

3. *Oatp-d* (MJAM)

3.1. Identificació i clonatge del cDNA sencer murí de *Oatp-d*

El clon 4.1RDA no presentava cap homologia significativa amb les seqüències disponibles a les bases de dades. Es tractava doncs, presumiblement, del fragment de cDNA d'un nou gen no identificat, expressat com a mínim als ronyons de ratolins C57BL/6 i diferencialment regulat pels andrògens en aquell teixit. La nova seqüència expressada (o *est*, *expressed sequence tag*), de 452 *pb* de longitud va ser dipositada a la divisió *dbEST* del *GenBank*TM amb el número d'accés corresponent U90332, i designada provisionalment amb el nom de MJAM.

En base a aquests resultats previs, es va iniciar un nou *screening* amb l'objectiu de clonar –i posteriorment caracteritzar– el cDNA sencer corresponent al clon “MJAM”, a afegir als ja realitzats pels gens murins *Cyp4b1* i *Oatp1*.

A tal efecte, es van utilitzar els filtres de la llibreria renal utilitzats en els *screenings* anteriors, hibridant-los aquesta vegada amb una sonda de ~450 *bp* (fragment *PstI-SpeI* del clon 4.1RDA) que contenia l'insert íntegre de MJAM. Després de la primera ronda s'havia identificat només un únic putatiu positiu, que en successives rondes de *re-screening* es logrà isolar de manera homogènia i pura, anomenant-lo finalment MJAM 8.2. La mida final d'aquest clon –determinada per digestió i verificada per seqüenciació–, va ser de 1640 *pb* incloent la reduïda cua de poli(A) (19 *nt*) localitzada a l'extrem 3' (*figura 62*).

L'examen introductor de la seqüència obtinguda va localitzar-hi el segment representat per la sonda 4.1RDA, però no revelà cap possible ORF de grandària i extensió significatives, afegint-se al fet de que a l'extrem 5' del clon s'havia perdut la diana *EcoRI*, present en els clons de la llibreria. Aquest últim esdeveniment va fer-nos pensar que aquell clon MJAM 8.2 podia ser parcial i no representar encara el cDNA *full-length*. L'enfrontament de tot el conjunt d'aquesta seqüència de ~1,6 *kb*, traduïda en totes les pautes de lectura possibles (algoritme *BLASTx*), amb les bases de dades retornà per primer cop una certa homologia –tot i que discreta (*i.e.* ~34%)– amb segments d'algun gen, concretament amb l'*Oatp1* de rata. Això va fer-nos pensar que el MJAM podia correspondre a un membre relacionat amb la família murina dels transportadors d'anions orgànics, dels quals ja estàvem treballant amb un d'ells: l'*Oatp1*.

Donat que en aquest primer *screening* no s'havia aconseguit el cDNA sencer, es va repetir resembrant de nou la llibreria i preparant filtres-rèplica frescos. La sonda utilitzada en aquest cas no va ser la 4.1RDA sinó el fragment *BglII* de ~1,5 *kb* alliberat del clon MJAM 8.2, que conté l'insert casi sencer i és representatiu de posicions més 5' del cDNA respecte d'aquella. Després de varies tandes consecutives d'enriquiment i purificació dels nous clons positius obtinguts inicialment, es va aconseguir quedar-se al final amb 3 nous clons independents d'hibridació positiva, anomenats MJAM 17.1, 7.1.1, i 2.1, respectivament. A la *figura 61A* es mostren les digestions del DNA d'aquests clons obtinguts, juntament amb la del clon previ MJAM 8.2, mentre que al *quadre 61B* s'esquematitzen comparativament tots els clons. Per facilitar la manipulació del clon plasmídic 2.1 obtingut –de quasi 10 *kb* de grandària– el seu insert es va subclonar pels llocs *EcoRI-XhoI* dins el vector *pBluescriptIII*. Un cop subclonat, es va seqüenciar íntegrament confirmant-se que corresponia a MJAM, i que s'havia allargat unes 600 *pb* més *upstream* respecte el segment parcial conegut (representat en el clon 8.2). Amb la nova seqüència es repetiren els anàlisis d'homologia, contrastant-la amb les bases de dades del *GenBank*TM/EMBL. Es va obtenir un llistat d'homologies segmentàries amb varis membres de la família dels OATPs, encapçalat pel transportador de prostaglandines (PGT) humà i de rata.

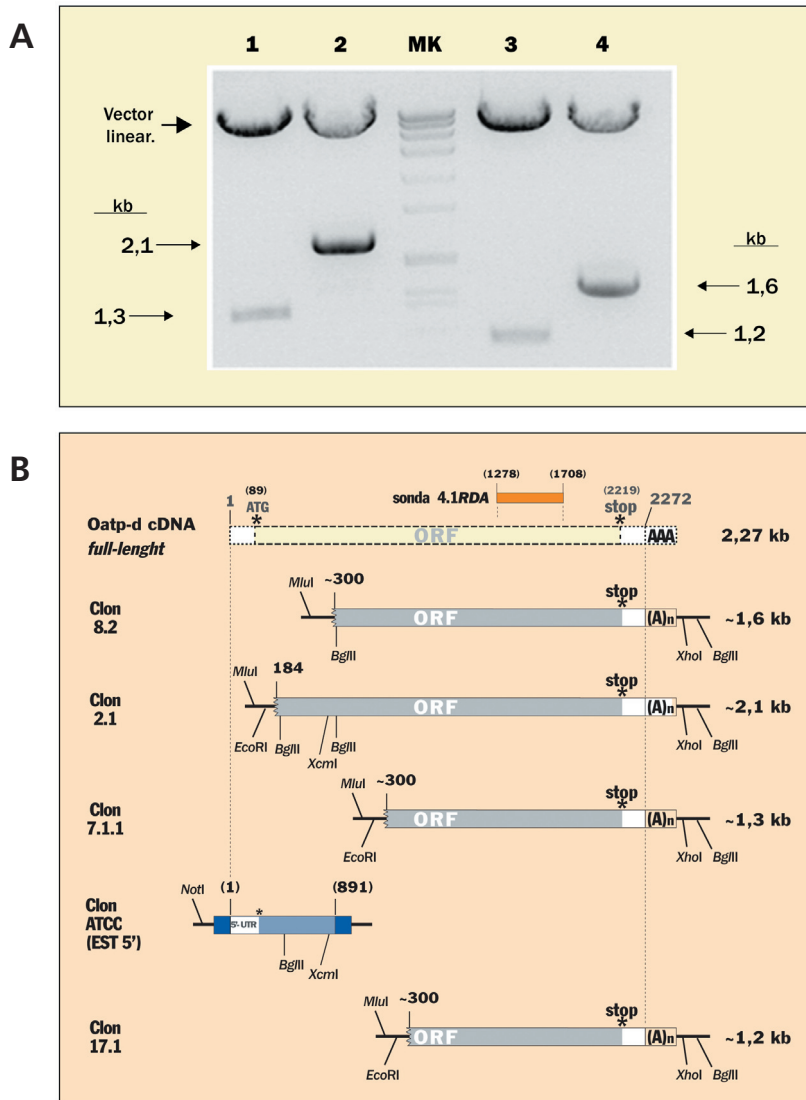


FIG 62. Esquema dels diferents clons de cDNA obtinguts en el procés de clonatge del cDNA complet de *MJAM/Oatp-d*. Al quadre (A) es mostra la digestió diagnòstica amb els enzims *EcoRI*+*XhoI* dels 4 clons positius aïllats de la llibreria de cDNA (1: clon 7.1.1, 2: clon 2.1, 3: clon 1.2, 4: clon 8.2, MK: marcador de pes molecular); veure el text pels detalls. En (B) s'indica la descripció a manera de resum del conjunt de clons de *mjam* descrits en el text; es mostren tan les mides i característiques més rellevants dels clons aïllats de la llibreria renal com els productes obtinguts amb el 5'-RACE i el clon sol·licitat al ATCC (*American Type Culture Collection*), tots ells utilitzats per construir el cDNA *full-length* definitiu. També s'indica la posició relativa de la sonda 4.1RDA utilitzada en el *screening*. La numeració en els clons és relativa al cDNA depositat al *GenBank*TM amb el número d'accés AF226324

La comparació de la seqüència del clon *MJAM* 2.1 –traduïda en la pauta que rendia un tros major sense interrupcions– amb la proteïna PGT humana, rendia una homologia mitjana del ~30% d'identitats aminoacídiques. Al examinar el putatiu ORF derivat del *MJAM* murí i contrastar-lo amb el del PGT, quedava manifest que el clon de ratolí començava aproximadament a partir de l'alçada dels *aa* 13-15 en l'altre proteïna. Això feia preveure que el putatiu ATG d'inici del *MJAM* possiblement es trobés proper seqüencialment, però alguns nucleòtids fora del que el clon 2.1 contenia.

La següent estratègia per intentar obtenir la part 5' restant i aconseguir el cDNA *full-length* va ser el 5'-RACE, que ja s'havia practicat amb èxit amb el cas del *Oatp1* murí. Es van dissenyar varis *primers antisense* a partir de la seqüència dels 300 *pb* inicials del clon i es procedí a realitzar les etapes de la tècnica (procés indicat esquemàticament a la figura 63). Cal dir que en tots els intents realitzats, fins i tot introduint variacions en el protocol i provant *primers* alternatius, no es va aconseguir amplificar productes significatius excepte una petita banda de només ~100 *pb*, subclonada i seqüenciada amb dificultats.

El resultat i recapitulació de tots aquests experiments va ser que s'havia aconseguit avançar 102 *nt* addicionals respecte la seqüència parcial ja coneguda, resultant amb una extensió efectiva del putatiu ORF previ.

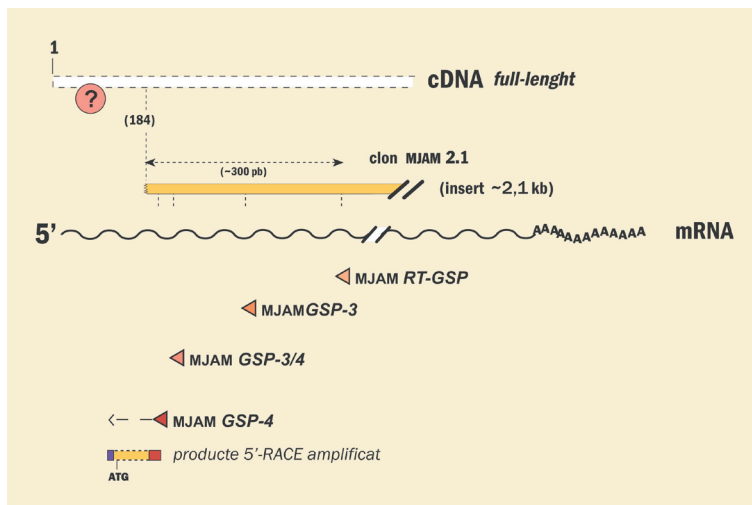


FIG 63. Il·lustració esquemàtica del 5'-RACE realitzat per intentar completar el cDNA del MJAM murí. Es mostren les posicions aproximades dels primers utilitzats en el 5'-RACE, així com el producte amplificat; també s'indica la mida relativa del clon parcial MJAM 2.1 i del putatiu cDNA full-length

L'alineament dels primers 500 *pb* del cDNA (obtinguts fusionant la seqüència del 5'-RACE amb la del clon extret de la llibreria), amb tots els possibles *est* de ratolí d'aquella regió va rendir una sèrie de seqüències *est* –la majoria derivades dels extrems 5' de cDNA's de llibreries murines– que es podien alinear perfectament amb la zona, confirmant-se la bondat de la seqüència del nostre tros de cDNA. D'entre totes elles, només una s'extenia 83 *pb* addicionals *upstream* de la seqüència més 5' coneguda, aportant-nos la informació que ens mancava sobre aquella regió; el clon en qüestió es sol·licità al ATCC. Mitjançant digestió i lligació es va empalmar en el 5' del nostre cDNA 2.1 MJAM subclonat a *pBluescriptII* (veure la representació esquemàtica en la figura 64), de manera que al final del procés s'obtingué el cDNA full-length de MJAM en un clon únic i colineal.

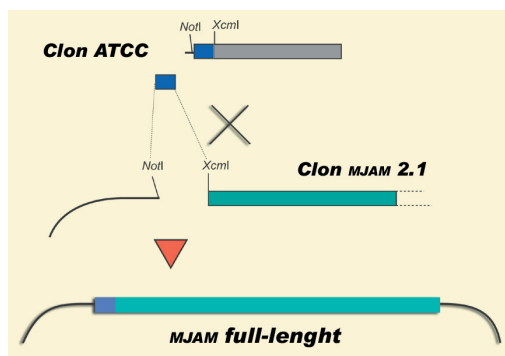


FIG 64. Construcció del clon sencer de cDNA del MJAM murí. Esquema del procés de construcció del cDNA full-length a partir del clon parcial MJAM 2.1 completat amb el fragment indicat (derivat del clon provinent del ATCC). Veure el text pels detalls

3.1.2. Característiques del cDNA

A la figura 65 (pàg. següent) es mostra la seqüència complerta del cDNA clonat del gen MJAM de ratolí (amb una llargada total de 2272 *pb*), com la proteïna deduïda corresponent. La regió 5' no traduïda del cDNA comprèn els primers 88 *nt* i com es pot apreciar és extraordinàriament rica en GC (~80%), fet que podria explicar les dificultats en obtenir clons representatius d'aquella zona. L'ORF s'inicia al primer ATG que apareix en el cDNA –situat a la posició 89–, quedant definida una regió codificant de 2133 *nt* que donaria lloc a una proteïna predita de 710 *aa*. Al igual que en el cas de l'*Oatp1* de ratolí, en aquest cDNA també trobem dos codons de stop ...TAG TGA... situats consecutivament –en aquell són TAA TGA–, un possible mecanisme, potser, per assegurar-se una terminació correcta de la traducció del polipèptid naixent. Finalment pel que respecta als comentaris sobre la seqüència clonada del MJAM, l'extrem 3' del clon disponible conté un 3'-UTR de només 50 *nt* de llargada, sense incloure cap senyal de poliadenilació aparent i amb una petita cua de poli(A) de 21 *nt*.

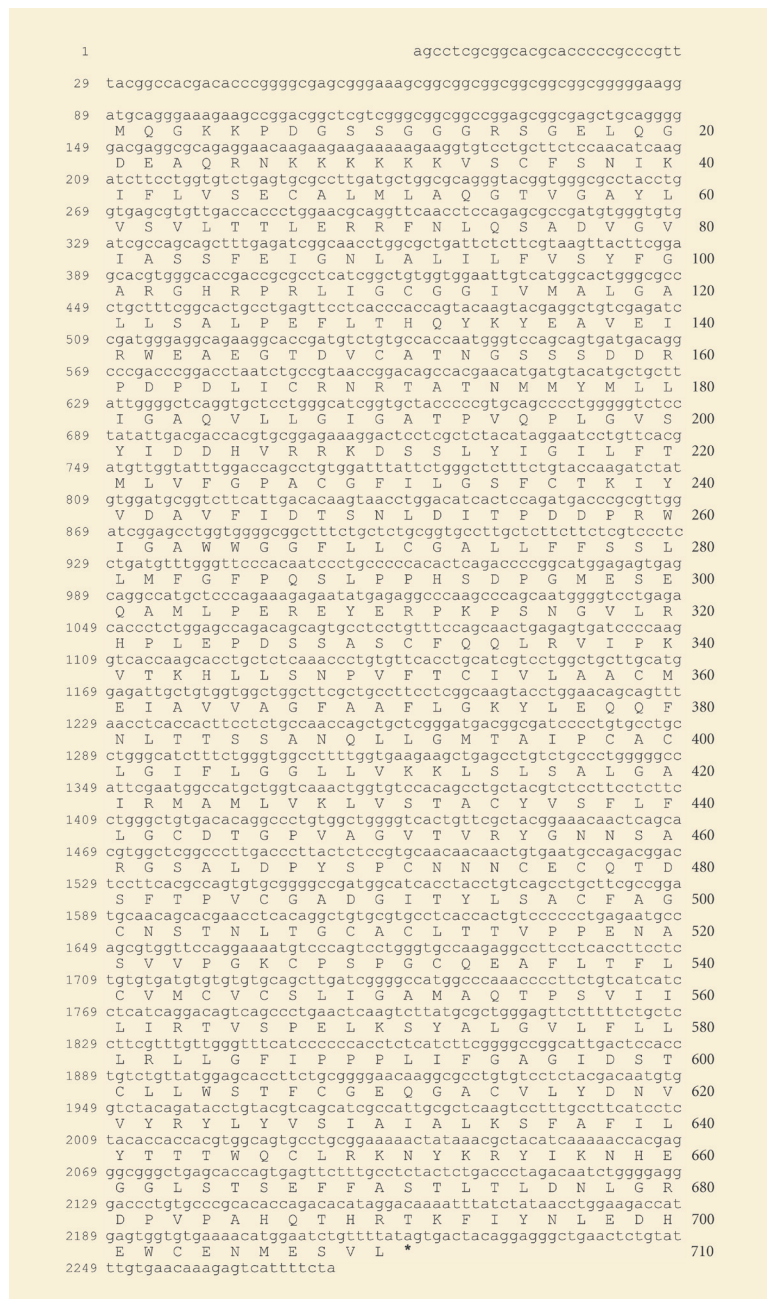


FIG 65. Seqüència del cDNA murí de *MJAM* (*Oatp-d*). Seqüència nucleotídica (numeració a l'esquerra) i llur corresponent seqüència deduïda d'aminoàcids (numeració a la dreta) del *MJAM*. L'esmentada seqüència ha estat dipositada al *GenBank*™ amb el número d'accés AF226324 . L'asterisc (*) simbolitza el codó de stop

3.2. Caracterització preliminar de la proteïna

L'anàlisi de la proteïna deduïda de 710 *aa* codificada per *MJAM*, va confirmar que es tractava d'un nou membre de la creixent família de transportadors d'anions orgànics / prostaglandines *OATP/PGT*. Enfrontant-la amb les bases de dades, va retornar una sorprenentment semblança amb un nou representant humà de la família susdita, clonat per Tamai, I. *et al.*, [231], i designat com a *OATP-D*. L'elevada homologia presentada per el nostre cDNA identificat (90% a nivell de nucleòtids i 96% considerant les proteïnes) amb el *OATP-D* humà (*Genbank*™ acc. n°AB031050), va fer-nos concloure que havíem clonat el seu corresponent ortòleg murí. En conseqüència hem actualitzat el nom inicial provisional "MJAM" per la designació més acurada de *Oatp-d* –en minúscules, en concordança amb els criteris de designació establerts per la família, representant amb majúscules els membres humans i amb

minúscules els de rosegadors—, i que serà el que s'utilitzarà a partir d'ara en aquest capítol, excepte algunes ocasions determinades —o per omissió.

mouse_Oatp-d	1	M Q G K K P D GS S GG R SG L Q D E A Q R N K K K K K V S C F S N I K I F L V S E C A L M L A O G T V G A V I
human_OATP-D	1	M Q G K K P G S S GG R SG L Q D E A Q R N K K K K K V S C F S N I K I F L V S E C A L M L A O G T V G A V I
rat_Oatp-d	1	M Q G K K P G S S GG R SG L Q D E A Q R N K K K K K V S C F S N I K I F L V S E C A L M L A O G T V G A V I
mouse_Oatp-d	61	V S V L T L T L E R R F N L Q S A D V G V I A S S F E I G N L A L I L F V S Y F G A R G H R P R L I G C G G I V M L G A
human_OATP-D	61	V S V L T L T L E R R F N L Q S A D V G V I A S S F E I G N L A L I L F V S Y F G A R G H R P R L I G C G G I V M L G A
rat_Oatp-d	61	V S V L T L T L E R R F N L Q S A D V G V I A S S F E I G N L A L I L F V S Y F G A R G H R P R L I G C G G I V M L G A
mouse_Oatp-d	121	L L S A L P E F L T H Q Y K Y E A G E T R W G A E R D V C A N G S D D R P D P D L I C R N R T A T N M M Y L L L
human_OATP-D	121	L L S A L P E F L T H Q Y K Y E A G E T R W G A E R D V C A N G S D D R P D P D L I C R N R T A T N M M Y L L L
rat_Oatp-d	121	L L S A L P E F L T H Q Y K Y E A G E T R W G A E R D V C A N G S D D R P D P D L I C R N R T A T N M M Y L L L
mouse_Oatp-d	181	I G A Q V L L G I G A T P V Q P L G V S Y I D D H V R R K D S S L Y I G I L F T M L V F G P A C G F L G S F C T K I Y
human_OATP-D	181	I G A Q V L L G I G A T P V Q P L G V S Y I D D H V R R K D S S L Y I G I L F T M L V F G P A C G F L G S F C T K I Y
rat_Oatp-d	181	I G A Q V L L G I G A T P V Q P L G V S Y I D D H V R R K D S S L Y I G I L F T M L V F G P A C G F L G S F C T K I Y
mouse_Oatp-d	241	V D A V F I D T S N L D I T P D D P R W I G A W G G F L L C G A L L F F S S L L M F G F P Q S L P P H S D P G M E S E
human_OATP-D	241	V D A V F I D T S N L D I T P D D P R W I G A W G G F L L C G A L L F F S S L L M F G F P Q S L P P H S D P G M E S E
rat_Oatp-d	241	V D A V F I D T S N L D I T P D D P R W I G A W G G F L L C G A L L F F S S L L M F G F P Q S L P P H S D P G M E S E
mouse_Oatp-d	301	Q A M L P E R E Y E R P K P S N G V L R H P L E P D S A S C F Q L R V I P K V T K H L L S N P V F T C I V L A A C M
human_OATP-D	301	Q A M L P E R E Y E R P K P S N G V L R H P L E P D S A S C F Q L R V I P K V T K H L L S N P V F T C I V L A A C M
rat_Oatp-d	301	Q A M L P E R E Y E R P K P S N G V L R H P L E P D S A S C F Q L R V I P K V T K H L L S N P V F T C I V L A A C M
mouse_Oatp-d	361	E I A V V A G F A A F L G K Y L E Q Q F N L T T S A N Q L L G M T A I P C A C L G I F L G L L V K K L S L S A L G A
human_OATP-D	361	E I A V V A G F A A F L G K Y L E Q Q F N L T T S A N Q L L G M T A I P C A C L G I F L G L L V K K L S L S A L G A
rat_Oatp-d	361	E I A V V A G F A A F L G K Y L E Q Q F N L T T S A N Q L L G M T A I P C A C L G I F L G L L V K K L S L S A L G A
mouse_Oatp-d	421	I R M A M L V L V S T A C Y V S F L F L G C D T G P V A G V T V R Y G N S A R G S A L D P Y S P C N N N C E C Q T D
human_OATP-D	421	I R M A M L V L V S T A C Y V S F L F L G C D T G P V A G V T V R Y G N S A R G S A L D P Y S P C N N N C E C Q T D
rat_Oatp-d	421	I R M A M L V L V S T A C Y V S F L F L G C D T G P V A G V T V R Y G N S A R G S A L D P Y S P C N N N C E C Q T D
mouse_Oatp-d	481	S F T P V C G A D G I T Y L S A C F A G C N S T N L T G C A L T T V P E N A G V V P G K C P S P G Q E A F I T F
human_OATP-D	481	S F T P V C G A D G I T Y L S A C F A G C N S T N L T G C A L T T V P E N A G V V P G K C P S P G Q E A F I T F
rat_Oatp-d	481	S F T P V C G A D G I T Y L S A C F A G C N S T N L T G C A L T T V P E N A G V V P G K C P S P G Q E A F I T F
mouse_Oatp-d	541	C V M C V C S L I G A M A Q T P S V I L I R T V S P E L K S Y A L G V L F L L R L L G F I P P L I F G A G I D S T
human_OATP-D	541	C V M C V C S L I G A M A Q T P S V I L I R T V S P E L K S Y A L G V L F L L R L L G F I P P L I F G A G I D S T
rat_Oatp-d	541	C V M C V C S L I G A M A Q T P S V I L I R T V S P E L K S Y A L G V L F L L R L L G F I P P L I F G A G I D S T
mouse_Oatp-d	601	C L F W S T F C G E G A C V L Y D N V V R Y L V S I A I A L K S F A F I L Y T T W Q L R K N Y K R Y I K N H E
human_OATP-D	601	C L F W S T F C G E G A C V L Y D N V V R Y L V S I A I A L K S F A F I L Y T T W Q L R K N Y K R Y I K N H E
rat_Oatp-d	601	C L F W S T F C G E G A C V L Y D N V V R Y L V S I A I A L K S F A F I L Y T T W Q L R K N Y K R Y I K N H E
mouse_Oatp-d	661	G L S T S E F F A S T L T D N L G R D P V P A H Q T H R T K F I Y N L E D H E W C E N M E S V L
human_OATP-D	661	G L S T S E F F A S T L T D N L G R D P V P A H Q T H R T K F I Y N L E D H E W C E N M E S V L
rat_Oatp-d	661	G L S T S E F F A S T L T D N L G R D P V P A H Q T H R T K F I Y N L E D H E W C E N M E S V L

FIG 66. Alineament entre les proteïnes Oatp-d de ratolí, de rata* i humana. Comparació entre les seqüències proteiques deduïdes per Oatp-d entre els putatius representants ortòlegs (donada la seva elevada homologia), de les tres espècies esmentades. Els residus ressaltats amb gris indiquen substitucions conservatives, mentre que els ressaltats amb blanc corresponen a substitucions no conservatives. L'alineament s'ha realitzat utilitzant el programa CLUSTALW accessible al EBI via [www](http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast/). *S'ha pres la proteïna traduïda a partir del cDNA depositat al GenBank™ acc. n°: AF239219

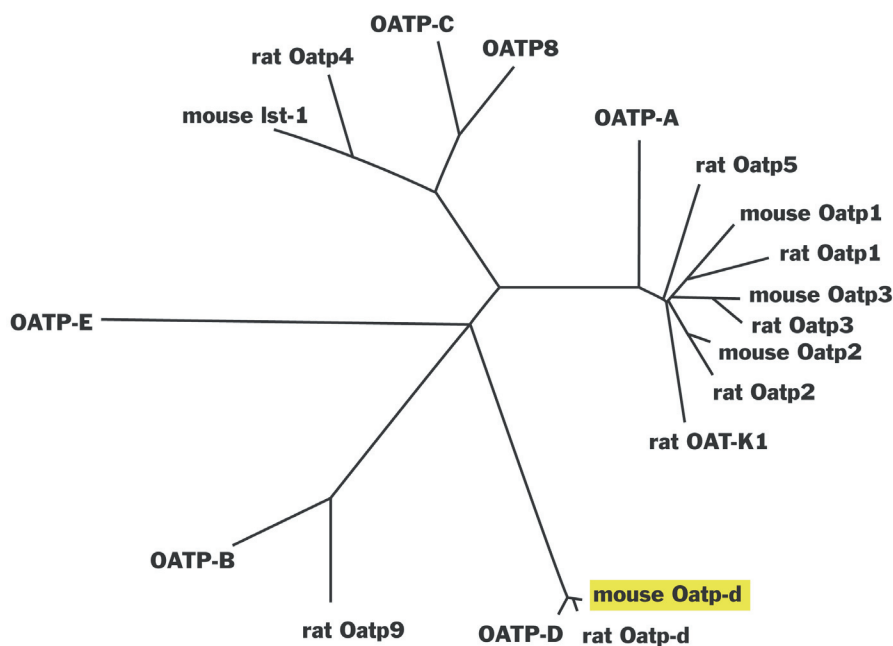


FIG 67. Relació filogenètica entre Oatp-d i els membres de la família Oatp/PGT de diferents espècies. L'arbre filogenètic ha estat construït utilitzant els programes CLUSTAL W i TREEVIEW (<<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>>). La longitud de les branques està representada a escala

Recentment també ha aparegut en el *GenBank*TM una entrada (*acc. n° AF239219*) corresponent al putatiu *Oatp-d* de rata, el clonatge del qual encara no s'ha publicat; aquest cDNA –anomenat com a “*rat prostagalinidin transporter subtype 2 (Pgt2)*”–, presenta una homologia a nivell de nucleòtids del 95% amb el cDNA murí clonat en aquest treball i unes identitats del 91% (*nt*) amb el cDNA humà. L'alineament entre aquestes tres proteïnes es representa a la *figura 66, pàg. anterior*. Com pot observar-se, les tres proteïnes presenten una elevada conservació dels seus aminoàcids, diferent només en 27 posicions de un total de 710 aminoàcids.

En l'altre figura (*fig. 67, pàg. anterior*) es representa un arbre filogenètic complet de la família dels Oatps/OATP de mamífer, en el qual pot observar-se que les proteïnes individuals s'agrupen en famílies i subfamílies en funció de la seva semblança i homologia. D'entre totes, la conservació evolutiva més elevada és per la subfamília *Oatp-d/Pgt2/OATP-D*, que constitueix una de les branques separades en

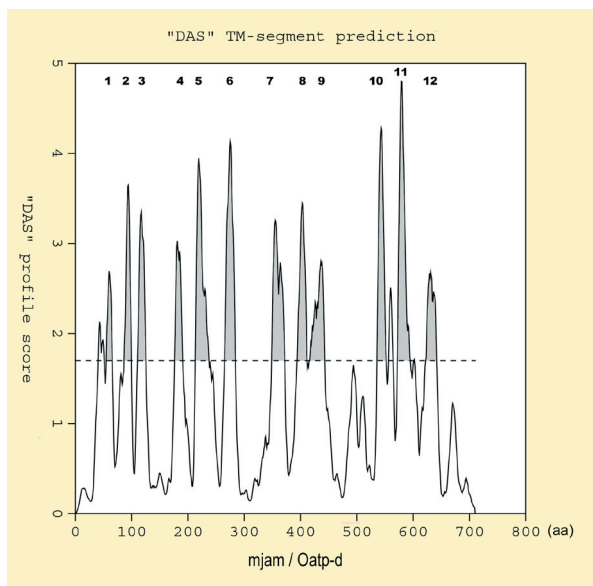


FIG 68. Perfil d'hidropatia per Oatp-d. La predicció dels segments transmembrana s'ha realitzat utilitzant el programa DAS <<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>>, [286]. S'indiquen els 12 putatius dominis hidrofòbics aproximats que atravessarien la membrana

l'arbre global. Considerant les propietats funcionals conegudes per alguns dels membres, es fa evident en l'arbre que aquelles proteïnes transportadores amb l'espectre de substrats amfipàtics més ampli, s'agrupen conjuntament en una gran família dividida en dos subgrups que inclou per una banda els *Oatp1,2, i 3* de rata i ratolí, l'*OATP-A* humà, etc., i per l'altra sub-branca als *OATP-C i B, rlst-1 i Oatp4/lst-1*, entre d'altres.

L'anàlisi d'hidropatia de la proteïna *Oatp-d* tal com s'indica a la *figura 68*, prediu l'existència de 12 dominis transmembrana de manera similar al que succeeix per la majoria de proteïnes de la família *Oatp*. Cal esmentar però, que de moment ni per aquesta ni per les altres s'ha demostrat experimentalment aquesta topologia hipotetitzada.

3.3. Expressió del mRNA de Oatp-d en els teixits de ratolí

A continuació es passà a l'estudi de l'expressió d'aquest nou gen clonat, en un nombre representatiu de teixits murins d'edat adulta. Es varen dissenyar i optimitzar primers específics per l'amplificació de l'*Oatp-d* i es realitzà la corresponent RT-PCR (*taula XXIX*) amb RNA dels teixits indicats a la *figura 69*. Com es pot observar es detectà una banda de la mida adient (la identitat de la qual es va confirmar per seqüenciació) en tots els teixits testats. Tot i no tractar-se d'un mètode quantitatiu sinó merament qualitatiu, ronyó i pulmó foren els teixits on aparentment l'expressió era màxima, contrastant amb fetge o glàndula prepucial, on la banda corresponent era d'una intensitat bastant menor. A la vista d'aquests

TAULA XXIX. Característiques i condicions de la RT-PCR

primers (5'→3')	Amplicó	Motlle	Condicions (abreujades)
<i>Oatp-d Sense1</i> - GCGCAGAGGAACAAGAAGAAG	~0,9 kb	500 ng de RNA _r ratolí ♂ 129/SvJ	RT @50°C, PCR @58°C; 40 cicles
<i>Oatp-d smjam5</i> - GCTTGGGCCTCTCATATTCTC			

resultats podem afirmar amb suficient certesa que l' *Oatp-d* seria un gen d'àmplia distribució expressat en la majoria de teixits –sinó tots– i per lo tant és de suposar que amb una funció general i necessària potser pel conjunt de teixits murins, tot i que falta encara molta informació i resultats per poder aprofundir en aquest hipotètic aspecte funcional.

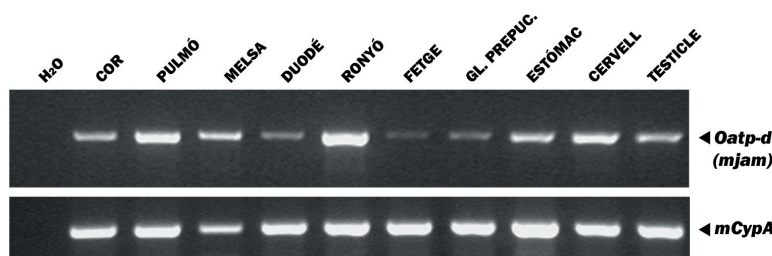


FIG 69. **Patró d'expressió del gen *Oatp-d* murí.** Distribució tissular de l'expressió de *Oatp-d* en diferents teixits de ratolí adult, analitzats per RT-PCR. 500 ng d'RNA total dels teixits indicats (H₂O: control negatiu de la reacció), van ser transcrits inversament i amplificats utilitzant els primers específics per *Oatp-d* S1/smjam5 (*upper / lower*, respectivament). 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

3.4. Regulació androgènica de l'expressió de *Oatp-d* a ronyó

Al igual que s'havia fet per els gens del *Cyp4b1* i de *Oatp1*, es va analitzar mitjançant *northern-blot* l'expressió renal del gen *MJAM / Oatp-d* en ratolins mascle castrats i control de diferents soques, per determinar la influència dels andrògens. El filtre de RNA total utilitzat amb anterioritat pels altres gens es va deshibridar completament, hibridant-se de nou amb una sonda corresponent al cDNA d'*Oatp-d* de

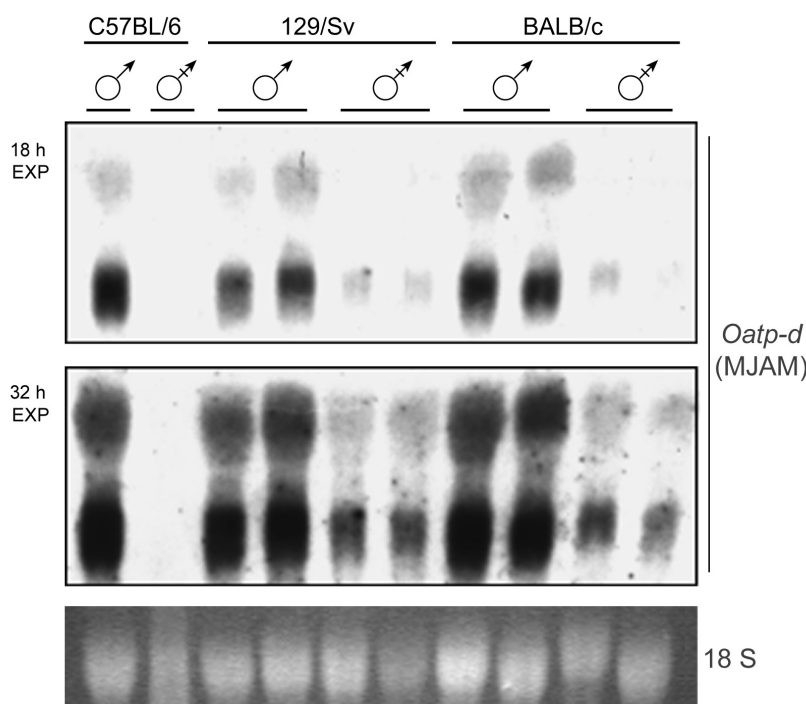
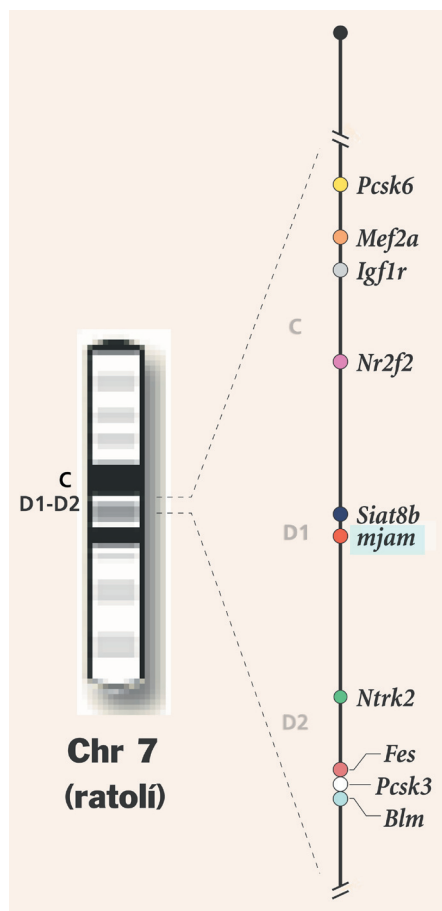


FIG 70. **Influència androgènica de l'expressió renal d'*Oatp-d* en varies soques murines.** Anàlisi per *Northern-blot* del mRNA de *Oatp-d/MJAM*, en el ronyó de tres soques murines consanguïnes. Fins a 15 µg d'RNA total renal (dos animals per situació) de mascles intactes i castrats, de les soques C57BL/6, 129/Sv i BALB/c, van ser resoltos electroforèticament en gel de formaldehid i transferits a membranes de niló. La hibridació va realitzar-se a continuació amb fragment del cDNA (155-1028) de *Oatp-d* marcat radioactivament, sota les condicions descrites al corresponent apartat dels MÈTODES. Tan en mascles control com en mascles castrats, apareixen dos transcrits (d'entre 6 i 3,5 kb), amb una intensitat disminuïda en els segons; s'indica el resultat de dos exposicions diferents (18 i 32 h), per que espugui apreciar millor les bandes de menor intensitat. Es mostra també la banda del RNA ribosomal 18S (tenyida amb EtBr prèviament a la transferència, com indicador de càrrega).

ratolí. A la *figura 70* (pàg. anterior) observem el resultat després de 12 i 32 h d'exposició del mateix. Tan en animals intactes com en castrats apareixen dos transcrits d'intensitat molt menor en els segons, quedant reafirmada la regulació per andrògens del gen en el teixit renal, sotmesa en aquestes tres soques diferents de ratolí. Com a normalització s'ha utilitzat el gen de la *ciclofilina A* i la banda del RNA ribosomal 18S.

3.5. Mapatge cromosòmic dels gens corresponents de rata i ratolí mitjançant *radiation hybrid mapping*

L'anàlisi d'homologia realitzat amb el gen *MJAM/Oatp-d* clonat va revelar que constava de dos gens altament homòlegs tan en humans (*OATP-D*) com en rata (*Pgt2*, no publicat encara). D'aquests 3 gens, el millor caracteritzat fins a la data era el representant humà, del qual es coneixia que es trobava localitzat en el cromosoma 15q26; donat que aquesta regió correspon a les regions sintèniques del cromosoma 7 en



ratolí i, sobretot al cromosoma 1 en rata (en una regió propera a un locus d'interès genètic en hipertensió) va fer decidir-nos a mapar el corresponent gen *Oatp-d* tan en rata com en ratolí. L'aproximació utilitzada va ser la de dissenyar uns primers específics pels dos gens i utilitzar un pannel d'híbrids de radiació, format per múltiples clons híbrids discrets construïts respectivament amb DNA genòmic de rata i ratolí, dins un *background* de hàmsster. Va procedir-se a realitzar les PCR corresponents i un cop analitzats els resultats d'amplificació positiva/negativa, va determinar-se llur posició genòmica en les regions D1-D2 del chr 7 (a uns 34 cM del centròmer) per el *Oatp-d* de ratolí, aproximadament entre els marcadors D7Mit182 i D7Mit212, i pel *oatp-d* de rata en el chr 1, en la regió 1q34-1q36, aproximadament entre els marcadors D7Got118 i D1Mit2.

A la *figura 71* es representa esquemàticament la posició genòmica aproximada de *MJAM* en el cromosoma 7 de ratolí.

FIG 71. Localització cromosòmica del gen *Oatp-d/mjam* murí. Es mostren les posicions aproximades dels gens propers al seu locus. Els resultats s'han contrastat i completat consultant els mapes del genoma de ratolí recentment seqüenciat, disponibles tan a les bases de dades del NCBI com del Ensembl (*Mus musculus*), [287]

3.6. Exàmen de les possibles implicacions en hipertensió: expressió renal i seqüenciació de *Oatp-d* en rates hipertenses i normotenses

En el transcurs del clonatge de l'*mjam* de ratolí, aparegué en les bases de dades un clon genòmic humà, el PAC pDJ430i19 (*acc. n°* AC005319), derivat dels projectes de seqüenciació del genoma humà (*veure figura 72*). El clon genòmic en qüestió, de 118 kb de longitud seqüenciat en la seva totalitat, contenia segments curts d'alta homologia amb el cDNA de ratolí corresponent a *MJAM/Oatp-d*, amb el que nosaltres estàvem treballant. En aquell moment tan el cDNA com el gen de l' *OATP-D* humà eren desconeguts, no

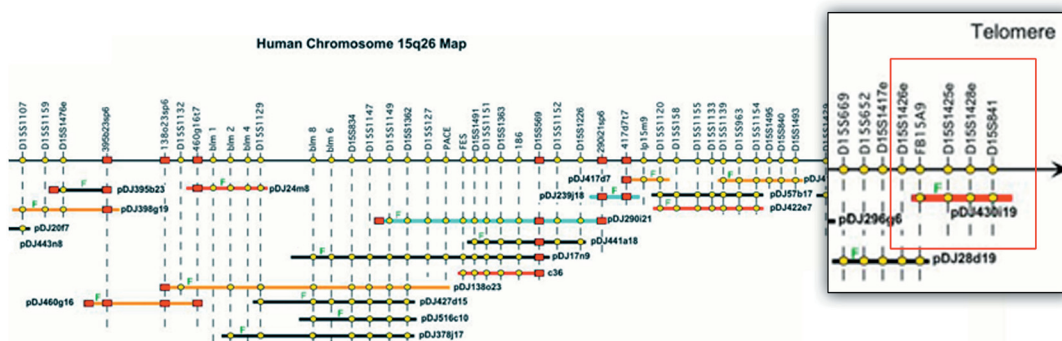


FIG 72. Mapa de la regió del chr 15q26 humà. Es mostren els diferents clons genòmics (BACs i PACs) solapants que conformen un contig, i els diferents marcadors polimòrfics derivats de la regió. En l'extrem de la dreta pot observar-se la posició del PAC pDJ430i19 que conté parcialment el gen *OATP-D* humà. El mapa deriva dels projectes de seqüenciació genòmica desenvolupats a la Universitat de Texas del Sudoest, *UTSW*

estaven encara publicats ni tan sols figuraven com a seqüència en les bases de dades. Tot plegat va fer-nos pensar de que es tractava del gen humà homòleg al *MJAM* murí i que les zones curtes d'homologia detectades correspondrien a les regions exòniques. Malauradament el PAC no englobava tot el gen putatiu, mancant-li l'extrem 5' del mateix. Una altra informació disponible va ser la seva localització cromosòmica, ja que el PAC humà havia estat mapat en el cromosoma 15. En aquest context, vam intentar el clonatge del hipotètic cDNA "MJAM" humà, dissenyant-se primers a partir de la seqüència del PAC homòloga al *MJAM* murí. Mitjançant RT-PCR i a partir de RNA humà de ronyó, es va aconseguir amplificar ~1,5 kb corresponents al extrem 3' del cDNA. L'homologia detectada amb el BLAST era vinculant: corresponia a exons *reals* d'un gen humà que s'expressava i donava lloc a un RNA missatger, com a mínim a ronyó. Un grup japonès introduïa al Genbank l'esmentada seqüència, batejant-la com a *OATP-D*, fet que aniria seguit al cap de pocs mesos per la corresponent publicació (Tamai, I. *et al.*, [231]) del clonatge i caracterització preliminar

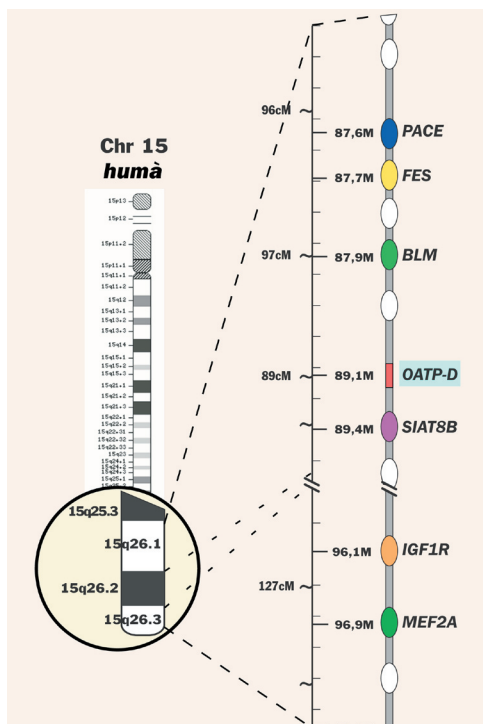


FIG 73. Mapa de la regió cromosòmica 15q25-26 humana. Representació esquemàtica de la regió q25-26 del cromosoma 1 humà. Es mostra el mapa físic aproximatiu i l'ordre relatiu dels gens (en base a l'informació disponible a les bases de dades del genoma humà del NCBI i de l'Ensembl, [287])

de varis membres humans, de la família de transportadors d'anions orgànics OATP, entre els que figurava evidentment el mateix *OATP-D*. En conseqüència, vam centrar-nos amb l'*Oatp-d* de ratolí.

El gen *OATP-D* humà, equivalent al *MJAM/Oatp-d* de ratolí, estava cartografiat en el cromosoma 15, concretament a la regió 15q26.1 (veure figura 73), a tenor de la informació proporcionada pel consorci humà de seqüenciació del genoma, disponible lliurement a les bases de dades públiques. Repassant per sobre la bibliografia sobre aquella regió genòmica –i gràcies també als suggeriments del Dr. Hubank de la *University College London, UK*–, es va trobar dos publicacions recents que associaven a nivell de *linkage* una zona del chr. 15q amb la pressió arterial (i més o menys propera a la regió del gen).

Krushkal J. *et al.* [238] havien encetat un estudi de *genome-wide linkage analysis* per mirar de localitzar possibles gens que afectessin la variació interindividual de la pressió sanguínia, en població nord-americana. Aquests autors varen identificar distintes zones en varis cromosomes suggestives d'estar contribuint al control de la pressió arterial –entre elles en el cromosoma 15, localitzada

en l'interval de 84-101 cM des de la punta del braç curt (equivaldria a nivell citogenètic aproximadament a 15q25-26).

El segon treball [288] era també un estudi de *linkage* a nivell de tot el genòma, realitzat en població rural xinesa de pressió sanguínia extrema; identifica un locus candidat proper al marcador D15S203, situat en l'extrem final del braç llarg del cromosoma 15, conclouent que l'esmentada regió podria estar implicada en la regulació de la pressió sanguínia (diastòlica). Quan comparàvem els resultats extrets dels dos treballs anteriors, vàrem observar que existeix poca correspondència entre els vèrils llocs d'influència en la pressió sanguínia identificats en l'un i l'altre, excepte en el cas del chr. 15, coincidint ambdós majoritàriament en la regió candidata.

Un altre bloc d'evidències deriva dels nombrosos estudis a nivell genètic sobre hipertensió que existeixen en rates, el model animal més utilitzat ja que permet realitzar anàlisis genètics de la variació de la pressió sanguínia utilitzant soques hipertenses i no hipertenses.

Tradicionalment s'han identificat al llarg del seu genoma, mitjançant l'entrecruament i selecció extensius entre soques genèticament hipertenses i soques de pressió sanguínia normal, un seguit de regions cromosòmiques delimitades per anàlisi de lligament genètic, que correlacionaven amb la major o menor predisposició a esdevenir hipertens. Aquests *loci* genètics, coneguts com a QTL (*quantitative trait locus*) o *locus* de caràcter quantitatiu, representen regions on podrien residir una sèrie de gen(s) que estaria(n) contribuint potencialment en el fenotip hipertens. Tan en rates de la soca SHR (hipertenses espontànies), com en la soca Dahl (hipertensió sensible a la sal), s'han identificat i refinat nombrosos QTL de pressió sanguínia en la majoria de cromosomes, però és d'especial interès per nosaltres els situats en el cromosoma 1 de rata. Estudis de diversos grups [289-291], realitzats independentment en diferents soques i sublínies congèniques, coincideixen en una regió localitzada difusament en un principi en la regió 1q31-1q35 i que posteriorment s'ha acotat i subdividit en varis QTLs.

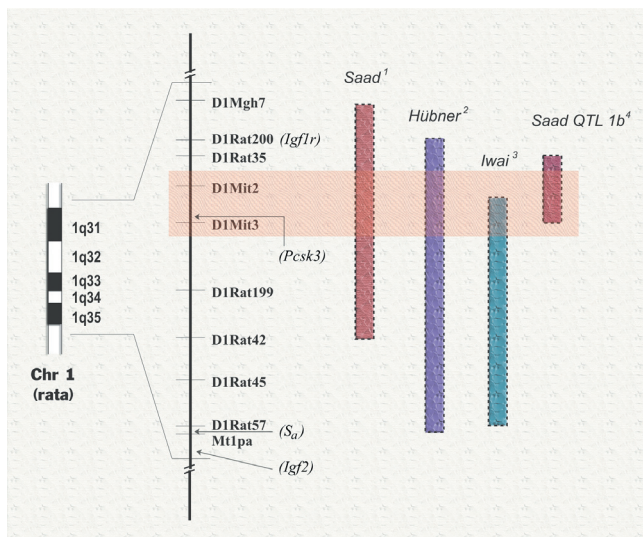


FIG 74. Representació esquemàtica dels diferents QTLs de pressió sanguínia identificats en el cromosoma 1 de rata. Es mostra acotada aproximadament la regió de coincidència entre els QTLs descrits per diferents autors: ¹Saad Y., *et al.*, [289]; ²Hübner N., *et al.*, [294]; ³Iwai N., *et al.*, [293]; ⁴Saad Y., *et al.*, [292]. Les posicions mostrades dels marcadors són orientatives i no estan dibuixades a escala; s'indica també la situació aproximada de varis marcadors genètics a títol aclaridor: *Igf1r*, *Insulin-like growth factor receptor 1*; *Pcsk3*, *furin precursor*; *Sa*, *Rat hypertension-associated homolog (acyl-CoA synthetase)*; *Igf2*, *Insulin-like growth factor 2 precursor*

Saad, Y. i col·laboradors inicialment van delinear un "QTL1" –en rates de la soca Dahl sensible a la sal– flanquejat pels marcadors Mt1pa i D1Mgh7 [289], que posteriorment han acotat i refinat desdoblant-lo en varis components; un d'ells (el batejat com QTL1b) es situaria entre els marcadors D1Rat35 i D1Rat131, en la mateixa soca anterior [292]. D'altra banda, en estudis duts a terme per Iwai N. *et al.*, [293] treballant amb rates SHR, han capturat el QTL delimitat aproximadament per D1Mit3 i D1Rat57, mentre que en una línia congènica derivada de les SHR-SP (*SHR stroke prone*), el segment d'influència en la pressió sanguínia correspondria al QTL puntejat pels marcadors Mt1pa i D1Rat200 [294]. A la figura 39 s'il·lustren tots aquests QTLs amb efectes sobre la pressió sanguínia anomenats; com podrà observar-se (en la figura 74), totes les regions delimitades a partir de vèrils soques

congènites en estudis independents es solapen potencialment als voltants de la zona definida pel QTL *Ib*, entre el marcador D1Rat35 i més enllà (ens sentit telomèric) del D1Mit3, i on podria residir l'element genètic comú atesa la correspondència de fenotips observada. De manera complementària, anomenar que aquesta regió del cromosoma 1 de rata equival a la regió sintènica 15q25.1-15q26.1 del cromosoma 15 humà i, que correspon aproximadament amb els QTLs descrits per Krushkal *et al.* i Xu *et al.* en humans en aquell cromosoma; es a dir, que les dades comparatives entre rata i humans troben correspondència en aquesta zona on precisament hem localitzat putativament al gen *Oatp-d* en rates (*i.e.* en una zona delimitada per els marcadors gènics *Igfr1* i *Pcsk3*), regió sintènica alhora amb el cromosoma 7 murí (chr. 7 D1) on també hem confirmat que es troba el gen *Oatp-d* de ratolí (Fig. 75).

D'altra banda, s'ha d'emfatitzar que les regions genòmiques implicades en aquesta exposició són força grans i, malauradament les dades de mapatge i les posicions disponibles de marcadors no són sempre acurades, de manera que l'alineament resultant entre diferents espècies no és gaire precís. Amb

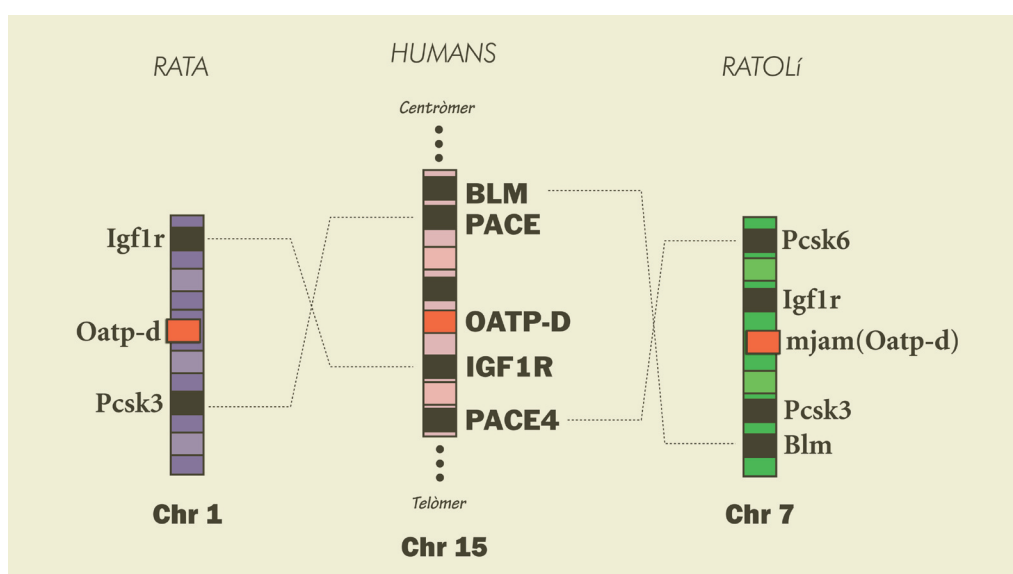


FIG 75. Mapa comparatiu entre humans, rata i ratolí de les regions sintèniques al chr 15q26 humà. Es mostra la posició aproximada dels diferents gens –però no tots, identificats en cada zona (en llurs posicions relatives, segons els mapes disponibles del NCBI). Notar la inversió en el sentit del segment cromosòmic en rosegadors respecte humans. En vermell la situació temptativa del gen OATP-D/Oatp-d de cada espècie. Aquest mapa comparatiu s'ha construït basant-se en l'informació genòmica i els diversos mapes disponibles a les bases de dades públiques

tot, creiem però suggestiva la coincidència entre les espècies humana i en rates d'un QTL hipotèticament similar; restaran nous experiments i estudis per delimitar més finament la regió responsable i identificar definitivament els element(s) genètic(s) o gen(s) responsable(s) situats en aquell *locus* que podrien estar contribuint (entre molts d'altres d'arreu del genoma) a un fenotip amb tendència a la hipertensió.

Un tercer punt grup de dades fan referència al conjunt de bibliografia recent que relaciona i atorga un important paper als andrògens en el desenvolupament i regulació de la hipertensió en varis models de rates hipertenses [296]. La castració a l'edat de 3-5 setmanes atenua la pujada en la pressió sanguínia en rates de les soques SHR i Dahl sensibles a la sal [295-297, 120]; el mecanisme però, pel qual es produïrien aquests efectes encara resta desconegut. Per una altra banda, existeixen evidències substancials que suporten la teoria que algunes formes de disfunció renal juguen un rol en el desenvolupament i la progressió de totes les formes d'hipertensió [123].

A la vista d'aquestes consideracions prèvies i tenint present les dades esmentades, (*i.e.*, l'elevada homologia entre *Oatp-d* d'humans i de rosegadors, sinònim de funció o funcions altament conservades

–i per tal suposadament vitals; la localització cromosòmica del gen en humans i en rata (temptativa), situada en una regió bressol de QTLs amb influència en la pressió sanguínia –veure figures 73 i 74– i la regulació per andrògens que presenta la seva expressió a ronyó murí), ens varem plantejar investigar les següents qüestions:

- i) Provar de localitzar finament a nivell genòmic el gen en ratolí i en rata, mitjançant *Radiation hybrid mapping* (ja fet, *vide supra*, apartat 3.4)
- ii) Estudiar-ne l'expressió del mRNA als ronyons de rates amb tensió normal (Wistar-Kyoto) i en rates genèticament hipertenses (SHR)
- iii) Seqüenciar els cDNAs de *Oatp-d* corresponents de cadascuna d'aquestes dos soques per veure si existeix alguna diferència entre elles

Expressió de *Oatp-d/Pgt2* al ronyó de rates de les soques WKY i SHR

Per avaluar si podien existir diferències d'expressió renal entre les dos soques de rata esmentades, es va procedir a realitzar una estimació per RT-PCR dels nivells de mRNA de *Oatp-d*, a partir de RNA total renal. Amb aquest objectiu es varen obtenir rates mascle adultes –dues rates per situació– de les soques Wistar-Kyoto i SHR, algunes de les quals varen ser gonadectomitzades (veure apartat MATERIALS, 1.2 i 1.4). Després de un període de recuperació, els animals castrats i control es van sacrificar i se'ls hi va extreure els ronyons, a partir dels quals es preparà el RNA corresponent. Per amplificar específicament el missatger de *Oatp-d* s'utilitzaren primers adients, derivats de la regió codificant, i les condicions d'amplificació van ajustar-se per tal que ens mantinguéssim dins la zona lineal de l'amplificació, tot evitant que les reaccions entressin en una fase de saturació; com a gen control de referència es va utilitzar la ciclofilina A (les condicions de les reaccions es resumeixen a la *taula XXX*).

TAULA XXX. Característiques i condicions de la RT-PCR

primers (5'→3')	Amplicó	Motlle	Condicions (abreujades)
<i>Oatp-d</i> rD 1201f - CTGCGATGGAGATTGCTGTG	regió: ~1200-2000' (~0,8 kb)	125 ng de RNA _T de ronyó de rata	RT @48°C, PCR @58°C; 24 cicles
<i>Oatp-d</i> rD 2017r - GCGATGCTGACGTACAGGT			

*Posicions d'anclatge aproximades (en nt) respecte al cDNA acc.n: AF239219; Per la ciclofilina A s'han utilitzat les mateixes condicions aquí descrites (per la seqüència dels seus primers, veure apartat MATERIALS, secció 6., taula oligonucleòtids II)

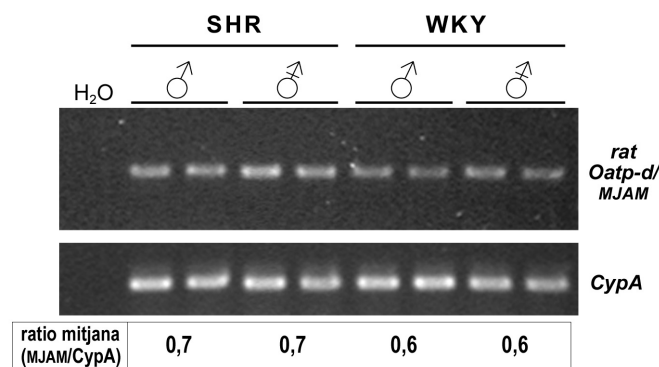


FIG 76. Expressió de *Oatp-d* a ronyó de rates SHR i WKY. Estimació qualitativa dels nivells d'expressió per RT-PCR de *Oatp-d* en rates (mascles i castrades) de les soques SHR i WKY. Es mostren les ratios aproximades entre els valors derivats de la densitometria del gel (tenyit amb EtBr).

El resultat d'aquests experiments es mostren a la figura 76. Com pot observar-se, els nivells renals d'expressió d'*Oatp-d* entre les dues soques –determinats amb aquesta tècnica particular– són força

semblants, com també ho són els nivells entre les rates control i les castrades de cada soca; potser en les rates SHR s'intueix una tendència alcista, però en tot cas dins els marges de variació experimental típics i per tant per res significatius. Per facilitar la interpretació s'ha adjuntat els valors de les *ratio* corresponents a les densitometries de cada banda (tot i no representar dades completament quantitatives).

Seqüenciació del cDNA codificant per *Oatp-d* en rates SHR i WKY

La seqüència del cDNA del *Oatp-d* de rata que correspon a la part codificant únicament (disponible al *Genbank*TM com a "Pgt2", acc. nº AF239219), es va allargar computacionalment en sentit 5' i 3' amb l'ajut de ESTs de rata extrets de la base de dades *dbest* (i que presentaven identitat amb *Oatp-d*). Amb aquestes noves seqüències que corresponien a les zones no traduïdes del cDNA es van reconstruir els UTRs obtenint una seqüència d'una llargada total de 2,7 kb (no es mostra), amb prou tros per poder dissenyar *primers* amb els que amplificar tot la regió codificant. A partir d'aquesta nova seqüència virtual del putatiu *Oatp-d* de rata es varen dissenyar una sèrie de *primers* específics que cobrissin tota la seva extensió (veure taula oligonucleòtids II, apartat MATERIALS, pàg. 105).

Es va aïllar RNA total a partir dels ronyons de les rates WKY i SHR de 9 setmanes d'edat. Amb aquest RNA extret es varen realitzar les corresponents RT-PCRs amb les parelles de *primers* esmentades, amplificant una sèrie de fragments de cDNA solapats que cobrissin la seqüència sencera de cDNA així com les regions immediates 5' i 3' flanquejants; els productes obtinguts van ser purificats i seqüenciats directament, amb dideoxiterminadors fluorescents utilitzant un seqüenciador automàtic. Tots els fragments de PCR van ser generats en duplicat a partir de mostres independents de RNA, derivades de varies rates individuals de les soques SHR i WKY.

S'ha seqüenciat completament la regió codificant del gen *Oatp-d* en rates de les soques WKY i SHR. L'anàlisi comparatiu de les seqüències del cDNA entre les dues soques no ha detectat en principi diferències a nivell de cap nucleòtid. Cal esmentar que per tenir una major certesa caldria disposar de la seqüència genòmica (de la qual no disposem), amb els corresponents exons en cada cas, per descartar completament l'absència de polimorfismes entre aquestes dos soques. Evidentment només s'ha examinat la seqüència codificant (accedint-hi via mRNA), quedant per escutar les zones reguladores del gen i les regions intròniques. Ara per ara però, no disposem de suficients dades per afirmar o negar que el gen *Oatp-d* presenti variacions genotípiques entre les rates hipertensives SHR i les normotenses WKY. D'altra banda, s'ha localitzat una única diferència comparant entre les dos soques i la seqüència prèvia existent al *Genbank*TM –derivada de la soca *Norway Rat* (acc nº AF239219); aquest polimorfisme (*nt* 1337) consisteix en el canvi d'una G (present en WKY i SHR) enlloc d'una T (present en la soca *Norway*); aquesta variació provoca un canvi no-conservatiu en la proteïna predita corresponent, situat al codó 446, passant-se d'una Valina (*norway*) a una Glicina (WKY&SHR). Malauradament tampoc disposem d'informació sobre si aquest canvi aminoacídic pot influir a nivell funcional en el polipèptid resultant, restant futurs estudis per aclarir totes aquestes qüestions.