

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

RESULTATS

1. *Cyp4b1*

1.1. Obtenció i caracterització del cDNA sencer murí de *Cyp4b1*

Com a pas inicial per tal d'escometre el clonatge genòmic del gen *Cyp4b1* de ratolí, amb la seva regió promotora associada, calgué obtenir primer de tot el seu cDNA corresponent complet. En una primera temptativa es dissenyaren primers específics pel *Cyp4b1* a partir de la seva seqüència disponible a les bases de dades, amb els quals s'intentà amplificar el cDNA sencer tot utilitzant com a motlle mRNA de ronyó. Degut a l'aparició de problemes tècnics en el transcurs d'aquesta aproximació inicial, es decidí alternativament emprendre el *screening* d'una llibreria de cDNA renal, construïda en el plasmidi pAD-Gal4 [STRATAGENE], de la que ja es disposava al laboratori.

Procés de *Screening*

La sonda utilitzada per rastrejar la llibreria va consistir en el fragment *XbaI-PstI* de 265 pb, derivat del clon 5.1RDA (aïllat prèviament en el nostre laboratori) i que corresponia als nucleòtids 424-789 del cDNA murí del *Cyp4b1*. El *screening* primari de la llibreria amb aquesta sonda '5.1RDA' marcada radioactivament va rendir inicialment 13 positius candidats. Un cop identificades a les plaques mare les colònies bacterianes d'hibridació positiva, aquestes varen ser picades, sembrades i sotmeses a successives rondes de *re-screening*/enriquiment fins a purificar-ne a homogeneïtat els 3 clons positius definitius presumiblement representatius de *Cyp4b1*. L'anàlisi per digestió del DNA dels clons positius aïllats mostrà que dels tres, dos d'ells compartien el mateix insert d'unes 1,5 kb (Fig. 36A, carrils 2 i 3), mentre que el clon positiu restant oferia l'insert major, d'aproximadament 1,8 kb de grandària (*ibid.*, carril 4).

La seqüenciació parcial dels clons amb primers flanquejants confirmà que els tres inserts pertanyien a *Cyp4b1*, però malauradament ni el clon de major llargària contenia la total integritat del

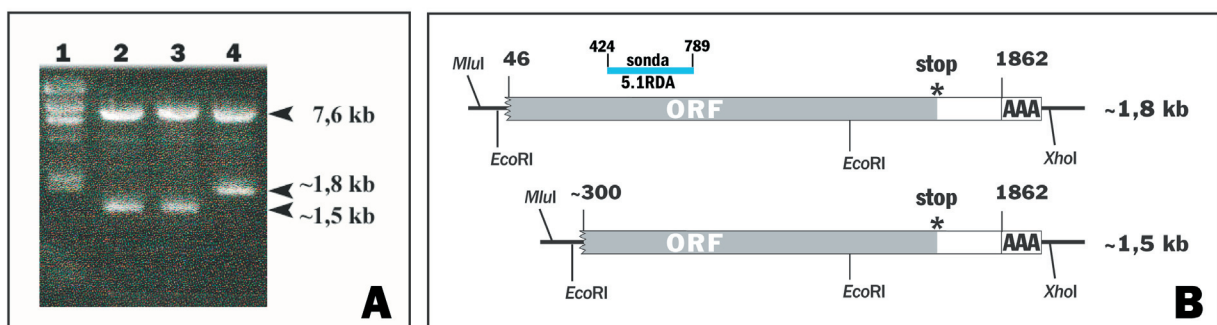


FIG 36. Clons positius isolats de *Cyp4b1*

A. Digestió diagnòstica amb els enzims *MluI*+*XhoI* dels 3 clons positius (carrils 2-4; carril 1, marcador de pes molecular) aïllats a partir del *screening* de la llibreria de cDNA de ronyó de ratolí. (1 µg de DNA plasmídic de cada clon es va digerir 2 h a 37°C amb la combinació dels enzims indicats. Els fragments resultants, es van resoldre electroforèticament en un gel d'agarosa, visualitzant-se amb EtBr.

B. Descripció dels dos clons independents diferencials digerits en el pannell A, indicant-ne la longitud de l'insert i les correspondències amb el cDNA complet de *Cyp4b1*[†], així com la posició aproximada dins els clons de la sonda 5.1RDA.

[†]La numeració es refereix respecte el cDNA dipositat al *GenBank*[™] amb el numero d'accés NM_007823

cDNA (xifrada en 1871 pb). Concretament, els 2 clons idèntics menors representaven des de les ~300 fins a les 1862 pb del cDNA, mentre que l'insert de 1,8 kb contenia el fragment 46-1862 del cDNA del *Cyp4b1*, mancant-li 27 pb fins l'ATG d'inici de traducció, així com tot el 5'-UTR (19 pb) per correspondre al *full-length* (veure Fig. 36B).

L'estructura i característiques del cDNA del *Cyp4b1* de ratolí, clonat inicialment per Imaoka S. i col·laboradors [139], pot visualitzar-se a la figura 37, on també es mostra esquemàticament la proteïna deduïda per la qual codifica.

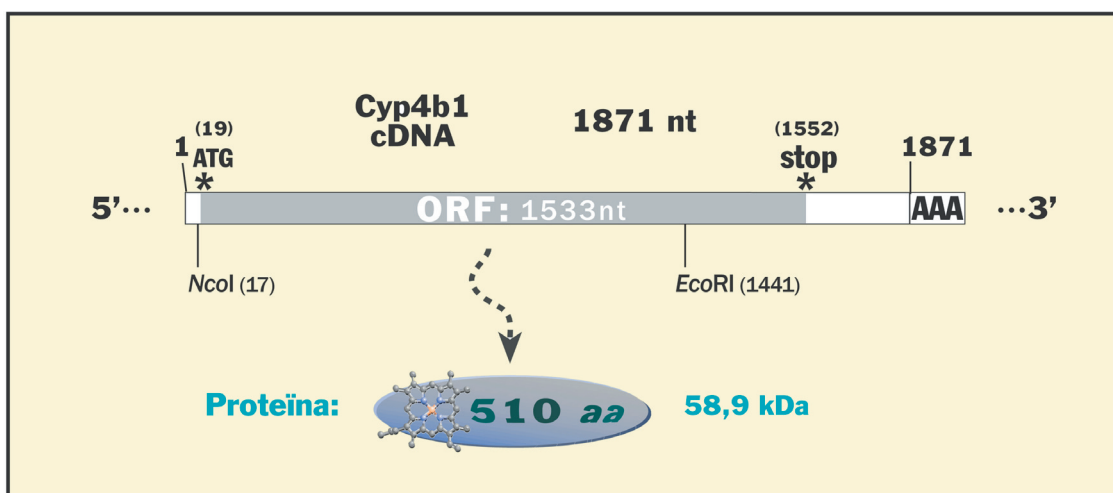


FIG. 37. Il·lustració de l'estructura del cDNA murí de *Cyp4b1*. Representació esquemàtica del cDNA complet de ratolí del gen *Cyp4b1*, amb la proteïna corresponent codificada pel mateix. En ella s'indica el grup *hemo* present en l'holoenzim. També es mostren algunes dianes de restricció escollides amb llurs posicions relatives dins el cDNA.

1.2. Expressió en els teixits de ratolí

A continuació es va investigar qualitativament l'expressió del *Cyp4b1* a nivell de missatger per RT-PCR, en un ampli ventall d'òrgans i teixits murins adults (Fig. 38). La soca de ratolí escollida fou la 129/SvJ i el gènere masculí com a representatiu, donat que el nostre interès recau sobretot en l'estudi i la influència del sexe i de les hormones androgèniques en la regulació de l'expressió gènica renal.

Els teixits on es detectà expressió del gen *Cyp4b1* foren ronyó i pulmó, amb una banda de menor intensitat en l'últim dels dos; en la resta de teixits els resultats foren negatius (Fig. 38).

Tan les condicions d'amplificació com els primers, s'optimitzaren per tal d'assolir la màxima especificitat per *Cyp4b1* en l'amplificació, tot evitant interferències amb d'altres membres de la família de citocroms P450 (veure la Taula XXIII per les condicions generals de la RT-PCR utilitzades). Complementàriament, la identitat dels fragments amplificats es va verificar per seqüenciació; com a control intern d'amplificació i d'integritat del RNA missatger s'utilitzà el gen de la ciclofilina A, amb els seus primers corresponents (veure MÈTODES, secció 2.4.2)

TAULA XXIII. Característiques i condicions de la RT-PCR

primers (5'→3')	Amplicó	Motlle	Condicions (abreujades)
<i>cyp4b1</i> 459f - TGATGTGCTGAAGCCCTATG	~1,2 kb	500 ng de RNA _r ratolí ♂ 129/SvJ	RT @50°C, PCR @57°C; 35 cicles
<i>cyp4b1</i> 1695r - AAAGCCCAGGCATTGAATC			

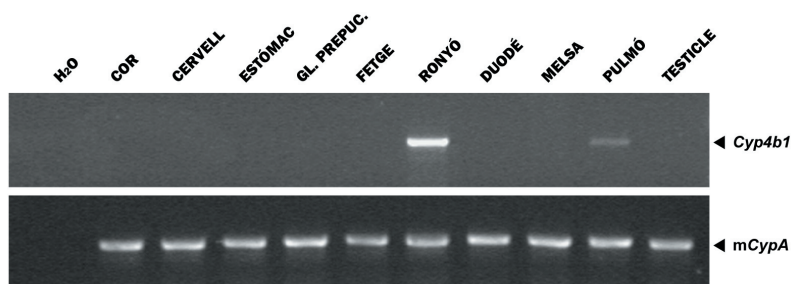


FIG 38. Distribució tissular de l'expressió de *Cyp4b1*. Patró d'expressió de *Cyp4b1* en diferents teixits murins adults, analitzats per RT-PCR. 500 ng de RNA total dels teixits indicats (H₂O: control negatiu de la reacció), van ser transcrits inversament i amplificats utilitzant els primers específics per *Cyp4b1* 459f i 1685r. Com a gen de referència s'han usat primers per la ciclofilina A de ratolí (mCypA). (veure MÈTODES); els productes d'amplificació obtinguts es varen resoldre en un gel d'agarosa al 2% i visualitzats amb EtBr

1.3. Regulació androgènica a ronyó

Un cop investigat el patró d'expressió del citocrom P450 4b1 als teixits de ratolí (en mascles de la soca 129/Sv) i verificada la seva presència a ronyó, es va passar a aprofundir en l'anàlisi de la seva regulació renal pels andrògens. Donat el fet àmpliament reconegut de l'existència de diferències d'expressió notòries, segons l'edat, sexe o soca de ratolí entre membres individuals de la família CYP, es va passar a examinar per *northern-blot* si els esteroides sexuals masculins intervenien en la regulació renal de l'expressió murina de *Cyp4b1*, en les soques consanguínies C57BL/6, BALB/c i 129/SvJ. Es procedí a la castració de varis animals de les tres soques esmentades, deixant-los recuperar de la intervenció durant una setmana. Un cop transcorregut aquest període, es varen sacrificar juntament amb els corresponents animals control intactes, recollint-ne els ronyons i preparant RNA total per tal de ser analitzat per *northern-blot*; l'hibridació dels filtres es realitzà amb una sonda específica de *Cyp4b1* corresponent al fragment *nt's* 1-478 del cDNA.

Com es pot apreciar a la Fig. 39, en les tres soques testades el senyal d'hibridació del missatger

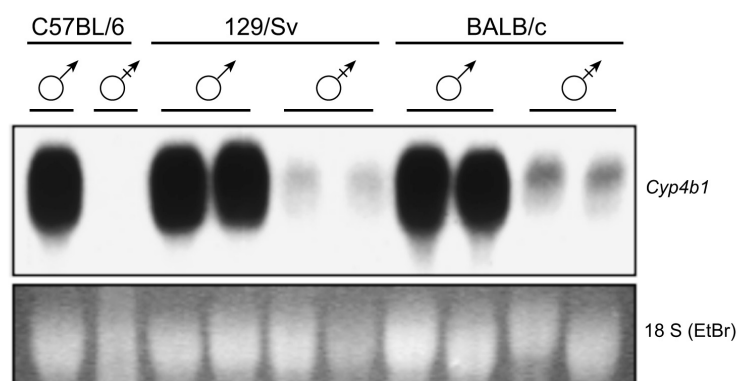


FIG 39. Dependència androgènica de l'expressió renal de *Cyp4b1* en varies soques de ratolí. Anàlisi per Northern-blot del mRNA de *Cyp4b1*, en el ronyó de tres soques consanguínies. 15 µg d'RNA total de ronyó (dos animals per situació) de mascles intactes i castrats, de les soques C57BL/6, 129/Sv i BALB/c, van ser sotmesos a electroforesi en un gel de formaldehid i transferits a membranes de niló. La hibridació va realitzar-se amb la el cDNA (1-478) de *Cyp4b1* marcat amb ³²P sota les condicions descrites al corresponent apartat dels MÈTODES. Un únic transcrit de ~2,0 kb es detecta en els mascles control intactes i en menor intensitat en els ronyons dels castrats. La senyal d'hibridació va ser normalitzada amb el control intern de ciclofilina A (mCypA). La banda del RNA ribosomal 18S (tenyida amb EtBr prèvia transferència) és mostrada també com indicador de càrrega

de *Cyp4b1* –d’aproximadament ~ 2 kb–, disminueix ostensiblement en els ronyons dels animals castrats, confirmant la diferència renal entre sexes prèviament descrita a nivell de proteïna i d’activitat enzimàtica microsomal per Imaoka S *et al.* [139].

En els subsegüents estudis relacionats amb la regulació androgènica del gen, es treballa amb materials de la soca 129/Sv, un cop verificat el seu comportament similar a les altres.

1.4. Distribució del mRNA de *Cyp4b1* en el ronyó de ratolí

Per establir la distribució dels mRNAs del *Cyp4b1* dins el ronyó es va realitzar hibridació *in situ* de seccions congelades de ronyó murí, amb ribosondes marcades amb digoxigenina complementàries a la seqüència del seu cDNA. La detecció s’obtingué immunològicament amb anticossos anti-digoxigenina conjugats amb l’enzim fosfatasa alcalina, i revelant el conjunt amb el substrat cromòfor BCIP/NBT que rendeix un precipitat de coloració blau-violàcia.

Com es pot apreciar en la *figura 6* els transcrits del *Cyp4b1* es localitzen primàriament en el còrtex renal, a nivell de les cèl·lules epitelials del túbul proximal, amb mínima presència a regions medul·lars.

El marcatge intens observat en aquestes porcions del túbul proximal contrasta amb l’absència aparent de marcatge a glomèrul, nanses de Henle i porcions distals de la nefrona. La corresponent hibridació de seccions renals amb la sonda *sense* (o anticomplementària) no va oferir cap marcatge apreciable (*Fig. 40*).

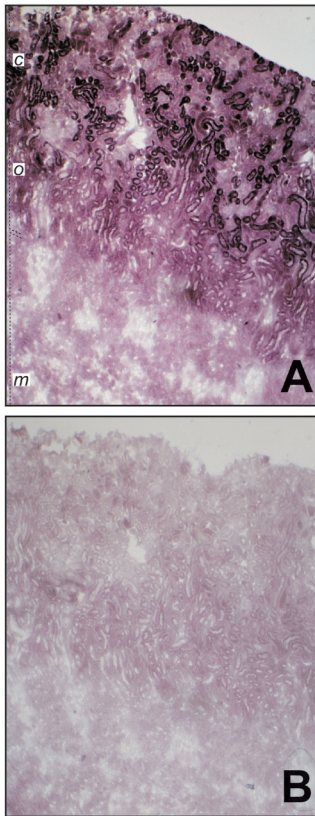


FIG 40. Distribució renal dels transcrits del *Cyp4b1* de ratolí per hibridació *in situ*. Seccions renals murines obtingudes amb criostat van ser hibridades amb una ribosonda complementària a *Cyp4b1* marcada amb digoxigenina, i tenyides amb un anticòs anti-digoxigenina revelat amb un substrat cromogènic. En el quadre (A) es mostra el resultat obtingut amb la sonda complementària, observant-se un intens marcatge a l’escorça renal i a la branca externa de la medul·la externa, mentre que a (B) es mostra el resultat obtingut amb la sonda anticomplementària corresponent sota idèntiques condicions, en el qual es pot apreciar l’absència significativa de senyal. El marcatge es concentra en les cèl·lules pròximotubulars dels segments S_1 i S_2 (c, còrtex), mentre que disminueix en els segments S_3 adjacents de la medul·la externa (o, part externa de la medul·la externa), glomèruls i túbuls distals (m, medul·la). Augments X40 (A i B)

1.5. Clonatge genòmic i caracterització del gen

Amb l’objectiu de clonar i caracteritzar l’estructura genòmica del gen *Cyp4b1* murí, s’emprengué el screening d’una llibreria genòmica de ratolí en bacteriòfag λ . La llibreria comercial utilitzada, deriva de DNA genòmic de ratolí de la soca 129/SvJ, clonat en el vector LambdaFIX®II [STRATAGENE] (veure apartat MATERIALS, secció 4).

En primer lloc es va procedir a determinar el títol vigent de la llibreria subministrada o disponible, que s’estimà en 10^9 pfu/mL. Un cop titulada la llibreria, es va sembrar i repartir en plaques grans i es

prepararen els corresponents filtres rèplica de nitrocel·lulosa, passant-se llavors pròpiament a realitzar l'screening amb la sonda marcada radioactivament amb ^{32}P . En total es van rastrejar uns 1.000.000 clons independents, per tal de tenir una representació suficient del genoma murí.

La sonda *Cyp4b1* utilitzada en les hibridacions fou el fragment *EcoRI-EcoRI* de $\sim 1,4$ kb provenint del clon *Cyp4b1* n $^{\circ}$ 13 (obtingut en l'apartat 1.1), i que correspon aproximadament als nucleòtids 46-1400 del cDNA de *Cyp4b1*. Després del primer *screening* primari s'identificaren fins un nombre de 13 presumptes clapes de lisi d'hibridació positiva, que en successives rondes de re-infecció i re-*screening* (fins a un total de 5) varen anant sent descartades fins a quedar-se finalment amb 5 d'elles, els quals es van purificar fins a homogeneïtat. Els 8 clons positius finals aïllats es van anomenar consecutivament com a λCYP 1-8, respectivament.

Resultats preliminars per *Southern-blot* (no mostrats) determinaren que el clon λCYP 3 podia contenir una bona part del gen *Cyp4b1* i es seleccionà, en conseqüència, aquest per iniciar-ne l'anàlisi. Es preparà doncs a partir de grans volums de lisat del clon positiu en qüestió, DNA de fag en abundància, que seria sotmès tan a un mapatge per digestió enzimàtica com a seqüenciació directe amb *primers* específics derivats de la seqüència del cDNA corresponent. Amb aquesta estratègia s'anaren seqüenciant els exons i els seus límits amb els introns, la mida aproximada dels quals es determinà en alguns d'ells per PCR llarga. L'estructura genòmica i l'organització exó/intró es mostra a la *Figura 41* i a la *taula XXIV*, respectivament.

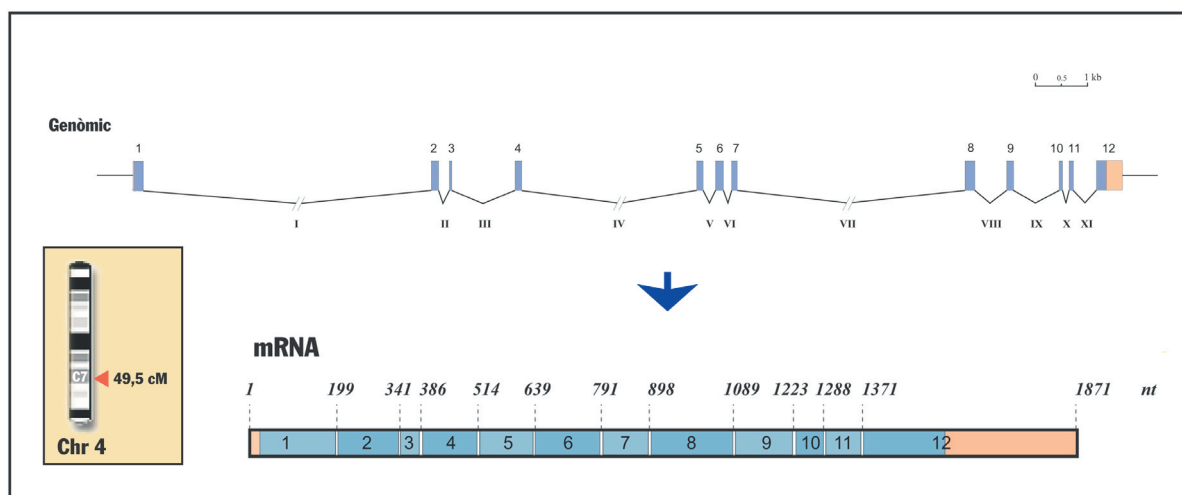


FIG 41. Estructura genòmica del gen *Cyp4b1* murí. Il·lustració esquemàtica del gen *Cyp4b1* amb les correspondències de cada exó amb el mRNA derivat, on s'indiquen les posicions de cada *boundary*. Els exons (numerats de l'1 al 12) estan representats com a rectangles, mentre que les línies obliques entre exons indiquen les regions intròniques (numerades del I-XI). La coloració blava i rosada en els exons i el mRNA representen les regions codificants i les regions no traduïdes, respectivament. Es mostra també, a la part superior dreta del conjunt, una barra d'escala a títol orientatiu. En el quadre inferior esquerre, es representa com a recordatori la localització cromosòmica del gen amb la distància aproximada, derivada dels mapes citogenètics vigents

Informació prèvia situa el gen en el cromosoma 4 murí, a uns 45 cM aproximadament [169]. El gen cobreix una zona d'unes 23 kb aproximadament i està format per 12 exons i 11 introns. El inici de traducció està present en el primer exó; la mida dels exons varia des de 45 fins a 198 pb, amb excepció del darrer exó –el dotzè– que té una grandària de 500 pb i conté el codó de terminació TAG i la regió 3'-UTR amb una senyal de poliadenilació AATAAA inclosa. Les llargades dels introns s'han estimat a través de la seqüenciació directe del intró (pels de mida reduïda), o mitjançant PCR de llarg recorregut amb *primers* exònics flanquejants. En alguns casos, l'alineament amb seqüències-traça (*traces*), generades pel consorci

TAULA XXIV. Organització Exònica/Intrònica del gen *Cyp4b1* de ratolí. Taula-resum de les característiques dels segments exònics i intrònics, grandàries i seqüència en les interseccions, del *Cyp4b1* murí.

Exó	Mida exó	Posicions	Donador de <i>splicing</i> - 5'	Intró	Mida intró	Acceptor de <i>splicing</i> - 3'
	<i>pb</i>				<i>pb</i>	
1	198	1 - 198	...GCC CTT GAG / gtatgtggg...	I	~6,000	...ttgtttcag / ATC CAG AAG...
2	142	199 - 340	...GCC GAG GGG / gtaaggtgc...	II	184	...gtcctgcag / ACC CGA AGG...
3	45	341 - 385	...AGT GGA TCG / gtaagttaa...	III	~1,200	...ctttctcag / GAA AAG GCC...
4	128	386 - 513	...GTG ATG CTG / gtgagttcc...	IV	~4,000	...gtattccag / GAC AAG TGG...
5	125	514 - 638	...AAG CCA CAG / gtcaggagc...	V	238	...tctgtatag / TGA CAA CAG...
6	152	639 - 790	...ACC ATA CAG / gtaggcctt...	VI	134	...ttgtgtccag / ATC ATG TCA...
7	107	791 - 897	...GGT GCC CGG / gtgagtga...	VII	~4,000	...ttctttcag / GAT GAA AGT...
8	198	898 - 1088	...CTT CCA GTG / gtgagtgat...	VIII	~1,800	...tgctggcag / GGA TGA TCT...
9	134	1089 - 1222	...TAC CTG CAG / gtaggttgc...	IX	918	...tgcttacag / GCA GCC TGA...
10	65	1223 - 1287	...GAC CCA GAG / gtacagtg...	X	94	...tctccttag / GTC TTT GAC...
11	83	1288 - 1370	...AGG GCC CAG / gtaggtaga...	XI	416	...ttgtgtgcag / GAA TTG CAT...
12	500	1371 - 1871				

Nota. Les seqüències dels exons i dels introns es mostren en lletres majúscules i minúscules, respectivament. Les posicions nucleotídiques s'han numerat d'acord a la seqüència de cDNA ja publicada del *Cyp4b1* (*Genbank*TM acc nº. D50834)

de seqüenciació del genoma murí, i fetes públiques a la *mouse genome database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi>) també s'han utilitzat per determinar i verificar la longitud d'algun intró concret.

L'íntegre totalitat dels exons seqüenciats ha coincidit amb la seqüència del cDNA publicada per Imaoka, S. i col·laboradors [139], i totes les interseccions exó/intró determinades s'avenen canònicament amb les seqüències consens AG/GT dels donadors i acceptors de *splicing*.

1.6. Aïllament i caracterització de la regió promotora

Com a pas inicial i necessari abans d'abordar l'aïllament del promotor del *Cyp4b1*, s'ha clonat i caracteritzat (descriu en l'apartat anterior) el gen estructural corresponent, tot per començar a comprendre els mecanismes reguladors de la seva expressió a ronyó. Prosseguint en aquest sentit, es va passar a continuació a realitzar la identificació i el clonatge de llur regió reguladora 5'. Amb una sonda de 233 *pb*, corresponent a l'extrem més 5' del cDNA de *Cyp4b1* (*nt* 23-233) i que fou generada per RT-PCR amb els primers específics mCyp23U i mCyp 218L (veure apartat primers), es procedí a hibridar filtres amb clapes de lisi dels 8 clons genòmics de *Cyp4b1* obtinguts en el *screening* previ. Complementàriament també s'hibridaren els mateixos filtres amb l'oligonucleòtid *mCYP4B1* 23 (corresponent a les posicions 23-44 del cDNA), per corroborar la presència de seqüències el més 5' possibles. De tots ells, el que mostrava un senyal d'hibridació més intens va ser un altre cop, el clon λ CYP3, suggerint que podria incloure part de la regió 5' adjacent. L'anàlisi conseqüent del clon va confirmar que contenia la regió proximal promotora del gen *Cyp4b1*, de manera que es va procedir a subclonar-la i analitzar-la.

1.6.1. Identificació de l'inici de transcripció

La caracterització del promotor començava per determinar el/s punt/s d'inici/s de transcripció. Per tal de mapar en el gen aquests llocs de iniciació transcripcional, es va dur a terme experiments de *primer extension* i complementàriament, de 5'-RACE. Com a motlle de partida es va fer servir mRNA de ronyó de diferents soques murines.

Primer extension

Pel *primer extension*, es van testar els següents primers “lower”: mCyp103L, corresponent a les posicions 62-82 en el cDNA, i mCYP4B1 218L (posicions 197-218) (veure Fig. 42). Un cop marcats radioactivament amb ^{32}P , es va procedir a realitzar amb ells una reacció de seqüència manual sobre el clon genòmic λCYP3 com a motlle, i en paral·lel una transcripció inversa sobre mRNA renal de diferents soques. Les reaccions es purificaren i els productes obtinguts es van resoldre conjuntament en un gel vertical de seqüenciació, tal i com es detalla a MÈTODES, secció 2.4.4.

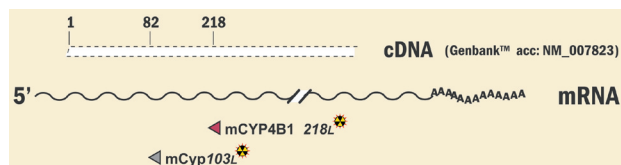


FIG 42. Esquema de l'estratègia de *primer extension*. Il·lustració esquemàtica del procés de *primer extension* realitzat per determinar l'inici transcripcional del *Cyp4b1*. S'indiquen els primers utilitzats amb les seves posicions relatives

Dos productes d'extensió de intensitats desiguals, de 119 nt (el majoritari) i 116 nt (el minoritari), varen obtenir-se amb el primer 103L (Fig. 43), mentre que amb l'altre primer 218L, que s'anellava en una posició més distant del inici del missatger, s'obtingué un únic producte de 235 nt de llargària (no es mostra).

Tenint en compte la mida dels productes majoritaris obtinguts amb els dos primers citats, la posició potencial de l'inici de transcripció, designada com a +1, recauria a 34 pb *upstream* del codó d'inici de traducció ATG –es a dir, 16 pb més 5' respecte la posició marcada com a “1” del cDNA de *Cyp4b1* publicada [139]. El producte de 116 nt obtingut també amb el primer 103L, podria representar un segon lloc –minoritari– d'inici. Donat que amb el primer 218L només es detecta un sol producte majoritari, que coincideix amb la mateixa posició d'inici, i avançant resultats del 5'-RACE, on també s'obtingueren evidències equivalents, podem afirmar que en principi el gen *Cyp4b1* utilitza un inici majoritari de transcripció.

5'-RACE

Per confirmar els resultats obtinguts amb el *primer extension*, es realitzà l'aproximació complementària del 5'-RACE, amb la qual també és possible inferir el lloc de inici transcripcional. Amb els primers específics de *Cyp4b1* següents: 418r, 218L, i 103L (per realitzar la RT, la 1^a PCR, i la *nested* PCR, respectivament), s'obtingué una banda única d'uns 200 pb. Aquest producte amplificat es va subclonar, i després de seqüenciar diverses colònies –totes de seqüència coincident– es varen confirmar les troballes dels experiments de *primer extension*. La localització del lloc estimat de inici de la transcripció està situat 16 nt més amunt respecte l'extrem 5' de la seqüència coneguda de cDNA (*GenBank*TM acc. NM_002873). En la

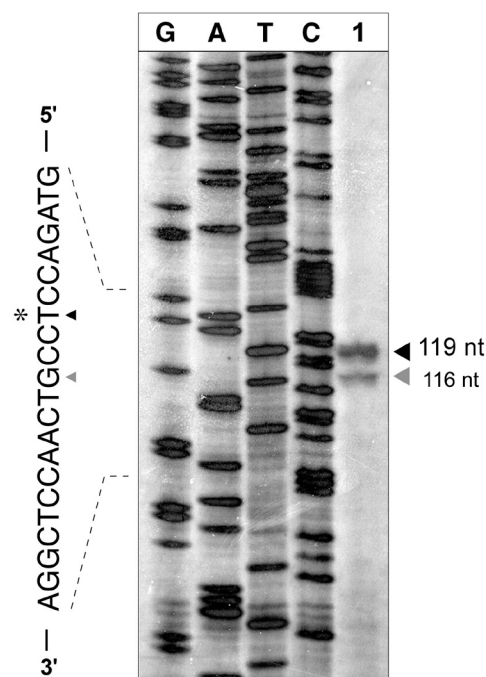


FIG 43. Identificació dels llocs d'inici transcripcional del gen *Cyp4b1* de ratolí. La seqüència nucleotídica flanquejant dels llocs d'iniciació s'il·lustra a la part esquerre de la figura, amb les posicions d'inici obtingudes per *primer extension* marcades per triangles i les obtingudes per 5'-RACE designades amb un asterisc. Les sagetes a la dreta de la seqüència indiquen els llocs d'inici transcripcional majors (negre) i menor (gris), mapats amb els experiments de primer extension obtinguts amb el primer cyp 103L i RNA total de ronyó murí com a motlle (carril 1). S'indiquen les mides de les bandes exteses així com el gel de seqüència manual. Per més detalls consultar els MÈTODES, secció 2.4.4.

fragment *NcoI* de ~1,8 kb, que compren des de la posició -1797 de seqüència *upstream* i que inclou 34 pb de regió UTR *downstream* des de l'inici de transcripció; Aquesta construcció s'anomenà -1,8*luc*. En la figura 44A es mostra un esquema del fragment subclonat amb algunes dianes de restricció indicades. En la figura 44B es mostra la seqüència nucleotídica d'aquestes ~1,8 kb de 5' flanquejant del gen *Cyp4b1* murí. L'anàlisi computacional de l'esmentada seqüència amb el programa MatInspector ha identificat varis llocs d'unió putatius a factors de transcripció, com GATA-1, MLF-1 (*myeloid leukemia factor-1*), Sp1, NFAT o AP-1.

1.8. Activitat transcripcional del promotor

Per examinar la capacitat de la regió promotora identificada per dirigir la transcripció d'un gen reporter fusionat al darrere, es van dur a terme una sèrie de diferents experiments amb transfecció transitòria de construccions *reporter*, en cèl·lules de túbul proximal renal entre d'altres.

1.8.1 Anàlisi delecional o fragmentacional del promotor de *Cyp4b1*

En primer lloc, amb l'objectiu avaluar quina regió podia ser la més rellevant per la transcripció basal es van preparar una sèrie de construccions amb fragments decreixents del promotor de *Cyp4b1*, subclonades en el vector plasmídic *pGL3-basic* que codifica per l'enzim luciferasa, propi de la cuca de llum (*Photinus pyralis*).

Els fragments de promotor van ser generats per PCR, amb *primers upper* dissenyats a les distàncies corresponents amb una diana *NcoI* incorporada, i com a *lower* comú en tots ells s'escollí el *primer cyp* 103L. L'amplificació es va realitzar sobre el constructe -1,8*luc* de motlle, utilitzant una DNA polimerasa fidel per tal d'evitar la introducció d'errors en la seqüència. Un cop amplificats i purificats, els fragments es van digerir amb l'enzim *NcoI* i varen subclonar-se finalment al vector *pGL3-basic*, obert per *NcoI* i defosforil·lat. En total es generaren 8 fragments representatius del promotor, que contenen des de -1797 (-1,8 kb) fins a -34 pb *upstream* del lloc d'iniciació transcripcional, i extenen-se tots ells més enllà fins

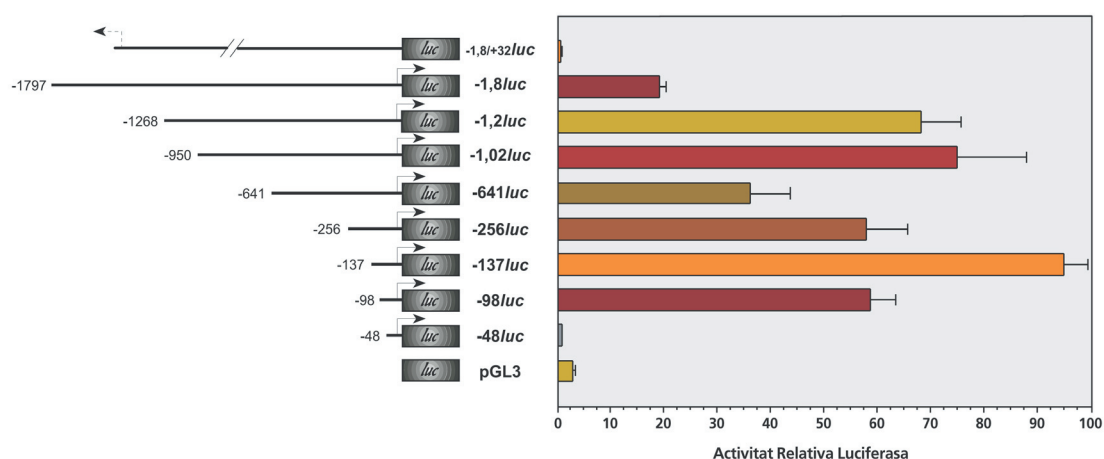


FIG 45. Anàlisi del promotor proximal del gen *Cyp4b1* de ratolí mitjançant deleccions seriades. Varies construccions quimèriques de fragments de la regió flanquejant 5' del *cyp4b1* fusionats al gen de la luciferasa (i esquematitzades a la part esquerra de la figura), van ser transfectades transitòriament en la línia cel·lular epitelial de ronyó murí PCT3 per estimar-ne les corresponents activitats transcripcionals (representades gràficament a la dreta). Per estandarditzar l'eficiència de transfecció, les cèl·lules es van cotransfectar amb el vector control *pSEAP2*, i les activitats luciferasa normalitzades en front de les activitats SEAP (fosfatasa alcalina secretada). Els valors expressen la mitjana \pm S.D. Cada transfecció es va realitzar com a mínim per quadruplicat amb tres experiments independents

a la posició +34; Totes les construccions es van comprovar i seqüenciar extensivament per verificar-ne l'absència de mutacions.

Les transfeccions es van realitzar en la línia renal PCT3, corresponent a cèl·lules epitelials derivades de túbul proximal murí, utilitzant com a vehicle d'entrada un mètode comercial basat en liposomes catiónics (*LipofectaminePLUS*, INVITROGEN). Transcorregudes 48 h, les cèl·lules es recolliren i l'activitat luciferasa fou mesurada. Per estandarditzar i normalitzar els valors deguts a la diferent eficiència de transfecció, es varen cotransfectar les cèl·lules amb el vector d'expressió de l'enzim secretat de la fosfatasa alcalina (SEAP), *pSEAP2*, i les activitats corresponents mesurades en els sobrenedants dels medis de cultiu.

Els assaigs de transfecció transitòria es van realitzar en plaques de 24 pous, per facilitar-ne la manipulació i la màxima reproducibilitat. En general es realitzaren de 4-8 rèpliques de cada situació en almenys 3 experiments diferents.

Com es pot apreciar a la *figura 45*, el fragment que inclou el tros més gran de promotor (construcció $-1,8\text{ luc}$) és capaç de conferir un increment de ~ 6 cops en l'activitat transcripcional, comparat amb el plasmidi control *pGL3-basic*, mancat de promotor, mentre que el constructe amb la mateixa seqüència testada, inserida en l'orientació inversa ($+34/-1,8\text{ luc}$) fracassa en dirigir alguna transcripció del gen reporter. L'eliminació de 549 *pb* de l'extrem 5' del promotor (construcció $-1,2\text{ luc}$) resulta en un increment de l'activitat transcripcional de ~ 23 vegades, suggerint la possibilitat de que en aquest fragment resideixin elements reguladors negatius o repressors. Quan es delectona successivament encara més la longitud del tros restant de promotor, no es redueixen qualitativament els nivell d'activació assolits amb el fragment d' $1,2\text{ kb}$, excepte per la construcció -641 luc , quina activitat decau un 53% respecte al fragment precedent $-1,02\text{ luc}$, recuperant-la altre cop amb delectons addicionals.

D'entre totes les construccions testades la màxima activitat luciferasa s'observà amb la construcció -137 luc , que va ascendir fins a ~ 32 cops respecte al control negatiu *pGL3-basic*. Quan s'escapça aquest fragment de promotor fins al *nt* -98 , en va resultar una pèrdua d'activitat luciferasa però mantenint-se encara 20 cops superior a l'assolida pel plasmidi reporter buit. La delectió fins al nucleòtid -48 va abolir completament la inducció, indicant que el segment mínim necessari per obtenir certa activitat transcripcional recau entre les posicions -98 i -48 , i que en aquest segment possiblement es troben els elements mínims necessaris per governar *in vitro* l'expressió basal del *Cyp4b1* de ratolí.

1.8.2. Comportament del promotor de *Cyp4b1* en diverses línies cel·lulars

Els experiments previs s'han realitzat en la línia renal de túbul proximal PCT3; Per avaluar si l'activitat mostrada pel promotor en aquestes cèl·lules era específica, o podia reproduir-se en d'altres tipus cel·lulars, es va testar també en altres línies, tan renals com no renals. Els fragments seleccionats per transfectar consistiren en el -1.8 luc (corresponent al promotor complet) i el -137 luc (que oferia l'activitat màxima en les cèl·lules PCT3). En la *figura 46* s'expressen els resultats d'aquests experiments, realitzats en les línies cel·lulars indicades.

Mentre que en tots els tipus cel·lulars s'observà una activitat mínima negligible pel que fa al vector control, la construcció -137 luc va generar una notòria inducció del gen reporter, a part de en les cèl·lules PCT3, en la línia murina PR10 (derivada de túbul proximal, *pars recta*) i en la línia humana HEK293 (derivada de ronyó embrionari humà). En la resta de línies, *i.e.* les MDCK (derivades de ronyó de gos), les CV-1 (derivades de ronyó de mico) i les HepG2 (derivades d'hepatoblastoma humà), aquesta construcció va assolir una resposta propera a la inactivitat. Pel que fa a l'altra construcció, que contenia el fragment

major de promotor, aconseguí induccions significatives (quantitativament menors a les corresponents al fragment $-137/+34$) únicament en les dos línies de túbul proximal de ratolí i en les HEK293, amb resultats indetectables en la resta.

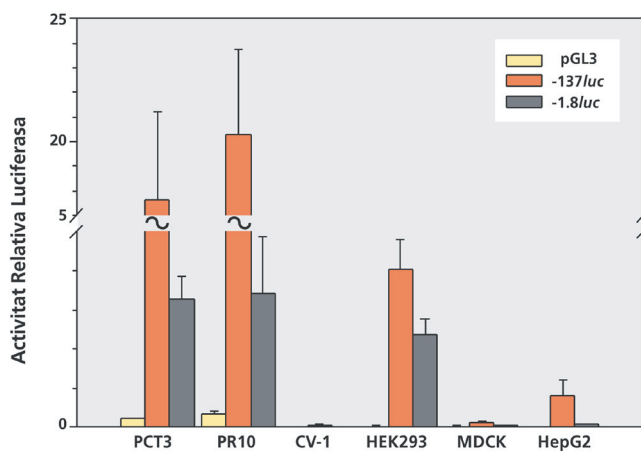


FIG 46. Anàlisi funcional del promotor del gen *Cyp4b1* en diferents línies cel·lulars. Activitat de les construccions $-1.8luc$ i $-137luc$ del promotor de *Cyp4b1* en diferents línies cel·lulars. El vector "buit" pGL3-basic (barres grogues), les construccions *Cyp4b1*-luciferasa de $-1.8luc$ (barres grises) i $-137luc$ (barres color marró-teula) van ser transfectades a les línies cel·lulars de túbul proximal murí (PCT3 i PR10), de ronyó humà i de ronyó de mico (HEK293 i CV-1, respectivament) canines d'aparença a túbul distal (MDCK), i d'hepatoblastoma humà (HepG2). Les activitats luciferasa per cada construcció i línia foren mesurades, i els valors resultants corregits utilitzant les corresponents activitats de fosfatasa alcalina secretada, per normalitzar les diferències entre l'eficiència de transfecció intra i inter-línia. S'han utilitzat dades de 3 experiments independents realitzats en quadruplicat. Els resultats són representatius de 3 experiments separats

En general, el fragment de promotor complet de $\sim 1,8 kb$ ha produït unes respostes menors en totes les línies comparativament amb el segment més curt de $-137 pb$, indicant que en el fragment gran poden existir seqüències o elements atenuadors de la resposta, que es mostra màxima quan no estan presents. L'activitat luciferasa màxima absoluta s'ha assolit amb la construcció $-137luc$ i en les cèl·lules PCT3 (i PR10), amb una activitat moderadament menor en les HEK293 i residual en les CV-1 i les MDCK). De forma interessant, la construcció *Cyp4b1* de -137 a $+32$ ha estat capaç de suportar una lleu però rellevant expressió del gen reporter en la línia hepàtica humana HepG2. Això indicaria que aquesta reduïda regió de promotor pot contenir elements reguladors bàsics que dirigeixen l'expressió basal en línies cel·lulars renals –on és plenament actiu– i fins i tot no renals com les HepG2. No obstant, incrementant la mida del fragment amb la inclusió de seqüències fins a -1797 (construcció $-1,8luc$), provoca una davallada de l'activitat, que es manté només en les línies murines i mínimament en la HEK293, amb una moderada expressió del reporter.

1.8.3. Avaluació de la resposta androgènica del promotor murí de *Cyp4b1*

A continuació es va voler investigar si la resposta androgènica observada *in vivo*, podia reflectir-se a nivell transcripcional mitjançant inducció del promotor pels andrògens.

La caracterització detallada dels elements moleculars que governen les respostes androgèniques a ronyó ha estat difícil, en part per la manca de sistemes cel·lulars apropiats capaços de respondre a andrògens. Treballs recents del nostre laboratori han demostrat que les línies immortalitzades PCT3 i PR10, derivades de túbul proximal de ratolí, representen un sistema vàlid per l'anàlisi de l'activitat transcripcional de promotors depenents d'andrògens [58].

Utilitzant, doncs, aquests models es va transfectar transitòriament la línia cel·lular renal PCT3 amb una sèrie de construccions de DNA, constituïdes per fragments decreixents del promotor fusionats al gen de la luciferasa. Un plasmidi codificant pel receptor d'andrògens humà (el *pSV-AR₀*) va ser cotransfectat juntament amb les construccions anteriors per assolir una màxima transactivació. La

resposta androgènica de les construccions va ser testada incubant les cèl·lules cotransfectades en absència i en presència de $1 \mu\text{M}$ de dihidrotestosterona (DHT). En la *figura 47* es mostra gràficament el resultat d'aquests experiments; el tractament va obtenir canvis mínims en la inducció de l'activitat luciferasa, amb només una inducció de ~ 2 vegades l'activitat per les construccions -137Luc , -641Luc i $-1,8\text{Luc}$, però amb menys activitat absoluta en els dos darrers. El control positiu de l'inducció " 1xARECyp98Luc ", constituït per una construcció quimèrica en la qual s'ha inserit una còpia de l'element de resposta a andrògens canònic, davant del fragment de promotor mínim del *Cyp4b1*, el -98Luc , va resultar en una inducció del gen reporter substancialment elevada (~ 10 vegades), mentre que el plasmidi *pGL3-basic* –mancat de promotor–, no va mostrar cap canvi significatiu en l'activitat luciferasa.

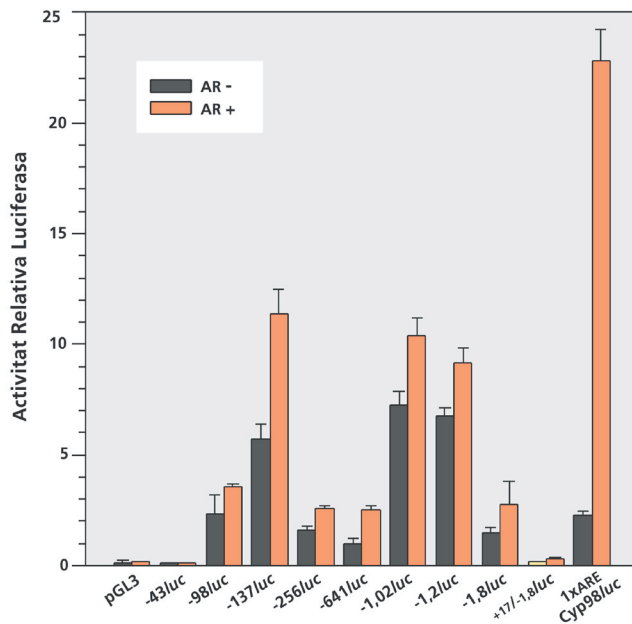


FIG 47. Anàlisi de la regulació transcripcional per part dels andògens del promotor proximal de *Cyp4b1* de ratolí. El mateix grup de construccions reporteres *Cyp4b1-luc*, indicat en la figura prèvia, va ser cotransfectat en les cèl·lules PCT3, juntament amb el plasmidi pSV-AR₀ (que codifica pel receptor d'andrògens de humà), en absència (barres grises) i en presència (barres taronges) de 10^{-6} M de dihidrotestosterona (DHT). Els valors van ser estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra a la gràfica representa la mitja \pm S.D. (desviació estàndard) de dos experiments separats, cadascun realitzat en quadruplicat