



TESI DOCTORAL

CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DELS GENS  
*Cyp4b1*, *Oatp1* i *Oatp-d*:

NOUS MODELS DE REGULACIÓ  
ANDROGÈNICA AL RONYÓ DE RATOLÍ

*Joan Isern i Marin*



2 0 0 3

TESI DOCTORAL

**CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DELS GENS *Cyp4b1*, *Oatp1* i *Oatp-d*:  
NOUS MODELS DE REGULACIÓ ANDROGÈNICA AL RONYÓ DE RATOLÍ**

Dissertació presentada per

**Joan Isern i Marin**

per tal d'optar al grau acadèmic de

DOCTOR EN BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Treball experimental realitzat al Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM)  
dels Hospitals Vall d'Hebron, sota la direcció de la

***Dra. Anna Meseguer i Navarro***

Tesi adscrita al Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular, PROGRAMA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR,  
bienni 1996-1998, de la **Universitat Autònoma de Barcelona**. Tutor: *Dr. Simó Schwartz i Riera*

*Joan Isern i Marin*

*Anna Meseguer i Navarro*

**Barcelona, Maig de 2003**

*Un hombre se propone la tarea de dibujar el mundo. A lo largo de los años puebla un espacio con imágenes de provincias, de reinos, de montañas, de bahías, de naves, de islas, de peces, de habitaciones, de instrumentos, de astros, de caballos y de personas. Poco antes de morir, descubre que ese paciente laberinto traza la imagen de su cara.*

JORGE LUIS BORGES, *El hacedor*

Índex de figures, il·lustracions i taules .....	11
Llistat d'abreviatures .....	21

**RESUM 17**

**INTRODUCCIÓ 19**

<b>1. L'aparell renal .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1</b> El sistema excretor .....	21
<b>1.2</b> El ronyó .....	21
<b>1.3</b> Estructura renal .....	21
<b>1.3.1</b> Anatomia general .....	22
<b>1.3.2</b> La nefrona .....	22
• <i>El corpuscle renal</i> .....	22
• <i>El túbul proximal</i> .....	23
• <i>La nansa de Henle</i> .....	24
• <i>Els túbuls distals i col·lectors</i> .....	25
<b>1.3.3</b> Nefrogènesi .....	25
<b>1.4</b> Aspectes funcionals .....	26
<i>Aspectes metabòlics del transport d'ions</i> .....	27
<b>2. Mecanismes moleculars d'acció de les hormones esteroidals .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b> Consideracions generals .....	28
<b>2.2</b> Regulació de l'expressió gènica per les hormones esteroidals .....	28
<b>2.3</b> La superfamília de receptors nuclears .....	29
<b>2.3.1</b> Característiques estructurals .....	30
<b>2.3.2</b> Factors d'influència en l'activitat dels receptors nuclears .....	31
<b>2.3.3</b> Interaccions amb el DNA .....	32
<b>3. Els andrògens .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b> Comentaris generals .....	34
<b>3.2</b> Bioquímica, fisiologia i respostes biològiques dels andrògens .....	34
<b>3.2.1</b> Biosíntesi .....	34
<b>3.2.2</b> Transport plasmàtic, metabolisme perifèric i excreció .....	35
• <i>La Testosterona 5<math>\alpha</math>-reductasa</i> .....	36
• <i>L'Aromatasa</i> .....	37
<b>3.2.3</b> Fisiologia dels andrògens .....	37
<b>3.2.4</b> Respostes biològiques .....	38
<b>3.3</b> L'eix hipotalàmic-hipofisari-gonadal .....	39
• <i>Funcionament integrat de l'eix</i> .....	40
<b>3.4</b> El receptor d'andrògens .....	40
<b>3.4.1</b> Estructura i funció del receptor d'andrògens .....	41
• <i>Característiques estructurals</i> .....	41
• <i>Proteïnes coreguladores del AR</i> .....	41
<b>3.4.2</b> Mecanismes d'acció i localització del AR .....	41
• <i>Discriminació en l'acció</i> .....	42
• <i>Distribució del AR</i> .....	44
• <i>Unió selectiva del receptor d'andrògens al DNA</i> .....	44
• <i>Particularitats dels elements de resposta a andrògens (AREs)</i> .....	46
• <i>Accions reguladores post-transcripcionals</i> .....	47
<b>3.5</b> Accions en els teixits reproductius i en els no reproductius .....	47
<b>3.5.1</b> Accions en les teixits gonadals .....	47
<b>3.5.2</b> Efectes en els teixits extragonadals .....	47

• Respostes a fetge .....	48
Perfils dimòrfics de secreció de GH .....	48
• Respostes androgèniques en el múscul .....	49
• Respostes androgèniques en d'altres teixits .....	49
<b>3.6 Dimorfisme sexual del ronyó: aspectes fisiològics, cel·lulars i moleculars .....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.1 El ronyó murí com a model per l'estudi de l'acció androgènica .....</b>	<b>50</b>
• Dimorfisme sexual en el creixement i mida renals.....	51
Ontogènia i influència dels andrògens neonatals .....	51
Situacions d'hipertrofia renal .....	51
• Dimorfisme sexual en el metabolisme i l'excreció	
d'anions i cations orgànics .....	54
• Hormones sexuals i hipertensió .....	55
<b>3.6.2 Gens regulats pels andrògens a ronyó .....</b>	<b>55</b>
• Identificació de nous gens amb regulació andrògena	
al ronyó de ratolí.....	57
<b>4. Els citocroms P450 .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Descripció.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2 Estructura i propietats enzimàtiques .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3 La superfamília dels P450 .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.1 Aspectes generals.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.2 Les famílies de citocroms P450 humans .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3.3 Diferències entre humans i rosegadors .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 Inducció dels P450 per esteroides i xenobiòtics .....</b>	<b>63</b>
<b>4.5 Els citocroms P450 renals .....</b>	<b>64</b>
• Aspectes generals de la capacitat metabòlica renal.....	64
• Expressió de CYPs a ronyó de ratolí .....	65
<b>4.6 La família CYP4 de mamífers .....</b>	<b>66</b>
<b>4.6.1 Els CYP4B1 individuals.....</b>	<b>67</b>
CYP4B1 de conill .....	67
CYP4B1 de rata .....	67
CYP4B1 humana.....	68
Cyp4b1 de ratolí.....	68
<b>5. Els OATP .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1 Descripció, nomenclatura i característiques generals .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2 Membres individuals en humans i rosegadors .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.1 Els Oatp's de rata .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.2 Els OATP's humans .....</b>	<b>79</b>
<b>5.2.3 Els Oatp's de ratolí.....</b>	<b>82</b>
<b>6. Aspectes cel·lulars i moleculars del transport renal de compostos orgànics.....</b>	<b>84</b>
<b>6.1 Mecanismes de secreció d'anions i cations orgànics .....</b>	<b>84</b>
<b>6.1.1 El transport renal d'anions orgànics .....</b>	<b>85</b>
• Característiques generals .....	85
<b>6.2 Model funcional del transport renal d'anions orgànics .....</b>	<b>87</b>
• Identificació de les entitats moleculars	
responsables del transport.....	87

## OBJECTIUS

89

## MATERIALS

93

<b>1. Animals i teixits.....</b>	<b>95</b>
<b>1.1. Ratolins .....</b>	<b>95</b>
<b>1.2. Rates.....</b>	<b>95</b>
<b>1.3. Granotes.....</b>	<b>95</b>

1.4. Procediments quirúrgics i tractaments hormonals .....	96
• <i>Castració</i> .....	96
• <i>Tractament amb andrògens</i> .....	96
• <i>Extracció de teixits</i> .....	96
2. Línies cel·lulars.....	97
2.1 Cèl·lules.....	97
2.2 Medis de cultiu .....	98
3. Soques Bacterianes .....	99
4. Vectors .....	100
5. Reactius químics .....	103
5. Oligonucleòtids .....	103
6. Instrumentació i aparells.....	106

## MÈTODES

109

1. Purificació d'àcids nucleïcs.....	111
1.1. Extracció de RNA total.....	111
• <i>Mètode de Chomczynski</i> .....	111
• <i>Extracció de RNA amb el kit RNeasy de QUIAGEN</i> .....	111
1.2. Extracció de poli(A) <sup>+</sup> .....	111
1.3. Purificació de DNA plasmídic.....	112
• <i>Miniprep</i> .....	112
• <i>Maxiprep</i> .....	112
1.4. Purificació de DNA .....	113
• <i>λ miniprep</i> .....	113
• <i>λ maxiprep</i> .....	113
1.5 Extracció de DNA genòmic .....	115
1.6 Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa .....	116
1.7 Purificació de productes de PCR.....	117
2. Anàlisi d'àcids nucleïcs.....	118
1.1. Electroforesi en gels d'agarosa .....	118
• <i>Preparativa</i> .....	118
• <i>Analítica</i> .....	118
2.2. Marcatge radioactiu de sondes de DNA.....	118
• <i>Marcatge terminal d'oligonucleòtids</i> .....	119
• <i>Marcatge per random priming</i> .....	120
2.3. Anàlisi de DNA.....	120
2.3.1. Southern-blot .....	120
2.3.2. PCR .....	121
2.3.3 Seqüenciació de DNA .....	122
• <i>Automàtica</i> .....	122
<i>DNA plasmídic i productes de PCR</i> .....	123
<i>DNA de fag</i> .....	123
• <i>Manual</i> .....	123
2.4. Anàlisi de RNA .....	124
2.4.1. Northern-blot.....	124
2.4.2. RT-PCR.....	125
2.4.3. 5'-RACE .....	126
2.4.4. <i>Primer extension</i> .....	128
2.4.5. Hibridació <i>in situ</i> .....	129
• <i>Tractament dels portaobjectes</i> .....	129
• <i>Preparació dels talls histològics de teixit</i> .....	130
• <i>Preparació de les sondes</i> .....	130

• <i>Hibridació</i> .....	131
<b>3. Screening de llibreries de DNA</b> .....	<b>134</b>
<b>3.1.</b> Screening d'una llibreria genòmica de ratolí.....	134
• <i>Conservació d'estocs de bacteriòfag lambda</i> .....	136
<b>3.2.</b> Screening d'una llibreria de cDNA.....	137
<b>3.3.</b> Replicació de plaques bacterianes sobre membranes.....	138
• <i>Mètodes I i II</i> .....	139
• <i>Tractament dels filtres-rèplica</i> .....	139
• <i>Hibridació i screening de filtres-rèplica</i> .....	140
• <i>Deshibridació de membranes</i> .....	141
<b>4. DNA recombinant</b> .....	<b>142</b>
<b>4.1</b> Clonatge i subclonatge de DNA .....	142
• <i>Clonatge estàndard de DNA</i> .....	142
<i>Defosforilació del vector</i> .....	142
<i>Farciment d'extrems protuberants en 5' (fill-in)</i> .....	142
<i>Lligació entre vector i l'insert</i> .....	142
• <i>Clonatge de productes de PCR</i> .....	143
<i>Preparació de l'insert</i> .....	143
<i>Lligació del vector amb l'insert</i> .....	144
<b>4.2</b> Transformació de bacteris competents .....	144
• <i>Preparació de bacteris competents per electroporar</i> .....	144
• <i>Electroporació</i> .....	145
• <i>Transformació per xoc tèrmic</i> .....	145
<b>5. Mapatge per híbrids per radiació</b> .....	<b>146</b>
<b>5.2.</b> Panel de ratolí.....	146
<b>5.3.</b> Panel de rata .....	146
<b>6. Cultius cel·lulars i transfeccions</b> .....	<b>148</b>
<b>6.1.</b> Cultius cel·lulars .....	148
• <i>Línies i medis de cultiu</i> .....	148
• <i>Tripsinització</i> .....	148
• <i>Recompte de cèl·lules</i> .....	149
• <i>Conservació de cèl·lules</i> .....	149
• <i>Descongelació de cèl·lules</i> .....	149
<b>6.2.</b> Depleció del sèrum fetal d'esteroides.....	150
<b>6.3.</b> Construcció de plasmidis reporters recombinants.....	150
<b>6.4.</b> Transfecció transitòria .....	151
• <i>Transfecció transitòria de construccions reporter</i> .....	152
<b>6.5.</b> Assaigs de gens reporters .....	153
• <i>Assaig d'activitat luciferasa</i> .....	153
• <i>Assaig d'activitat SEAP</i> .....	154
<b>7. Expressió i anàlisi funcional de proteïnes</b> .....	<b>155</b>
<b>7.1.</b> Traducció <i>in vitro</i> de cDNA's mitjançant lisats de reticulòcit .....	155
<b>7.2.</b> Expressió funcional en oòcits de <i>Xenopus laevis</i> .....	156
• <i>Síntesi in vitro de cRNA</i> .....	156
• <i>Obtenció i preparació d'oòcits per microinjectar</i> .....	157
• <i>Microinjecció de cRNA en oòcits de X. laevis</i> .....	158
• <i>Assaigs de transport</i> .....	158

## RESULTATS

161

<b>1. Cyp4b1</b> .....	<b>163</b>
<b>1.1.</b> Obtenció (i caracterització) del cDNA sencer murí de Cyp4b1 .....	163

• <i>Procés de screening</i> .....	164
<b>1.2.</b> Expressió en els teixits de ratolí .....	165
<b>1.3.</b> Regulació androgènica a ronyó .....	166
<b>1.4.</b> Distribució del mRNA de Cyp4b1 en el ronyó de ratolí .....	166
<b>1.5.</b> Clonatge genòmic i caracterització del gen.....	168
<b>1.6.</b> Aïllament i caracterització de la regió promotora .....	168
<b>1.6.1.</b> Identificació de l'inici de transcripció .....	169
• <i>Primer extension</i> .....	169
• <i>5'-RACE</i> .....	170
<b>1.7.</b> Anàlisi de la seqüència 5'-flanquejant .....	171
<b>1.8.</b> Activitat transcripcional del promotor .....	171
<b>1.8.1.</b> Anàlisi delecional o fragmentacional del promotor de Cyp4b1 .....	171
<b>1.8.2.</b> Comportament del promotor de Cyp4b1 en vèries línies cel·lulars.....	172
<b>1.8.3.</b> Avaluació de la resposta androgènica del promotor murí de Cyp4b1 .....	173
<b>2. Oatp1</b> .....	<b>175</b>
<b>2.1.</b> Clonatge i caracterització del cDNA sencer murí de Oatp1 .....	175
<b>2.1.2.</b> Procés de clonatge .....	175
• <i>Screening d'una llibreria de cDNA</i> .....	175
• <i>5'-RACE</i> .....	176
• <i>Composició del clon sencer definitiu</i> .....	177
• <i>Característiques del cDNA de Oatp1</i> .....	180
<b>2.1.3.</b> Traducció in vitro mitjançant lisats de reticulòcit.....	180
<b>2.2.</b> Expressió del mRNA de Oatp1 en els teixits de ratolí .....	181
<b>2.3.</b> Regulació androgènica de l'expressió de Oatp1 .....	181
• <i>Regulació androgènica de l'expressió d'Oatp1 a ronyó</i> .....	182
• <i>Anàlisi en diferents soques murines</i> .....	182
<b>2.4.</b> Identificació temptativa de la seva regió 5' adjacent .....	183
<b>2.5.</b> Estudi funcional de Oatp1: expressió i assaigs de transport en oòcits de Xenopus.....	184
<b>3. Oatp-d (MJAM)</b> .....	<b>187</b>
<b>3.1.</b> Identificació i clonatge del cDNA sencer murí de Oatp-d .....	187
<b>3.1.1.</b> Característiques del cDNA.....	189
<b>3.2.</b> Caracterització preliminar .....	190
<b>3.3.</b> Expressió del mRNA de Oatp-d en els teixits de ratolí .....	192
<b>3.4.</b> Regulació androgènica de l'expressió de Oatp-d a ronyó .....	193
<b>3.5.</b> Mapatge cromosòmic dels gens corresponents de rata i ratolí mitjançant radiation hybrid mapping.....	194
<b>3.6.</b> Exàmen de les possibles implicacions en hipertensió: expressió renal i seqüenciació de Oatp-d en rates hipertenses i normotenses .....	194
• <i>Estimació de l'expressió de Oatp-d/Pgt2 al ronyó de rates de les soques WKY i SHR</i> .....	198
• <i>Seqüenciació del cDNA codificant per Oatp-d en rates SHR i WKY</i> .....	199

<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>199</b>
------------------	------------

<b>CONCLUSIONS</b>	<b>221</b>
--------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>219</b>
---------------------	------------

<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>241</b>
-------------------	------------



II-lustracions i figures

Figura	Descripció	Pàgina
INTRODUCCIÓ		
Fig. 1.	Òrgans constituents del sistema urinari.....	21
Fig. 2.	Secció vertical del ronyó.....	22
Fig. 3.	Esquema del nefró.....	22
Fig. 4.	Segments del túbul proximal renal.....	23
Fig. 5.	El glomèrul.....	24
Fig. 6.	Secció histològica del ronyó (detall).....	24
Fig. 7.	Desenvolupament esquematitzat de la nefrona.....	26
Fig. 8.	Model general simplificat dels mecanismes d'acció de les hormones esteroïdals.....	29
Fig. 9.	Estructura tridimensional del domini d'unió a DNA del receptor d'estrògens (ER).....	30
Fig. 10.	Estructura esquemàtica dels receptors d'esteroides.....	31
Fig. 11.	Dits de zinc dels receptors nuclears.....	32
Fig. 12.	Estructura i ruta d'obtenció de la testosterona i els seus metabòlits actius.....	34
Fig. 13.	Ruta biosintètica dels andrògens a partir del colesterol (simplificat).....	35
Fig. 14.	Diagrama esquemàtic de l'eix masculí hipotalàmic-hipòfiso-testicular.....	40
Fig. 15.	Translocació nuclear del AR depenent d'andrògens.....	42
Fig. 16.	Esquema dels possibles nivells de discriminació entre les respostes específiques de receptor.....	43
Fig. 17.	Models esquemàtics d'interacció del domini d'unió a DNA del AR al seu element de resposta en el DNA.....	47
Fig. 18.	Perfils dels nivells plasmàtics de GH en rates mascle i femella adultes.....	48
Fig. 19.	Efecte de la testosterona en la vida mitjana d'eliminació ( $t_{1/2el}$ ) del <i>p</i> -aminohippurat.....	54
Fig. 20.	Plegament i model de l'estructura tridimensional dels CYPs.....	59
Fig. 21.	Esquema del sistema format per la NADPH-citocrom P450 reductasa i el citocrom P450 microsomals.....	61
Fig. 22.	Esquema de les vies metabòliques de l'àcid araquidònic (AA).....	64
Fig. 23.	Substrats dels enzims CYP4B1.....	67
Fig. 24.	Representació esquemàtica de la topologia de membrana dels membres de la família dels Oatps.....	69
Fig. 25.	Estructura d'alguns substrats seleccionats de la família dels OATP/Oatp.....	70
Fig. 26.	Alineament múltiple entre els membres de la família dels Oatp.....	71
Fig. 27.	Predicció de la topologia per la proteïna Oatp5 de rata.....	77
Fig. 28.	Immunolocalització de OATP-C (OATP2) recombinant en cèl·lules transfectades establement.....	79
Fig. 29.	Expressió de Oatp1 en els teixits de ratolí BALB/c.....	82
Fig. 30.	Model esquemàtic dels sistemes de transport d'anions orgànics en el túbul proximal renal.....	86
OBJECTIUS		
Fig. 31.	Gens regulats pels andrògens a ronyó de ratolí.....	92
MATERIALS I MÈTODES		
Fig. 32.	Monocapa de cèl·lules de la línia PR10.....	97
Fig. 33.	Cèl·lules de la línia MDCK.....	97
Fig. 34.	Procés esquemàtic de purificació dels fags.....	114
Fig. 35.	Esquema dels <i>streaks</i> realitzats sobre membranes de nitrocel·lulosa.....	139
RESULTATS		
Fig. 36.	Clons positius isolats de Cyp4b1.....	163
Fig. 37.	Il·lustració de l'estructura del cDNA murí de Cyp4b1.....	164
Fig. 38.	Distribució tissular de l'expressió de Cyp4b1.....	165
Fig. 39.	Dependència androgènica de l'expressió renal de Cyp4b1 en varies soques de ratolí.....	165
Fig. 40.	Distribució renal dels transcrits del Cyp4b1 de ratolí per hibridació in situ.....	166
Fig. 41.	Estructura genòmica del gen Cyp4b1 murí.....	167
Fig. 42.	Esquema de l'estratègia de primer extension.....	169
Fig. 43.	Identificació dels llocs d'inici transcripcional del gen Cyp4b1 de ratolí.....	169
Fig. 44.	Seqüència de nucleòtids de la regió promotora proximal del gen Cyp4b1 murí.....	170
Fig. 45.	Anàlisi del promotor proximal del gen Cyp4b1 de ratolí mitjançant deleccions seriades.....	171
Fig. 46.	Anàlisi funcional del promotor del gen Cyp4b1 en diferents línies cel·lulars.....	173
Fig. 47.	Anàlisi de la regulació transcripcional per part dels andrògens del promotor proximal de Cyp4b1 de ratolí.....	174
Fig. 48.	Il·lustració esquemàtica del 5'-RACE realitzat per completar el cDNA de Oatp1 murí.....	176
Fig. 49.	Esquema dels diferents clons de cDNA obtinguts en el procés de clonatge del cDNA complet de Oatp1.....	176

Fig. 50.	Seqüència corresponent al cDNA murí de Oatp1 .....	178
Fig. 51.	Multiplicitat de transcrits i diferents llargades de 3'UTR.....	177
Fig. 52.	Il·lustració de l'estructura del cDNA murí de Oatp1 .....	179
Fig. 53.	Arbre filogenètic radial del Oatp1 de ratolí .....	179
Fig. 54.	Alineament entre les proteïnes Oatp1 (ratolí), OATP-A (humà) i Oatp1 (rata).....	180
Fig. 55.	Traducció <i>in vitro</i> del cDNA de Oatp1 .....	180
Fig. 56.	Expressió de Oatp1 a diferents teixits de ratolí.....	181
Fig. 57.	Influència dels andrògens en l'expressió d'Oatp1 a fetge i ronyó mitjançant anàlisi per northern-blot. ....	182
Fig. 58.	Dependència androgènica de l'expressió renal de Oatp1 en vàries soques murines.....	182
Fig. 59.	Promotor putatiu del Oatp1 .....	183
Fig. 60.	Cinètica temporal (time-course) per varis substrats de Oatp1 .....	185
Fig. 61.	Cinètiques del transport de E <sub>2</sub> 17βG (A) i de DHEAS (B) mediat per Oatp1 en oòcits de <i>X. laevis</i> .....	186
Fig. 62.	Esquema dels diferents clons de cDNA obtinguts en el procés de clonatge del cDNA complet de MJAM/Oatp-d ...	188
Fig. 63.	Il·lustració esquemàtica del 5'-RACE realitzat per intentar completar el cDNA del MJAM murí .....	189
Fig. 64.	Construcció del clon sencer de cDNA del MJAM murí .....	189
Fig. 65.	Seqüència del cDNA murí de MJAM (Oatp-d).....	190
Fig. 66.	Alineament entre les proteïnes Oatp-d de ratolí, de rata i humana.....	191
Fig. 67.	Relació filogenètica entre Oatp-d i els membres de la família Oatp/PGT de diferents espècies .....	191
Fig. 68.	Perfil d'hidropatia per Oatp-d .....	192
Fig. 69.	Patró d'expressió del gen Oatp-d murí .....	193
Fig. 70.	Influència androgènica de l'expressió renal d'Oatp-d en vàries soques murines .....	193
Fig. 71.	Localització cromosòmica del gen Oatp-d/mjam murí.....	194
Fig. 72.	Mapa de la regió del chr 16q26 humà.....	195
Fig. 73.	Mapa de la regió cromosòmica 15q25-26 humana.....	195
Fig. 74.	Representació esquemàtica dels diferents QTLs de pressió sanguínia identificats en el cromosoma 1 de rata.....	196
Fig. 75.	Mapa comparatiu entre humans, rata i ratolí de les regions sintèniques al chr 15q26 humà .....	197
Fig. 76.	Expressió de Oatp-d a ronyó de rates SHR i WKY.....	198

#### DISCUSSIÓ

Fig. 77.	Anàlisi d'expressió per western-blot de Oatp1 a fetge i ronyó de rata.....	212
Fig. 78.	Taula d'homologies entre les proteïnes deduïdes per Oatp-d/OTAP-D de vàries espècies de mamífers.....	214

### Taules

----Taula----	Descripció	Pàgina
INTRODUCCIÓ		
Taula	I. Elements de resposta a hormones (HRE) de varis receptors esteroïdals.....	33
Taula	II. Nivells plasmàtics d'andrògens, en humans i rosegadors.....	38
Taula	III. Respostes biològiques als andrògens.....	39
Taula	IV. Especificitat de lligant del Receptor d'Andrògens .....	42
Taula	V. Abundàncies relatives del mRNA del AR en varis teixits respecte la pròstata .....	44
Taula	VI. Alguns gens on s'han identificats elements de resposta a andrògens .....	45
Taula	VII. Seqüència core d'alguns elements de resposta a andrògens (ARE) naturals i similars .....	46
Taula	VIII. Classificació funcional d'alguns gens murins regulats per andrògens a ronyó.....	56
Taula	IX. Distribució d'espècies de les famílies de Citocroms P450 (abreujada) .....	60
Taula	X. Les famílies de CYP humans i llur principals funcions .....	62
Taula	XI. Abundància de citocroms P450 en diferents llibreries renals de ratolí .....	65
Taula	XII. Descripció i característiques moleculars dels diferents Oatp's.....	72
Taula	XIII. Propietats funcionals dels diferents Oatp's.....	73
Taula	XIV. Alguns cations i anions orgànics transportats pels túbuls renals .....	84
MATERIALS I MÈTODES		
Taula	XV. Identificació dels clons diferencials de cDNA obtinguts en el treball de Melià et al. [133].....	91
Taula	XVI. Soques bacterianes d' <i>Escherichia coli</i> utilitzades.....	99
Taula	XVII. Clons RDA.....	103
Taula	XVIII. Oligonucleòtids .....	104
Taula	XIX. Oligonucleòtids II .....	105
Taula	XX. Primers d'anclatge utilitzats en el 5'-RACE .....	127
Taula	XXI. Construccions <i>reporter</i> del promotor de <i>Cyp4b1</i> .....	150
Taula	XXII. Quantitats i volums de transfecció.....	151

Taula	XXIII.	Característiques i condicions de la RT-PCR.....	164
Taula	XXIV.	Organització Exònica/Intrònica del gen <i>Cyp4b1</i> de ratolí.....	168
Taula	XXV.	Homologies entre <i>Oatp1</i> de ratolí i altres membres de la família dels <i>Oatp</i> 's.....	179
Taula	XXVI.	Característiques i condicions de la RT-PCR.....	181
Taula	XXVII.	Substrats.....	184
Taula	XXVIII.	Comparació de les $K_m$ aparents ( $\mu\text{M}$ ) entre <i>Oatp1</i> de ratolí i de rata.....	185
Taula	XXIX.	Característiques i condicions de la RT-PCR.....	192
Taula	XXX.	Característiques i condicions de la RT-PCR.....	198
Taula	XXX.	Seqüències N-terminal de varis <i>Oatps</i> en comparació amb la del motiu consens PDZ.....	212

## LLISTAT D'ABREVIATURES

<i>aa</i>	aminoàcid
<i>b, kb</i>	base, kilobase
<i>cDNA</i>	DNA complementari
<i>Ci</i>	Curie
<i>cfu</i>	unitats formadores de colònia
<i>cpm</i>	contes per minut
<i>Da</i>	Dalton
<i>DEPC</i>	dietilpirocarbonat
<i>DNA</i>	àcid desoxiribonucleic
<i>F</i>	Faradi
<i>g</i>	gram
<i>h</i>	hora
<i>m</i>	metre
<i>M</i>	molar
<i>min</i>	minut
<i>mRNA</i>	RNA missatger
<i>N</i>	normal
<i>o/n</i>	al llarg de tota la nit ( <i>overnight</i> )
<i>pb</i>	parell de bases
<i>pfu</i>	unitats formadores de calba de lisi
<i>RNA</i>	àcid ribonucleic
<i>rpm</i>	revolucions per minut
<i>RT</i>	temperatura ambient ( <i>room temperature</i> )
<i>s</i>	segon
<i>U</i>	unitat d'activitat enzimàtica
<i>UV</i>	ultraviolat
<i>Vf</i>	volum final
$\Omega$	Ohm

### Prefixes mètrics

G	<i>giga</i>	( $10^9$ )
M	<i>mega</i>	( $10^6$ )
k	<i>kilo</i>	( $10^3$ )
m	<i>mili</i>	( $10^{-3}$ )
$\mu$	<i>micro</i>	( $10^{-6}$ )
n	<i>nano</i>	( $10^{-9}$ )
p	<i>pico</i>	( $10^{-12}$ )

*A la clara memòria del meu avi, Joan Isern i Arnau*

Aquesta tesi es centra bàsicament en l'estudi i caracterització de tres gens de ratolí, que comparteixen la característica d'expressar-se a ronyó i d'estar regulats pels andrògens, els quals estimulen la seva expressió renal a nivell de mRNA.

El primer d'ells correspon al gen *Cyp4b1* –representant dels citocroms P450, enzims implicats en el metabolisme oxidatiu tan de substàncies endògenes com en la detoxificació de fàrmacs i xenobiòtics. S'ha estudiat la seva expressió en diversos teixits murins i, mitjançant hibridació *in situ*, s'ha localitzat la distribució del seus transcrits en el ronyó. En aquest darrer teixit, s'ha investigat l'efecte de les hormones andrògenes en la seva expressió, utilitzant ratolins castrats i control de vàries soques. A nivell genòmic, s'ha clonat el seu gen i les dues primeres *kb* de promotor del *Cyp4b1*, determinant la seva seqüència, la seva organització genòmica i els límits exó/intró corresponents. Amb el fragment de promotor aïllat s'han preparat construccions reportereres, amb les quals s'han realitzat assaigs de transfecció transitòria per tal d'analitzar i avaluar els possibles elements reguladors presents, tan a nivell d'expressió basal en línies renals, com a nivell d'inducció i capacitat de resposta androgènica.

Els dos gens restants descrits –*Oatp1* i *Oatp-d/MJAM*– eren prèviament desconeguts, pel que s'ha hagut de clonar i seqüenciar el seu cDNA sencer en aquest treball. Un cop identificats s'ha vist que ambdós corresponien a membres de la família murina dels transportadors d'anions orgànics, OATPs, proteïnes poliespecífiques de transport amb una ampli ventall de substrats que pot incloure des de sals biliars, esteroides conjugats i eicosanoides, fins a drogues i xenobiòtics orgànics. Al igual que pel *Cyp4b1*, s'ha estudiat la seva distribució tissular a nivell de missatger, i també la dependència androgènica de la seva expressió renal en diferents soques murines.

Per *Oatp1* en particular, s'ha realitzat una caracterització preliminar a nivell funcional determinant la seva afinitat per alguns substrats, amb assaigs de transport en oòcits de *Xenopus laevis*. A nivell genòmic, s'ha identificat temptativament la seqüència de la possible regió 5' adjacent del seu gen.

Finalment, per *Oatp-d* (prèviament anomenat *MJAM*), s'han realitzat diversos estudis comparatius amb rates i humans, que inclouen el mapatge cromosòmic del gen en ratolins i del seu corresponent ortòleg en rates. El posicionament dels gens *Oatp-d* de rata i OATP-D –l'ortòleg humà– en sengles regions genòmiques on han estat situats possibles *loci* genètics d'influència en hipertensió, ha fet que exploréssim a nivell preliminar una possible implicació d'aquest gen en els processos esmentats. S'ha abordat a través de comparar la seqüències dels cDNA corresponents i l'expressió renal de *Oatp-d* en rates de les soques WKY(normotenses) i SHR (hipertenses genètiques).

El present treball hauria d'englobar-se dins el marc d'una aproximació als mecanismes específics reguladors de l'expressió per part dels andrògens. És en aquest context, amb l'horitzó de la recerca dels possibles elements moleculars que possibiliten i governen l'acció androgènica a ronyó, i de l'esclariment del seu significat fisiopatològic, on es pot situar el treball experimental que es descriurà a continuació.