcional, también ejerce un grado de supresión a nivel de secreción proteica (Rauch et al., 2009). Se sabe que tanto la respuesta transcripcional como la traduccional de la insulina frente al estímulo con glucosa se manifiestan en tiempos cortos (Leibiger et al., 1998; Leibiger et al., 2000). Estudios en células INS-1E tan sólo requerían 30 minutos post-estimulación para efectuar las mediciones de insulina (Merglen et al., 2004). De esta manera se evaluó el efecto de Tacrolimus sobre la expresión (génica y proteica) de insulina en células INS-1E tratadas con esta droga a 100 ng/mL en un período de 4 horas, en dos condiciones, alta (4,5 g/L) y baja (1 g/L) concentración de glucosa respecto a los niveles fisiológicos. En la **Figura 5A** se aprecia un aumento de la detección de insulina en la fracción intracelular al ser analizada mediante Western Blot, respaldando los resultados obtenidos previamente en la línea celular β pancreática MIN6 (Rauch et al., 2009), al igual como sucede con el inhibidor de la secreción proteica Brefeldina A.

Mediante RT-PCR no se aprecia efecto de esta droga a nivel génico, no hubo diferencias estadísticamente significativas (**Figura 5B y D**).

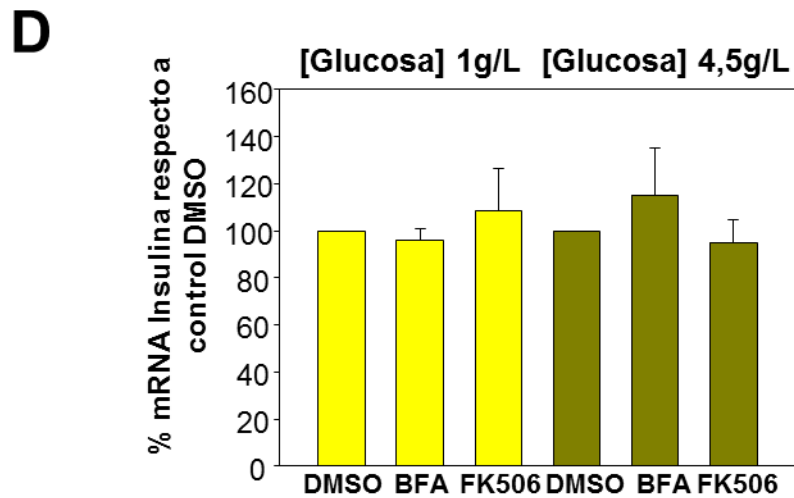
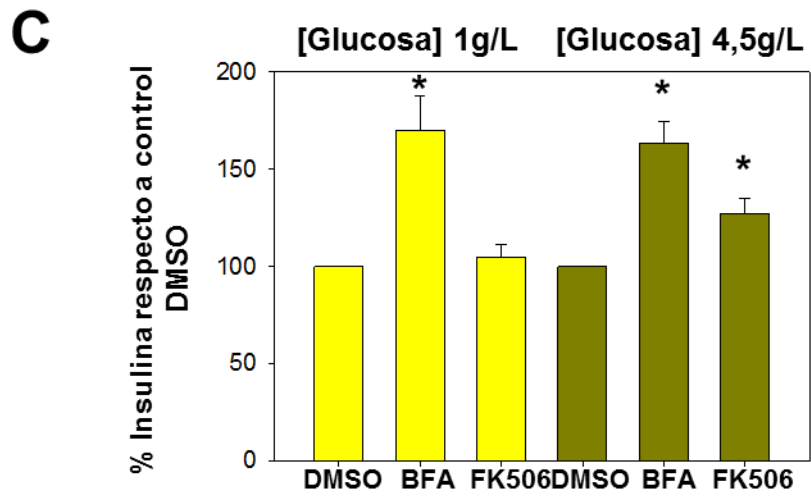
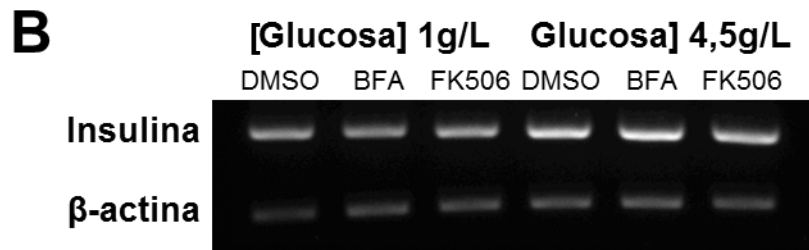
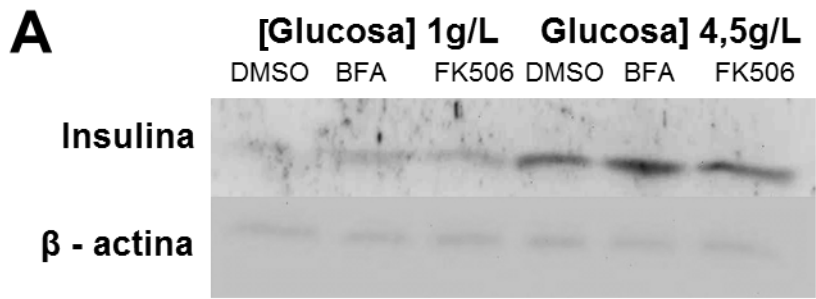


Figura 5. Efecto de Tacrolimus en la expresión de insulina. Células INS-1E fueron tratadas con Tacrolimus en alta concentración (4,5 g/L) y baja concentración (1 g/L) de glucosa durante 4 horas. Se realizó un ensayo de Western blot con extractos proteicos de estas células utilizando un anticuerpo anti-insulina (A). Mediante RT-PCR con mRNA de estas mismas células se amplificó un fragmento del gen de insulina (B). C y D muestran los gráficos de los análisis densitométricos correspondientes al Western blot y RT-PCR, respectivamente. Esta figura es representativa de 3 experimentos. (*) representa $p < 0,05$ respecto a DMSO. Los datos fueron normalizados con β -actina.

4.3. Localización de FKBP12 y GBF-1 bajo el tratamiento con Tacrolimus en la línea celular pancreática INS-1E

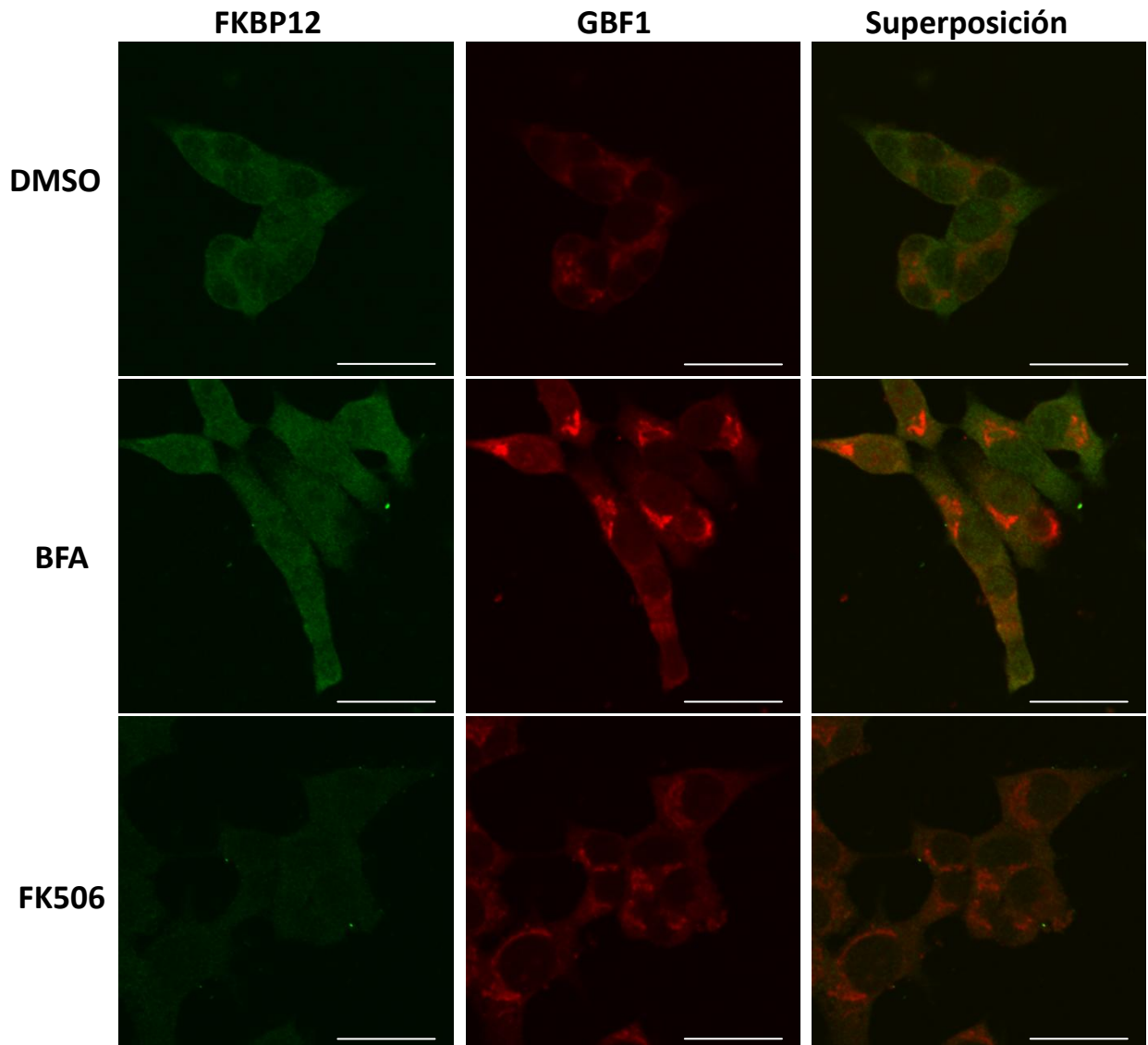
El nuevo mecanismo descrito para FK506, que involucra bloqueo de secreción de IL-2 en línea celular de linfocitos y de insulina en línea célula pancreática (Rauch et al., 2009), explicaría los efectos adversos asociados a este tratamiento. El efecto de FK506 podría ser similar al de BFA, el cual es utilizado ampliamente para analizar bloqueo de secreción y cuyo blanco es GBF1 (GEF de alto peso molecular). Por otro lado, hay antecedentes de que BIG1 (GEF de alto peso molecular) interactúa con FKBP13 (Padilla et al., 2003). Por lo tanto se analizó la distribución de FKBP12 bajo los tratamientos con las drogas FK506 y BFA, y paralelamente se detectó la localización de GBF-1, una proteína crucial para el transporte de proteínas desde el RE al Golgi.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se evaluó la localización de FKBP12 con GBF-1, esta última para verificar la acción de Brefeldina sobre el aparato de Golgi, y adicionalmente para obtener evidencia que sugiera alguna interacción de esta inmunofilina a nivel de la región comprendida entre el Golgi y el retículo endoplasmático. Para ello, células INS-1E estimuladas en condiciones de alta (4,5 g/L) y baja (1 g/L) concentración de glucosa fueron tratadas con BFA y FK506. Luego de 4 horas, las células fueron fijadas y preparadas para la inmunodetección.

La detección de FKBP12 muestra la distribución de esta inmunofilina en el citoplasma (**Figura 6A**), y una aparente movilización de ésta al interior del núcleo al

A

[Glucosa] 1g/L



B

[Glucosa] 4,5 g/L

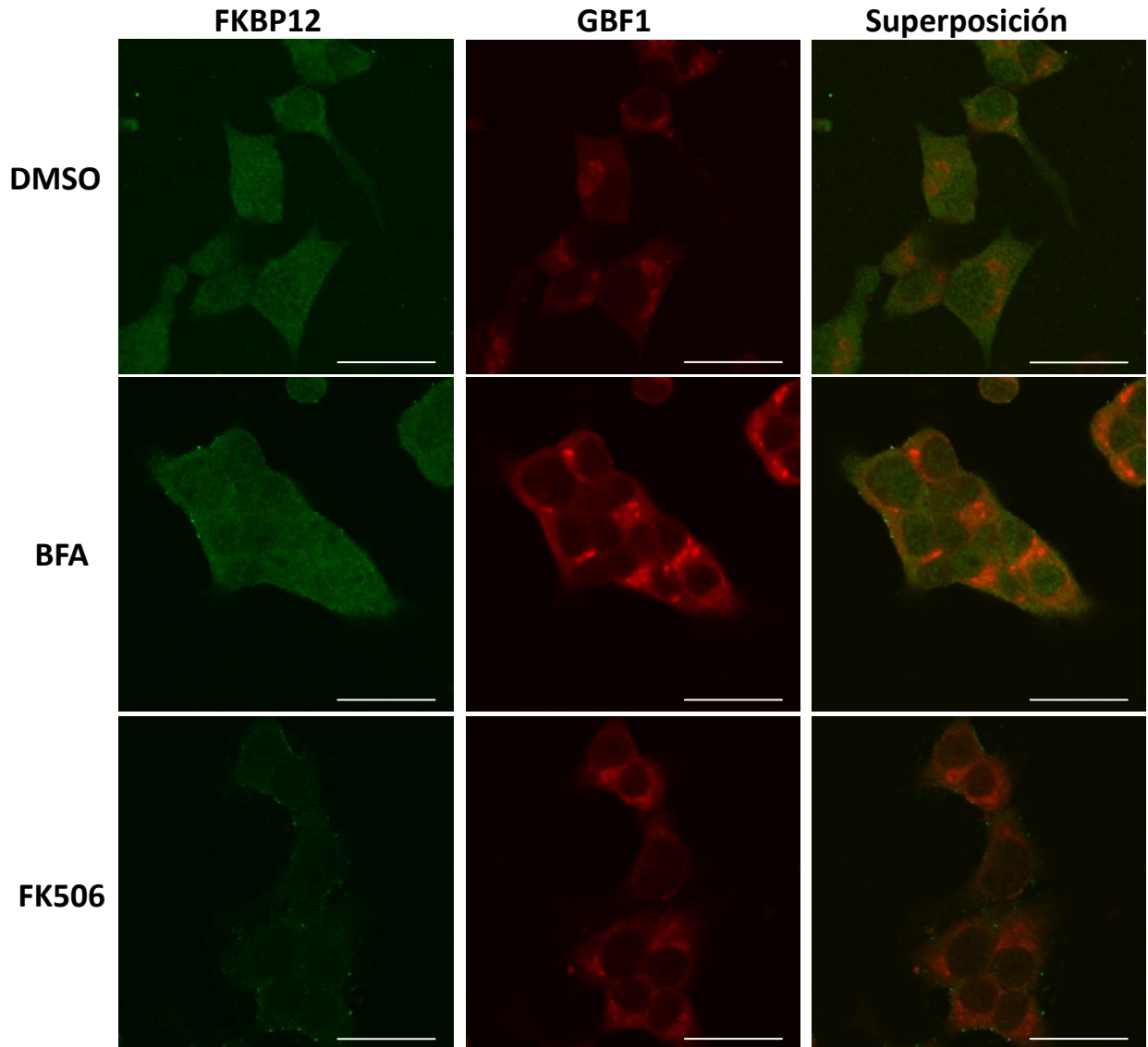


Figura 6. Detección de FKBP12 y GBF1 mediante inmunofluorescencia indirecta en células INS-1E tratadas con BFA y FK506.

Células INS-1E fueron tratadas con BFA y FK506 al ser estimuladas con 1 g/L (panel A) y 4,5 g/L de glucosa (panel B). Luego de 4 horas de tratamiento, las células fueron fijadas en paraformaldehído 4% e incubadas con una mezcla de anticuerpos comerciales específicos para FKBP12 y GBF1 hechos en ratón y conejo respectivamente. Como anticuerpo secundario se utilizó una mezcla de anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa Fluor® 488 y anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor® 594. Esta figura es representativa de 3 experimentos. La barra de magnificación corresponde a 20 μm .

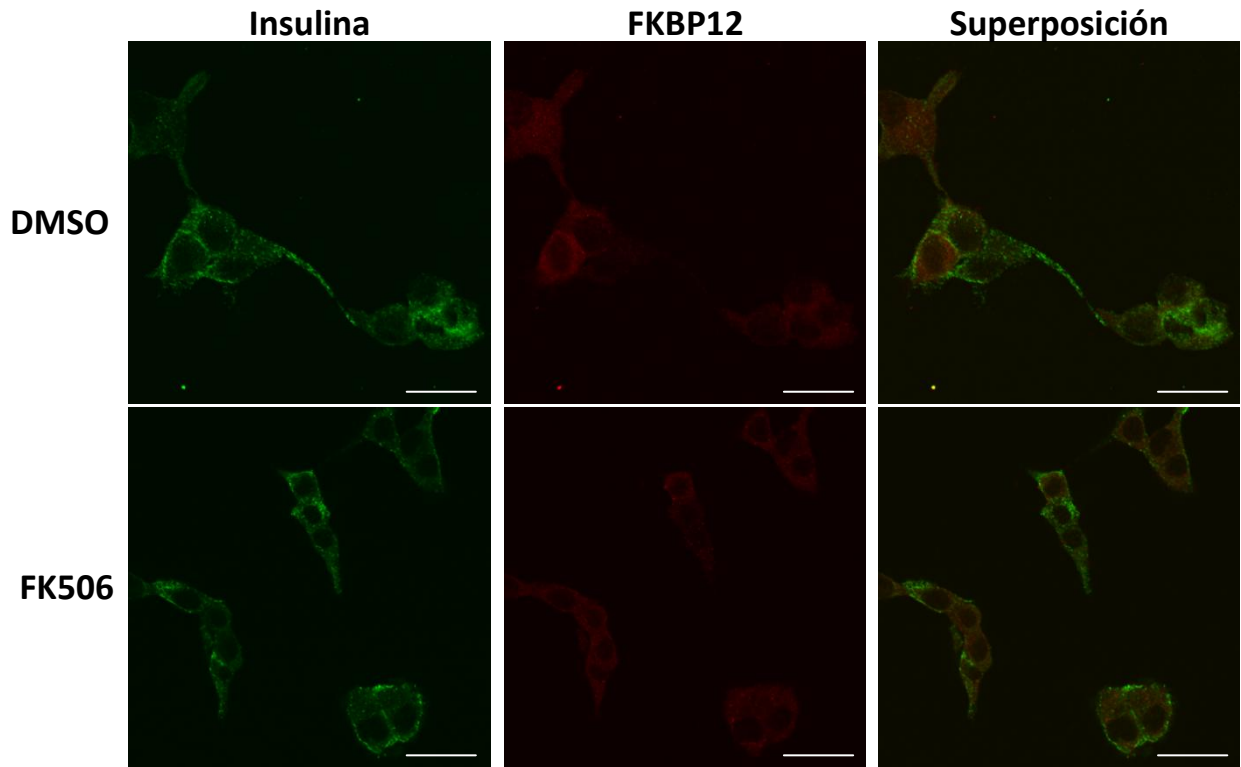
encontrarse la célula en activa secreción (**Figura 6B**). Sin embargo el tratamiento con Tacrolimus muestra una significativa disminución en la detección de esta chaperona (en ambas concentraciones de glucosa). En este contexto, se puede apreciar cómo la distribución de GBF1 es afectada dramáticamente producto del tratamiento de BFA y el eventual desacoplamiento del aparato de Golgi. La señal de GBF1 muestra que esta proteína aumenta su distribución por el citoplasma y además se acumula en una región cercana al núcleo (presumiblemente en el RE) (**Figura 6A y B**). Efectos similares a BFA (aunque menos intensos) se evidencian en el tratamiento con Tacrolimus dado que se aprecia un leve aumento de la señal correspondiente a GBF1 (**Figura 6A y B**) que bien podrían aportar nuevos antecedentes en los efectos adversos de este fármaco inmunosupresor, principalmente los relacionados con la vía secretoria de proteínas.

4.3.1. Localización de FKBP12 e Insulina bajo el tratamiento con Tacrolimus en células INS-1E

Las células β – pancreáticas secretan insulina en forma dependiente al aumento de la concentración de glucosa. Esta secreción se bloquea por la acción de FK506 (Rauch et al., 2009; Øzbay et al., 2011). Luego de detectar la distribución de GBF1 y FKBP12 una vez que la vía secretoria ha sido alterada con BFA y Tacrolimus, resta ver cómo este último (Tacrolimus) es capaz de afectar la localización de una proteína de secreción de importancia como Insulina en la línea celular INS-1E.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se evaluó la localización de FKBP12 con insulina (**Figura 7**). Para ello, células INS-1E estimuladas con alta (4,5 g/L) y baja (1 g/L) concentración de glucosa fueron tratadas con Tacrolimus. Luego de 4 horas, las células fueron fijadas y preparadas para la inmunodetección.

Los paneles **7A** y **7B** muestran la localización de FKBP12 (rojo) e insulina (verde), se puede apreciar cómo esta proteína de secreción (insulina) se distribuye en la periferia de la célula al ser estimulada con [glucosa] 4,5 g/L (Panel B). Como se esperaba, la detección de insulina aumenta al interior de la célula al ser tratada con FK506 debido a una acumulación de la proteína, de acuerdo a lo propuesto por Rauch et al. (2009) en línea celular pancreática de ratón. Sin embargo, no se aprecian zonas donde co-localice FKBP12 e insulina.

A**[Glucosa] 1 g/L**

B

[Glucosa] 4,5 g/L

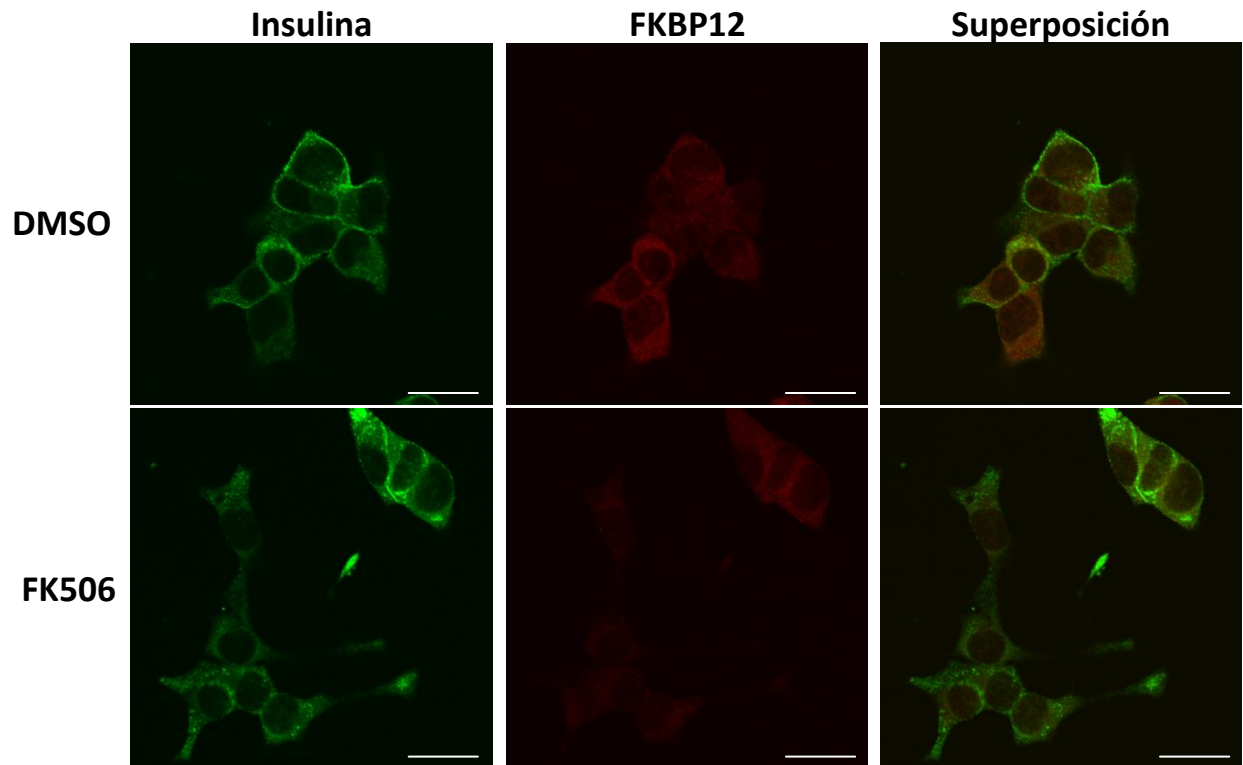


Figura 7. Detección de FKBP12 e Insulina mediante inmunofluorescencia indirecta en células INS-1E tratadas con BFA y FK506.

Células INS-1E fueron tratadas con FK506 bajo dos condiciones: alta glucosa fisiológica (4,5 g/L) y baja glucosa fisiológica (1 g/L). Luego de 4 horas las células fueron fijadas e incubadas con una mezcla de anticuerpos comerciales específicos para FKBP12 e insulina hechos en ratón y conejo respectivamente. Como anticuerpo secundario se utilizó una mezcla de anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa Fluor® 594 y anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor® 488. La señal verde corresponde a la proteína insulina, y la señal roja corresponde a la inmunofilina 12. Esta figura es representativa de 3 experimentos. La barra de magnificación corresponde a 20 μ M.

4.4. Efecto de Tacrolimus sobre la expresión génica de ambas inmunofilinas en la línea celular INS-1E

El efecto inmunosupresor de Tacrolimus está ampliamente descrito y se explica porque desencadena la disminución del transcrito de IL-2 (Reem et al., 1983; Elliott et al., 1984; Tocci et al., 1989). Del mismo modo, hay evidencias que esta droga también bloquea la transcripción de insulina (Redmon et al., 1996; Lawrence et al., 2001; Oetjen et al., 2003), lo que eventualmente generaría diabetes en pacientes tratados con este fármaco. Sin embargo, no se tiene certeza si FK506 es capaz de afectar los niveles de expresión de otras proteínas con las que interactúa como las inmunofilinas, por ejemplo al inhibir la actividad PPIasa de FKBP12, o bien al promover la acumulación de proteínas al interior de la célula. Por ende en esta primera etapa se evaluó la expresión del transcrito de ambas inmunofilinas al ser tratadas con Tacrolimus y Brefeldina A como control, utilizando una concentración baja (1 g/L) y elevada (4,5 g/L) de glucosa.

Mediante RT-PCR se analizó la expresión de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) (**Figura 8A**) en células INS-1E tratadas con Tacrolimus durante 4 horas. Al igual que en experimentos previos, a una concentración de glucosa de 1 y 4,5 g/L.

Los análisis densitométricos de ambas inmunofilinas mostraron un leve descenso del transcrito en presencia de Tacrolimus, aunque sólo bajo el tratamiento con alta glucosa (FKBP12, FKBP19 **Figura 8** panel **B, C** respectivamente).

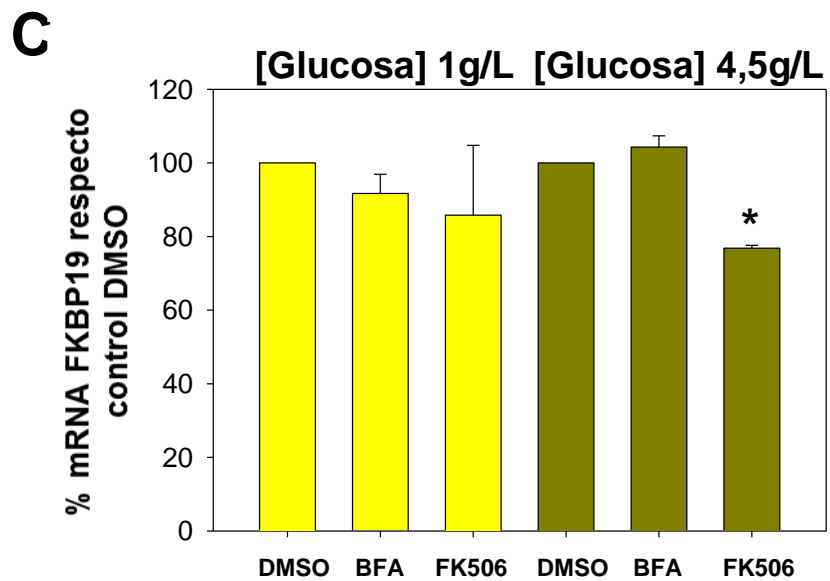
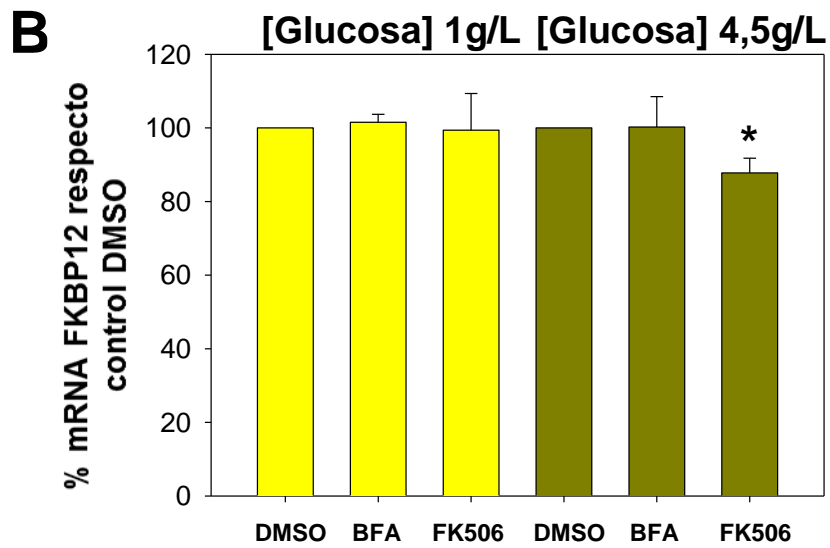
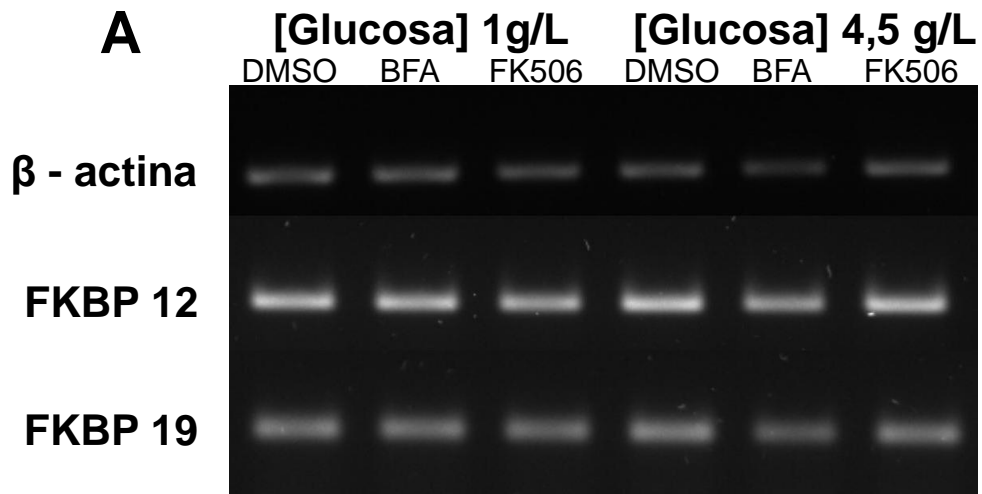


Figura 8. Efecto de Tacrolimus sobre la expresión génica de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11). A partir de células INS-1E tratadas con Tacrolimus por 4 horas en condición de baja y activa secreción proteica (1 y 4,5 g/L de glucosa, respectivamente) se extrajo el RNA total. Mediante RT-PCR se detectó el mRNA de las inmunofilinas 12 y 19 (A) y se cuantificaron por análisis densitométricos (B, FKBP12; C, FKBP19). Esta figura es representativa de 3 experimentos. (*) representa $p < 0,05$ respecto a DMSO. Los datos fueron normalizados con β -actina.

4.4.1. Efecto de Tacrolimus sobre los niveles proteicos de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en la línea celular INS-1E

Una vez establecido que la línea celular INS-1E responde al tratamiento con FK506 de manera similar a los estudios realizados con anterioridad en nuestro laboratorio (Rauch et al., 2009), el siguiente paso fue evaluar el efecto de esta droga sobre la expresión de las inmunofilinas 12 y 19 (FKBP11), la primera por su ya mencionada interacción con el fármaco, y la segunda por su aparente importancia en la vía secretoria. Más aún, FKBP12 por ser una inmunofilina citoplasmática y FKBP19 (FKBP11) por estar asociada con el retículo endoplásmico rugoso, nos permite tener una visión más amplia del efecto de esta droga al interior de la célula.

Mediante Western Blot se analizó proteínas totales de células tratadas con Tacrolimus durante 4 horas, en condición de activa secreción proteica (4,5 g/L de glucosa) y baja secreción (1 g/L de glucosa). Interesantemente se observó un aumento de inmunofilina 12 al ser tratada con FK506 y BFA en condición de activa secreción, es decir, a alta concentración de glucosa (**Figura 9B**). En cambio los niveles de FKBP19 descendieron bajo estas mismas condiciones (**Figura 9C**). Sorpresivamente, la detección de inmunofilina 19 muestra la aparición de una segunda banda (levemente mayor) bajo el tratamiento con Brefeldina A principalmente, y en menor medida con Tacrolimus, dónde la segunda banda es detectada en la condición de baja secreción. No se observó otras variaciones significativas en células en estado de baja concentración de glucosa (1 g/L).

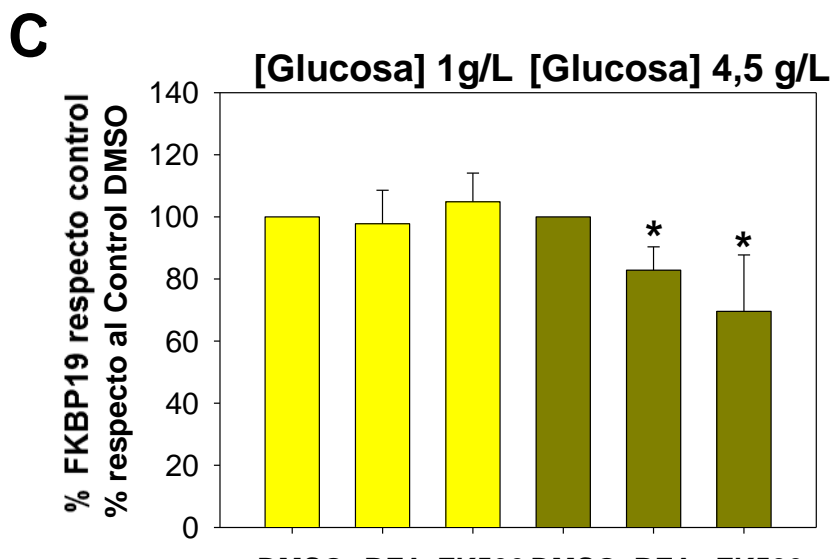
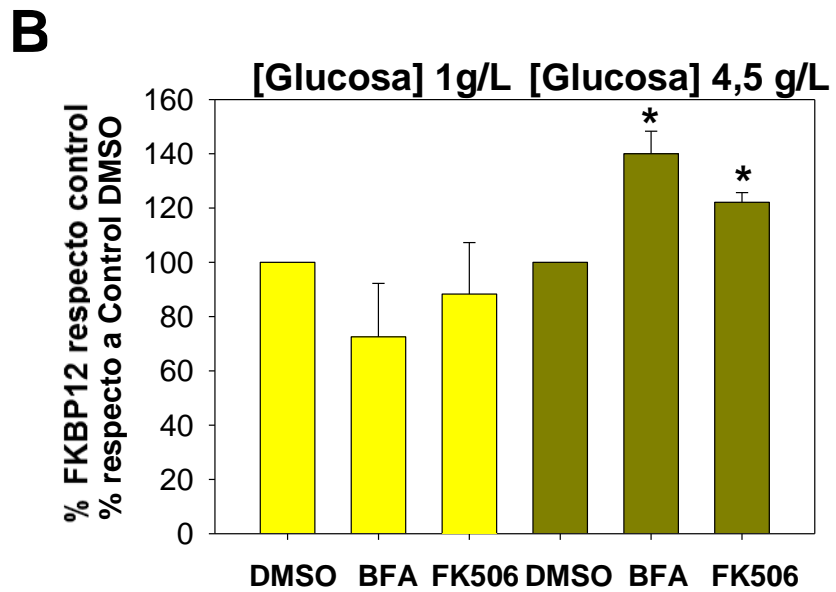
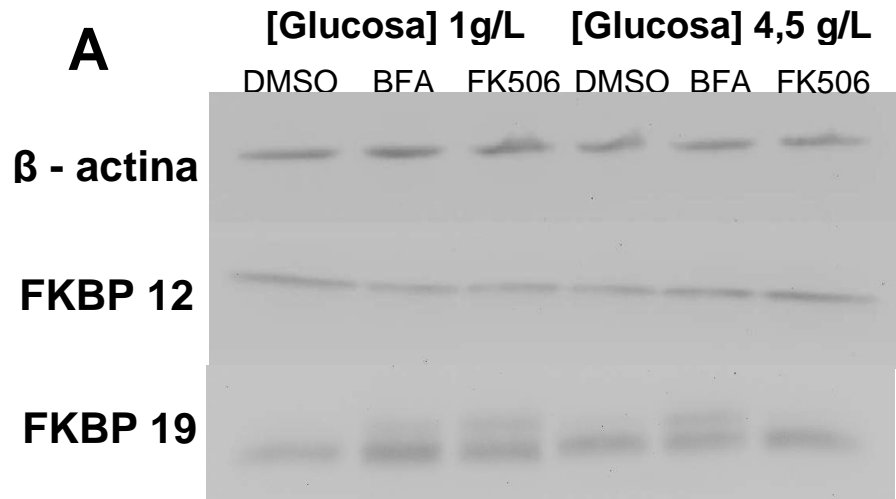


Figura 9. Efecto de Tacrolimus sobre los niveles proteicos de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11). Se incubó células INS-1E con el fármaco FK506 bajo dos condiciones fisiológicas de glucosa: 1 g/L (baja) y 4,5 g/L (alta). Luego de 4 horas de tratamiento se realizó extracción de proteínas y separación por SDS-PAGE 12%. Mediante Western blot se detectó FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) (panel A) y se compararon en las diferentes condiciones. Los paneles B y C muestran los análisis densitométricos de FKBP12 y FKBP19, respectivamente. Esta figura es representativa de 3 experimentos. (*) representa $p < 0,05$ respecto a DMSO. Los datos fueron normalizados con β -actina.

4.5. Secreción de FKBP12 por células INS-1E

Está descrito que FKBP12 es el receptor de Tacrolimus, una proteína que reside en el citosol y es la inmunofilina más abundante. Aún cuando de acuerdo a la estructura de FKBP12, esta inmunofilina no debería ser secretada, hay algunos antecedentes que sí lo demostrarían (Bang et al., 1995; Walensky et al., 1998; Aström-Olsson et al., 2009). Por otra parte FKBP19 (FKBP11) se ha asociado con funciones de secreción proteica, aparentemente posee un dominio transmembrana siendo la única inmunofilina con esta característica (Rulten et al., 2006). Sin embargo, no hay estudios que reflejen la presencia de esta proteína en la porción extracelular.

De esta manera se procedió a examinar, en la fracción obtenida de los sobrenadantes de las células INS-1E, extraídos del experimento anterior donde se trató con FK506 y BFA células INS-1E estimuladas con alta (4,5 g/L) y baja (1 g/L) glucosa. Si el aumento de FKBP12 generado por Tacrolimus es debido a un bloqueo en la secreción proteica, éste debería verse reflejado con una disminución de esta inmunofilina en la porción extracelular.

La **Figura 10**, a través de Western blot, muestra efectivamente la presencia de FKBP12 a nivel extracelular, indicando que esta inmunofilina es secretada por la célula a diferencia de FKBP19 (FKBP11) que no fue detectada (**Figura 10A**). El resultado muestra una notable diferencia entre las condiciones, pues las células tratadas con baja glucosa (1g/L) presentan mayores niveles de inmunofilina 12 a nivel extracelular respecto a las tratadas con alta glucosa donde es casi nula. Sin embargo no se pudo establecer variaciones significativas entre los tratamientos con ambas drogas (**Figura 10B**).

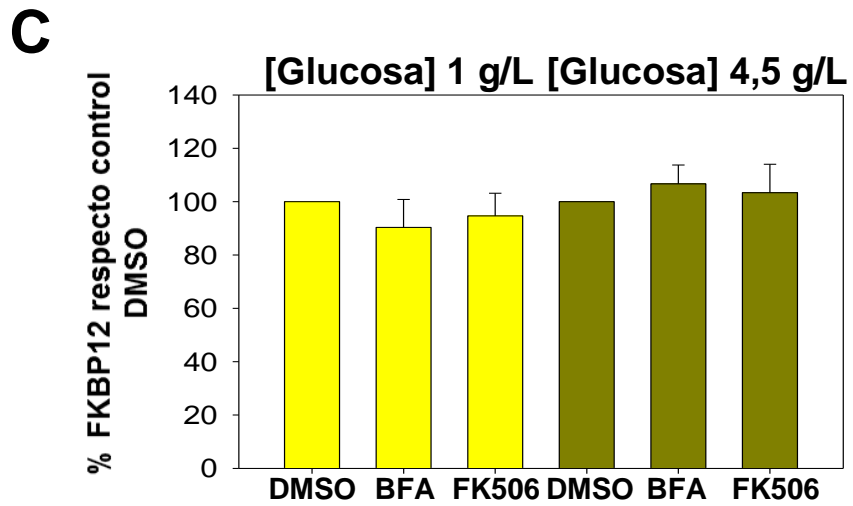
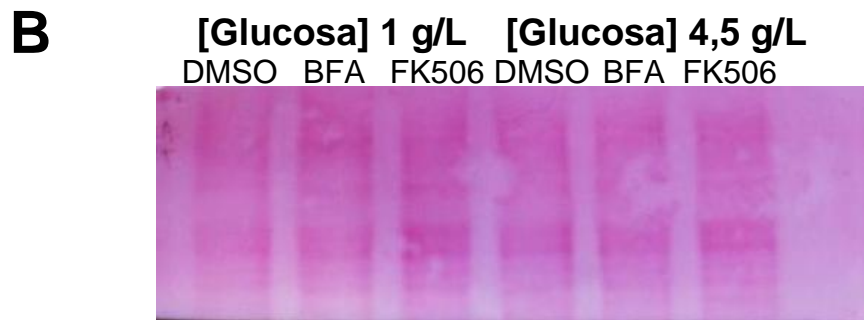
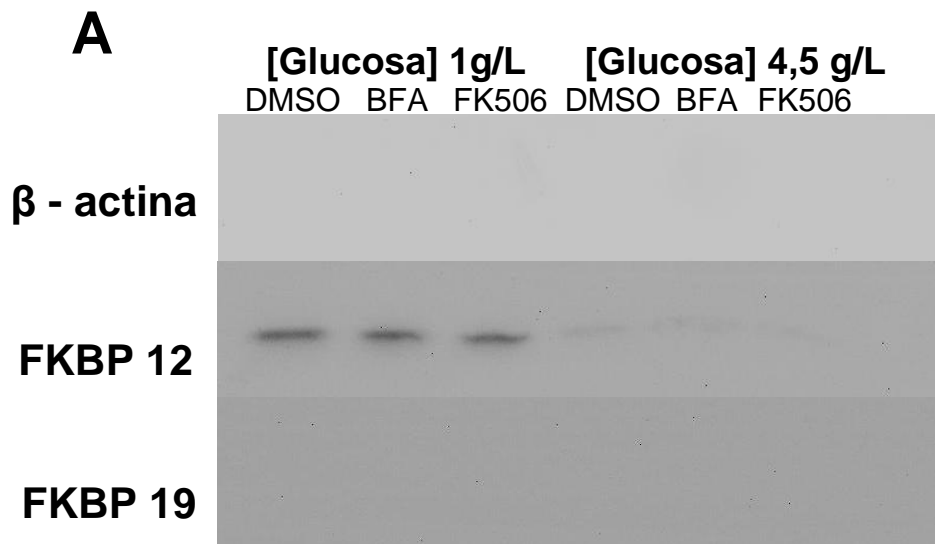


Figura 10. Secreción de FKBP12 al medio extracelular. Se detectó FKBP12 mediante Western blot utilizando el medio de cultivo recolectado (sobrenadante) de los ensayo anteriores con células INS-1E. El panel A muestra el revelado de los ensayos de inmunodetección para β -actina, FKBP12 y 19 (FKBP11). En B se muestra la tinción con rojo Ponceau de la membrana de PVDF para mostrar la presencia de la misma cantidad de proteínas en todos los carriles. El panel C muestra el gráfico de los análisis densitométricos obtenidos de la inmunodetección de FKBP12. No se detectó β -actina ni FKBP19 en los sobrenadantes recolectados. Esta figura es representativa de 3 experimentos.

4.6. Expresión de Inmunofilinas bajo diabetes inducida en ratas

El desarrollo de diabetes producto del tratamiento con Tacrolimus es uno de los efectos secundarios más comunes inducidos por este fármaco. La causa más común es la resistencia a insulina, o bien la disminución en la producción-secreción de esta hormona.

En los experimentos previos, se estableció una relación entre Tacrolimus a dosis terapéuticas y la expresión de inmunofilinas en células β pancreáticas, siendo lo más destacable el aumento de inmunofilina 12 en presencia de esta droga. Ahora resta saber qué ocurre con los niveles de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en la condición de diabetes. Para ello, a través de inmunohistoquímica se detectó la expresión de estas FKBP's en cortes de páncreas de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina comparando con los respectivos controles.

La inmunodetección de insulina en el tejido pancreático de rata revela la dramática disminución de esta proteína en la condición de diabetes (**Figura 11**).

Las **figuras 12 y 13** muestran un incremento en la abundancia de ambas inmunofilinas, particularmente en los islotes de Langerhans al cuarto mes de diabetes (**Figura 12-13 B, E**), aunque se aprecia un descenso al octavo mes respecto al anterior. La inmunodetección de FKBP12 muestra que esta chaperona es abundante en los islotes de Langerhans. FKBP19 en cambio, es predominante en los acinos pancreáticos, especialmente en la periferia de acuerdo a lo descrito en Rulten et al. (2006), y su expresión al interior de los acinos aumenta levemente al octavo mes de diabetes (**Figura 13 C, F**).

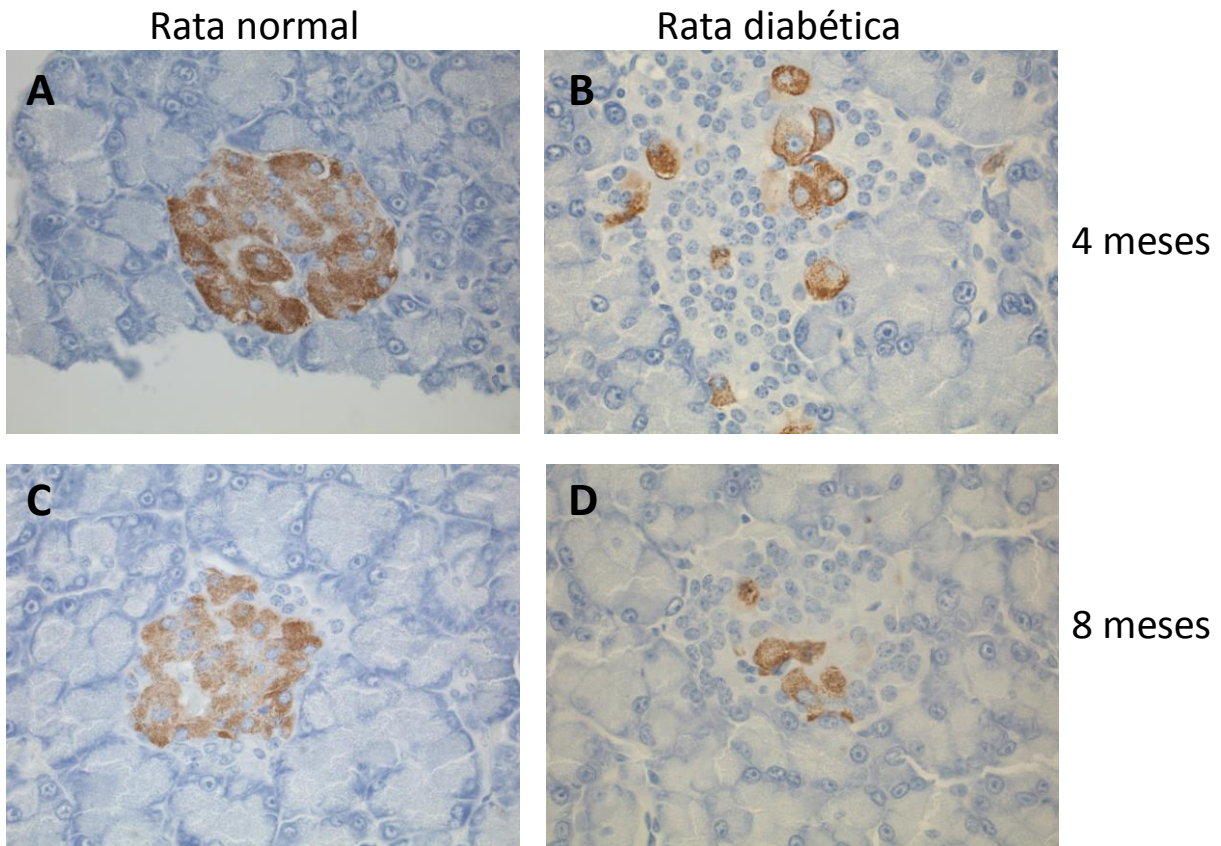


Figura 11. Detección de insulina en tejido pancreático de ratas normales y diabéticas. A partir de diferentes cortes de páncreas de ratas control y tratadas con STZ se realizó la inmunodetección con un anticuerpo anti-Insulina. Las figuras A y C representan un corte histológico de páncreas de ratas normales de 4 y 8 meses respectivamente. Las figuras B y D corresponden a un páncreas de ratas diabéticas de 4 y 8 meses respectivamente. Cada imagen tiene un aumento de 63X. Esta figura es representativa de 3 experimentos.

FKBP12

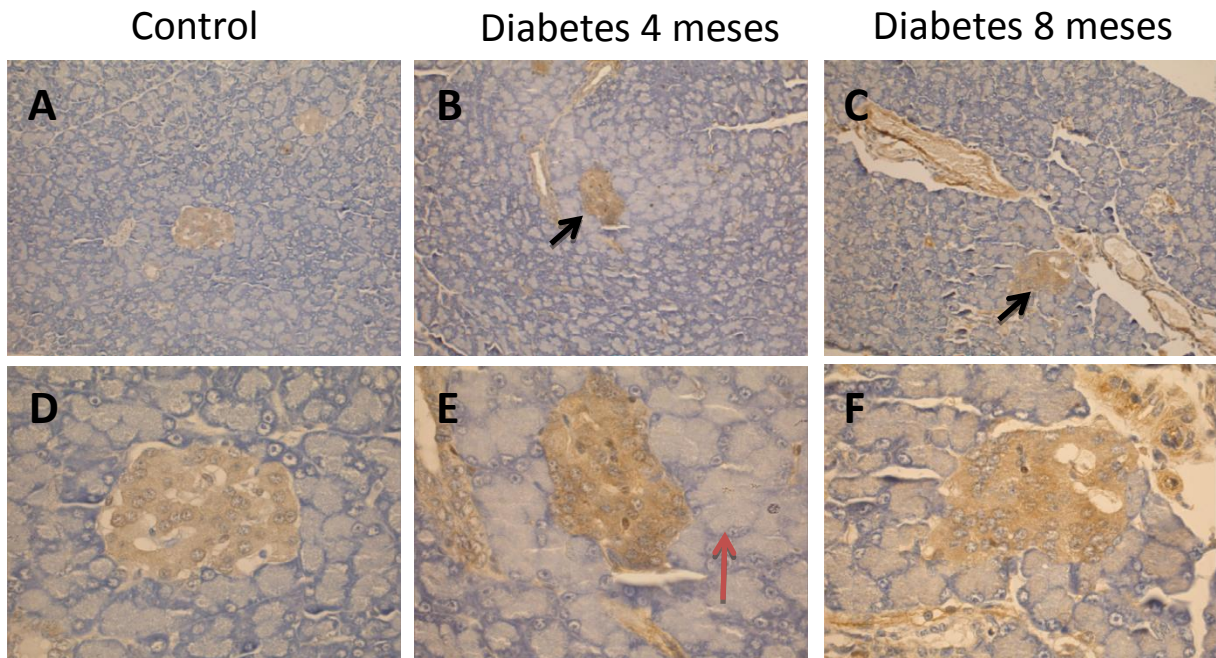


Figura 12. Determinación de la localización y expresión de FKBP12 mediante inmunohistoquímica en ratas diabéticas. Se incubó con anti-FKBP12 diferentes cortes de páncreas de rata. En la figura: A y D, corte histológico control de rata de 6 meses (20X y 63X respectivamente), B y E, rata diabética de 4 meses (20X y 63X respectivamente), C y F, rata diabética de 8 meses (20X y 63X respectivamente). Las flechas rojas indican los acinos pancreáticos y las flechas negras los islotes de Langerhans. Esta figura es representativa de 3 experimentos.

FKBP19 (FKBP11)

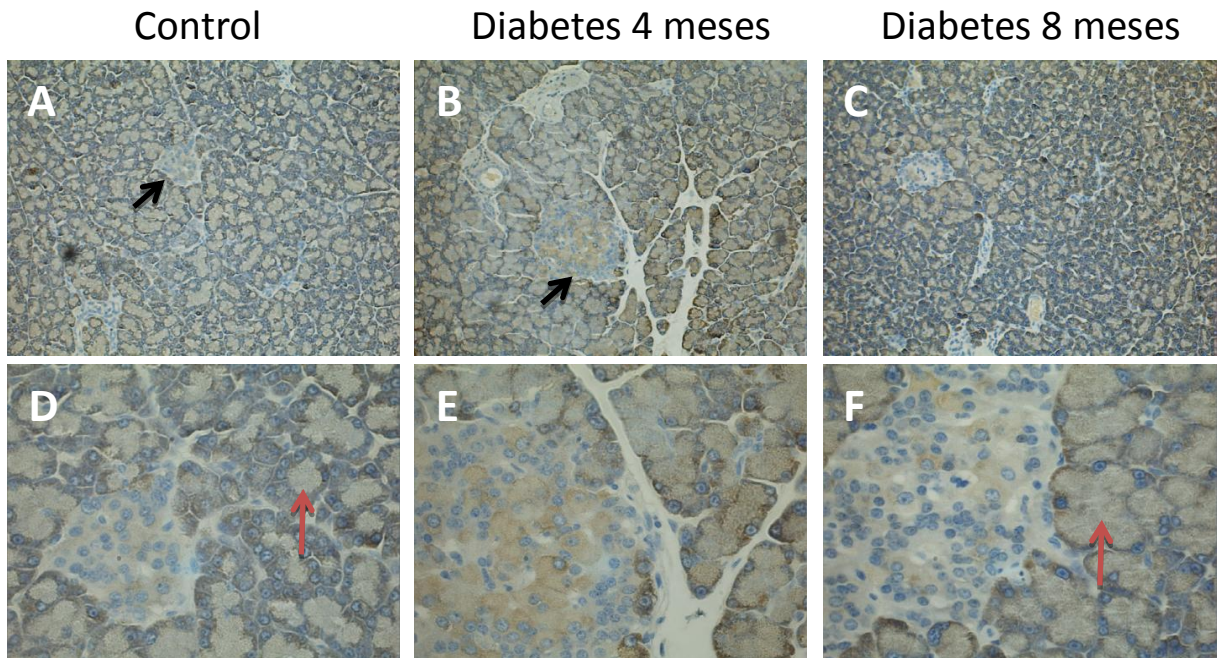


Figura 13. Determinación de la localización y expresión de FKBP19 (FKBP11) mediante inmunohistoquímica en ratas diabéticas. Se incubó con anti-FKBP19 diferentes cortes de páncreas de rata. En la figura: A y D, corte histológico control de rata de 6 meses (20X y 63X respectivamente), B y E, rata diabética de 4 meses (20X y 63X respectivamente), C y F, rata diabética de 8 meses (20X y 63X respectivamente). Las flechas rojas indican los acinos pancreáticos y las flechas negras los islotes de Langerhans. Esta figura es representativa de 3 experimentos.

4.6.1. Expresión de Inmunofilinas en páncreas humano diabético.

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad metabólica caracterizada por la destrucción selectiva de las células beta del páncreas causando una deficiencia absoluta de insulina. Los experimentos previos se caracterizaron por el análisis de expresión de FKBP12 y 19 (FKBP11) en presencia de niveles proteicos intracelulares elevados producto del bloqueo de la secreción proteica. Dada estas condiciones, resulta interesante determinar la expresión de las inmunofilinas en estudio en ausencia o a bajos niveles de insulina.

Mediante inmunohistoquímica se detectó la localización y expresión de FKBP12 y FKBP19 en cortes de tejido pancreático en condición de diabetes mellitus tipo 1 (**Figura 14**). Los cortes histológicos de páncreas provienen de la autopsia de un paciente con esta enfermedad.

De acuerdo a los resultados, al igual que en los cortes de rata se aprecia una distribución predominante de FKBP12 en los islotes de Langerhans (panel A) y de FKBP19 en los acinos pancreáticos (panel B). Como era de esperar, la expresión de insulina es casi nula en el páncreas diabético (panel B). Sin embargo, de modo opuesto al caso anterior, ambas inmunofilinas se ven dramáticamente disminuidas bajo Diabetes mellitus tipo 1, tanto en la porción endocrina (panel D) como exocrina (panel F) del páncreas. Los resultados entregan evidencia de la relación entre estas proteínas con actividad PPIasa y la insulina, u otras proteínas igualmente afectadas por esta enfermedad.

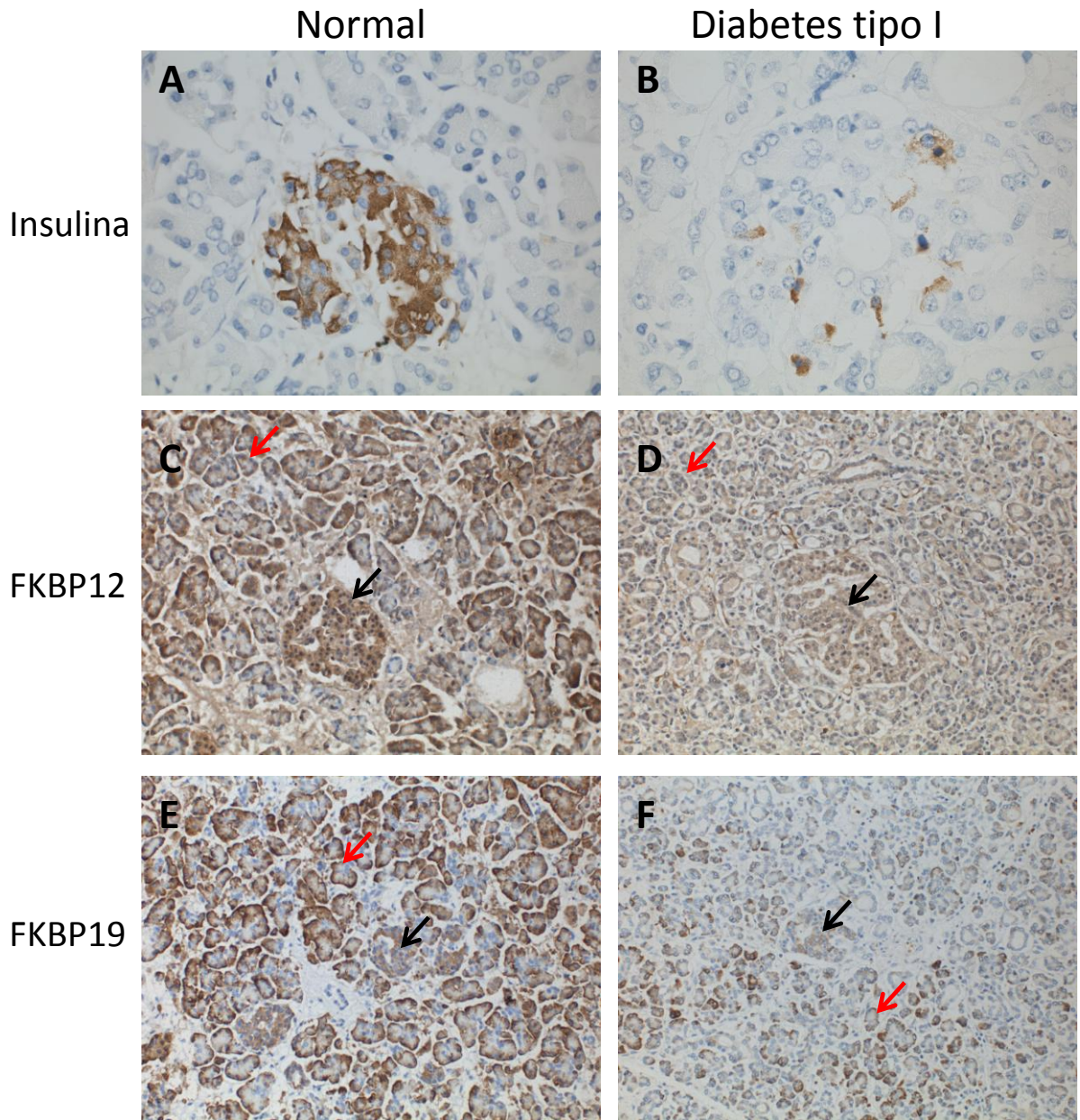


Figura 14. Identificación de FKBP12 y FKBP19 (FKBP11) en páncreas humano en condición de diabetes tipo I. Mediante inmunohistoquímica se determinó la localización y expresión de inmunofilinas 12 y 19 en cortes de páncreas humano. Las figuras A, C y E representan un páncreas normal obtenido de una autopsia. B, D y F corresponden a cortes de páncreas con diabetes tipo I obtenidos también de una autopsia. Se detectó los niveles de insulina como control de diabetes. A y B tienen un aumento de 63X, C, D, E y F tienen un aumento de 20X. Las flechas negras indican los islotes de Langerhans, las rojas los acinos pancreáticos. Esta figura es representativa de 1 experimento.

5. DISCUSIÓN

A la fecha, nuestro laboratorio cuenta con importantes aportes que brindan evidencia de un efecto adicional del fármaco inmunosupresor Tacrolimus (FK506) que conlleva al bloqueo de la secreción proteica, demostrado hasta ahora en Interleuquina 2 (IL-2) e insulina. Insulina es el mayor producto secretado por las células β de los islotes de Langerhans, se sugiere que el bloqueo en la secreción por FK506 en estas células podría desencadenar diabetes como uno de los efectos secundarios más comunes de este inmunosupresor.

De acuerdo al análisis realizado en la línea celular INS-1E se presentaron resultados similares a los obtenidos en trabajos previos de nuestro laboratorio con la línea β -pancreática de ratón MIN6 y de linfocitos T (Jurkat j77) (Rauch et al., 2009), donde se demostró por primera vez que Tacrolimus además de inhibir la expresión de IL-2 e insulina es capaz también de bloquear su secreción al medio extracelular, ya que el análisis de células MIN6 y Jurkat tratadas con Tacrolimus mostró niveles intracelulares de insulina e IL-2 (respectivamente) superiores a las no tratadas (Rauch et al., 2009). La estrategia utilizada en Rauch et al. (2009) puso en manifiesto el efecto de FK506 sobre la secreción de proteínas. Al estimular células Jurkat con PMA 1 hora previa al tratamiento con FK506 se aseguró la síntesis de IL-2. De otro modo este efecto sería enmascarado por el clásico mecanismo de FK506 al inhibir la producción de ARN mensajero de IL-2. Otro aspecto que cabe destacar es el uso de tiempos cortos de incubación. Frecuentemente los estudios con Tacrolimus (FK506) abarcan periodos de 48 horas para la medición de IL-2 (Kahan, 1987) o sobre 8 horas para

insulina (Redmon et al., 1996; Oetjen et al., 2003; Øzbay et al., 2011) que favorecen la degradación de proteínas de corta vida media y/o la represión transcripcional ejercida por el fármaco, impidiendo su detección. Precisamente, el tratamiento de células INS-1E con Tacrolimus por 4 horas no mostró cambios significativos en la expresión génica de Insulina que pudieran sugerir una inhibición en la transcripción del mRNA de esta hormona a tiempos cortos (Øzbay et al., 2011).

Ahora a nivel proteico, el tratamiento de la línea celular β pancreática de rata INS-1E con el fármaco inmunosupresor FK506 en condiciones de activa secreción (4,5 g/L de glucosa) mostró un bloqueo en la liberación de insulina. El análisis por Western blot muestra que la proteína detectada es cercana a los 12 kDa, lo que corresponde a una forma inmadura de la insulina (proinsulina). La insulina madura tiene un tamaño aproximado de 5 kDa y se encuentra constituida por dos cadenas (alfa y beta) unidas por puentes disulfuro (Sanger, 1949; Ryle et al., 1955). El pequeño tamaño de esta proteína hace muy dificultoso su detección por el método de Western blot, sobre todo al realizarse en condiciones desnaturantes. Por ende, para el análisis de Western Blot sólo se pueden hacer estimaciones indirectas del efecto de esta droga sobre la liberación de insulina, basándonos en la acumulación del contenido de la proteína sin procesar (proinsulina) localizada al interior de la célula. Al igual que con las células MIN6 (Rauch et al., 2009), se incubó con Tacrolimus en un período de 4 horas donde se confirmó el bloqueo en la secreción de insulina representado por un aumento aproximado de un 30% de esta proteína respecto a células no tratadas. Sin embargo, el efecto de FK506 en esta condición sólo resulta en la mitad del alcanzado con Brefeldina A, estas diferencias en la magnitud de la inhibición de la secreción de insulina pueden

explicarse por un efecto más potente de esta droga al deslocalizar el aparato de Golgi (Klausner et al., 1992), resultando en un bloqueo más drástico de la secreción proteica.

Las inmunofilinas cuentan con actividad peptidil-prolilisomerasa, una característica de suma importancia para el plegamiento correcto de las proteínas dentro de la célula. La capacidad de catalizar la isomerización de residuos de prolina entre configuraciones cis y trans confiere a las FKBP un papel vital en el plegamiento de proteínas (Schiene y Fischer, 2000). Más aún, existen muchos ejemplos de inmunofilinas funcionando como chaperonas, en mamíferos FKBP52 quien se une a Hsp90 mediante sus dominios TPR (Silverstein et al., 1999; Galigniana et al., 2002; Galat, 2003), FKBP25 quien se asocia con la proteína caseína quinasa II y nucleolina (Jin y Burakoff, 1993) y FKBP38 quien ayuda a la proteína anti-apoptótica Bcl-2 a localizar en la membrana mitocondrial protegiéndola de degradación (Kang et al., 2005a; Kang et al., 2005b). La actividad chaperona de las inmunofilinas no es inhibida por FK506, sugiriendo que ésta es independiente de la actividad PPIasa. Por este motivo la participación de las FKBP se torna fundamental en el correcto desarrollo de células de activa secreción proteica, como es el caso de células pancreáticas. El tratamiento de células beta pancreáticas con FK506 sugiere una acumulación de la hormona insulina al interior de la célula, por tanto, el objetivo de este trabajo se enmarca en el análisis de la expresión de las FKBP 12 y 19 (FKBP11) bajo el tratamiento con este inmunosupresor. Como se esperaba, se detectó un aumento en los niveles intracelulares de al menos una de estas proteínas. El análisis densitométrico por Western blot muestra un aumento aproximado de un 20% de FKBP12, sin embargo se aprecia un descenso en los niveles de FKBP19 (FKBP11) de alrededor de un 25%.

El aumento de FKBP12 podría sugerir una respuesta de esta inmunofilina respecto a la acumulación de insulina u otras proteínas producto de la acción de Tacrolimus dado que también se aprecia un aumento de esta FKBP al ser tratada con Brefeldina A que bloquea la vía secretoria de proteínas. El efecto de ambas drogas se hace evidente exclusivamente cuando la célula se encuentra en activa secreción al ser estimulada con alta concentración de glucosa (4,5 g/L). Además, esta condición parece favorecer la permanencia de FKBP12 al interior de la célula dado que la biosíntesis de proteínas se ve incrementada, por consiguiente, la mayor disponibilidad de esta inmunofilina podría estar favoreciendo un efecto más potente de Tacrolimus al aumentar la interacción ligando-receptor. Sin embargo, no se apreció un efecto de ambas drogas sobre la liberación de FKBP12 al medio extracelular como podría haberse esperado. En la literatura son escasos los antecedentes que notifiquen un rol de FKBP12 (una proteína citosólica) fuera de la célula (Bang et al., 1995; Walensky et al., 1998; Aström-Olsson et al., 2009), y menos aún para FKBP19 (FKBP11) que no fue detectada en la fracción extracelular.

El incremento en los niveles proteicos de FKBP12 fue más notorio bajo el tratamiento con BFA (40%) respecto a FK506 (20%). Si bien aún no se tiene certeza del mecanismo de acción alternativo de este fármaco inmunosupresor, claramente se puede comparar con la acción de BFA. Brefeldina A afecta de manera reversible la organización del aparato de Golgi (Klausner et al., 1992) causando un bloqueo general de la vía secretoria. Bajo este punto de vista, el menor incremento de FKBP12 con Tacrolimus respecto al efecto observado con BFA, sería indicativo de que existe un bloqueo parcial de la vía secretoria, y no tan amplio como el que ejerce BFA. FK506

podría afectar vías o proteínas específicas, o bien ejercer un efecto menos potente. Existen antecedentes de la participación de FKBP12 en la vía secretoria, donde esta inmunofilina interactúa con la GTPasa H-Ras y regula el tráfico Golgi-membrana plasmática, y más aún, FK506 inhibe el tráfico retrógrado mediado por H-Ras (Ahearn et al., 2011). Dentro de la vía secretoria en el Golgi, los factores intercambiadores de GTP (GEFs) son piezas clave. Interesantemente existen reportes que muestran la interacción de GEFs con inmunofilinas. FKBP13 es una inmunofilina secretoria que interactúa con el GEF BIG1 (Padilla et al., 2003), posiblemente influenciando la actividad ARF y el tráfico vesicular. Además resulta sugerente la existencia del dominio DCB descrito para la unión de ciclofilinas (Grebe et al., 2000). La asociación de DCB con otro dominio conservado denominado HUS influye sobre la dimerización de GBF1 y BIG y la unión con proteínas en su región N-terminal (Ramaen et al., 2007) como la mencionada FKBP13 y la chaperona Hsc70 (Ishizaki et al., 2006). En este trabajo se intentó detectar mediante inmunofluorescencia si FKBP12 era capaz de interactuar con el GEF GBF1, no obstante, los resultados sugieren que estas dos proteínas no co-localizan en ningún compartimento de la célula. Por otra parte al analizar individualmente FKBP12 y GBF1 se hacen hallazgos interesantes. Primero, se observa un leve aumento de FKBP12 en los tratamientos con glucosa 4,5 g/L (mayor biosíntesis de proteínas) y BFA (acumulación de proteínas), lo que claramente se explicaría por el rol como chaperona de esta inmunofilina. Inesperadamente la señal de FKBP12 disminuye drásticamente en las muestras tratadas con Tacrolimus, contraponiéndose con los resultados obtenidos mediante Western blot. Esto podría explicarse por la presencia de la molécula de FK506 aún unido a su blanco FKBP12 en las células

fijadas, dificultando la unión de la IgG anti-FKBP12 y haciendo decaer la eficiencia de la inmunodetección. En el caso de GBF1, se puede apreciar cómo la localización de esta proteína es afectada dramáticamente bajo el tratamiento con BFA, tal como se ha descrito previamente (Claude et al., 1999; Niu et al., 2005). Lo interesante es que en las células tratadas con Tacrolimus, GBF1 mostró una localización similar a la observada bajo el tratamiento con BFA, aunque mucho menos intenso. Si bien la acumulación de GBF1 en el Golgi no fue tan evidente, se puede apreciar un aumento de la señal en la región periférica, sugiriendo la retención de GBF1 en otras membranas donde localiza, un efecto descrito para BFA (Niu et al., 2005). Estos resultados dan luces de algún eventual efecto (directo o indirecto) de FK506 sobre GBF1, una proteína de mucha importancia en la secreción proteica. Sin duda aportan a la búsqueda de nuevos blancos de investigación referentes a la acción de este fármaco, y por cierto dan soporte a los hallazgos de nuestro laboratorio que relacionan FK506 con la vía secretoria. Sin embargo, se requiere investigación adicional que pudiera sugerir un eventual bloqueo de la vía secretoria producto de la acción de FK506 sobre la actividad GEF mediado por inmunofilinas.

A pesar de los antecedentes expuestos para FKBP19 que sugerían un rol crítico en la secreción de proteínas en células pancreáticas, los resultados no guardan relación con la hipótesis de esta investigación. Más aún, se aprecia un descenso de los niveles, a nivel transcripcional y proteico de esta inmunofilina, tanto para el tratamiento con FK506 como para BFA. Por otra parte, cabe destacar que no existen antecedentes que describan la actividad PPIasa en FKBP19 (FKBP11), sólo se ha hecho mención de una región putativa para este dominio catalítico que guarda una identidad aminoacídica de

un 38% con FKBP12 (Rulten et al., 2006), esta última clásicamente descrita con actividad peptidil prolil isomerasa (Harding et al., 1989, Siekierka et al., 1989b). Si bien los resultados de FKBP19 (FKBP11) distan de los de FKBP12, no se puede descartar una participación de esta inmunofilina en la vía secretoria o el plegamiento de proteínas en células β pancreáticas. Los antecedentes demostrados por Rulten et al. (2006) dan cuenta de una inmunofilina particular, expresada sólo en eucariontes y con las características típicas de una inmunofilina secretoria pero no localizada en el RE. Un aspecto relevante del análisis mediante inmunodetección de FKBP19 (FKBP11) en este modelo de estudio fue la aparición de un doblete de FKBP19 precisamente cuando las células INS-1E fueron tratadas con BFA y en menor medida con Tacrolimus. De acuerdo a lo establecido por Rulten et al. (2006), podría corresponder a una forma inmadura donde no fue escindido un fragmento de 3 kDa en la región N-terminal. Desde esta perspectiva, los datos muestran que Brefeldina A y Tacrolimus afectarían la maduración de esta proteína, aportando nuevos antecedentes del efecto de este fármaco inmunosupresor sobre la vía secretoria. Sin embargo queda por establecer si la forma de “3 kDa más” carece de actividad en la célula, de ser así, Brefeldina A y Tacrolimus podrían estar alterando alguna vía crucial de la secreción de proteínas al disminuir los niveles de FKBP19 (FKBP11) y/o favorecer una forma inactiva de esta inmunofilina.

Por otra parte, el análisis de expresión de inmunofilinas en cortes histológicos de páncreas muestra un incremento de ambas FKBP's en condición de diabetes inducida con Estreptozotocina (STZ). A modo de establecer una comparación del efecto sobre células beta entre esta enfermedad y el tratamiento con Tacrolimus, los resultados

muestran que los niveles de FKBP12 aumentan en ambos casos, aportando nuevos antecedentes que permitan conectar a este fármaco inmunosupresor y la diabetes. Del mismo modo que sucede con Tacrolimus en células INS-1E, el aumento de esta inmunofilina citosólica podría deberse a un incremento de proteínas mal plegadas al interior de las células beta del páncreas. En efecto, diabetes tipo 2 es una enfermedad que se ha asociado a la formación de agregados de proteínas. Los trastornos metabólicos típicos de esta enfermedad contribuyen a un estado de estrés oxidativo, que junto con un incremento en la producción de insulina favorecen la aparición de estrés en el retículo endoplasmático y proteínas mal plegadas (Hayden et al., 2005). El tratamiento gradual con STZ guarda cierta relación con diabetes tipo 2 (Srinivasan et al., 2005; Gilbert et al., 2011) pues las células β al verse disminuidas compensan produciendo más insulina. Precisamente, el aumento de FKBP en páncreas diabético inducido con STZ fue más evidente a 4 meses que a 8 meses de tratamiento. Lo que podría sugerir que la participación de FKBP se presenta a tiempos cortos del tratamiento con STZ, donde aún hay cantidades considerables de insulina. Además el estrés oxidativo producto del tratamiento con STZ (Lenzen., 2008) representa otra aproximación para las condiciones de esta enfermedad.

Asimismo, en diabetes tipo 2 (predominante en el tratamiento con Tacrolimus) se activan mecanismos para minimizar la agregación de proteínas tales como, el aumento en la expresión de chaperonas del RE como BiP, GRP78 y GRP94 (Oyadomari et al., 2002; Araki et al., 2003), y la degradación de proteínas mal plegadas en el RE (endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD) (Oyadomari et al., 2002), donde son transportadas del Retículo endoplásmico al citosol para su

degradación en el proteosoma, incluso mediante autofagia (Kaniuk et al., 2007). Interesantemente, FKBP19 (FKBP11) es una inmunofilina que se ve incrementada en la condición de diabetes tipo 2 junto con otras proteínas de actividad chaperona en los islotes pancreáticos (Lu et al., 2008). Estos antecedentes guardan relación con los resultados obtenidos al inmunodetectar FKBP19 (FKBP11) en cortes histológicos de ratas diabéticas inducidas con STZ, sin embargo, no se tiene certeza si el incremento de FKBP19 (FKBP11) en la porción acinar guarda relación con el desarrollo de diabetes, ni menos si existe acumulación de proteínas mal plegadas en esta región. Sin embargo, existe evidencia que muestra que la diabetes inducida por STZ puede afectar la secreción de enzimas en los acinos pancreáticos al disminuir los niveles de Ca^{+2} producto del bajo metabolismo de glucosa, el estrés oxidativo típico de la condición de diabetes y la disminución de NADPH que controla el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Han y Liu, 2010). Si bien FKBP19 (FKBP11) experimenta un incremento a nivel de páncreas diabético inducido con STZ, aportando evidencia de su actividad en el plegamiento proteico, no ocurre lo mismo en células INS-1E o Jurkat tratadas con FK506 o BFA. Esto podría explicarse por las diferentes condiciones de cada muestra: el tejido fue extraído desde un contexto fisiológico donde existe una amplia variedad de factores que afectarían positiva o negativamente la expresión de esta inmunofilina, mientras que en las líneas en cultivo el medio de crecimiento es mucho más restrictivo. Además los tiempos empleados en cada modelo experimental difieren sustancialmente. Si bien, el estudio de FKBP19 (FKBP11) no se pudo correlacionar completamente en ambos modelos (páncreas de rata y células INS-1E), se respalda el rol importante de esta inmunofilina en células β -pancreáticas. Se requiere

un estudio más completo que abarque la detección de esta proteína a distintos tiempos para dilucidar la relevancia de FKBP19 en células β .

Diabetes tipo 1 también es una enfermedad asociada a proteínas mal plegadas, se ha relacionado la apoptosis de células beta con el estrés en el RE (Oyadomari et al, 2002). Sin embargo la respuesta de chaperonas para prevenir la agregación de proteínas sólo se observa en fases tempranas de diabetes. En fases avanzadas, la expresión de chaperonas disminuye (Yamagishi et al, 2001; Wang et al., 2009), y la síntesis de insulina es nula (por ende su agregación) dada la destrucción masiva de células β . El análisis de expresión de inmunofilinas sobre cortes histológicos de páncreas en condición de Diabetes tipo 1 no muestra un aumento de ninguna de estas FKBP como era de esperarse dada la progresión y tiempo prolongado de la enfermedad. Sin embargo, es necesario validar estos argumentos demostrando que el incremento de las FKBP en diabetes inducida con STZ en el modelo de rata sea debido a la presencia de proteínas mal plegadas por ejemplo, con marcadores específicos de estrés del RE o mediante el empleo de modelos establecidos de diabetes tipo 2.

En resumen, los datos analizados en esta investigación muestran un incremento en la expresión de FKBP12 en la línea celular beta pancreática INS-1E al ser tratada con dosis terapéuticas de Tacrolimus. Este trabajo sugiere que el aumento de proteínas mal plegadas consecuencia de un efecto no deseado de Tacrolimus, del bloqueo generalizado de la secreción proteica por Brefeldina A o bien de la condición de diabetes, es el que promueve la biosíntesis de esta chaperona con actividad PPIasa. Más aún esta tendencia se aprecia en la línea celular de linfocitos T Jurkat, cuya

respuesta al inmunosupresor FK506 ha sido ampliamente descrita, afectando dramáticamente la liberación de IL-2 y limitando la respuesta inmunológica. Más aún los resultados muestran que la biosíntesis de estas PPlasas se ven influenciadas también por la estimulación con PMA en estas células, probablemente por la síntesis de nuevas proteínas. En definitiva, la acción de Tacrolimus sobre las líneas celulares en estudio fue capaz de alterar la expresión y distribución de factores relacionados con la secreción de proteínas, aportando nuevos antecedentes del efecto de este fármaco inmunosupresor sobre la vía secretoria.

6. REFERENCIAS

Ahearn IM, Tsai FD, Court H, Zhou M, Jennings BC, Ahmed M, Fehrenbacher N, Linder ME, Philips MR. (2011). FKBP12 binds to acylated H-ras and promotes depalmitoylation. *Mol. Cell.*, 41, 173-185.

Altman A, Mustelin T, Coggeshall KM. (1990). T lymphocyte activation: a biological model of signal transduction. *Crit Rev Immunol.*, 10, 347-391.

Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H. P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.*, 119, 2173–2183.

Arakawa H, Nagase H, Hayashi N, Fujiwara T, Ogawa M, et al. (1994). Molecular cloning and expression of a novel human gene that is highly homologous to human FK506-binding protein 12kDa (hFKBP-12) and characterization of two alternatively spliced transcripts. *Biochem Biophys Res Commun.*, 200, 836-843.

Araki E, Oyadomari S, Mori M. (2003). Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med*, 42, 7-14.

Aström-Olsson K, Karlsson L, Mattsson Hultén L, Davidsson P, Mantovani V, Månsson C, Olofsson SO, Wiklund O, Grip L. (2009). Myocardial release of FKBP12 and

increased production of FKBP12.6 in ischemia and reperfusion experimental models. *Biochem Biophys Res Commun.*, 390, 1299-1304.

Baier-Bitterlich G, Uberall F, Bauer B, Fresser F, Wachter H, Grunicke H, Utermann G, Altman A, Baier G. (1996). Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol.*, 16, 1842-1850.

Bang H, Müller W, Hans M, Brune K, Swandulla D. (1995). Activation of Ca²⁺ signaling in neutrophils by the mast cell-released immunophilin FKBP12. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92, 3435-3438.

Bennett, W.M., DeMattos, A., Meyer, M.M., Andoh, T., Barry, J.M. (1996). Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int.*, 50, 1089–1100.

Bierer, B. E., Mattila, P. S., Standaert, R. F., Herzenberg, L. A., Burakoff, S. J., Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. (1990). Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 9231-9235.

Brecht S, Schwarze K, Waetzig V, Christner C, Heiland S, Fischer G, Sartor K, Herdegen T. (2003). Changes in peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity and FK506

binding protein expression following neuroprotection by FK506 in the ischemic rat brain. *Neuroscience*, 120, 1037–1048.

Brillantes, A. M., Ondrias, K, Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasova, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., and Marks, A. R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77, 513-523.

Bush KT, Hendrickson BA, Nigam SK. (1994). Induction of the FK506-binding protein, FKBP13, under conditions which misfold proteins in the endoplasmic reticulum. *Biochem J.*, 303, 705-708.

Chen Z, Li Z, Wei B, Yin W, Xu T, Kotlikoff MI, Ji G. (2010). FKBP12.6-knockout mice display hyperinsulinemia and resistance to high-fat diet-induced hyperglycemia. *FASEB J.*, 24, 357-363.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162, 156-159.

Claude, A., B.P. Zhao, C.E. Kuziemy, S. Dahan, S.J. Berger, J.P. Yan, A.D. Arnold, E.M. Sullivan and P. Melancon. (1999). GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol.*, 146, 71-84.

Clipstone N and Crabtree GR. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 357, 695–697.

Collins, J.H. (1991). Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178, 1288-1290.

Davis, E.C., Broekelmann, T.J., Ozawa, Y., and Mecham, R.P. (1998). Identification of tropoelastin as a ligand for the 65-kD FK506-binding protein, FKBP65, in the secretory pathway. *J. Cell Biol.*, 140, 295–303.

Dean, N., and Pelham, H.R.B. (1990). Recycling of proteins from the Golgi compartment to the ER in yeast. *J. Cell Biol.*, 111, 369–377.

Docherty K and Clark AR. (1994). Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J.*, 8, 20–27.

Donaldson, J.G., D. Finazzi, and R.D. Klausner. (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane catalyzed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, 360, 350-352.

Donaldson, J.G. and C.L. Jackson.(2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases.*Curr Opin Cell Biol.*, 12, 475-482.

Drachenberg CB., Klassen DK., Weir MR., Wiland A., Fink JC., Bartlett ST., Cangro CB., Blahut S., Papadimitriou JC. (1999). Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation*, 68, 396-402.

Elliott, J. F., Lin,Y., Mizel, S. B., Bleackley, R. C., Harnish, D. G., and Paetkau, V. (1984). Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. *Science*, 226, 1439-1441.

Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337, 476–478.

Fromme, J. C., and Schekman, R. (2005). COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo? *Curr.Opin.Cell Biol.*, 17, 345–352.

Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E. and Burakoff, S. J. (1992). Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 3686-3690.

Galat A. (2003). Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity–targets–functions. *Curr Top Med Chem.*, 3, 1315–1347.

Galigniana, M. D., Harrell, J. M., Murphy, P. J., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J. M. (2002). Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry*, 41, 13602–13610.

Gerard M, Deleersnijder A, Daniëls V, Schreurs S, Munck S, Reumers V, Pottel H, Engelborghs Y, Van den Haute C, Taymans JM, Debyser Z, Baekelandt V. (2010). Inhibition of FK506 binding proteins reduces alpha-synuclein aggregation and Parkinson's disease-like pathology. *J Neurosci.*, 30, 2454-2463.

German MS, Moss LG, and Rutter WJ.(1990). Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures.*J Biol Chem.*, 265, 22063–22066.

Gilbert, E.R., Fu, Z. and Liu, D. (2011). Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. *Exp. Diabetes Res.*, 2011:416254. doi: 10.1155/2011/416254.

Gillis, S., M. M. Ferm, W. Ou, and K. A. Smith. (1978). T-cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, 120, 2027-2032.

Glick BS, Malhotra V. (1998). The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*, 95, 883–889.

Grebe, M., Gadea, J., Steinmann, T., Kientz, M., Rahfeld, J. U., Salchert, K., Koncz, C., and Jurgens, G. (2000). A conserved domain of the arabidopsis GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding. *Plant Cell*, 12, 343–356.

Han J, Liu YQ. (2010). Suppressed glucose metabolism in acinar cells might contribute to the development of exocrine pancreatic insufficiency in streptozotocin-induced diabetic mice. *Metabolism*, 59, 1257-1267.

Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 226, 544-547.

Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., and Schreiber, S.L. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, 341, 758–760.

Harrison, R. K., Stein, R. L. (1990). Substrate specificities of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein. Evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, 29, 3813- 3816.

Hayden MR, Tyagi SC, Kerklo MM, Nicolls MR. (2005). Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease. *JOP.*, 6, 287-302.

Henquin JC. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49, 1751–1760.

Hoitsma, A.J. and Hilbrands, L.B. (2006). Relative risk of new-onset diabetes during the first year after renal transplantation in patients receiving tacrolimus or cyclosporine immunosuppression. *Clin. Transpl.*, 20, 659-664.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.*, 29, 577-580.

Ishikawa K, Nagase T, Suyama M, Miyajima N, Tanaka A, et al. (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res.*, 5, 169-176.

Ishizaki, R., Shin, H. W., Iguchi-Arigo, S. M., Arigo, H., and Nakayama, K. (2006). AMY-1 (associate of Myc-1) localization to the trans-Golgi network through interacting with BIG2, a guanine-nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors. *Genes Cells*, 11, 949–959.

Ishizuka J, Gugliuzza KK, Wassmuth Z, Hsieh J, Sato K, Tsuchiya T, Townsend CM Jr, Fish JC, Thompson JC. (1993). Effects of FK506 and cyclosporine on dynamic insulin secretion from isolated dog pancreatic islets. *Transplantation*, 56, 1486-1490.

Jackson, C.L. and Casanova, J.E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide exchange factors. *Trends Cell Biol.*, 10, 60-67.

Jain A, Brody D, Hamad I, Rishi N, Kanal E, Fung J. (2000). Conversion to Neoral for neurotoxicity after primary adult liver transplantation under tacrolimus. *Transplantation*, 1, 172-176.

Janjic D, Maechler P, Sekine N, Bartley C, Annen AS, Wolheim CB. (1999). Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. *Biochem Pharmacol.*, 57, 639–648.

Ji, G., Feldman, M. E., Greene, K. S., Sorrentino, V., Xin, H.-B., and Kotlikoff, M. I. (2004). RYR2 proteins contribute to the formation of Ca²⁺ sparks in smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 123, 377–386.

Jin, Y.-J., Albers, M. W., Lane, W. S., Bierer, B. E., Schreiber, S. L., and Burakoff, S. J. (1991). Molecular cloning of a membrane-associated human FK506- and rapamycin-binding protein, FKBP-13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 6677-6681

Jin YJ, Burakoff SJ, Bierer BE. (1992). Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25. *J Biol Chem.*, 267, 10942-10945.

Jin, Y.J., and Burakoff, S.J. (1993). The 25-kDa FK506-binding protein is localized in the nucleus and associates with casein kinase II and nucleolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 7769–7773.

Kahan BD. (1987). Immunosuppressive therapy. *Tex. Heart. Inst. J.*, 14, 351-358.

Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, Brumell JH. (2007). Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes*, 56, 930-939.

Kang CB, Feng L, Chia J, Yoon HS. (2005a). Molecular characterization of FK-506 binding protein 38 and its potential regulatory role on the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 30–38.

Kang CB, Tai J, Chia J, Yoon HS. (2005b). The flexible loop of bcl-2 is required for molecular interaction with immunosuppressant FK-506-binding protein 38 (FKBP38). *FEBS Lett*, 579, 1469–1476.

Kang CB, Hong Y, Dhe-Paganon S, Yoon HS. (2008). FKBP Family Proteins: Immunophilins with Versatile Biological Functions. *Neurosignals*, 16, 318-325.

Kawamoto K, Yoshida Y, Tamaki H, Torii S, Shinotsuka C, Yamashina S, Nakayama K.(2002). GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADPribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic*, 3, 483–495.

Klausner, R.D., J.G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol.*, 116, 1071-1080.

Kuzhandaivelu N, Cong YS, Inouye C, Yang WM, Seto E. (1996). XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res.*, 24, 4741-4750.

Lam, E., Martin, M.M., Timerman, A.P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukas, T., Abraham, R.T., O'Keefe, S.J., O'Neill, E.A., and Wiederrecht, G.J. (1995a). A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, 270, 26511–26522.

Lam E, Martin M, Wiederrecht G. (1995b). Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs. *Gene*, 160, 297-302.

Lawrence MC, Bhatt HS, Watterson JM, and Easom RA. (2001). Regulation of insulin gene transcription by a Ca(2+)-responsive pathway involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells. *Mol Endocrinol.*, 15, 1758–1767.

Leibiger, B., Moede, T., Schwarz, T., Brown, G. R., Köhler, M., Leibiger, I. B., and Berggren, P. O. (1998). Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 9307–9312.

Leibiger B, Wahlander K, Berggren PO, Leibiger IB. (2000). Glucose-stimulated Insulin Biosynthesis Depends on Insulin-stimulated Insulin Gene Transcription. *J. Biol. Chem.*, 275, 30153-30156.

Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51, 216-226.

Levine T, Rabouille C. (2005). Endoplasmic reticulum: One continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Curr Opin Cell Biol.*, 17, 362–368.

Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66, 807-815

Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J., and Glick, B. S. (2006). Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature*, 441, 1002–1006.

Lu H, Yang Y, Allister EM, Wijesekara N, Wheeler MB. (2008). The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics.*, 7, 1434-1451.

Lyons WE, Steiner JP, Snyder SH, Dawson TM. (1995). Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP-12. *J Neurosci.*, 15, 2985–2994.

Maino VC, Green NM, Crumpton MJ. (1974). The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. *Nature*, 251, 324-327.

Maki N, Sekiguchi F, Nishimaki J, Miwa K, Hayano T, Takahashi N, Suzuki M. (1990). Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidylprolyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87, 5440-5443.

Mansour, S.J., J. Skaug, X-H.Zhao, J., Giordano, S.W. Scherer, and P. Melancon. (1999). p200 ARF-GEP1: A Golgi-localized guanine nucleotide exchange factor whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96, 7968-7973.

Meng X, Lu X, Morris CA, Keating MT. (1998). A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. *Genomics*, 52, 130-137.

Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*, 145, 667-678.

Meuer SC, Hussey RE, Cantrell DA, Hodgdon JC, Schlossman SF, Smith KA, Reinherz EL. (1984). Triggering of the T3-Ti antigen receptor complex results in clonal T cell proliferation via an interleukin 2 dependent autocrine pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1509-1513.

Misumi, Y., Y. Misumi, K. Miki, A. Takatsuki, G. Tamura, and Y. Ikehara.(1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.*, 261, 11398-11403.

Moretta A, Pantaleo G, Lopez-Botet M, Moretta L. (1985). Selection and characterization of monoclonal antibodies to the idiotype-like structure of an interleukin-2-producing human leukemia T-cell line. *Int. J. Cancer*, 36, 253-259.

Mouratou B, Biou V, Joubert A, Cohen J, Shields DJ, Geldner N, Jürgens G, Melançon P, Cherfils J. (2005). The domain architecture of large guanine nucleotide exchange

factors for the small GTP-binding protein Arf. *BMC Genomics*, 6:20 doi:10.1186/1471-2164-6-20

Munro S, Pelham HR. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48, 899-907.

Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. (1984). Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, 311 699–705.

Nair SC, Rimerman RA, Toran EJ, Chen S, Prapapanich V, et al. (1997). Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. *Mol Cell Biol.*, 17, 594-603.

Nakamura T, Yabe D, Kanazawa N, Tashiro K, Sasayama S, Honjo T. (1998). Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of FKBP23, a novel FK506-binding protein with Ca²⁺-binding ability. *Genomics*, 54, 89-98.

Nishizuka Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308, 693-698.

Nishizuka Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, 9, 484-496.

Niu TK, Pfeifer AC, Lippincott-Schwartz J, Jackson CL. (2005). Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell*, 16, 1213-1222.

Noguchi, N., Yoshikawa, T., Ikeda, T., Takahashi, I., Shervani, N. J., Uruno, A., Yamauchi, A., Nata, K., Takasawa, S., Okamoto, H., and Sugawara, A. (2008). FKBP12.6 disruption impairs glucose-induced insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371, 735–740.

Oetjen E, Baun D, Beimesche S, Krause D, Cierny I, Blume R, Dickel C, Wehner S, Knepel W. (2003). Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus in primary, mature islets of transgenic mice. *Mol Pharmacol.*, 63, 1289-1295.

Oyadomari S, Araki E, Mori M. (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*, 7, 335-345.

Ozbay LA, Smidt K, Mortensen DM, Carstens J, Jørgensen KA, Rungby J. (2011). Cyclosporin and tacrolimus impair insulin secretion and transcriptional regulation in INS-1E beta-cells. *Br J Pharmacol.*, 162, 136-146.

Padilla PI., Chang MJ., Pacheco-Rodriguez G., Adamik R., Moss J., Vaughan M. (2003). Interaction of FK506-binding protein 13 with brefeldin A-inhibited guanine nucleotide

exchange protein 1 (BIG1): effects of FK506. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100, 2322-2327.

Patterson CE, Gao J, Rooney AP, Davis EC. (2002). Genomic organization of mouse and human 65 kDa FK506-binding protein genes and evolution of the FKBP multigene family. *Genomics*, 79, 881-889.

Patterson CE, Schaub T, Coleman EJ, Davis EC. (2000). Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Mol Biol Cell.*, 11, 3925-3935.

Paty, B.W., Harmon, J.S., Marsh, C.L. and Robertson, R.P. (2002). Inhibitory effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion from HIT-T15 cells and wistar rat islets. *Transplantation*, 73, 353-357.

Peattie DA, Harding MW, Fleming MA, DeCenzo MT, Lippke JA, Livingston DJ, Benasutti M. (1992). Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 89, 10974-10978.

Pelham, H.R. (1991). Multiple targets for brefeldin A. *Cell*, 67, 449-451.

Penforis A, Kury-Paulin S. (2006). Immunosuppressive drug-induced diabetes. *Diabetes Metab.*, 32, 539-546.

Peyroche, A., B. Antony, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils and C.L. Jackson. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell.*, 3, 275-285.

Polastri L, Galbiati F, Bertuzzi F, Fiorina P, Nano R, Gregori S, Aldrighetti L, Pozza G, Secchi A, Adorini L, and Davalli AM. (2002). Secretory defects induced by immunosuppressive agents on human pancreatic β -cells. *Acta Diabetol.*, 39, 229–233.

Radu, R.G., Fujimoto, S., Mukai, E., Takehiro, M., Shimono, D., Nabe, K., Shimodahira, M., Kominato, R., Arakami, y., Nishi, Y., Funakoshi, S., Yamada, Y. and Seino, Y. (2005). Tacrolimus suppresses glucose-induced insulin release from pancreatic islets by reducing glucokinase activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 288, 365-371.

Ramaen O, Joubert A, Simister P, Belgareh-Touzé N, Olivares-Sanchez MC, Zeeh JC, Chantalat S, Golinelli-Cohen MP, Jackson CL, Biou V, Cherfils J. (2007). Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem.*, 282, 28834-28842.

Randazzo, P. A., Yang, Y. C., Rulka, C. & Kahn, R. A. (1993). Activation of ADP-ribosylation Factor by Golgi Membranes. *J. Biol. Chem.*, 268, 9555–9563.

Rauch MC, San Martin A, Ojeda D, Quezada C, Salas M, Carcamo JG, Yañez AJ, Slebe JC, Claude A. (2009). Tacrolimus causes a blockage of protein secretion which reinforces its immunosuppressive activity and also explains some of its toxic side-effects. *Transpl Immunol.*, 22, 72–81.

Redmon JB, Olson LK, Armstrong MB, Greene MJ, and Robertson RP.(1996). Effects of tacrolimus (FK-506) on human insulin gene expression, insulin mRNA levels, and insulin secretion in HIT-T15 cells. *J Clin Invest.*, 98, 2786–2793.

Reem, G. H., Cook, L. A., and Viltek, J. (1983). Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T lymphocytes inhibited by cyclosporin A. *Science*, 221, 63-65.

Renault, L., Christova, P., Guibert, B., Pasqualato, S. and Cherfils, J. (2002). Mechanism of domain closure of Sec7 domains and role in BFA sensitivity. *Biochemistry*, 41, 3605-3612.

Ricordi C, Zeng YJ, Alejandro R, Tzakis A, Venkataramanan R, Fung J, Bereiter D, Mintz DH, Starzl TE. (1991). In vivo effect of FK506 on human pancreatic islets. *Transplantation*, 52, 519-522.

Rothman, J.E., and L. Orci. (1996). Budding vesicles in living cells. *Sci Am.*, 274, 70-75.

Rulten SL, Kinloch RA, Tateossian H, Robinson C, Gettins L, Kay JE. (2006). The human FK506- binding proteins: characterization of human FKBP19. *Mamm Genome.*, 17, 322-331.

Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L. F., Kitai, R. (1955). The disulphide bonds of insulin. *Biochem J.*, 60, 541-556.

Sanger, F. (1949). Fractionation of oxidized insulin. *Biochem. J.*, 44, 126–128.

Sanokawa-Akakura R, Cao W, Allan K, Patel K, Ganesh A, Heiman G, Burke R, Kemp FW, Bogden JD, Camakaris J, Birge RB, Konsolaki M. (2010). Control of Alzheimer's amyloid beta toxicity by the high molecular weight immunophilin FKBP52 and copper homeostasis in *Drosophila*. *PLoS One*, 5(1):e8626. doi: 10.1371/journal.pone.0008626.

Sata, M., J.G. Donaldson, J. Moss, and M. Vaughan.(1998). Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange activity of Sec7 domain from yeast Sec7 with yeast and mammalian ADP ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95, 4204-4208.

Sawada, S., Suzuki, G., Kawase, Y. and Takaku, F. (1987). Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation. *J. Immunol.*, 139, 1797-1803.

Schiene, C., Fischer, G. (2000). Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol.*, 10, 40–45.

Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer*, 19, 621–626.

Schreiber, S. L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*, 251, 283-287.

Sewell, T., Lam, E., Martin, M., Leszyk, J., Weidner, J., Calaycay, J., Griffin, P., Williams, H., Hung, S., Cryan, J., Sigal, N., and Wiederrecht, G. (1994). Inhibition of Calcineurin by a Novel FK-506-binding Protein. *J. Biol. Chem.*, 269, 21094–21102.

Shadidy M, Caubit X, Olsen R, Seternes OM, Moens U, Krauss S. (1999). Biochemical analysis of mouse FKBP60, a novel member of the FKPB family. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1446, 295-307.

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241, 202-205.

Shin HW, Morinaga N, Noda M, Nakayama K. (2004). BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Mol. Biol. Cell.*, 15, 5283–5294.

Siekierka, J.J., Hung, S.H., Poe, M., Lin, C.S., and Sigal, N.H. (1989a). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 341, 755–757.

Siekierka, J.J., Staruch, M.J., Hung, S.H., and Sigal, N.H. (1989b). FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein, which is distinct from the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *J. Immunol.*, 143, 1580–1583.

Siekierka JJ, Wiederrecht G, Greulich H, Boulton D, Hung SH, Cryan J, Hodges PJ, Sigal NH. (1990). The cytosolic-binding protein for the immunosuppressant FK-506 is both a ubiquitous and highly conserved peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J Biol Chem.*, 265, 21011-21015.

Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Kanelakis, K. C., Radanyi, C., Renoir, J. M., Pratt, W. B. (1999). Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J Biol Chem*, 274, 36980–36986.

Smith KA, Baker PE, Gillis S, Ruscetti FW. (1980). Functional and molecular characteristics of T-cell growth factor. *Mol Immunol.*, 17, 579-589.

Snyder, S. H., Lai, M. M., Burnett, P. E. (1998). Immunophilins in the Nervous System. *Neuron*, 21, 283–294.

Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.*, 52, 313-320.

Standaert RF, Galat A, Verdine GL, Schreiber SL. (1990). Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature*, 346, 671-674.

Steiner, J.P., Dawson, T.M., Fotuhi, M., Glatt, C.E., Snowman, A.M., Cohen, N., Snyder, S.H. (1992). High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature*, 358, 584–587

Strasser S, Alejandro R, Shapiro ET, Ricordi C, Todo S, Mintz DH. (1992). Effect of FK506 on insulin secretion in normal dogs. *Metabolism*, 41, 64-67.

Straub SG, Sharp GW. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 18, 451–463.

Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 337, 473–475.

Tang, B. L., Wang, Y., Ong, Y. S., and Hong, W. (2005). COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim.Biophys. Acta.*, 1744, 293–303.

Teasdale RD, Jackson MR. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 12, 27-54.

Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, Kwok P, Dumont F, Lin S, Degudicibus S, Siekierka JJ, Chin J, Hutchinson NI. (1989). The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol.*, 143, 718–276.

Truneh A, Albert F, Golstein P, Schmitt-Verhulst AM. (1985). Early steps of lymphocyte activation bypassed by calcium ionophores and phorbol ester acting in synergy. *Nature*, 313, 318-320.

Walensky LD, Dawson TM, Steiner JP, Sabatini DM, Suarez JD, Klinefelter GR, Snyder SH. (1998). The 12 kD FK 506 binding protein FKBP12 is released in the male reproductive tract and stimulates sperm motility. *Mol. Med.*, 4, 502-514.

Wang M, Wang P, Peng JL, Wu S, Zhao XP, Li L, Shen GX. (2009). The altered expression of glucose-regulated proteins 78 in different phase of streptozotocin-affected pancreatic beta-cells. *Cell Stress Chaperones*, 14, 43-48.

Wijdicks EFM, Wiesner RH, Krom RAF. (1995). Neurotoxicity in liver transplant recipients with cyclosporin immunosuppression. *Neurology*, 45, 1962-1964.

Yamagishi N, Nakayama K, Wakatsuki T, Hatayama T. (2001). Characteristic changes of stress protein expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.*, 69, 2603-2609.

Yamaji R, Adamik R, Takeda K, Togawa A, Pacheco-Rodriguez G, Ferrans VJ, Moss J, Vaughan M. (2000). Identification and localization of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP ribosylation factors in a macromolecular complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97, 2567–2572.

Zhao, X., Lasell, T.K.R. and Melancon, P. (2002). Localization of large ADP-Ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factors to different Golgi Compartments: Evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol. Biol. Cell.*, 13, 119-133.

Zhao X, Claude A, Chun J, Shields DJ, Presley JF, Melançon P. (2006). GBF1, a cis-Golgi and VTCs-localized ARF-GEF, is implicated in ER-to-Golgi protein traffic. *J Cell Sci.*, 119, 3743-3753.