

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

RESULTATS

**DISCUSSIÓ**

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

El nostre laboratori ha estat interessat tradicionalment en l'estudi dels mecanismes de regulació androgènica a ronyó, teixit que presenta –particularment en ratolins– una marcada inducció de l'expressió gènica en resposta a les hormones andrògenes. Entre els gens d'expressió estimulada trobem el del *Kap* (*kidney androgen-regulated protein*), amb la peculiaritat de ser pràcticament exclusiu del túbul proximal i d'ésser un dels gens d'expressió renal més abundant en ratolins mascles [298, 299, 57]. L'estudi i la caracterització de la regulació multihormonal del gen del *Kap* ha centrat part de la feina duta a terme al laboratori en els últims anys [300, 94, 57, 58].

Com ja s'ha exposat a la introducció i als objectius (pàgina 91), malgrat el fet de que existeixen un nombre de gens regulats pels andrògens caracteritzats clàssicament a ronyó, com el mateix *Kap*, l'*Odc* (*ornitina descarboxilasa*) o l'*Adh-1* (*alcohol deshidrogenasa-1*) entre d'altres [96], a nivell molecular es desconeix gran part dels mecanismes implicats en llur regulació específica i també la significació fisiològica. Els andrògens en el ronyó sovint no afecten només a gens individualitzats, sinó que activen una sèrie de gens simultàniament –amb diferents cinètiques d'inducció, però implicant en conjunt l'establiment de xarxes gèniques, amb un conjunt de gens (la majoria enzims o proteïnes transportadores) regulats coordinadament, l'estudi del qual pot aportar noves pistes per entendre el paper fisiopatològic del dimorfisme sexual renal.

Amb aquestes consideracions prèvies i aprofitant l'experiència acumulada al laboratori referent a l'estudi dels andrògens en el ronyó murí, va plantejar-se la possibilitat d'iniciar un nou projecte que ampliés l'horitzó d'estudi en aquest camp, basat en la identificació i caracterització de nous gens regulats pels andrògens a ronyó en el model de ratolí, estimulats sota condicions semblants. L'estratègia va centrar-se en tècniques d'anàlisi diferencial de RNA, prenent com a objectes d'examen els ronyons control de ratolins femella respecte ronyons de femelles estimulades amb DHT [133]. Producte d'aquests experiments es va aconseguir identificar en el laboratori una sèrie de fragments gènics expressats, corresponents a gens d'expressió renal sexualment dimòrfica.

La continuació natural d'aquests treballs preliminars consistia en prosseguir l'estudi d'aquests nous gens, alguns d'ells completament desconeguts. En aquest punt és on s'inicia el treball recollit en aquesta tesi.

El primer punt a resoldre era el de restringir òbviament el nombre de gens a tractar, reduint-los fins a una quantitat raonable per un treball experimental de tesi. Per tan calia escollir d'entre els diferents gens identificats els millors candidats (o si més no els més atractius sota el nostre punt de vista) per tal de continuar en la seva caracterització. Del total de bandes de cDNA identificades (veure *taula XV*, pàg. 91), vàrem escollir-ne finalment tres: l'anomenada 5.1RDA (corresponent al citocrom P450 *Cyp4b1*), la 7.1RDA (amb homologia al transportador d'anions orgànics *Oatp1* de rata) i la 7.1RDA (sense homologies significatives amb cap seqüència del *Genbank*<sup>TM</sup> per aquelles dates) batejada com a MJAM. Una quarta banda, la 8.1RDA (amb homologia al gen *S<sub>A</sub>* de rata i humà), també va escollir-se per el seu posterior estudi, però en aquest cas objecte d'una altra tesi i formant part d'un altre projecte del laboratori.

Tornat als gens escollits, el primer d'ells corresponia al *Cyp4b1*, el qual ja havia estat descrit feia

temps en ratolí i en altres espècies incloses la humana [139, 172, 173]; tot i això, repassant la literatura, com que el coneixement que es disposava de llur regulació renal era bastant limitada i la seva aparent expressió restringida només a pulmó i ronyó (regulat per andrògens en aquest últim teixit), va fer decidir-nos per ampliar el seu estudi, enfocat en el clonatge del gen i del promotor corresponent –que encara no estava descrit, com a pas previ per l'anàlisi d'elements reguladors en el seu promotor (o eventualment en regions intergèniques) tal i com havia estat realitzat pel gen del *Kap* [301, 58].

Pel cas de la segona banda, identificada com a un presumpte membre de la família de transportadors orgànics a ratolí, de la qual es coneixien encara comptats representats murins per aquella època, vàrem considerar que seria interessant clonar el corresponent cDNA complet i contribuir a l'establiment de la família dels *oatp*'s murins, sense deixar de banda la seva regulació androgènica a ronyó.

Finalment, l'última banda diferencial de cDNA identificada, la “MJAM”, va ser escollida en base a la desconeixença total que oferia. L'anàlisi per *northern-blot* en diferents teixits de ratolí femella, revelava que l'expressió del gen corresponent era pràcticament ubiqua [133], fet que va fer-nos pensar *a priori* que podia tractar-se d'un gen amb una funció cel·lular bastant bàsica o de tipus *house-keeping*. Abans de qualsevol conclusió calia, però, clonar també el seu cDNA *full-length* per veure si aquest ja presentava alguna homologia amb quelcom conegut, així que l'afegirem a les dos anteriors com a objecte d'estudi constituent del treball experimental.

## **Cyp4b1**

### *Expressió en els teixits de ratolí i regulació androgènica a ronyó*

Les concentracions més grans d'enzims CYP en els teixits de mamífers les trobem al fetge. Com a conseqüència d'aquest fet no és d'estranyar que molts estudis s'hagin centrat en la caracterització molecular i bioquímica de les hemoproteïnes P450 hepàtiques i la seva regulació. D'altra banda, malgrat que el contingut de P450 en els microsomes renals és substancial (un 20-25% els del fetge)[302], no es disposa de tanta informació respecte les hemoproteïnes renals.

En el seu treball precedent, imaoka et al. localitzaven al Cyp4b1 a nivell proteic (mitjançant *immunoblot*) en els microsomes renals i pulmonars d'ambdós sexes, detectant la banda de major intensitat –d'entre totes– en la fracció microsomal dels ronyons de ratolins mascle [139]. Els nostres resultats confirmen aquestes troballes, ja que mitjançant RT-PCR hem detectat expressió a nivell de missatger només a pulmó i ronyó (amb una major expressió qualitativament en aquest darrer teixit), d'entre un total de 10 teixits murins. Fora d'aquests teixits examinats, en rata i ratolí també s'ha trobat expressió de Cyp4b1 en la bufeta urinària, on sembla que podria estar patint una regulació androgènica [184].

El fet de que tan la proteïna com el mRNA del *Cyp4b1* es trobin augmentats en els mascles pot suggerir que les diferències d'expressió renal entre sexes es donen principalment a nivell d'expressió gènica, però caldrien experiments addicionals per determinar si es tracta de fenòmens transcripcionals, post-transcripcionals o d'altres. Respecte a l'absència d'expressió de *Cyp4b1* a fetge, malgrat que en conill sí que s'ha trobat expressió [172], nosaltres hem estat incapaços de detectar-la en el fetge murí confirmant resultats previs d'altres autors [139, 185]; com a conclusió, remarcar que existeixen importants diferències entre espècies en els patrons d'expressió específica de teixit –pel que fa a aquest CYP concret, i que com a mínim en ratolí es tractaria d'una forma majoritària en els microsomes renals de mascle.

Les principals propietats catalítiques del Cyp4b1 han estat determinades per diferents autors [139, 172, 303-305], sobretot pel que respecta a la seva acció sobre xenobiòtics i procarcinògens. El 3-metoxi-4-aminoazobenzè (3-MeO-ABB) és un potent procarcinògen que pot ser activat metabòlicament per els P450 i que indueix tumors hepàtics en rates [139]. En els teixits extrahepàtics aquest tòxic també pot ser modificat per l'acció de la maquinària metabòlica local (que en el cas del 3-MeO-ABB es tractaria d'enzims diferents dels hepàtics). Concretament, en el ronyó murí s'ha descrit una elevada activitat dels microsomes renals en l'activació metabòlica del 3-MeO-ABB, amb una marcat dimorfisme sexual favorable als ratolins mascle [306]. Aquests mateixos autors també han observat que aquesta activitat enzimàtica renal (responsable de l'activació mutagènica –via *N*-hidroxilació, del 3-MeO-ABB), presenta dependència androgènica ja que els ratolins BALB/c mascle mostren una activitat microsomal vers aquest substrat molt superior a la de les corresponents femelles (que pràcticament no mostren activitat).

La castració dels mascles aboleix la *N*-hidroxilació renal del 3-MeO-ABB fins a nivells quasi indetectables, que es poden recuperar per administració de testosterona. La dependència amb l'edat en l'expressió renal de l'esmentada activitat enzimàtica sembla correlacionar bé amb la maduració sexual del ratolí mascle, començant a manifestar-se a partir de la 4 setmana de vida (coincidint amb l'inici de la pubertat) i mantenint-se incrementada fins a l'envelliment [306]. Estudis posteriors, basant-se amb la utilització d'inductors químics i de inhibidors, Imaoka, S. *et al.*, [129] han demostrat que l'enzim responsable en ratolins de l'activació renal del tòxic 3-MeO-ABB és el Cyp4b1. Per tan podem assumir amb certa precaució que l'enzim responsable de les observacions de Degawa, M. *et al.*, esmentades prèviament ([306]), correspondria al Cyp4b1, fet que concorda a la regulació androgènica i abundant expressió renal en mascles que també s'ha determinat en aquest treball.

Donat que es poden manifestar diferències d'expressió i regulació entre formes gèniques individuals –especialment pel cas dels citocroms P450– en funció de l'edat, sexe, espècie (i soca), vàrem proposar-nos a continuació avaluar si els esteroides sexuals també intervenien en la regulació de l'expressió renal del *Cyp4b1* en vàries soques consanguínies de ratolí. Utilitzant el seu cDNA murí corresponent com a sonda, hem confirmat mitjançant northern-blot que el gen està regulat pels andrògens en el ronyó de ratolins BALB/c, 129/Sv i C57BL/6 (B6); la castració de ratolins mascle provoca una davallada dels nivells renals de mRNA del Cyp4b1 en les tres soques esmentades (*Fig. 39, pàg 135*).

Treballs previs utilitzant tractaments amb andrògens (concretament DHT) de femelles i mascles B6 castrats, així com de fàrmacs antiandrogènics (*flutamida*) han suggerit que la resposta inductora estaria mediada pels andrògens via receptor d'andrògens [133].

Les diferències entre mascles i femelles en resposta a toxines ambientals, drogues i carcinògens han estat estudiades de manera extensiva en el ronyó de ratolí [307-309]. Aquestes diferències s'expressen a nivell d'una taxa metabòlica diferencial per determinats compostos químics, amb velocitats de metabolisme renal majors (en general) en els mascles que les femelles, per determinats compostos. Aquest dimorfisme sexual vindria determinat primàriament per la testosterona [34] malgrat que el mecanisme molecular d'aquesta diferència no està comprès del tot. Alguns estudis han aportat evidències sobre el fet de que les hormones masculines podrien modular el sistema renal dels citocroms P450 a ratolí, amb la conseqüent modificació del metabolisme de xenobiòtics [308, 130]. Molt probablement, aquesta diferència estarà contribuint a la incrementada nefrotoxicitat i carcinogènesi induïdes químicament en els mascles [309]. Estudis epistemològics han mostrat també que la incidència del carcinoma renal en

humans és el triple en homes que en dones [311].

Així doncs l'activació metabòlica de determinats procarcinògens per part dels CYPs en regions específiques pot contribuir a augmentar l'incidència de tumors en la regió. La presència de P450 com el Cyp4b1 en el cortex renal podria augmentar la susceptibilitat de les cèl·lules epitelials proximatubulars a la carcinogènesi.

En humans, s'ha reportat que els carcinomes pulmonars exhibeixen nivells d'expressió elevats del mRNA de CYP4B1 respecte el teixit normal [312] i que en rates, la regulació androgènica del Cyp4b1 és la responsable del major índex en mascles d'activació de carcinògens a la bufeta urinària [179]. En conjunt, tota aquesta informació suggereix la existència de una possible associació en la sobrerregulació pels andrògens a ronyó d'aquest membre de la família dels citocroms P450 i la ben documentada major incidència del carcinomes renals de cèl·lules clares (ccRCC, *clear cell renal cell carcinoma*) en homes que en dones; de forma interessant, la majoria d'aquests tumors s'originen a partir de les cèl·lules epitelials del túbul proximal, que són precisament les dianes cel·lulars de l'acció andrògena.

Per delimitar la distribució del missatger de Cyp4b1 a ronyó es varen realitzar experiments d'hibridació *in situ* sobre talls de ronyó murí obtinguts amb criostat. Donada la gran expressió renal del seu mRNA es va optar per utilitzar un protocol de *in situ* no radioactiva, utilitzant ribosondes marcades amb digoxigenina i detectades colorimètricament. Majoritàriament el trobem expressat abundantament a còrtex a nivell tubuloproximal, de manera similar a d'altres CYPs expressats a ronyó [166].

Altres citocroms P450 murins expressats renalment com el Cyp2e1, responsable entre d'altres de l'activitat *demetilasa* sobre el compost químic *nitrosodimetilamina* (NDMA), pateixen una regulació per andrògens semblant: el tractament de femelles amb testosterona indueix els seus nivells renals de mRNA fins a 50 vegades, respecte els animals control [138]. El seu mecanisme d'inducció depèn clarament de la presència del receptor d'andrògens, ja que en ratolins *Tfm* (mancats d'un receptor androgènic funcional) els nivells dels mascles s'equiparen al de les femelles.

Malgrat que el rol fisiològic del Cyp4b1 encara no ha estat ben determinat, la seva abundant expressió renal i distribució restringida a les cèl·lules del túbul proximal podria estar apuntant cap a unes implicacions funcionals i toxicològiques importants.

#### *Clonatge genòmic i anàlisi del promotor*

L'estructura genòmica determinada pel *Cyp4b1* consta de 12 exons, de manera similar a la d'altres membres de la família *Cyp4*. Aquest fet pot suggerir un possible origen comú i posterior duplicació, ja que es troben tots localitzats molt propers en el chr 4. el locus del *Cyp4* a ratolí troba el corresponent sintènic en humà on també trobem la família *CYP4A* i *CYP4B* molt propera. Els resultats obtinguts s'han contrastat amb la recent seqüència del genoma de ratolí oferta pel *mouse genome consortium*, obtenint-se una verificació de la seqüència dels *boundaries* entre exons i introns. El gen del *Cyp4b1* murí està codificat per 12 exons distribuïts al llarg d'unes 17 kb, amb un rang de mides des de 45 pb fins a 500 pb. Tots els llocs acceptors/donadors de *splicing* s'avenen amb la regla AG/GT. El primer exó descrit conté el codó d'inici de traducció, deixant un 5'-UTR de només 19 pb. Aquesta estructura és compartida per altres membres de la subfamília de citocroms P450 *Cyp4*, que consten d'una distribució i un nombre similar d'exons [169].

L'inici de transcripció –determinat per 5'-RACE i *primer extension*– ha resultat ser doble, ocorrent en dos posicions properes, amb un dels dos com a lloc d'inici majoritari (el situat a 34 pb respecte l'inici de traducció). Propera a aquesta regió s'ha identificat una putativa caixa TATA (GTATAAGA), bastant semblant a la seqüència canònica (<sup>G/C</sup>)TATA(A/T)A. Com la majoria de regions promotores, la regió flaquejant 5' proximal del *Cyp4b1* és rica en GC més que en AT's, identificant-hi diferents llocs potencials d'unió a factors de transcripció. Entre d'altres, tres putatives caixes GC (de reconeixement per Sp1) properes a la caixa TATA. En aquest punt no està clar quins d'aquests elements putatius (o d'altres encara per identificar) jugaran un paper important en la regulació transcripcional del *Cyp4b1*, l'avaluació de la qual requerirà d'estudis addicionals.

Quan es col·loca en front d'un gen reporter, el promotor del *Cyp4b1* és capaç d'iniciar la transcripció gènica basal d'una manera més o menys cèl·lula específica, ja que s'obtenen les activitats més elevades en les cèl·lules PCT3 i PR10, de túbul proximal renal. D'entre tots els fragments de promotor generats, la construcció –137*luc* ha estat la que ha ofert una activitat luciferasa màxima que es perd paulatinament al reduir el fragment successivament fins els nucleòtids –98 i –48, perdent-se completament en aquesta última construcció; l'anàlisi seqüencial d'aquest segment de 50 nt (entre –48 i –98) revela a priori un putatiu lloc MZF-1 localitzat en la posició relativa –55, la importància del qual en l'estimulació de la transcripció s'haurà de definir en futurs estudis.

El factor MZF-1 ha estat considerat un factor de transcripció propi de les cèl·lules hematopoïètiques, expressat majoritàriament en les línies mieloides en diferenciació (per una revisió, [313]). *In vitro*, s'ha determinat que MZF-1 és capaç de reprimir l'expressió de gens reporters en línies cel·lulars no hematopoïètiques mentre que n'activa l'expressió en les línies hematopoïètiques, suggerint que la presència de adaptadors i reguladors específics de teixit podrien determinar la funció reguladora transcripcional del MZF-1 [314].

Quan s'ha testat el promotor per avaluar la seva resposta androgènica, les induccions detectades han estat bastant discretes, en comparació amb el control positiu quimèric (1xARE*Cyp98luc*) construït inserint un element de resposta a andògens canònic en la construcció –98*luc*. Aquestes respostes baixes inclús cotransfectant amb el receptor d'andrògens humà podrien explicar-se com que en els fragments analitzats no es troben presents elements de resposta, que residirien més *upstream* de les –1,8 kb estudiades en aquest treball; tampoc no descartem que estigues originat per l'absència de factors necessaris requerits per l'inducció del gen del *Cyp4b1* absents en aquestes cèl·lules, tot i que l'alta expressió del control positiu desaconsella aquesta hipòtesi, indicant que la línia PCT3 disposa de tots els factors necessaris com a model cel·lular vàlid per l'estudi de la regulació androgènica, com s'ha confirmat en un recent treball del nostre grup [58]. Una altra possibilitat addicional és que l'acumulació de mRNA (nivells a l'estat estacionari) observada *in vivo* vingui justificada –com a mínim en part–, per una regulació post-transcripcional del gen tal com s'ha descrit per altres CYPs a ronyó [163]; en aquest moment no podem descartar aquesta darrera hipòtesi ja que no disposem de informació sobre les taxes renals de transcripció del *Cyp4b1* entre ratolins mascles i femelles.

Com a resum final d'aquesta part, hem aïllat i caracteritzat el gen i la regió promotora del *Cyp4b1* murí. A més a més, hem investigat la seva expressió en els teixits de ratolí i la distribució del seu mRNA dins el ronyó.

## Caracterització del *Oatp1* i *Oatp-d* murins

### *Aspectes generals*

El present treball descriu dos nous membres de la família murina dels transportadors d'anions orgànics, *Oatp-1* i *Oatp-d*, dels quals s'ha analitzat els perfils d'expressió, regulació renal, així com algunes funcions de transport pel cas del primer. Ambdós s'han obtingut durant els experiments d'identificació de gens regulats per andrògens a ronyó. Els dos transportadors clonats estan estructuralment relacionats amb la resta de *Oatps*; a partir dels seus perfils d'hidropatia s'infereix que per totes aquestes proteïnes es prediu una estructura amb l'existència de 12 dominis transmembrana

*MJAM* és peculiar respecte altres *Oatps* en diversos aspectes, juntament amb els seus equivalents d'humans (*OATP-D*) i de rata (*Pgt2*) –amb els que es troba molt estretament vinculat– han divergit conjuntament a nivell de seqüència dels altres membres de la superfamília; a nivell d'aminoàcids, el *MJAM* és únicament un ~30-40% idèntic a cadascun dels altres *Oatps*, comparat amb les identitats del ~30-80% mostrades entre els altres transportadors. A més a més els extrems *N-t* i *C-t* apareixen força diferents respecte altres proteïnes de la família, especialment un segment altament bàsic a l'extrem *N-terminal* (...RNKKKKKKV...).

Les diferències en l'especificitat de substrat i la distribució tissular desigual fa dificultós l'assignació d'ortòlegs entre els *Oatp* de rata i els *OATP* humans [232]. Per aquest motiu és important identificar els *oatps* de ratolí, per tal de que amb la informació derivada es pugui facilitar el procés d'assignació esmentat; la sintènia entre humans i ratolins està ben establerta: el clonatge i el coneixement de la localització cromosòmica del *oatps* murins, d'aquesta manera, els possibles ortòlegs humans dels *oatp* a rosegador poden ser més fàcilment identificats en el ratolí. A més a més, el ratolí constitueix un model manipulable genèticament, oferint la possibilitat de suprimir gens d'*Oatp* individualment (mitjançant les tècniques de *knock-out*), amb la finalitat d'extreure informació sobre la importància fisiològica d'aquests transportadors.

Els perfils d'expressió dels dos *oatp* clonats, s'han determinat mitjançant RT-PCR. S'han utilitzat primers específics de cada gen, evitant-se possibles reaccions creuades aparegudes en *northern-blot* en l'anàlisi d'altres *oatps* [205, 209], amb el que s'ha pogut determinar amb precisió l'expressió de cada gen; aquests patrons d'expressió poden aportar pistes útils per esbrinar els seus rols fisiològics *in vivo*.

En particular, el *Oatp1* s'expressa exclusivament a fetge i a ronyó suggerint que realitza un paper específic en aquests teixits, per contra, *MJAM* està expressat a nivells significatius en un ampli rang de teixits, postulant-se un paper més *house-keeping* o una funció més general requerida en la majoria de teixits

### *Oatp-1*

El primer dels dos nous membres que hem clonat a ratolí ha estat l'anomenat *Oatp1*. Com es descriu a resultats, a partir del clon parcial 7.1*RDA* es va aconseguir obtenir després de varis intents el seu cDNA sencer a partir de ronyó. Simultàniament al treball de caracterització del nou membre aïllat de la família murina dels *oatps*, que s'estava duent a terme al laboratori, va aparèixer una publicació en la qual es descrivia el clonatge del mateix gen amb el qual nosaltres estàvem treballant [240]. Els autors havien obtingut el nou cDNA a partir de fetge de ratolí BALB/c, anomenant-lo *Oatp1* (i en conseqüència li fou

assignada posteriorment la nomenclatura de *Slc21a1*). La justificació de l'elecció d'aquest nom, triat per analogia amb el del *Oatp1* de rata ja conegut [190], la basaven en criteris d'homologia, característiques funcionals i distribució tissular, suggerint que s'havia clonat l'ortòleg murí del *Oatp1* de rata citat [240].

Per la nostre banda, tal com es descriu a l'apartat resultats, havíem aconseguit isolar un cDNA sencer de 3,2 kb de llargària que codificava per una proteïna deduïda de 670 aa, que es revelà totalment coincident amb el transportador reportat més tard per Hagenbuch *et al.*, [240] (*GenBank acc.* AF148218). En el nostre anàlisi inicial, el nou membre de la família murina de polipèptids de transport d'anions orgànics que teníem entre mans presentava homologies significatives amb varis *oatps* de rata i humans; concretament, les identitats més elevades (a nivell d'aminoàcids) corresponien amb l'*oatp1* i l'*oatp3* de rata (81 i 80% respectivament), mentre que a nivell de nucleòtids eren del 88% pels ambdós. Si bé en un principi no quedava clar de quin dels dos representants de rata en podria constituir *a priori* l'equivalent, vàrem adoptar en definitiva la nomenclatura d'*Oatp1* per designar-lo.

Si es compara el cDNA descrit per Hagenbuch *et al.* amb el nostre clon (obtingut a partir de ronyó de ratolí C57BL/6 s'observa que tot i exhibir idèntica seqüència codificant, el cDNA renal (*GenBank acc.* AF223067) consta d'una regió 3'-UTR molt més llarga (en total, 0,5 kb més extensa). La presència de varies senyals putatives de poliadenilació al llarg del segment 3'-UTR pot explicar la coexistència de varis transcrits amb longitud variable en el seu extrem 3', fet que concorda amb les múltiples bandes observades per northern-blot tan a fetge com a ronyó per l'*Oatp1* murí. Aquest fet es remissiu del que succeeix per altres membres de la família dels *Oatps*, alguns dels quals també presenten múltiples bandes de mida variable en llur transcrits [190, 201, 205]. Fruit del resultat obtingut per *northern-blot* amb l'ús de diferents sondes del *Oatp1* murí (*Fig. 51, pàg. 177*), podem indicar que com a mínim varies de les espècies de mRNA detectades per northern-blot corresponen a longituds variables en llur regió 3' no traduïda, més que a espècies concernents a altres membres relacionats de la família o a transcrits alternatius de *Oatp1* amb divergències en l'ORE. En aquests moments desconeixem si aquesta característica d'exhibir diferents regions 3'-UTR, representa algun tipus de avantatge en quan a estabilitat del mRNA o en l'eficiència traduccional del missatger, i si alguna d'aquestes formes és utilitzada preferentment d'una manera teixit-específica [143].

Actualment ja s'han clonat molts altres membres murins de la família dels *Oatps*, disposant-se de les seves seqüències corresponents. Si construïm un arbre filogenètic amb tots ells (*Fig. 67, pàg. 191*) es pot observar que l'*Oatp1* (*Slc21a1*), juntament amb l'*Oatp5* (*Slc21a13*), *Oatp3* (*Slc21a7*) i *Oatp2* (*Slc21a5*) formen una branca bastant compacta guardant entre ells moltes semblances que fan que estiguin agrupats en l'arbre; altres *Oatps* com el *lst-1* (*Slc21a10*) o el *Oatp-d* (*Slc21a11*) –el qual tractarem més endavant– constitueixen branques separades en l'arbre, guardant amb els anteriors unes relacions més distants i presentant una certa divergència. El fet de que els 4 gens anteriors es trobin localitzats en un *cluster* al cromosoma 6, pot reforçar la idea de que deriven d'un antecedent comú que ha donat lloc per duplicació gènica a varis gens altament relacionats. En aquest sentit cal aclarir que si bé l'*Oatp1* de ratolí havia estat mapat inicialment en el cromosoma X per Hagenbuch *et al.*, les dades actuals derivades de la seqüenciació del genoma de ratolí han desmentit aquell resultat previ, tot confirmat que en realitat es troba localitzat en el cromosoma 6 G1 [287], proper al *lst-1* (*Slc21a10*) i d'altres en el *locus* esmentat (aquesta regió genòmica murina és sintènica amb la regió 12q12 en humans, que també conté varis gens de la família OATP humana).



## Expressió

Resultats previs situen l'expressió del mRNA de *Oatp1* –utilitzant un *blot* comercial de teixits murins– a fetge i ronyó [240]; en aquest treball confirmem per RT-PCR aquestes troballes en ratolins 129/Sv, amb la utilització de *primers* específics i augmentant el ventall de teixits estudiats. En principi no detectem expressió al cervell murí, malgrat que l'*Oatp1* de rata clarament està expressat a cervell de rata [192], juntament amb fetge i ronyó. Aquesta dada reafirma el fet de que per aquest grup de gens (de la família dels *oatps*), tal com passa amb altres famílies multigèniques com la dels citocroms P450, poden existir diferències significants d'expressió i distribució tissular entre espècies per a un determinat membre, i fins i tot entre diverses soques d'una mateixa espècie. En la soca C57BL/6 utilitzada en els experiments descrits a la *figura 57* (pàg 182), observem per *northern-blot* nivells d'expressió de *Oatp1* similars entre fetge i ronyó, al contrari de Hagenbuch *et al.*, [240], que detecten una expressió molt superior a fetge que a ronyó en la soca BALB/c (*Fig. 29*, pàg. 82). Per tant, a la vista d'aquestes dades creiem que s'ha d'obrar amb prudència alhora d'extrapolar resultats d'expressió en una espècie o en una soca determinada.

## Regulació androgènica

L'expressió de *mOatp1* al fetge no ha mostrat cap diferència clara entre gèneres, en canvi l'expressió renal es troba sotmesa a un estricte control androgènic: si bé en ratolins mascles adults els nivells del mRNA de *oatp1* són manifestos, la castració dels mateixos o en animals femella normals els nivells d'expressió renal decauen fortament fins a ser imperceptibles; la restitució hormonal d'animals castrats o el tractament similar de ratolins femella amb DHT provoca una normalització de l'expressió de *oatp1* similar a la observada en mascles intactes. Malauradament no disposem d'informació a nivell de proteïna per confirmar aquest marcat dimorfisme sexual del “tot o res” pel que respecta a *Oatp1*. Cal esmentar que en rates –i tornant un altre cop al cas del *rOatp1*, si bé els nivells d'expressió a ronyó del missatger en femelles són molt menors que en rates mascle, per *western-blot* es reafirma i s'accentua la diferència concretant-se en una absència detectable de proteïna immunoreactiva en femelles.

L'anàlisi a nivell de productes gènics proteics, reafirma aquestes observacions ja que en femelles no és possible detectar per *western-blot* aparentment cap banda immunoreactiva a ronyó [196, 318]. Altres transportadors renals exhibeixen expressió renal dimòrfica entre sexes, si bé no tan marcadament dràstics com són en rates *Oct2* [31] o *Oat2* [319], aquest darrer exemple en situació invertida: major expressió en femelles que en mascles, la castració dels quals n'augmenta els nivells fins als observats en femelles.

Si bé la major a menor diferència d'expressió pot veure's influïda en aquest casos segons la soca de rates o de ratolins, el fet irrefutable és que per a un conjunt de transportadors relacionats, entre ells l'*oatp1* de ratolí, i en determinats òrgans existeix una complexa diferencialitat d'expressió que es tradueix en una fisiologia i farmacocinètica d'excreció de determinats substrats clarament depenent de gènere.

L'anàlisi en diferents soques de ratolí –per confirmar la regulació androgènica observada– ha estat afirmativa, reafirmant les observacions adquirides en C57BL/6 i estenent-les a BALB/c i 129/Sv; en principi no s'observen grans diferències d'expressió renal del missatger de *Oatp1* entre les 3 soques, observant una disminució substantiva (per no dir abolicció) d'expressió en els animals castrats de les respectives soques murines.

## Proteïna

Si bé el pes molecular calculat per la proteïna deduïda és de 74,4 *kDa*, la traducció *in vitro* del cDNA d'Oatp1 rendeix un polipèptid amb una mida relativa aparent de només ~56 *kDa*, bastant inferior al seu pes predit. Aquesta discrepància entre el pes molecular aparent dels productes traduïts comparat amb la mida observada de les proteïnes de transport natives ha estat observada també per altres transportadors de membrana [315]. El pes aparent menor dels productes de traducció *in vitro* podria originar-se per modificacions posttraduccional variables i/o per migració anòmala en els gels de SDS-PAGE, donat els seu elevat contingut en aminoàcids de caràcter hidrofòbic (corresponents als segments transmembrana) que podria estar influïent en el grau d'afinitat per el SDS fet que n'augmentaria la mobilitat [190].

De moment no disposem d'informació respecte la possible localització de Oatp1 en el ronyó ni en el fetge, especialment a quin domini membranós pot estar destinada. Si ens fixem en altre membres de la família dels oatps expressats a ronyó dels quals si que es disposa d'informació, tan l'Oatp1 de rata com l'OAT-K1 i OAT-K2 es troben localitzats a les membranes *brush-border* de les cèl·lules del túbul proximal, per tant en el domini tubular luminal [191, 222, 316].

Pel cas de l'OAT-K1 de rata, l'anàlisi per western-blot d'extractes crus de membranes renals mostra una forma immunoreactiva relativament petita (40 *kDa* de pes molecular aparent), enlloc de la seva massa molecular calculada en 74 *kDa* (sense valorar possibles glicosilacions)[316]. Aquesta divergència en les mides es pot explicar assumint que la molècula d'Oat-K1 pateix un processat proteolític *in vivo* en les cèl·lules renals.

La funció i localització de Oat-K1 han estat caracteritzades també en varies línies cel·lulars transfectades: en les cèl·lules LLC-PK1 mediarà el transport a nivell basolateral, expressant-se amb una massa molecular aparent de ~70 *kDa* [220]; en la línia MDCK en canvi, es detecta com una forma de 50 *kDa* present en les fraccions membranoses apicals de les cèl·lules transfectants, comparable a la variant proteica indígena del ronyó (*i.e.* com una molècula processada proteolíticament)[221, 222]. Aquestes troballes poden estar indicant que els mecanismes de *sorting* cap a la membrana en les cèl·lules tubulars del ronyó de rata (i en les cèl·lules MDCK polaritzades) difereixen dels presents en les cèl·lules LLC-PK<sub>1</sub>.

És molt possible que el processat proteolític posttraduccional al que pugui estar sotmès aquest transportador (i per extensió altres oatp's) condicioni el seu destí final en un domini membranós o en un altre, i tot plegat d'una manera teixit específica.

Un exemple arquetípic el representa l'Oatp1 de rata, expressat en diferents dominis segons el teixit. En el ronyó, es troba localitzat a les membranes apicals de les cèl·lules túbuloproximals –preferentment del segment S<sub>3</sub>–, en contraposició amb la seva localització en el fetge situada al domini basolateral dels hepatòcits [191]. De fet, entre la forma renal i l'hepàtica també existeix –al igual que per Oat-K1– una diferència important: si bé identificada com una forma glicosilada de ~80 *kDa* (l'hepàtica), la proteïna renal migra en una electroforesi convencional SDS-PAGE (en condicions reductores) desdoblada en dos pèptids de 33 i 37 *kDa*, que figuren com una única banda d'uns 83 *kDa* en condicions no reductores; aquestes observacions són interpretades pels autors [191] postulant l'existència d'un event de processat proteolític (en dos llocs de tall alternatius), que fa que la proteïna detectada a ronyó es mantingui un cop tallada internament en forma de dos fragments processats, units per ponts disulfur (*Fig. 77*).

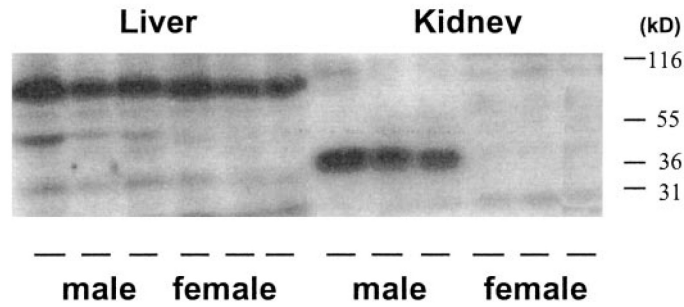


FIG 77. Anàlisi d'expressió per western-blot de Oatp1 a fetge i ronyó de rata. Extractes crus de membranes hepàtiques i renals de rates mascle i rates femella van ser sotmesos a SDS-PAGE. (Adaptat i modificat de Kato, Y. et al., [196])

Es possible que a les cèl·lules renals del túbul proximal existeixi una maquinària particular (diferent de la present als hepatòcits) capaç de reconèixer, processar convenientment i enviar determinades proteïnes de membrana com l'Oatp1 al seu respectiu domini adequat (en el seu cas la membrana apical). La significància fisiològica i el mecanisme precís pel processament proteolític i la distribució diferencial a la membrana teixit específica requereixen estudis addicionals.

En una revisió recent, es destaca la importància que poden tenir a ronyó les proteïnes amb dominis PDZ en la destinació de proteïnes de membrana cap els seus respectius dominis d'acció [210]. els dominis PDZ tenen l'habilitat de interaccionar amb petites seqüències peptídiques (els PDZ motifs: seqüència consens S/L-X-L/V/I [317]) situades a l'extrem C-terminal d'altres proteïnes, com proteïnes integrals de membrana; d'aquesta manera s'ha suggerit que les proteïnes amb dominis PDZ estarien implicades en l'estabilització, direccionament i regulació dels seus corresponents socis d'unió [188]. El coneixement actual del *targeting* de proteïnes transmembrana mediat per membres de la família de PDZ-domain containing proteins permet l'especulació sobre si en el ronyó la presència d'un 'motiu PDZ' en una proteïna de membrana és predictiu d'una localització apical. Certament, pels transportadors MRP2, NPT1, PEPT2 i els citats Oatp1 i Oat-K1/K2 de rata, entre d'altres, (tots ells amb un extrem C-t que s'avé amb la seqüència consens del motiu PDZ) s'ha descrit llur localització a la membrana *brush-border*; altres proteïnes renals mancades d'un motiu PDZ C-terminal potencial, es troben localitzades a la membrana basolateral [210]. En aquest sentit es remarcable que l'Oatp1 de ratolí comparteixi els mateixos darrers aminoàcids de l'extrem C terminal amb l'Oatp1 i l'Oat-k1 de rata, que s'avenen amb el motiu consens (veure

TAULA XXX. Seqüències N-terminal de varis Oatps en comparació amb la del motiu consens PDZ

PDZ motif	consens						T/S	X	V/I/L
mOatp1	...	N	D	E	L	K	T	K	L
rOatp1	...	N	D	E	L	K	T	K	L
OAT-K1	...	N	D	E	L	K	T	K	L

la taula XXX). Si bé per ara es desconeix la localització i si pateix processat a ronyó tal com el seu homòleg de rata, aquest conjunt d'evidències poden aportar pistes que requeriran ser ampliadades en el futur sobre el paper i la funció de oatp1 muri renal.

## Funció

Per a l'estudi de funcionalitat, hem utilitzat el sistema d'expressió de proteïnes per microinjecció de cRNA en oòcits de *Xenopus laevis*.

A nivell funcional, els resultats obtinguts expressant els cDNA clonat d'oatp1 murí en oòcits ofereixen unes  $K_m$  aparents de 8,2 i 4,9  $\mu\text{M}$  per la DEHAS i l'E<sub>2</sub>17G, respectivament. Aquests valors són bastant similars als determinats per l'Oatp1 de rata també en oòcits, excepte pel cas del taurocolat que mostra un valor de  $K_m$  aparent quatre cops superior, respecte als seu membre equivalent de ratolí.

L'ampli ventall d'especificitats de substrat pels diferents membres de la família dels Oatps ha estat investigades i descrit en varis treballs [201, 226, 268, 320, 321]. En la rata, d'entre els compostos comuns com el taurocolat, que és transportat per Oatp1, Oatp2 i Oatp3, trobem també substrats específics que com a mínim discriminen entre Oatp1 i Oatp2. Per exemple, el gadoxetat (compost utilitzat com agent de contrast en ressonància magnètica nuclear) és exclusivament transportat per el Oatp1 i no per el Oatp2 ni el OATP-A humà [261]. L'Oatp2 de rata, per la seva banda s'ha mostrat com a únic en la seva capacitat d'acceptar la digoxina com a substrat [201]. Pel cas que ens ocupa, l'Oatp1 de ratolí clonat ha mostrat majoritàriament unes característiques de transport anàlogues al Oatp1 de rata, transportant bromosulfaleina, taurocolat, E3S, ouabaina ([249]; *aquest treball*), però no el substrat específic de rOatp2 digoxina, però per altre banda hem vist que els oòcits expresadors de oatp1 murí també transporten prostaglandina E<sub>2</sub>, la qual no és transportada per el representant de rata [321].

A la vista del processat proteolític que poden patir altres Oatps a ronyó, no està clar si aquestes modificacions poden afectar l'afinitat per diferents substrats i en definitiva les característiques funcionals que poden patir. Si així fora, quedaria per determinar si la proteïna expressada en oòcits conté aquestes modificacions i si els valors obtinguts per aquests mitjans són extrapolables *in vivo* en les cèl·lules renals o si més no equiparables.

## MJAM

Tal com es descriu a l'apartat RESULTATS 3.1.2, si s'examina la seqüència del cDNA es pot observar l'excepcional riquesa en GC (fins a un 80 %) dels 150 *nt* inicials de l'extrem 5'. Aquesta peculiar característica pot explicar l'absència de clons representatius d'aquesta zona a la llibreria de la qual es realitzà el *screening* i les dificultats trobades en les RT-PCRs del 5'RACE per arribar fins al principi, al llarg d'aquesta zona putativament prolífica en estructures secundàries del mRNA corresponent de MJAM.

El cDNA de MJAM codifica per un polipèptid predit de 710 *aa*, que constaria de les 12 putatives regions transmembrana com les postulades pels transportadors de la família SLC21. amb homologies moderades (30-40%) amb la majoria dels membres dels oatps, d'entre ells destaca l'extremada identitat aminoacídica (96%) amb el transportador humà OATP-D. A la llum d'aquesta dada i també considerant la sintènia humans-ratolí entre la localització genòmica del *mjam* (chr 7) i el OATP-D (chr 15q25-26) no és imprudent afirmar que el cDNA de ratolí clonat representa el gen ortòleg veritable del OATP-D humà, i per tan considerem més adequat d'anomenar-lo Oatp-d. Regirant per les bases de dades disponibles de seqüències, s'identifiquen també cDNAs sencers altament homòlegs d'altres espècies (en rata (*Rattus norvegicus*): Pgt2<sup>+</sup>, 98%<sup>+</sup>; en vaca (*Bos taurus*): OATP-D<sup>s</sup>, 95%<sup>+</sup>), (*veure fig. 78*) així com fragments parcials de seqüències expressades igualment amb una alta homologia a pollastre (*Gallus gallus*), porc (*Sus scrofa*)

que no es mostren perquè encara no representen els corresponents gens sencers. D'altra banda en espècies menys relacionades també trobem homòlegs més llunyans (relacionats no només amb Oatp-d sinó també amb altres membres de la família dels OATP en mamífers), com un Oatp ancestral de Rajada (*Raja erinacea*)<sup>‡</sup>, com a nivell més distant diversos ORFs de mosca (*Drosophila melanogaster*) i a nemàtodes (*Caenorhabditis elegans*); aquest fet suporta l'hipòtesi de que la família gènica del oatps és bastant antiga evolutivament, no només estan present diversificadament en mamífers i vertebrats superiors sinó que també existint en formes ancestrals en organismes invertebrats, caldrà esperar a tenir més dades en altres organismes per confirmar-ho. Pel cas dels mamífers, creiem que aquest gen en les diferents variants presents en mamífers seria el més altament conservat d'entre tota la superfamília dels OATP/PGT.

<sup>†</sup>Genbank acc. AF239219; <sup>§</sup>Genbank acc. AJ508719; <sup>†</sup>homologies de les corresponents proteïnes deduïdes en aminoàcids; <sup>‡</sup>Genbank acc. AF449798.

S'ha especulat que la subfamília humana dels oatps ha divergit respecte la subfamília murina o de rata posteriorment a l'especiació, i que per tant seria difícil assignar ortòlegs clars en rosegadors dels OATPs humans. Les dades que presentem aquí matitzen aquesta interpretació, podent afirmar que per aquest gen del qual hem clonat el representant murí es dona una clara ortologia un a un entre el representant d'humans i el de rosegadors i, que en base a l'elevada homologia i la sintènia a nivell genòmic entre les tres espècies esmentades, considerem que OATP-D/Oatp-d seria el gen més conservat de tota la superfamília de OATP/PGT al llarg de l'evolució en mamífers.

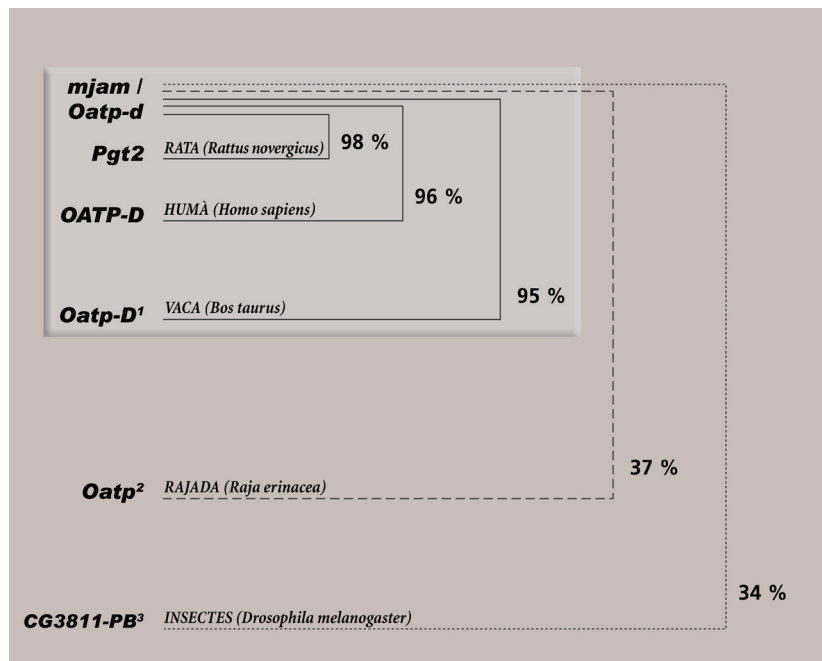


FIG 78. Taula d'homologies entre les proteïnes deduïdes per Oatp-d/OATP-D de diverses espècies de mamífers i, amb representants llunyans dels Oatp en espècies més distants. (Genbank acc: <sup>1</sup>AJ508719; <sup>2</sup>AE003625; <sup>3</sup>AF449798). Veure el text pels detalls

### Expressió i regulació

Si bé en general la majoria d'Oatps tenen una expressió restringida a un o varis teixits –fet que estaria indicant que exerceixen funcions específiques d'òrgan, l'Oatp-d de ratolí (al igual que el seu ortòleg humà) presenta una expressió ubíqua, detectant el seu missatger en la majoria de teixits testats, testicle i ronyó inclòs. A part del Oatp-d murí i humà, l'OATP-E i el PGT també es troben expressats pràcticament

en cada teixit en que s'han investigat [231], suggerint probablement que la funció d'aquests transportadors és requerida a nivell cel·lular independentment del teixit.

L'anàlisi de les bases de dades de EST derivats de llibreries específiques de teixits murins adults i embrionics, també pot aportar pistes addicionals sobre òrgans i sistemes cel·lulars on també s'hagi identificat el mRNA d'Oatp-d en forma de seqüència expressada; en aquest sentit és significativa la presència de clons corresponents a Oatp-d en llibreries embrionàries i fins i tot en llibreries construïdes amb cDNAs derivats a partir d'òcits no fertilitzats i d'embrions d'una sola cèl·lula (fertilitzats *in vitro*), entre d'altres (*veure* <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Mm&CID=25368&MAXEST=103>>). Així doncs, en base a aquestes dades esparses sembla ser que l'expressió de Oatp-d als teixits de ratolí s'estendria no només corporalment de manera ubíqua, sinó que a nivell cronològic estaria expressat també des de els primers estadis de la vida embrionària. De totes maneres caldran estudis futurs addicionals per determinar i concretar amb precisió els patrons d'expressió de Oatp-d al llarg de l'ontogènia i de la vida adulta dels ratolins.

Com molts d'altres Oatp's, *MJAM/Oatp-d* exhibeix varis transcrits per *northern-blot*, dues en concret: una banda majoritària d'un *3 kb* i una segona banda d'intensitat menor de *~4,5 kb* de grandària relativa.

Al igual que els altres gens tractats en aquest treball, la seva expressió renal es troba regulada pels andrògens. La castració de ratolins mascles en les tres soques tractades fa disminuir la intensitat dels dos transcrits amb hibridació, respecte als animals control intactes. Comparant-ho amb *Oatp1*, amb el qual està relacionat quant a pertinença a una mateixa superfamília gènica, tot i fer disminuir els nivells a l'estat estacionari del seu missatge, la depleció dels andrògens circulants per gonadectomia no els aboleix completament, com era el cas del *Oatp1*, el qual no som capaços de detectar en els ronyons ni en femelles ni de mascles castrats. De totes maneres, aquestes dades haurien de confirmar-se a nivell de proteïna per poder extreure'n conclusions inequívokes.

### Funció

A nivell funcional es disposen de poques dades respecte als possibles substrats pels quals Oatp-d tindria afinitat. Pel que respecta al OATP-D humà, que presenta una elevada identitat a nivell de seqüència amb el polipèptid de ratolí i per tan és d'esperar que també funcional, ha estat difícil establir funcions de transport d'anions orgànics clares. Si bé Tamai, I. *et al.* han demostrat que és capaç de transportar estrona-3-sulfat, benzilpenicil·lina i prostaglandina E<sub>2</sub> [231], els valors de *uptake* reportats són molt magres, restant per ser confirmats i ampliat en el futur.

Nosaltres hem intentat infructuosament realitzar assatjos funcionals en òcits de *Xenopus* injectats amb el cRNA de *MJAM*, però no hem obtingut resultats concloents per cap dels múltiples substrats típics testats (no es mostra).

Per tant, de moment la seva funció definitiva queda encara per definir, existint la possibilitat que els gens de *Oatp-d/OATP-D* hagin divergit funcionalment de la majoria de membres de la família de transportadors d'anions orgànics, especialitzant-se i adquirint noves funcionalitats que quedarien per precisar.

### Avaluació genètica i expressió renal del Oatp-d en rates normotenses i hipertenses

Finalment la darrera part dels estudis s'han centrat en investigar si podria existir una hipotètica relació del gen *Oatp-d* amb la predisposició genètica a la hipertensió. Com s'ha exposat en el corresponent

apartat introductori de la secció resultats, hi havia varies línies indirectes que podien fer despertar un cert interès en analitzar el gen en models animals de rates hipertenses. Per una banda l'elevada homologia entre els representants de humans i de rosegadors i per l'altre la seva conservació en mamífers al llarg de l'evolució, podria estar indicant que la funció –de moment desconeguda– de la proteïna OATP-D/Oatp-d és d'una relativa importància. En aquest sentit si hipotetitzem una funció transportadora de substrats aniònics orgànics (d'altra banda típica pels membres de la família de transportadors Oatps) podríem pensar possiblement en eicosanoides (prostaglandines, tromboxans, etc.) i d'altres mediadors, que poden dur a terme una acció important a nivell vascular i/o homeostàtic en òrgans com el ronyó per exemple, a més d'intervenir activament en l'etiogènesi d'aquests processos. Si bé en contraposició trobem que l'expressió del seu mRNA es troba àmpliament distribuïda per la majoria de teixits, la regulació androgènica que pateix (en ratolins) particularment en el teixit renal podria tenir a priori una certa relació amb les diferències observades a nivell de gènere en soques hipertenses, que atorguen un paper important als andrògens en l'evolució de la hipertensió i que a nivell molecular podrien ser conseqüència d'una expressió diferencial entre mascles i femelles, en certs teixits diana claus.

Pel que fa a l'expressió del gen *Oatp-d/Pgt2*, en els ronyons de rates Wistar-Kyoto (normotenses) i rates SHR (genèticament hipertenses), no hem observat variacions destacables –mitjançant una aproximació qualitativa per RT-PCR– entre els nivells presents entre les dues soques, ni tampoc diferències aparents entre mascle i castrat. Cal dir que aquests resultats suposen només una estimació preliminar per provar de palesar d'entrada l'existència d'alguna diferència notable –si és que es donés el cas–, però no ha estat així. D'altra banda, si bé s'ha mirat de ser el màxim de quantitatiu possible dins l'aproximació escollida per poder comparar els nivells a cada situació, els valors obtinguts no es poden prendre de manera concloent ja que caldria contrastar-los amb aproximacions tècniques més quantitatives com el *northern-blot* i potser en un nombre superior d'animals.

En tot cas, aquests resultats (tot i que limitats) suggereixen que en principi no existeixen diferències entre les dues soques quan a l'expressió renal d'aquest gen i, al contrari del que observem en ratolins, no sembla que la castració afecti la seva expressió a ronyó. Si aquesta última dada és confirmable i extensible a altres soques de rata, caldrà determinar-ho i caracteritzar-ho en experiments addicionals.

En relació a la localització genòmica del gen, amb el mapatge per *radiation hybrid* hem confirmat que el *Oatp-d* de rata es troba molt proper a una regió d'interès en el cromosoma 1 (on resideixen un o varis QTLs candidats relacionats amb la predisposició a la hipertensió), i que des de que va ser definida –a l'engròs– pels voltants del gen  $S_{\alpha}$ , s'ha anat refinant i subdelimitant en unes determinades regions més acotades, dins d'una de les quals hem situat eventualment a *Oatp-d*. Cal dir, però, que en tot aquest procés cartogràfic depenem dels mapes genètics disponibles per situar el gen en el seu locus, i aquests mapes utilitzats poden contenir incerteses i imprecisions que dificulten el procés d'identificació de gens candidats, per clonatge posicional. Amb aquestes eines, un cop confirmada la seva presència dins la regió esmentada i havent analitzat el llistat dels altres gens residents en la regió “calenta”, creiem que *Oatp-d* era un bon candidat per ser sotmès a un estudi més exhaustiu, a la llum dels arguments exposats; No caldrà repetir que el model d'implicació hipotetitzat es sustenta en pressupòsits que no deixen de ser simplificacions i com a tal es tracta d'una aproximació reduccionista: no menystenim el fet que l'emergència de la hipertensió essencial és un fenomen multifactorial i pleiotròpic, resultat de la interacció subtil d'una plèiade de factors genètics –amb diferents graus de contribució individual–, tot plegat en un determinat ambient permissiu o agreujant. En conseqüència, es va examinar la seqüència corresponent del gen en rates de les soques WKY i SHR (ambdós soques àmpliament utilitzades en estudis genètics sobre

la hipertensió heretable [322]), tal i com ja ha estat realitzat –amb resultats desiguals– amb altres gens de diferents regions candidates [323-325], a fi de detectar possibles canvis en la seqüència nucleotídica de la regió codificant.

La seqüenciació preliminar no ha identificat cap diferència en la seqüència codificant del gen *Oatp-d* en rates SHR i en rates WKY, i per tant es va investigar a continuació si s'observaven canvis en la seva expressió renal (resultat de possibles diferències en els promotors respectius). Ara per ara, però, l'anàlisi emprès no és prou extens ni exhaustiu (desconeixem si hipotèticament existeixen diferències a nivell genòmic, en regions intròniques, etc.) per pronunciar una conclusió clara i descartar-lo definitivament, ja que tampoc coneixem amb certesa la funció que estarà duent a terme la proteïna, aspecte que de ser conegut podria facilitar i aclarir l'anàlisi, i la pretesa implicació que nosaltres deixem en suspens.

Finalment, creiem que el conjunt de resultats i consideracions presentades fins aquí pot tenir algun interès en l'objectiu d'anar desentrellant les accions dels andrògens en la fisiologia renal i, per extensió, en les seves possibles implicacions en situacions patològiques. Al llarg del treball, hem intentat destacar d'alguna forma el paper potencial que els andrògens (i com a conseqüència, el dimorfisme renal en l'expressió gènica) pot exercir directa o indirectament en diversos processos d'interès fisiopatològic. Com a exemple, les possibles accions contribuint en l'etiogènia del carcinoma renal, participant en l'homeostasi i farmacocinètica de xenobiòtics, influint en el desenvolupament de la hipertensió (en determinats models), o jugant un paper en l'evolució de la malaltia renal.

Amb l'adveniment de l'era de la farmacogenòmica, en la qual es pretén disposar d'un coneixement extensiu de perfils metabòlics i excretors (per tal de poder personalitzar i adequar a cada individu tractaments terapèutics), cal considerar la intervenció de les hormones sexuals –i especialment dels esteroides androgènics– en alguns dels processos esmentats. Per tant, creiem que un coneixement rigorós a nivell molecular dels mecanismes reguladors i les implicacions funcionals del conjunt de gens (o xarxes gèniques) regulats/es pels andrògens a ronyó, poden ser de gran utilitat.



INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

**CONCLUSIONS**

BIBLIOGRAFIA

## Conclusions

### Cyp4b1

1. El gen del *Cyp4b1* de ratolí consta de 12 exons repartits en una regió genòmica d'unes 23 kb. S'ha clonat i seqüenciat 1,8 kb del seu promotor immediatament adjacent; a ronyó, l'origen de transcripció majoritari es situaria 34 pb prèvies al codó ATG.
2. El Cyp4b1 murí s'expressa –a nivell de missatger– a pulmó i de manera molt abundant a ronyó. En aquest darrer teixit, l'expressió del seu mRNA es localitza principalment en les cèl·lules epitelials del còrtex renal. L'expressió renal del Cyp4b1 es veu estimulada pels andrògens en ratolins de diferents soques (i.e. C57BL/6, BALB/c i 129/Sv).
3. En assaigs de transfecció transitòria, el promotor del *Cyp4b1* mostra activitat transcripcional en diferents línies cel·lulars, entre elles les derivades de túbul proximal PCT3 i PR10. El fragment de promotor –137/+32 ofereix la màxima activitat luciferasa en cèl·lules PCT3, d'entre la resta de fragments analitzats. El mínim segment necessari per obtenir activitat transcripcional recau entre les posicions –98 i –48, allotjant probablement els elements imprescindibles requerits per governar in vitro l'expressió basal del gen *Cyp4b1*. Pel que fa a l'estimulació amb DHT, la inducció assolida de les diferents construccions de promotor ha arribat en alguns casos fins un màxim de ~2 vegades, respecte la situació no estimulada; en aquestes condicions, el control positiu oferiria una activació de més de 10 vegades.

### Oatp1

1. S'ha clonat el cDNA complert –a partir de ronyó– del gen *Oatp1* de ratolí. La seva longitud és de 3227 nt, amb una pauta de lectura de 2010 pb que codifiquen per una proteïna deduïda de 670 aa.
2. El mRNA de *Oatp1* murí s'expressa a ronyó i a fetge. Per *northern-blot* s'observen múltiples transcrits de mides aparents compreses entre ~2,5 i ~5 kb, atribuïdes a espècies amb diferents llargàries en l'extrem 3'-UTR. Al ronyó, la seva expressió es troba sotmesa a regulació per andrògens –en ratolins de diferents soques–, disminuint fins a nivells pràcticament indetectables en animals castrats.
3. A nivell funcional, la proteïna murina Oatp1 –expressada en oòcits de *Xenopus*– transporta els conjugats esteroidals aniònics DHEAS ( $K_m = 8,2 \pm 1,4 \mu M$ ), E<sub>2</sub>17G ( $K_m = 4,9 \pm 0,9 \mu M$ ), E3S i l'eicosanoide PGE<sub>2</sub>, però no transporta esteroides neutres com la testosterona, el cortisol o l'aldosterona.

**MJAM / Oatp-d**

- 1.** S'ha identificat i clonat el cDNA sencer murí corresponent al gen *Oatp-d*, que prèviament era anomenat *MJAM*; aquest gen representaria l'ortòleg en ratolins del gen humà *OATP-D*. El cDNA –aïllat de ronyó– consta de 2272 *pb*, amb una regió codificant de 2133 *nt* que donaria lloc a una proteïna de 710 *aa*. Aquesta proteïna deduïda presenta una elevada homologia (>95%) amb les proteïnes OATP-D i Pgt2 d'humans i de rata, respectivament.
- 2.** El patró d'expressió del mRNA d'*Oatp-d* presenta una distribució generalitzada, detectant-se en tots els teixits de ratolí analitzats. Per *northern-blot* es detecten dos transcrits majoritaris a ronyó, l'expressió dels quals es troba regulada pels andrògens, disminuint en animals castrats.
- 3.** S'han mapat els gens *Oatp-d* de rosegadors, situant-los respectivament en el cromosoma 7 (regió D1-D2) de ratolins i en la regió cromosòmica 1q34-1q36, en rates; aquesta darrera regió coincideix amb un locus on s'ha descrit l'existència de varis QTL d'influència en la pressió sanguínia. En un estudi comparatiu, la seqüència (codificant) del cDNA de *Oatp-d*, derivat de rates de les soques WKY i SHR, no presenta cap diferència (tampoc a nivell d'expressió renal), mentre que respecte al de la soca *Norway rat* ofereix una substitució nucleotídica que rendeix el canvi G446V en la proteïna deduïda corresponent.

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

**BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- [1] HIPERENCICLOPÈDIA CATALANA, (2002) "El Ronyó" <<http://www.grec.net/home/cel/main.HTM>>
- [2] GRAY, HENRY. *Anatomy of the Human Body*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1918; Bartleby.com, 2000. <[www.bartleby.com/107/](http://www.bartleby.com/107/)>
- [3] TISCHER, C.C. AND MADSEN, K.M. (1996) Anatomy of the kidney. In: *The Kidney* (Brenner, B.M., ed.), 5th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, vol. I, pp. 22-24
- [4] NIGAMA, S.K., APERIA, A.C. AND BRENNER, B.M. Development and maturation of the kidney. (1996) In: *The Kidney* (Brenner, B.M., ed.), 5th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, vol. I, pp. 73
- [5] BEATO, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56(3), 335-44
- [6] CATO, A.C., PONTA, H. AND HERRLICH, P. (1992) Regulation of gene expression by steroid hormones. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 43, 1-36
- [7] TSAI, M.J. AND O'MALLEY, B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-86
- [8] MANGELSDORF, D.J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHUTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG, B., KASTNER, P., MARK, M. AND CHAMBON, P. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6), 835-9
- [9] WILLNOW, T.E. AND NYKJAER, A. (2002) Pathways for kidney-specific uptake of the steroid hormone 25-hydroxyvitamin D3. *Curr Opin Lipidol* 13, 255-60
- [10] EVANS R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854), 889-95
- [11] BEATO, M. AND KLUG, J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3), 225-36
- [12] GIGUERE, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20(5), 689-725
- [13] REVELLI, A., MASSOBRIO, M. AND TESARIK, J. (1998) Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19(1), 3-17
- [14] ONATE, S.A., TSAI, S.Y., TSAI, I.M.J. AND O'MALLEY, B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270(5240), 1354-7
- [15] CHEN, J.D. AND EVANS, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548), 454-7
- [16] PIÑA, B., BRUGGEMEIER, U. AND BEATO M. (1990) Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* 60(5), 719-31
- [17] LITWACK, G. AND NORMAN, A.W., *Hormones* (1997), 2nd ed., Academic Press, San Diego
- [18] PAYVAR, F., WRANGE, O., CARLSTEDT-DUKE, J., OKRET, S., GUSTAFSSON, J.A. AND YAMAMOTO, K.R. (1981) Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(11), 6628-32
- [19] HAM, J., THOMSON, A., NEEDHAM, M., WEBB, P. AND PARKER, M. (1988) Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res* 16(12), 5263-76
- [20] TSAI, M.J., CLARK, J.H., SCHRADER, W.T. AND O'MALLEY, B.W. (1998) Mechanisms of action of hormones that act as transcription-regulatory factors. In: *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson, J.D., Foster, D.W. et al., eds.), 9th ed., Saunders, Philadelphia
- [21] ALLAN, G.F., ING, N.H., TSAI, S.Y., SRINIVASAN, G., WEIGEL, N.L., THOMPSON, E.B., TSAI, M.J. AND O'MALLEY, B.W. (1991) Synergism between steroid response and promoter elements during cell-free transcription. *J. Biol. Chem.* 266(9), 5905-10
- [22] SCHULE, R., MULLER, M., KALTSCHMIDT, C., AND RENKAWITZ, R. (1988) Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242(4884), 1418-20
- [23] TAUSK, M. (1984) *Discov. Pharmacol.* 2, 307-318, *Citaa: Rusell, D.W et al.*, [25]
- [24] GRIFFIN, J.E. AND WILSON, J.D. (1998) Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson, J.D., Foster, D.W. et al., eds.), 9th ed., Saunders, Philadelphia
- [25] RUSSELL, D.W. AND WILSON, J.D. (1994) Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63, 25-61
- [26] PENNING, T.M., BURCZYNSKI, M.E., JEZ, J.M., HUNG,

- C.F., LIN, H.K., MA, H., MOORE, M., PALACKAL, N. AND RATNAM, K. (2000) Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 351(Pt 1), 67-77
- [27] WU, F.C. (1997) Endocrine aspects of anabolic steroids *Clin Chem* 43(7), 1289-92
- [28] MCPHAUL, M.J., MARCELLI, M., ZOPPI, S., GRIFFIN, J.E. AND WILSON, J.D. (1993) Genetic basis of endocrine disease. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 76(1), 17-23
- [29] HAMMOND, G.L., KONTTUR, I.M., VIHKO, P. AND VIHKO, R. (1978) Serum steroids in normal males and patients with prostatic diseases. *Clin Endocrinol (Oxf)* 9(2), 113-21
- [30] WILSON, J.D., FOSTER, D.W. *et al.*, eds. (1998) *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed., Saunders, Philadelphia, contraportada
- [31] URAKAMI, Y., OKUDA, M., SAITO, H. AND INUI, K. (2000) Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney *FEBS Lett* 473(2), 173-6
- [32] JONES, R.D., HALL, J., PUGH, P.J., ENGLISH, K.M., CHANNER, K.S. AND JONES, T.H. (2002) Circulating steroid levels in the testicular feminised (Tfm) mouse. *Endocrine Abstracts*, 21st Joint Meeting of the British Endocrine Societies, 3 P268
- [33] KOCHAKIAN, C.D. (1975) Definition of androgens and protein anabolic esters *Pharmacol Ther sect B* 1, 149
- [34] BARDIN, C.W. AND CATTERALL, J.F. (1981) Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science* 211(4488), 1285-94
- [35] RIEGMAN, P.H., VLIETSTRA, R.J., VAN DER KORPUT, J.A., BRINKMANN, A.O. AND TRAPMAN, J. (1991) The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* 5(12), 1921-30
- [36] PETERZIEL, H., MINK, S., SCHONERT, A., BECKER, M., KLOCKER, H. AND CATO, A.C. (1999) Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 18(46), 6322-9
- [37] CHANG, C.S., KOKONTIS, J. AND LIAO, S.T. (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240(4850), 324-6
- [38] LUBAHN, D.B., JOSEPH, D.R., SULLIVAN, P.M., WILLARD, H.F., FRENCH, F.S. AND WILSON, E.M. (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240(4850), 327-30
- [39] CHRISTIAENS, V., BEVAN, C.L., CALLEWAERT, L., HAELENS, A., VERRIJDT, G., ROMBAUTS, W. AND CLAESSENS, F. (2002) Characterization of the Two Coactivator-interacting Surfaces of the Androgen Receptor and Their Relative Role in Transcriptional Control. *J Biol Chem* 277(51), 49230-7
- [40] HEINLEIN, C.A. AND CHANG, C. (2002) Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endoc. Rev* 23(2), 175-200
- [41] KANG, H.Y., LIN, H.K., HU, Y.C., YEH, S., HUANG, K.E. AND CHANG, C. From transforming growth factor-beta signaling to androgen action: identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6), 3018-23
- [42] ROY, A.K., TYAGI, R.K., SONG, C.S., LAVROVSKY, Y., AHN, S.C., OH, T.S. AND CHATTERJEE, B. (2001) Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann N Y Acad Sci* 949, 44-57
- [43] HTUN, H., HOLTH, L.T., WALKER, D., DAVIE, J.R. AND HAGER, G.L. (1999) Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell* 10(2): 471-86
- [44] TOMURA, A., GOTO, K., MORINAGA, H., NOMURA, M., OKABE, T., YANASE, T., TAKAYANAGI, R. AND NAWATA, H. (2001) The subnuclear three-dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein. *J Biol Chem* 276(30), 28395-401
- [45] TYAGI, R.K., LAVROVSKY, Y., AHN, S.C., SONG, C.S., CHATTERJEE, B. AND ROY, A.K. (2000) Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol* 14(8)1162-74
- [46] RENNIE, P.S., BOWDEN, J.F., BRUCHOVSKY, N. AND CHENG, H. (1988) The relationship between inhibition of plasminogen-activator activity and prostatic involution. *Biochem J* 252(3), 759-64
- [47] YEH, S. AND CHANG, C. (1996) Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11), 5517-21
- [48] HO, K.C., MARSCHKE, K.B., TAN, J., POWER, S.G.,

- WILSON, E.M. AND FRENCH, F.S. (1993) A complex response element in intron 1 of the androgen-regulated 20-kDa protein gene displays cell type-dependent androgen receptor specificity. *J Biol Chem* 268(36), 27226-35
- [49] ADLER, A.J., SCHELLER, A. AND ROBINS, D.M. (1993) The stringency and magnitude of androgen-specific gene activation are combinatorial functions of receptor and nonreceptor binding site sequences. *Mol Cell Biol* 13(10), 6326-35
- [50] RENNIE, P.S., BRUCHOVSKY, N., LECO, K.J., SHEPPARD, P.C., MCQUEEN, S.A., CHENG, H., SNOEK, R., HAMEL, A., BOCK, M.E., MACDONALD, B.S., *et al.* (1993) Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol Endocrinol* 7(1), 23-36
- [51] NELSON CC, HENDY SC, SHUKIN RJ, CHENG H, BRUCHOVSKY N, KOOP BF AND RENNIE PS. (1999) Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol Endocrinol* 13(12), 2090-107
- [52] ROCHE, P.J., HOARE, S.A. AND PARKER, M.G. (1992) A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 6(12), 2229-35
- [53] BEATO, M., CHALEPAKIS, G., SCHAUER, M. AND SLATER, E.P. (1989) DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 32(5), 737-47
- [54] CLAESSENS, F., VERRIJDT, G., SCHOENMAKERS, E., HAELENS, A., PEETERS, B., VERHOEVEN, G. AND ROMBAUTS, W. (2001) Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76(1-5), 23-30
- [55] PALVIMO, J.J., REINIKAINEN, P., IKONEN, T., KALLIO, P.J., MOILANEN, A. AND JANNE, O.A. (1996) Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor. *J Biol Chem* 271(39), 24151-6
- [56] TAN, J.A., MARSCHKE, K.B., HO, K.C., PERRY, S.T., WILSON, E.M. AND FRENCH, F.S. (1992) Response elements of the androgen-regulated C3 gene. *J Biol Chem* 267(7), 4456-66
- [57] CEBRIAN, C., ARESTE, C., NICOLAS, A., OLIVE, P., CARCELLER, A., PIULATS, J. AND MESEGUER, A. (2001) Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J Biol Chem* 276(31), 29410-9
- [58] SOLER, M., TORNAVACA, O., SOLE, E., MENOYO, A., HARDY, D., CATERALL, J. F., VANDERWALLE, A. AND MESEGUER, A. (2002) Hormone-specific regulation of the kidney androgen-regulated gene promoter in cultured mouse renal proximal tubule cells. *Biochem. J* 366(Pt 3), 757-66
- [59] GOROSPE, M., CIRIELLI, C., WANG, X., SETH, P., CAPOGROSSI, M.C. AND HOLBROOK, N.J. (1997) p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14(8), 929-35
- [60] LU, S., JENSTER, G. AND EPNER, D.E. (2000) Androgen induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene: role of androgen receptor and transcription factor Sp1 complex. *Mol Endocrinol*. 14(5), 753-60
- [61] BARBULESCU, K., GESERICK, C., SCHUTTKE, I., SCHLEUNING, W.D. AND HAENDLER, B. (2001) New androgen response elements in the murine pem promoter mediate selective transactivation. *Mol Endocrinol* 15(10), 1803-16
- [62] WINDERICKX, J., HEMSCHOOTE, K., DE CLERCQ, N., VAN DIJCK, P., PEETERS, B., ROMBAUTS, W., VERHOEVEN, G. AND HEYNS, W. (1990) Tissue-specific expression and androgen regulation of different genes encoding rat prostatic 22-kilodalton glycoproteins homologous to human and rat cystatin. *Mol Endocrinol* 4(4):657-67
- [63] DEVOS, A., CLAESSENS, F., ALEN, P., WINDERICKX, J., HEYNS, W., ROMBAUTS, W. AND PEETERS, B. (1997) Identification of a functional androgen-response element in the exon 1-coding sequence of the cystatin-related protein gene crp2. *Mol Endocrinol* 11(8), 1033-43
- [64] CLEUTJENS, K.B., VAN EEKELEN, C.C., VAN DER KORPUT, H.A., BRINKMANN, A.O. AND TRAPMAN, J. (1996) Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271(11), 6379-88
- [65] SCHOENMAKERS, E., ALEN, P., VERRIJDT, G., PEETERS, B., VERHOEVEN, G., ROMBAUTS, W. AND CLAESSENS, F. (1999) Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem J* 341(Pt 3), 515-21
- [66] CLEUTJENS, K.B., VAN DER KORPUT, H.A., VAN EEKELEN, C.C., VAN ROOIJ, H.C., FABER, P.W. AND TRAPMAN, J. (1997) An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific

- antigen promoter. *Mol Endocrinol* 11(2), 148-61
- [67] TAN, J.A., MARSCHKE, K.B., HO, K.C., PERRY, S.T., WILSON, E.M. AND FRENCH, F.S. (1992) Response elements of the androgen-regulated C3 gene. *J Biol Chem* 267(7), 4456-66
- [68] HAELENS, A., VERRIJDT, G., SCHOENMAKERS, E., ALEN, P., PEETERS, B., ROMBAUTS, W. AND CLAESSENS, F. (1999) The first exon of the human sc gene contains an androgen responsive unit and an interferon regulatory factor element. *Mol Cell Endocrinol* 153(1-2), 91-102
- [69] MURTHA, P., TINDALL, D.J. AND YOUNG, C.Y. (1993) Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochemistry* 32(25), 6459-64
- [70] GHYSELINCK, N.B., DUFAURE, I., LAREYRE, J.J., RIGAUDIERE, N., MATTEI, M.G., DUFAURE, J.P. (1993) Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 7(2), 258-72
- [71] LU, S., LIU, M., EPNER, D.E., TSAI, S.Y. AND TSAI, M.J. (1999) Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Mol Endocrinol* 13(3), 376-84
- [72] LAREYRE, J.J., CLAESSENS, F., ROMBAUTS, W., DUFAURE, J.P. AND DREVET, J.R. (1997) Characterization of an androgen response element within the promoter of the epididymis-specific murine glutathione peroxidase 5 gene. *Mol Cell Endocrinol* 129(1), 33-46
- [73] DEVOS, A., CLAESSENS, F., ALEN, P., WINDERICKX, J., HEYNS, W., ROMBAUTS, W., AND PEETERS, B. (1997) Identification of a functional androgen-response element in the exon 1-coding sequence of the cystatin-related protein gene crp2. *Mol Endocrinol* 11(8), 1033-43
- [74] LUND, S.D., GALLAGHER, P.M., WANG, B., PORTER, S.C. AND GANSCHOW R.E. (1991) Androgen responsiveness of the murine beta-glucuronidase gene is associated with nuclease hypersensitivity, protein binding, and haplotype-specific sequence diversity within intron 9. *Mol Cell Biol* 11(11), 5426-34
- [75] CROZAT, A., PALVIMO, J.J., JULKUNEN, M. AND JANNE, O.A. (1992) Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs. *Endocrinology* 130(3), 1131-44
- [76] DARNE, C.H., MOREL, L., CLAESSENS, F., MANIN, M., FABRE, S., VEYSSIERE, G., ROMBAUTS, W. AND JEAN, C.L. (1997) Ubiquitous transcription factors NF1 and Sp1 are involved in the androgen activation of the mouse vas deferens protein promoter. *Mol Cell Endocrinol* 132(1-2), 13-23
- [77] GOWLAND, P.L. AND BUETTI, E. (1989) Mutations in the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus differentially affect the response to progestins, androgens, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 9(9), 3999-4008
- [78] VERCAEREN, I., WINDERICKX, J., DEVOS, A., PEETERS, B. AND HEYNS, W. (1993) An effect of androgens on the length of the poly(A)-tail and alternative splicing cause size heterogeneity of the messenger ribonucleic acids encoding cystatin-related protein. *Endocrinology* 132(3), 2496-502
- [79] PAEK, I. AND AXEL, R. (1987) Glucocorticoids enhance stability of human growth hormone mRNA. *Mol Cell Biol* 7(4), 1496-507
- [80] PASCALL, J.C. (1997) Post-transcriptional regulation of gene expression by androgens: recent observations from the epidermal growth factor gene. *J Mol Endocrinol* 18(3), 177-80
- [81] SHEFLIN, L.G. AND SPAULDING, S.W. (2000) Testosterone and dihydrotestosterone regulate AUF1 isoforms in a tissue-specific fashion in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(1), E50-7
- [82] SHEFLIN, L.G., ZHANG, W. AND SPAULDING, S.W. (2001) Androgen regulates the level and subcellular distribution of the AU-rich ribonucleic acid-binding protein HuR both in vitro and in vivo. *Endocrinology* 142(6), 2361-8
- [83] SCHOENMAKERS, E., VERRIJDT, G., PEETERS, B., VERHOEVEN, G., ROMBAUTS, W. AND CLAESSENS, F. (2000) Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem* 275(16), 12290-7
- [84] DAVEY, H.W., WILKINS, R.J. AND WAXMAN, D.J. (1999) STAT5 signaling in sexually dimorphic gene expression and growth patterns. *Am J Hum Genet* 65(4), 959-65
- [85] UDY, G.B., TOWERS, R.P., SNELL, R.G., WILKINS, R.J., PARK, S.H., RAM, P.A., WAXMAN, D.J. AND DAVEY, H.W. (1997) Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14), 7239-44



- [86] WAXMAN, D.J., PAMPORI, N.A., RAM, P.A., AGRAWAL, A.K. AND SHAPIRO, B.H. (1991) Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15), 6868-72
- [87] JANSSON, J.O., EDEN, S. AND ISAKSSON, O. (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 6(2), 128-50
- [88] MACLEOD, J.N., PAMPORI, N.A. AND SHAPIRO, B.H. (1991) Sex differences in the ultradian pattern of plasma growth hormone concentrations in mice. *J Endocrinol* 131(3), 395-9
- [89] OLSEN, N.J. AND KOVACS, W.J. (2001) Effects of androgens on T and B lymphocyte development. *Immunol Res* 23(2-3), 281-8
- [90] ROSINSKI-CHUPIN, I., TRONIK, D. AND ROUGEON, F. (1988) High level of accumulation of a mRNA coding for a precursor-like protein in the submaxillary gland of male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22), 8553-7
- [91] SENORALE-POSE, M., JACQUESON, A., ROUGEON, F., AND ROSINSKI-CHUPIN, I. (1998) Acinar cells are target cells for androgens in mouse submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 46(5), 669-78
- [92] MERCURIO, M.G. AND GOGSTETTER, D.S. (2000) Androgen physiology and the cutaneous pilosebaceous unit. *J Genet Specif Med* 3(4), 59-64
- [93] ICATTERALL, J.F., KONTULA, K.K., WATSON, C.S., SEPPANEN, P.J., FUNKENSTEIN, B., MELANITOU, E., HICKOK, N.J., BARDIN, C.W. AND JANNE, O.A. (1986) Regulation of gene expression by androgens in murine kidney. *Recent Prog Horm Res* 42, 71-109
- [94] OUAR, Z., SOLE, E., BENS, M., RAFESTIN-OBLIN, M.E., MESEGUER, A. AND VANDEWALLE, A. (1998) Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immortalized mouse proximal tubule cells. Technical note. *Kidney Int* 53(1), 59-66
- [95] HENNINGSSON, S., PERSSON, L. AND ROSENGREN, E. (1978) Polyamines and nucleic acids in the mouse kidney induced to growth by testosterone propionate. *Acta Physiol Scand* 102(4), 385-93
- [96] BERGER, F.G. AND WATSON, G. (1989) Androgen-regulated gene expression. *Annu Rev Physiol* 51, 51-65
- [97] KOENIG, H., GOLDSTONE, A., BLUME, G. AND LU, C.Y. (1980) Testosterone-mediated sexual dimorphism of mitochondria and lysosomes in mouse kidney proximal tubules *Science*. 209(4460), 1023-6
- [98] ASADI, F.K., DIMACULANGAN, D.D. AND BERGER, F.G. (1994) Androgen regulation of gene expression in primary epithelial cells of the mouse kidney. *Endocrinology* (3), 1179-87
- [99] SEYLE, H. (1939) The effect of testosterone in the kidney. *Journal of Urology* 42, 637-641
- [100] JEAN-FAUCHER, C., BERGER, M., GALLON, C., DE TURCKHEIM, M., VEYSSIERE, G. AND JEAN, C. (1987) Sex-related differences in renal size in mice: ontogeny and influence of neonatal androgens. *J Endocrinol* 115(2), 241-6
- [101] KARP, R., BRASEL, J.A. AND WINICK, M. (1971) Compensatory kidney growth after uninephrectomy in adult and infant rats. *Am J Dis Child* 121(2), 186-8
- [102] MULRONEY, S.E., KOENIG, J.L., CSIKOS, T., PESCE, C., STRIKER, L., LEROITH, D. AND HARAMATI, A. (1996) Temporal changes in insulin-like growth factor I, c-fos, and c-jun gene expression during hyperplastic kidney growth in weanling rats. *Endocrinology* 137(3), 839-45
- [103] MULRONEY, S.E., WODA, C., JOHNSON, M. AND PESCE, C. (1999) Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney Int* 56(3), 944-53
- [104] MULRONEY, S.E. AND PESCE, C.E. (2000) Early hyperplastic renal growth after uninephrectomy in adult female rats. *Endocrinology* 141(3), 932-7
- [105] SHIMAMURA, T. AND MORRISON, A.B. (1975) A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol* 79(1), 95-106
- [106] ZHANG, H., WADA, J., KANWAR, Y.S., TSUCHIYAMA, Y., HIRAGUSHI, K., HIDA, K., SHIKATA, K. AND MAKINO, H. (1999) Screening for genes up-regulated in 5/6 nephrectomized mouse kidney. *Kidney Int* 56(2), 549-58
- [107] OBINECHE, E.N., MENSAH-BROWN, E., CHANDRANATH, S.I., AHMED, I., NASEER, O. AND ADEM, A. (2001) Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. *Arch Physiol Biochem* 109(3), 241-5
- [108] MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA, M., CHMURZYNSKA, W. AND GRZELAKOWSKA-SZTABERT, B. (1993) Polyamines in testosterone-induced hypertrophic and antifolate-induced hyperplastic mouse kidney. Differential effect of alpha-difluoromethylornithine. *Biochim Biophys Acta* 1182(2), 133-41
- [109] MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA, M., PESKA, M., CHMURZYNSKA, W. AND GRZELAKOWSKA-SZTABERT, B. (1997) Catecholamines are required for androgen-induced ODC expression but not for hypertrophy of mouse kidney. *Biochim Biophys Acta* 1356(3), 292-8

- [110] DUDKOWSKA, M., STACHURSKA, A., CHMURZYSKA, W., GRZELAKOWSKA-SZTABERT, B., MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA, M. (2001) Cross-talk between steroid-receptor-mediated and cell-membrane-receptor-mediated signalling pathways results in the in vivo modulation of c-Met and ornithine decarboxylase gene expression in mouse kidney. *Biochem J* 353(Pt 2), 317-23
- [111] KOBORI, H., ICHIHARA, A., MIYASHITA, Y., HAYASHI, M. AND SARUTA, T. (1998) Mechanism of hyperthyroidism-induced renal hypertrophy in rats. *J Endocrinol* 159(1), 9-14
- [112] BOWMAN, H.M. AND HOOK, J.B. (1972) Sex differences in organic ion transport by rat kidney. *Proc Soc Exp Biol Med* 141(1), 258-62
- [113] KLEINMAN, K.I., LOEWENSTEIN, L. AND GOLDSTEIN, L. (1966) Sex difference in the transport of p-aminohippurate by the rat kidney. *Endocrinology* 78, 403-406
- [114] REYES, J.L., MELENDEZ, E., ALEGRIA, A. AND JARAMILLO-JUAREZ, F. (1998) Influence of sex differences on the renal secretion of organic anions. *Endocrinology* 139(4), 1581-7
- [115] URAKAMI, Y., NAKAMURA, N., TAKAHASHI, K., OKUDA, M., SAITO, H., HASHIMOTO, Y. AND INUI, K. (1999) Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Lett* 461(3), 339-42
- [116] HARVEY, A.M. AND MALVIN, R.L. (1966) The effect of androgenic hormones on creatinine secretion in the rat. *J Physiol (London)* 184(4), 883-8
- [117] GOLDSTONE, A., KOENIG, H. AND LU, C. (1982) Testosterone-dependent sexual dimorphism of the mouse kidney is mediated by polyamines. *Biochem Biophys Res Commun* 104(1), 165-72
- [118] BERGER, E.G. AND PORTER, C.W. (1986) Putrescine does not mediate the androgen-response in mouse kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 138(2), 771-7.
- [119] RECKELHOFF, J.F., ZHANG, H. AND SRIVASTAVA, K. (2000) Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 35(1 Pt 2), 480-3
- [120] ROWLAND, N.E. AND FREGLY, M.J. (1992) Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Hypertens A* 14(3), 367-75
- [121] ASHTON, N. AND BALMENT, R.J. (1991) Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124(1), 91-7
- [122] HIMMELMANN, A., SVENSSON, A. AND HANSSON, L. (1994) Influence of sex on blood pressure and left ventricular mass in adolescents: the Hypertension in Pregnancy Offspring Study. *J Hum Hypertens* 8(7), 485-90
- [123] DUBEY, R.K., OPARIL, S., IMTHURN, B. AND JACKSON, E.K. (2002) Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res* 53(3), 688-708
- [124] RECKELHOFF, J.F. AND GRANGER, J.P. (1999) Role of androgens in mediating hypertension and renal injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(2), 127-31
- [125] HOLLA, V.R., ADAS, F., IMIG, J.D., ZHAO, X., PRICE, E. JR., OLSEN, N., KOVACS, W.J., MAGNUSON, M.A., KEENEY, D.S., BREYER, M.D., FALCK, J.R., WATERMAN, M.R., AND CAPDEVILA, J.H. (2001) Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9), 5211-6
- [126] ELLISON, K.E., INGELFINGER, J.R., PIVOR, M. AND DZAU, V.J. (1989) Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J Clin Invest* 83(6), 1941-5
- [127] CHEN, Y.F., NAFTILAN, A.J. AND OPARIL, S. (1992) Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 19(5), 456-63
- [128] MELANITOU, E., COHN, D.A., BARDIN, C.W. AND JANNE, O.A. (1987) Genetic variation in androgen regulation of ornithine decarboxylase gene expression in inbred strains of mice. *Mol Endocrinol* 1(3), 266-73
- [129] SOLE, E., CALVO, R., OBREGON, M.J. AND MESEGUER, A. (1994) Thyroid hormone controls the cell-specific expression of the kidney androgen-regulated protein gene in S3 mouse kidney cells. *Endocrinology* 135(5), 2120-9
- [130] MESEGUER, A. AND CATTERALL, J.F. (1990) Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control. *Mol Endocrinol* 4(8), 1240-8
- [131] CARTIER, N., LACAVE, R., VALLET, V., HAGEGE, J., HELLIO, R., ROBINE, S., PRINGAULT, E., CLUZEAUD, F., BRIAND, P., KAHN, A., ET AL. (1993) Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci* 104 ( Pt 3), 695-704
- [132] LACAVE, R., BENS, M., CARTIER, N., VALLET, V., ROBINE, S., PRINGAULT, E., KAHN, A., AND VANDEWALLE, A. (1993) Establishment of renal

- proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci.* 104 ( Pt 3):705-12
- [133] MELIÀ, M.J., BOFILL, N., HUBANK, M. AND MESEGUER, A. (1998) Identification of androgen-regulated genes in mouse kidney by representational difference analysis and random arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Endocrinology* 139(2), 688-95
- [134] BARDIN, C.W., BROWN, T.R., MILLS, N.C., GUPTA, C. AND BULLOCK, L.P. (1978) The regulation of the beta-glucuronidase gene by androgens and progestins. *Biol Reprod* 18(1), 74-83
- [135] PAJUNEN, A.E., ISOMAA, V.V., JANNE, O.A. AND BARDIN, C.W. (1982) Androgenic regulation of ornithine decarboxylase activity in mouse kidney and its relationship to changes in cytosol and nuclear androgen receptor concentrations. *J Biol Chem* 257(14), 8190-8
- [136] SWANK, R.T., DAVEY, R., JOYCE, L., REID, P. AND MACEY, M.R. (1997) Differential effect of hypophysectomy on the synthesis of beta-glucuronidase and other androgen-inducible enzymes in mouse kidney. *Endocrinology* 100(2), 473-80
- [137] BETTUZZI, S., STROCCHI, P., DAVALLI, P., MARINELLI, M., FURCI, L. AND CORTI, A. (2001) Androgen responsiveness and intrarenal localization of transcripts coding for the enzymes of polyamine metabolism in the mouse. *Biochem Cell Biol* 79(2), 133-40
- [138] DAVIS, J.F. AND FELDER, M.R. (1993) Mouse ethanol-inducible cytochrome P-450 (P450IIE1). Characterization of cDNA clones and testosterone induction in kidney tissue. *J Biol Chem* 268(22), 16584-9
- [139] IMAOKA, S., HIROI, T., TAMURA, Y., YAMAZAKI, H., SHIMADA, T., KOMORI, M., DEGAWA, M. AND FUNAE, Y. (1995) Mutagenic activation of 3-methoxy-4-aminoazobenzene by mouse renal cytochrome P450 CYP4B1: cloning and characterization of mouse CYP4B1. *Arch Biochem Biophys* 321(1), 255-62
- [140] FELDER, M.R., WATSON, G., HUFF, M.O. AND CECL, J.D. (1988) Mechanism of induction of mouse kidney alcohol dehydrogenase by androgen. Androgen-induced stimulation of transcription of the Adh-1 gene. *J Biol Chem* 263(28), 14531-7
- [141] SMOLEN, T.N., BREWER, J.A. AND WEBER, W.W. (1993) Testosterone modulation of N-acetylation in mouse kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 264(2), 854-8
- [142] RUSH, G.F., NEWTON, J.F. AND HOOK, J.B. (1983) Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: the role of intrarenal glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther* 227(3), 658-62
- [143] ISERN, J., HAGENBUCH, B., STIEGER, B., MEIER, P.J. AND MESEGUER, A. (2001) Functional analysis and androgen-regulated expression of mouse organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) in the kidney. *Biochim Biophys Acta* 1518(1-2), 73-8
- [144] NELSON, S.A. AND ROBINS, D.M. (1997) Two distinct mechanisms elicit androgen-dependent expression of the mouse sex-limited protein gene. *Mol Endocrinol* 11(4), 460-9
- [145] MESEGUER, A., WATSON, C.S. AND CATTERALL, J.F. (1989) Nucleotide sequence of kidney androgen-regulated protein mRNA and its cell-specific expression in Tfm/Y mice. *Mol Endocrinol* 3(6), 962-7
- [146] KING, D., SUN, Y.H. AND LINGREL, J.B. (1986) Amino acid sequence of the testosterone-regulated mouse kidney RP2 protein deduced from its complementary DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 14(13), 5159-70
- [147] OMURA, T. AND SATO, R. (1964) *J Biol Chem* 239, 2370
- [148] ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y. AND ROSENTHAL, O. (1963) The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem Zeit* 338, 741-55
- [149] GUENGERICH, F.P. (1991) Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* 266(16), 10019-22
- [150] ZERBE, K., PYLYPENKO, O., VITALI, F., ZHANG, W., ROUSET, S., HECK, M., VRIJBLOED, J.W., BISCHOFF, D., BISTER, B., SUSSMUTH, R.D., PELZER, S., WOHLLEBEN, W., ROBINSON, J.A. AND SCHLICHTING, I. (2002) Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *J Biol Chem* 277(49), 47476-85
- [151] SEVRIUKOVA, I.F., LI, H., ZHANG, H., PETERSON, J.A. AND POULOS, T.L. (1996) Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5), 1863-8.
- [152] TEPHLY, T., GREEN, M., PUIG, J. AND IRSHAID, Y. (1988) Endogenous substrates for UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica*. 18(11), 1201-10
- [153] NELSON, D.R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J.J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D.J., WATERMAN, M.R., GOTOH, O., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., GUNSALUS, I.C. AND NEBERT, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6(1), 1-42

- [154] POULOS, T.L., FINZEL, B.C., GUNSALUS, I.C., WAGNER, G.C. AND KRAUT, J. (1985) The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem* 260(30), 16122-30
- [155] DEGTYARENKO, K.N. AND FABIÁN, P. ©1999 "Directory of P450-containing Systems" <<http://p450.abc.hu>>
- [156] NELSON, D.R. (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 369(1), 1-10
- [157] DENISON, M.S. AND WHITLOCK, J.P. JR. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem* 270(31), 18175-8
- [158] NEBERT, D.W. (1991) Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Mol Endocrinol* 5(9), 1203-14
- [159] HANKINSON, O. (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-40
- [160] NELSON, D. "Cytochrome P450s in humans" (2002) <<http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>>
- [161] ZELKO, I. AND NEGISHI, M. (2000) Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 277(1), 1-6
- [162] CIOLINO, H.P. AND YEH, G.C. (1999) The steroid hormone dehydroepiandrosterone inhibits CYP1A1 expression in vitro by a post-transcriptional mechanism. *J Biol Chem* 274(49), 35186-90
- [163] PAN, J., HONG, J.Y. AND YANG, C.S. (1992) Post-transcriptional regulation of mouse renal cytochrome P450 2E1 by testosterone. *Arch Biochem Biophys* 299(1), 110-5
- [164] IMAOKA, S., NAGASHIMA, K. AND FUNAE, Y. (1990) Characterization of three cytochrome P450s purified from renal microsomes of untreated male rats and comparison with human renal cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* 276(2), 473-80
- [165] MAIER, K.G. AND ROMAN, R.J. (2001) Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10(1), 81-7
- [166] MA, J., QU, W., SCARBOROUGH, P.E., TOMER, K.B., MOOMAW, C.R., MARONPOT, R., DAVIS, L.S., BREYER, M.D. AND ZELDIN, D.C. (1999) Molecular cloning, enzymatic characterization, developmental expression, and cellular localization of a mouse cytochrome P450 highly expressed in kidney. *J Biol Chem* 274(25), 17777-88
- [167] SIMPSON, A.E. (1997) The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol* 28(3), 351-9
- [168] NELSON, D.R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D.J., GUENGERICH, F.P., ESTABROOK, R.W., FEYEREISEN, R., GONZALEZ, F.J., COON, M.J., GUNSALUS, I.C., GOTOH, O., *et al.* (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12(1), 1-51
- [169] HENG, Y.M., KUO, C.S., JONES, P.S., SAVORY, R., SCHULZ, R.M., TOMLINSON, S.R., GRAY, T.J. AND BELL, D.R. (1997) A novel murine P-450 gene, *Cyp4a14*, is part of a cluster of *Cyp4a* and *Cyp4b*, but not of *CYP4F*, genes in mouse and humans. *Biochem J* 325 ( Pt 3), 741-9
- [170] HENNE, K.R., KUNZE, K.L., ZHENG, Y.M., CHRISTMAS, P., SOBERMAN, R.J. AND RETTIE, A.E. (2001) Covalent linkage of prosthetic heme to CYP4 family P450 enzymes. *Biochemistry* 40(43), 12925-31
- [171] OKITA, R.T. AND OKITA J.R. (2001) Cytochrome P450 4A fatty acid omega hydroxylases. *Curr Drug Metab* 2(3), 265-81
- [172] GASSER, R. AND PHILPOT, R.M. (1989) Primary structures of cytochrome P-450 isozyme 5 from rabbit and rat and regulation of species-dependent expression and induction in lung and liver: identification of cytochrome P-450 gene subfamily IVB. *Mol Pharmacol* 35(5), 617-25
- [173] NHAMBURO, P.T., GONZALEZ, F.J., MCBRIDE, O.W., GELBOIN, H.V. AND KIMURA, S. (1989) Identification of a new P450 expressed in human lung: complete cDNA sequence, cDNA-directed expression, and chromosome mapping. *Biochemistry* 28(20), 8060-6
- [174] YOKOTANI, N., SOGAWA, K., MATSUBARA, S., GOTOH, O., KUSUNOSE, E. KUSUNOSE, M. AND FUJII-KURIYAMA, Y. (1990) cDNA cloning of cytochrome P-450 related to P-450p-2 from the cDNA library of human placenta. Gene structure and expression. *Eur J Biochem* 187(1), 23-9
- [175] MASTYUGIN, V., AVERSA, E., BONAZZI, A., VAFAES, C., MIEYAL, P. AND SCHWARTZMAN, M.L. (1999) Hypoxia-induced production of 12-hydroxyeicosanoids in the corneal epithelium: involvement of a cytochrome P-450B1 isoform. *J Pharmacol Exp Ther* 289(3), 1611-9
- [176] KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., KONDO, T., YAMAMOTO, S., KINOSHITA, H. AND KUSUNOSE, M. (1994) Cloning and expression of a novel form of leukotriene B4 omega-

- hydroxylase from human liver. *FEBS Lett* 348(1), 70-4
- [177] GUENGERICH, F.P. (1977) Preparation and properties of highly purified cytochrome p-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase from pulmonary microsomes of untreated rabbits. *Mol Pharmacol* 13(5), 911-23
- [178] SLAUGHTER, S.R., WOLF, C.R., MARCINISZYN, J.P. AND PHILPOT, R.M. (1981) The rabbit pulmonary monooxygenase system. partial structural characterization of the cytochrome P-450 components and comparison to the hepatic cytochrome P-450. *J Biol Chem* 256(5), 2499-503
- [179] IMAOKA, S., YONEDA, Y., SUGIMOTO, T., IKEMOTO, S., HIROI, T., YAMAMOTO, K., NAKATANI, T. AND FUNAE, Y. (2001) Androgen regulation of CYP4B1 responsible for mutagenic activation of bladder carcinogens in the rat bladder: detection of CYP4B1 mRNA by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cancer Lett* 166(2), 119-23
- [180] BERTRAM, J.S. AND CRAIG, A.W. (1972) Specific induction of bladder cancer in mice by butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and the effects of hormonal modifications on the sex difference in response. *Eur J Cancer* 8(6), 587-94
- [181] MCKINNON, R.A., BURGESS, W.M., GONZALEZ, F.J., GASSER, R. AND MCMANUS, M.E. (1994) Species-specific expression of CYP4B1 in rabbit and human gastrointestinal tissues. *Pharmacogenetics* 4(5), 260-70
- [182] LECHEVREL, M., CASSON, A.G., WOLF, C.R., HARDIE, L.J., FLINTERMAN, M.B., MONTESANO, R. AND WILD, C.P. (1999) Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa. *Carcinogenesis* 20(2), 243-8
- [183] ZHENG, Y.M., FISHER, M.B., YOKOTANI, N., FUJII-KURIYAMA, Y. AND RETTIE, A.E. (1998) Identification of a meander region proline residue critical for heme binding to cytochrome P450: implications for the catalytic function of human CYP4B1. *Biochemistry* 37(37), 12847-51
- [184] IMAOKA, S., YONEDA, Y., MATSUDA, T., DEGAWA, M., FUKUSHIMA, S. AND FUNAE, Y. (1997) Mutagenic activation of urinary bladder carcinogens by CYP4B1 and the presence of CYP4B1 in bladder mucosa. *Biochem Pharmacol* 54(6), 677-83
- [185] IMAOKA, S., HAYASHI, K., HIROI, T., YABUSAKI, Y., KAMATAKI, T. AND FUNAE, Y. (2001) A transgenic mouse expressing human CYP4B1 in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 284(3), 757-62
- [186] CAI, S.Y., WANG, W., SOROKA, C.J., BALLATORI, N. AND BOYER, J.L. (2002) An evolutionarily ancient Oatp: insights into conserved functional domains of these proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(4), G702-10
- [187] KAWAJI, H., SCHONBACH, C., MATSUO, Y., KAWAI, J., OKAZAKI, Y., HAYASHIZAKI, Y., MATSUDA, H. (2002) Exploration of novel motifs derived from mouse cDNA sequences. *Genome Res* 12(3), 367-78
- [188] FANNING, A.S. AND ANDERSON, J.M. (1999) PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* (6), 767-72
- [189] VAN MONTFOORT, J.E., MULLER, M., GROOTHUIS, G.M., MEIJER, D.K., KOEPEL, H. AND MEIER, P.J. (2001) Comparison of "type I" and "type II" organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *J Pharmacol Exp Ther* 298(1), 110-5
- [190] JACQUEMIN, E., HAGENBUCH, B., STIEGER, B., WOLKOFF, A.W. AND MEIER, P.J. (1994) Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1), 133-7
- [191] BERGWERK, A.J., SHI, X., FORD, A.C., KANAI, N., JACQUEMIN, E., BURK, R.D., BAI, S., NOVIKOFF, P.M., STIEGER, B., MEIER, P.J., SCHUSTER, V.L. AND WOLKOFF, A.W. (1996) Immunologic distribution of an organic anion transport protein in rat liver and kidney. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1), G231-8
- [192] ANGELETTI, R.H., NOVIKOFF, P.M., JUVVADI, S.R., FRITSCHY, J.M., MEIER, P.J. AND WOLKOFF, A.W. (1997) The choroid plexus epithelium is the site of the organic anion transport protein in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1), 283-6
- [193] LI, L., LEE, T.K., MEIER, P.J. AND BALLATORI, N. (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* 273(26), 16184-91
- [194] LU, R., KANAI, N., BAO, Y., WOLKOFF, A.W. AND SCHUSTER, V.L. (1996) Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone. *Am J Physiol* 270(2 Pt 2), F332-7
- [195] SIMON, F.R., FORTUNE, J., IWAHASHI, M., BOWMAN, S., WOLKOFF, A. AND SUTHERLAND, E. (1999) Characterization of the mechanisms involved in the gender differences in hepatic taurocholate uptake. *Am J Physiol* 276(2 Pt 1), G556-65

- [196] KATO, Y., KUGE, K., KUSUHARA, H., MEIER, P.J. AND SUGIYAMA, Y. (2002) Gender difference in the urinary excretion of organic anions in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 302(2), 483
- [197] KANAI, N., LU, R., SATRIANO, J.A., BAO, Y., WOLKOFF, A.W., SCHUSTER, V.L. (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268(5212), 866-9
- [198] HAKES, D.J. AND BEREZNEY, R. (1991) Molecular cloning of matrix F/G: A DNA binding protein of the nuclear matrix that contains putative zinc finger motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(14), 6186-90
- [199] SCHUSTER, V.L. (1998) Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol.* 60, 221-42
- [200] BAO, Y., PUCCI, M.L., CHAN, B.S., LU, R., ITO, S. AND SCHUSTER, V.L. (2002) Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids. *Am J Physiol Renal Physiol.* 282(6), F1103-10
- [201] NOE, B., HAGENBUCH, B., STIEGER, B. AND MEIER, P.J. (1997) Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(19), 10346-50
- [202] GAO, B., STIEGER, B., NOE, B., FRITSCHY, J.M. AND MEIER, P.J. (1999) Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem* 47(10), 1255-64
- [203] KAKYO, M., SAKAGAMI, H., NISHIO, T., NAKAI, D., NAKAGOMI, R., TOKUI, T., NAITOH, T., MATSUNO, S., ABE, T. AND YAWO, H. (1999) Immunohistochemical distribution and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2). *FEBS Lett* 445(2-3), 343-6
- [204] ITO, A., YAMAGUCHI, K., ONOGAWA, T., UNNO, M., SUZUKI, T., NISHIO, T., SUZUKI, T., SASANO, H., ABE, T. AND TAMAI, M. (2002) Distribution of organic anion-transporting polypeptide 2 (oatp2) and oatp3 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43(3), 858-63
- [205] ABE, T., KAKYO, M., SAKAGAMI, H., TOKUI, T., NISHIO, T., TANEMOTO, M., NOMURA, H., HEBERT, S.C., MATSUNO, S., KONDO, H. AND YAWO, H. (1998) Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J Biol Chem* 273(35), 22395-401
- [206] TOKUI, T., NAKAI, D., NAKAGOMI, R., YAWO, H., ABE, T. AND SUGIYAMA, Y. (1999) Pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, is transported by rat organic anion transporting polypeptide, oatp2. *Pharm Res* 16(6), 904-8
- [207] ASABA, H., HOSOYA, K., TAKANAGA, H., OHTSUKI, S., TAMURA, E., TAKIZAWA, T. AND TERASAKI, T. (2000) Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J Neurochem* 75(5), 1907-16
- [208] REICHEL, C., GAO, B., VAN MONTFOORT, T. J., CATTORI, V., RAHNER, C., HAGENBUCH, B., STIEGER, B., KAMISAKO, T. AND MEIER, P.J. (1999) Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* 117(3), 688-95
- [209] WALTERS, H.C., CRADDOCK, A.L., FUSEGAWA, H., WILLINGHAM, M.C. AND DAWSON, P.A. (2000) Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(6), G1188-200
- [210] RUSSEL, E.G., MASEREEUW, R. AND VAN AUBEL, R.A. (2002) Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* 64, 563-94
- [211] FUJIWARA, K., ADACHI, H., NISHIO, T., UNNO, M., TOKUI, T., OKABE, M., ONOGAWA, T., SUZUKI, T., ASANO, N., TANEMOTO, M., SEKI, M., SHIIBA, K., SUZUKI, M., KONDO, Y., NUNOKI, K., SHIMOSEGAWA, T., IINUMA, K., ITO, S., MATSUNO, S. AND ABE, T. (2001) Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology* 142(5), 2005-12
- [212] FRIESEMA, E.C., DOCTER, R., MOERINGS, E.P., STIEGER, B., HAGENBUCH, B., MEIER, P.J., KRENNING, E.P., HENNEMANN, G., VISSER, T.J. (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254(2), 497-501
- [213] CATTORI, V., VAN MONTFOORT, J.E., STIEGER, B., LANDMANN, L., MEIJER, D.K., WINTERHALTER, K.H., MEIER, P.J. AND HAGENBUCH, B. (2001) Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflugers Arch* 443(2), 188-95
- [214] MEIER, P.J. AND STIEGER, B. (2002) Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64, 635-61
- [215] ABE, T., KAKYO, M., TOKUI, T., NAKAGOMI, R., NISHIO, T., NAKAI, D., NOMURA, H., UNNO, M., SUZUKI, M., NAITOH, T., MATSUNO, S. AND YAWO, H. (1999) Identification of a novel gene family encoding

- human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274(24), 17159-63
- [216] KAKYO, M., UNNO, M., TOKUI, T., NAKAGOMI, R., NISHIO, T., IWASASHI, H., NAKAI, D., SEKI, M., SUZUKI, M., NAITOH, T., MATSUNO, S., YAWO, H. AND ABE, T. (1999) Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rlst-1. *Gastroenterology* 117(4), 770-5
- [217] CATTORI, V., HAGENBUCH, B., HAGENBUCH, N., STIEGER, B., HA, R., WINTERHALTER, K.E. AND MEIER, P.J. (2000) Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (rlst-1) in rat liver. *FEBS Lett* 474(2-3), 242-5
- [218] CHOUDHURI, S., OGURA, K. AND KLAASSEN, C.D. (2000) Cloning of the full-length coding sequence of rat liver-specific organic anion transporter-1 (rlst-1) and a splice variant and partial characterization of the rat lst-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 274(1), 79-86
- [219] CHOUDHURI, S., OGURA, K. AND KLAASSEN, C.D. (2001) Cloning, expression, and ontogeny of mouse organic anion-transporting polypeptide-5, a kidney-specific organic anion transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 280(1), 92-8
- [220] SAITO, H., MASUDA, S. AND INUI, K. (1996) Cloning and functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney. *J Biol Chem* 271(34), 20719-25
- [221] MASUDA, S., TAKEUCHI, A., SAITO, H., HASHIMOTO, Y. AND INUI, K. (1999) Functional analysis of rat renal organic anion transporter OAT-K1: bidirectional methotrexate transport in apical membrane. *FEBS Lett* 459(1), 128-32
- [222] MASUDA, S., IBARAMOTO, K., TAKEUCHI, A., SAITO, H., HASHIMOTO, Y. AND INUI, K.I. (1999) Cloning and functional characterization of a new multispecific organic anion transporter, OAT-K2, in rat kidney. *Mol Pharmacol* 55(4), 743-52
- [223] WOLFF, M.W. AND SU, T.Z. (2002) Cloning and tissue-specific expression of spliced variants of the rat organic anion transporter (rOAT-K). *DNA Seq* 13(1), 15-25
- [224] NISHIO, T., ADACHI, H., NAKAGOMI, R., TOKUI, T., SATO, E., TANEMOTO, M., FUJIWARA, K., OKABE, M., ONOGAWA, T., SUZUKI, T., NAKAI, D., SHIIBA, K., SUZUKI, M., OHTANI, H., KONDO, Y., UNNO, M., ITO, S., IINUMA, K., NUNOKI, K., MATSUNO, S. AND ABE, T. (2000) Molecular identification of a rat novel organic anion transporter moat1, which transports prostaglandin D(2), leukotriene C(4), and taurocholate. *Biochem Biophys Res Commun* 275(3), 831-8
- [225] LI, J.Y., BOADO, R.J. AND PARDRIDGE, W.M. (2001) Blood-brain barrier genomics. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(1), 61-8
- [226] KULLAK-UBLICK, G.A., HAGENBUCH, B., STIEGER, B., SCHTEINGART, C.D., HOFMANN, A.F., WOLKOFF, A.W. AND MEIER, P.J. (1995) Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109(4)1274-82
- [227] GAO, B., HAGENBUCH, B., KULLAK-UBLICK, G.A., BENKE, D., AGUZZI, A. AND MEIER, P.J. (2000) Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 294(1), 73-9
- [228] HSIANG, B., ZHU, Y., WANG, Z., WU, Y., SASSEVILLE, V., YANG, W.P. AND KIRCHGESSNER, T.G. (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 274(52), 37161-8
- [229] KÖNIG, J., CUI, Y., NIES, A.T. AND KEPPLER, D. (2000) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(1), G156-64
- [230] KULLAK-UBLICK, G.A., STIEGER, B., HAGENBUCH, B., AND MEIER, P.J. (2000) Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20(3), 273-92
- [231] TAMAI, I., NEZU, J., UCHINO, H., SAI, Y., OKU, A., SHIMANE, M. AND TSUJI, A. (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273(1), 251-60
- [232] KULLAK-UBLICK, G.A., ISMAIR, M.G., STIEGER, B., LANDMANN, L., HUBER, R., PIZZAGALLI, F., FATTINGER, K., MEIER, P.J. AND HAGENBUCH, B. (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120(2), 525-33
- [233] ST-PIERRE, M.V., HAGENBUCH, B., UGELE, B., MEIER, P.J. AND STALLMACH T. (2002) Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 87(4), 1856-63
- [234] KÖNIG, J., CUI, Y., NIES, A.T. AND KEPPLER, D. (2000) Localization and genomic organization of a new

- hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* 275(30), 23161-8
- [235] LU, R., KANAI, N., BAO, Y., SCHUSTER, V.L. (1996) Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *J Clin Invest* 98(5), 1142-9
- [236] LU, R. AND SCHUSTER, V.L. (1998) Molecular cloning of the gene for the human prostaglandin transporter hPGT: gene organization, promoter activity, and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res Commun* 246(3), 805-12
- [237] CHAN, B.S., ENDO, S., KANAI, N. AND SCHUSTER, V.L. (2002) Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *Am J Physiol Renal Physiol* 282(6), F1097-102
- [238] KRUSHKAL, J., FERREL, L. R., MOCKRIN, S.C., TURNER, S.T., SING, C.F. AND BOERWINKLE, E. (1999) Genome-wide linkage analyses of systolic blood pressure using highly discordant siblings. *Circulation* 99(11), 1407-10
- [239] PIZZAGALLI, F., HAGENBUCH, B., STIEGER, B., KLENK, U., FOLKERS, G. AND MEIER, P.J. (2002) Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol* 16(10), 2283-96
- [240] HAGENBUCH, B., ADLER, I.D. AND SCHMID, T.E. (2000) Molecular cloning and functional characterization of the mouse organic-anion-transporting polypeptide 1 (Oatp1) and mapping of the gene to chromosome X. *Biochem J* 345 Pt 1, 115-20
- [241] PUCCI, M.L., BAO, Y., CHAN, B., ITOH, S., LU, R., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A. AND SCHUSTER, V.L. (1999) Cloning of mouse prostaglandin transporter PGT cDNA: species-specific substrate affinities. *Am J Physiol* 277(3 Pt 2), R734-41
- [242] OGURA, K., CHOUDHURI, S. AND KLAASSEN, C.D. (2001) Genomic organization and tissue-specific expression of splice variants of mouse organic anion transporting polypeptide 2. *Biochem Biophys Res Commun* 281(2), 431-9
- [243] VAN MONTFOORT, J.E., SCHMID, T.E., ADLER, I.D., MEIER, P.J. AND HAGENBUCH, B. (2002) Functional characterization of the mouse organic-anion-transporting polypeptide 2. *Biochim Biophys Acta* 1564(1), 183-8
- [244] OGURA, K., CHOUDHURI, S. AND KLAASSEN, C.D. (2000) Full-length cDNA cloning and genomic organization of the mouse liver-specific organic anion transporter-1 (lst-1). *Biochem Biophys Res Commun* 272(2), 563-70
- [245] CHOUDHURI, S., OGURA, K. AND KLAASSEN, C.D. (2001) Cloning, expression, and ontogeny of mouse organic anion-transporting polypeptide-5, a kidney-specific organic anion transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 280(1), 92-8
- [246] PRITCHARD, J.B. AND MILLER, D.S. (1993) Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* 73(4), 765-96
- [247] SICA, A.D. AND SCHOOLWERTH, A.C. (1996) Renal handling of organic anions and cations and renal secretion of uric acid. In: *The Kidney* (Brenner, B.M., ed.), 5th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, vol. I, pp. 607-626
- [248] VAN AUBEL, R.A., MASEREEUW, R. AND RUSSEL, F.G. (2000) Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(2), F216-32
- [249] PRITCHARD, J.B. AND MILLER, D.S. (1996) Renal secretion of organic anions and cations. *Kidney Int* 49(6), 1649-54
- [250] INUI, K.I., MASUDA, S. AND SAITO, H. (2000) Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int* 58(3), 944-58
- [251] BURCKHARDT, G. AND WOLFF, N.A. (2000) Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(6), F853-66
- [252] KOEPESELL, H. (1998) Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu Rev Physiol* 60: 243-66
- [253] KOEPESELL, H., GORBOULEV, V., KARBACH, U. AND ARNDT, P. (2000) Polyspecific cation transporters in the proximal tubule. *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 6, 3-4
- [254] HEIDENHAIN, R. (1874) Versuche über den vorgang der Harnabsonderung. *Pflügers Arch* 9, 1-27
- [255] PRITCHARD, J.B. AND MILLER, D.S. (1991) Comparative insights into the mechanisms of renal organic anion and cation secretion. *Am J Physiol* 261(6 Pt 2), R1329-40
- [256] CHEN, X., TSUKAGUCHI, H., CHEN, X.Z., BERGER, U.V. AND HEDIGER, M.A. (1999) Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest* 103(8), 1159-68
- [257] BORST, P. AND ELFERINK, R.O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-92
- [258] HERNANDO, N., FORSTER, I.C., BIBER, J. AND MURER, H. (2000) Molecular characteristics of



- phosphate transporters and their regulation. *Exp Nephrol* 8(6), 366-75
- [259] INUI, K., TERADA, T., MASUDA, S. AND SAITO, H. (2000) Physiological and pharmacological implications of peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 6, 11-3
- [260] DANTZLER WH. (2002) Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1566(1-2), 169-81
- [261] VAN MONTFOORT, J.E., HAGENBUCH, B., FATTINGER, K.E., MULLER, M., GROOTHUIS, G.M., MEIJER, D.K. AND MEIER, P.J. (1999) Polyspecific organic anion transporting polypeptides mediate hepatic uptake of amphiphatic type II organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* 291(1), 147-52
- [262] CUI, Y., KONIG, J., LEIER, I., BUCHHOLZ, U. AND KEPPLER, D. (2001) Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 276(13), 9626-30
- [263] ABE, T., UNNO, M., ONOGAWA, T., TOKUI, T., KONDO, T.N., NAKAGOMI, R., ADACHI, H., FUJIWARA, K., OKABE, M., SUZUKI, T., NUNOKI, K., SATO, E., KAKYO, M., NISHIO, T., SUGITA, J., ASANO, N., TANEMOTO, M., SEKI, M., DATE, F., ONO, K., KONDO, Y., SHIIBA, K., SUZUKI, M., OHTANI, H., SHIMOSEGAWA, T., IINUMA, K., NAGURA, H., ITO, S. AND MATSUNO, S. (2001) LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 120(7), 1689-99
- [264] ISMAIR, M.G., STIEGER, B., CATTORI, V., HAGENBUCH, B., FRIED, M., MEIER, P.J. AND KULLAK-UBLICK, G.A. (2001) Hepatic uptake of cholecystokinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver. *Gastroenterology* 121(5), 1185-90
- [265] VAN MONTFOORT, J.E., STIEGER, B., MEIJER, D.K., WEINMANN, H.J., MEIER, P.J. AND FATTINGER, K.E. (1999) Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent gadoxetate by the organic anion transporting polypeptide Oatp1. *J Pharmacol Exp Ther* 290(1), 153-7
- [266] ABU-ZAHRA, T.N., WOLKOFF, A.W., KIM, R.B., PANG, K.S. (2000) Uptake of enalapril and expression of organic anion transporting polypeptide 1 in zonal, isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 28(7), 801-6
- [267] TAKEUCHI, A., MASUDA, S., SAITO, H., ABE, T. AND INUI, K. (2001) Multispecific substrate recognition of kidney-specific organic anion transporters OAT-K1 and OAT-K2. *J Pharmacol Exp Ther* 299(1), 261-7
- [268] MEIER, P.J., ECKHARDT, U., SCHROEDER, A., HAGENBUCH, B. AND STIEGER, B. (1997) Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26(6), 1667-77
- [269] ECKHARDT, U., SCHROEDER, A., STIEGER, B., HOCHLI, M., LANDMANN, L., TYNES, R., MEIER, P.J. AND HAGENBUCH, B. (1999) Polyspecific substrate uptake by the hepatic organic anion transporter Oatp1 in stably transfected CHO cells. *Am J Physiol* 276, G1037-42
- [270] IWAI, N. AND INAGAMI, T. (1991) Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension* 17(2), 161-9
- [271] OKAMOTO, K. AND AOKI, K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27, 282-293
- [272] COLMAN, A. "Transcription and translation: a practical approach" (Hames, B.D, S.J. Higgins, Eds.), (1986) IRL Press, Oxford, England
- [273] MADIN, S.H. AND DARBY, JR. N. B. (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin., *Proc Soc Exp Bio. Med* 98, 574-576
- [274] JENSEN, F.J. *et al.* (1964) Infection of human and simian tissue cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 52, 53-59
- [275] GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., AND NAIRN, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74
- [276] ADEN, D.P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I. AND KNOWLES, B.B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-6
- [277] DAVIS, J.M. (Ed.) "Basic Cell Culture: A Practical Approach" 2<sup>nd</sup> Ed., (2002) Oxford University Press, England
- [278] YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. AND MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19
- [279] ROZEN, S. AND SKALETSKY, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S., MISENER, S. (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- [280] CHOMCZYNSKI, P. AND SACCHI, N. (1987) Single-

- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9
- [281] SANGER, F., NICKLEN, S. AND COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7
- [282] FROHMAN, M.A., DUSH, M.K. AND MARTIN, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8998-9002
- [283] BRAISSANT, O. AND WAHLI, W. (1998) A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *Biochemica* (Boehringer Mannheim) 1, 10-16
- [284] SAMBROOCK, E.F., FRITSCH, T. AND MANIATIS, T. (1989) In *Molecular cloning. a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbour Lab. Press, New York.
- [285] BALBIN, M. AND LÓPEZ-OTÍN, C. (1996) Hormonal regulation of the human pepsinogen C gene in breast cancer cells. *J Biol Chem* 271, 15175-15181
- [286] CSERZO, M., WALLIN, E., SIMON, I., VON HEIJNE, G. AND ELOFSSON, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* 10(6), 673-6
- [287] NCBI (*mouse genome*): [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?chr=mouse\\_chr.inf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?chr=mouse_chr.inf)>; ENSEMBL (*Mus musculus*): <[http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/)>
- [288] XU, X., YANG, J., ROGUS, J., CHEN, C., SCHORK, N. AND XU, X. (1999) Mapping of a blood pressure quantitative trait locus to chromosome 15q in a Chinese population. *Hum Mol Genet* 8(13), 2551-5
- [289] SAAD, Y., GARRETT, M.R., LEE, S.J., DENE, H. AND RAPP, J.P. (1999) Localization of a blood pressure QTL on rat chromosome 1 using Dahl rat congenic strains. *Physiol Genomics* 1(3), 119-25
- [290] KOVACS, P., VOIGT, B. AND KLOTING, I. (1997) Novel quantitative trait loci for blood pressure and related traits on rat chromosomes 1, 10, and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 235(2), 343-8
- [291] YAGIL, Y. AND YAGIL, C. (1998) Genetic basis of salt-susceptibility in the Sabra rat model of hypertension. *Kidney Int* 53(6), 1493-500
- [292] SAAD, Y., GARRETT, M.R. AND RAPP, J.P. (2001) Multiple blood pressure QTL on rat chromosome 1 defined by Dahl rat congenic strains. *Physiol Genomics* 4(3), 201-14
- [293] IWAI, N., TSUJITA, Y. AND KINOSHITA, M. (1998) Isolation of a chromosome 1 region that contributes to high blood pressure and salt sensitivity. *Hypertension* 32(4), 636-8
- [294] HÜBNER, N., LEE, Y.A., LINDPAINTNER, K., GANTEN, D. AND KREUTZ, R. (1999) Congenic substitution mapping excludes Sa as a candidate gene locus for a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1. *Hypertension* 34(4 Pt 1), 643-8
- [295] CHEN, Y.F. AND MENG, Q.C. (1991) Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci* 48(1), 85-96
- [296] RECKELHOFF, J.F. (2001) Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 37(5), 1199-208
- [297] RECKELHOFF, J.F., ZHANG, H. AND GRANGER, J.P. (1998) Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31(1 Pt 2), 435-9
- [298] TOOLE, J.J., HASTIE, N.D. AND HELD, W.A. (1979) An abundant androgen-regulated mRNA in the mouse kidney. *Cell* 17(2), 441-8
- [299] TAKENAKA, M., IMAI, E., KANEKO, T., ITO, T., MORIYAMA, T., YAMAUCHI, A., HORI, M., KAWAMOTO, S. AND OKUBO, K. (1998) Isolation of genes identified in mouse renal proximal tubule by comparing different gene expression profiles. *Kidney Int* 53(3), 562-72
- [300] SOLE, E., CALVO, R., OBREGON, M.J. AND MESEGUER, A. (1996) Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney. *Mol Cell Endocrinol* 119(2), 147-59
- [301] NIU, E.M., MESEGUER, A. AND CATTERALL, J.F. (1991) Genomic organization and DNA sequence of the mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene. *DNA Cell Biol* 10(1), 41-8
- [302] BURKE, M.D. AND ORRENIUS, S. (1979) Isolation and comparison of endoplasmic reticulum membranes and their mixed function oxidase activities from mammalian extrahepatic tissues. *Pharmacol Ther* 7(3), 549-99
- [303] VERSCHOYLE, R.D., PHILPOT, R.M., WOLF, C.R. AND DINSDALE, D. (1993) CYP4B1 activates 4-ipomeanol in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 123(2), 193-8
- [304] RETTIE, A.E., SHEFFELS, P.R., KORZEKWA, K.R., GONZALEZ, F.J., PHILPOT, R.M. AND BAILLIE, T.A. (1995) CYP4 isozyme specificity and the relationship between omega-hydroxylation and terminal desaturation

- of valproic acid. *Biochemistry* 34(24), 7889-95
- [305] FISHER, M.B., ZHENG, Y.M. AND RETTIE, A.E. (1998) Positional specificity of rabbit CYP4B1 for omega-hydroxylation of short-medium chain fatty acids and hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun* 248(2), 352-5
- [306] DEGAWA, M., MIURA, S. AND HASHIMOTO, Y. (1990) Androgen-dependent renal microsomal cytochrome P-450 responsible for N-hydroxylation and mutagenic activation of 3-methoxy-4-aminoazobenzene in the BALB/c mouse. *Cancer Res* 50(9), 2729-33
- [307] HONG, J.Y., PAN, J.M., NING, S.M. AND YANG, C.S. (1989) Molecular basis for the sex-related difference in renal N-nitrosodimethylamine demethylase in C3H/HeJ mice. *Cancer Res* 49(11), 2973-9
- [308] POHL, L.R., GEORGE, J.W. AND SATOH, H. (1984) Strain and sex differences in chloroform-induced nephrotoxicity. Different rates of metabolism of chloroform to phosgene by the mouse kidney. *Drug Metab Dispos* 12(3), 304-8
- [309] HU, J.J., RHOTEN, W.B. AND YANG, C.S. (1990) Mouse renal cytochrome P450IIE1: immunocytochemical localization, sex-related difference and regulation by testosterone. *Biochem Pharmacol* 40(12), 2597-602
- [310] AHIR, S. AND MOHLA, S. (1989) Regulation of renal N-nitrosodimethylamine demethylase activity by androgens, progestin, glucocorticoid, and estrogen in BALB/c mice. *Cancer Res* 49(14), 3737-41
- [311] JAVADPOUR, N. (1984) Overview of renal cancer, In: *Cancer of the kidney*. Thieme-Stratton Inc., New York
- [312] CZERWINSKI, M., MCLEMORE, T.L., GELBOIN, H.V. AND GONZALEZ, F.J. (1994) Quantification of CYP2B7, CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors. *Cancer Res* 54(4), 1085-91
- [313] NAGAMURA-INOUE, T., TAMURA, T. AND OZATO, K. (2001) Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells. *Int Rev Immunol* 20, 83-105
- [314] MORRIS, J.F., RAUSCHER 3rd, F.J., DAVIS, B., KLEMSZ, M., XU, D., TENEN, D. AND HROMAS, R. (1995) The myeloid zinc finger gene, MZF-1, regulates the CD34 promoter in vitro. *Blood* 86 (1995), 3640-7
- [315] HAGENBUCH, B., STIEGER, B., FOGUET, M., LUBBERT, H. AND MEIER, P.J. (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23), 10629-33
- [316] MASUDA, S., SAITO, H., NONOGUCHI, H., TOMITA, K. AND INUI, K. (1997) mRNA distribution and membrane localization of the OAT-K1 organic anion transporter in rat renal tubules. *FEBS Lett* 407(2), 127-31
- [317] WANG, S., RAAB, R.W., SCHATZ, P.J., GUGGINO, W.B. AND LI, M. (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* 427(1), 103-8
- [318] GOTOH, Y., KATO, Y., STIEGER, B., MEIER, P.J. AND SUGIYAMA, Y. (2002) Gender difference in the Oatp1-mediated tubular reabsorption of estradiol 17beta-D-glucuronide in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(6), E1245-54
- [319] KOBAYASHI, Y., HIROKAWA, N., OHSHIRO, N., SEKINE, T., SASAKI, T., TOKUYAMA, S., ENDOU, H. AND YAMAMOTO, T. (2002) Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 290(1), 482-7
- [320] BOSSUYT, X., MULLER, M., HAGENBUCH, B. AND MEIER, P.J. (1996) Polyspecific drug and steroid clearance by an organic anion transporter of mammalian liver. *J Pharmacol Exp Ther* 276(3), 891-6
- [321] KANAI, N., LU, R., BAO, Y., WOLKOFF, A.W. AND SCHUSTER, V.L. (1996) Transient expression of oatp organic anion transporter in mammalian cells: identification of candidate substrates. *Am J Physiol* 270(2 Pt 2), F319-25
- [322] RAPP, J.P. (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 80(1), 135-72
- [323] KREUTZ, R., STRUK, B., RUBATTU, S., HUBNER, N., SZPIRER, J., SZPIRER, C., GANTEN, D. AND LINDPAINTNER, K. (1997) Role of the alpha-, beta-, and gamma-subunits of epithelial sodium channel in a model of polygenic hypertension. *Hypertension*. 29(1 Pt 1), 131-6
- [324] HERRERA, V.L., XIE, H.X., LOPEZ, L.V., SCHORK, N.J. AND RUIZ-OPAZO, N. (1998) The alpha1 Na,K-ATPase gene is a susceptibility hypertension gene in the Dahl salt-sensitiveHSD rat. *J Clin Invest* 102(6), 1102-11
- [325] PRAVENEC, M., KREN, V., KUNES, J., SCICLI, A.G., CARRETERO, O.A., SIMONET, L. AND KURTZ, T.W. (1991) Cosegregation of blood pressure with a kallikrein gene family polymorphism. *Hypertension* 17(2), 242-6



## agraïments

M'havia imposat d'entrada una autolimitació de mitja plana: tot lo que la sobrepassi serà gratuït, vel·leitós; tot lo que la verifiqui serà parcial, genuí, convencional. Defugir dels artificis, buscar un llenguatge oral, recordar l'essència, tributar amb franquesa; he fracassat. Lluny de la disciplina possible, tota la narració ha anat assolit cotes monumentals i vanes, inclús la seva pròpia manifestació, que adopta caires hiperbòlics i tal vegada autocomplaents. Uns agraïments de 4 planes neixen condemnats irremissiblement a la desídia, a la fatiga, a l'oblit. Voldria resistir-me a l'esperança de que el lector ocasional o hipotètic sabrà canalitzar la indiferència en alguna forma de sopor indulgent, podrà indultar –a la fi– les petites vanitats que han pogut emboirar aquest acte *sentit* en el fons, sincer.



pressat pels terminis implacables, amb els minuts esmunyint-se dels dits, irredempt i com sempre contra rellotge, caldrà enfrontar-se ja sense postergació als reconeixements.

Eternament posposats, arriba per fi el moment ineludible d'iniciar la redacció d'aquestes línies mínimes, però necessàries, de reconeixement i de deute. També ja d'entrada, sensació de negligència, d'inabastabilitat, de fallida, impossible –gairebé obscè– provar de traslladar en lletres tota aquesta etapa intensa i irrepitable. Com ser fidel al to, el ministeri, al tacte, les lluentors, també les frustracions..., com resumir-ho en unes quantes frases ben acostumades i fastuosos adjectius: res més que dèbils paraules, anhel que potser un cop desenllustrades (i mai a plena llum de dia) hagin conservat –tot just entrevistes per un instant–, una pàl·lida ombra dels reflexes d'aquests anys. Però deixem ja els preludis, les vanes il·lusions i rendim-nos a les persones, elles són en el fons les brases que enllumenen el record.

En primer lloc ja, i elevat quasi a categoria vitalícia, vull transmetre el meu agraïment il·limitat a tota la meva família, tiets, àvies, etc., però sobretot als meus pares i a la meva germana, per descomptat!: agrair tot el seu suport i la sincera comprensió de sempre (com no somriure al escoltar aquell entranyable “–encara està estudiant...”), i especialment en aquest darrer –i llarg!– període de reclusió paramonàstica (i per moments paranoicocrítica), en el qual hagués estat impossible dur a terme res sense la seva participació capital. No podré mai correspondre el vostre afecte i esforç com us mereixeríeu.

En segon lloc, i no per això en jerarquia inferior, a la Susanna, (no et podràs queixar que no et dediqui un lloc preferent entre aquests paràgrafs!), per a la qual faig extensible les lloances prèvies i doblement (o triple!), per què si algú ha tingut que aguantar-me realment tot aquest temps –sovint amb seriosos perjudici per la salut– has estat tu: no concebo suficient paciència acumulada en tota la història per suportar tal vegada una empresa d'aquestes magnituds (el fet d'aguantar cert individu capaç de redactar aquesta trama, s'entén).

Abans que res, també, agraeixo significativament l'excel·lent predisposició i generositat de la Dra. Rosa Miró, sense la intervenció i les gestions de la qual la meva estada a l'Hospital hagués estat impossible, o si més no en unes condicions desfavorables.

I ja a escala acadèmic-humana, resulta imperatiu traslladar –sobretot– el meu deïbit i càlid reconeixement a la labor rectoral i tutelar de l'Anna (glupps, aquí m'he excedit potser un xic!), amb la qual he pogut realitzar la tesi doctoral, aprendre “l'ofici”, i de qui no m'ha faltat mai guia, consell i suport al llarg d'aquests anys. Voldria destacar el seu optimisme contagiós, com també una sana obstinació i constància, amb la qual

ha estat capaç de forjar en aquests anys –i no sempre en entorns i condicions favorables– un grup humà immillorable; un servidor no pot sinó expressar satisfacció i deute per haver tingut l'oportunitat de formar-hi part durant aquest període, i del qual ara costa acomiadar-se. No podré oblidar ni deixar de valorar la tenacitat amb la qual vas aconseguir que finalment em pogués incorporar al teu grup; aquelles reunions de feina extrallargues, la passió abocada en els projectes, el record (barreja de sorpresa i perplexitat) d'aquelles primeres audicions de les entranyables 'explicacions-síntesi', denses, entusiastes, un condensat de totes les línies en curs, tota-la-feina-de-tots desplegada com un vano, els ràpids i vigorosos traços d'un segment S3 sobre un tovalló de paper, els resultats del conjunt del lab en quinze minuts, en deu, en cinc, simultàniament sense transparència ni superposició...

Espero que sabràs dispensar-me per les meves caòtiques llibretes d'actes sense actualitzar des de gairebé el segle anterior...

En aquest laboratori, en definitiva, he tingut el repte i l'oportunitat de formar-me (o potser acabar-me d'espallar!) i participar del món de la recerca científica, no sempre tan glamourós, genial, obscur, o sinistre com reflexa el saber popular, o el cel·luloide.

Va pel "lab 2", doncs, entitat semiheracliana en trànsit permanent i mutació constant, passen les persones, les poyates, les pipetes, alguna cosa ha de romandre en la vertiginosa successió, alguna rialla, queda l'àmbit, la gravitació, llibretes, termocicladors.

Gràcies per haver-me acollit i per què sobretot entre vosaltres he après el delicat exercici de la convivència (tot i que jo per norma –ja ho sabeu–, sempre porto la contrària!). Amb vosaltres definitivament he aconseguit perdre la por als "temibles" northerns fins arribar a proclamar sense rubor en un esclat de notorietat que *les ribonucleases no existeixen!* (i a la que podia, hibridava tot blot que em caigués a les mans, vivint quasi de rendes amb la "reserva-nacional-del-blots-i-nylons" *made in M<sup>a</sup> Jesús & Maya*). Espero que sabreu amnistiarme per haver tingut que suportar l'anomenada "música-del-joan" a volums decibèl·lics (sobretot a l'entranyable "hora-del-joan", d'emissió a la franja horària *late-night*, i.e. >7:00 p.m., o ultradecibèl·lics en cas de l'absència dels 'jefes').

Permeteu-me enumerar –amb el perill d'omissió d'algú, vagin excuses per endavant!–en discret homenatge, els nusos d'aquesta cadena teixida per anys, estades, tesis i comiats, de la qual m'agradaria creure com a conjectura que també n'he format part, només com a excusa per poder registrar a la pàgina impresa els noms esparsos per la memòria i l'oblit (sense cap ànim d'ordre cronològic ni emocional o alfabètic): la Nati, la M<sup>a</sup> Jesús (de la qual hauria de sentir-me indigne successor), la Marta José; la Yólanda; la Núria Ribera, el Toni Nicolás (co-membre fundador amb mi mateix del "XY-team", grup en notòria minoria i seriosament menystingut dins un lab2 plenament estrogènic!); l'Anna "facility" Menoyo; La 'Nurieta' Bofill, amb la seva infinita afectuositat i desbordant humanitat, com una fada bona, nervi incombustible per la que desitjo el millor del món i de la qual conservaré sempre un petit raconet en el meu cor, tanmateix –com deia el poeta–, *...roído de culebras*; la Maya, *considerada* per mi gairebé com una germana, *la Mayital*; la Cristina Puche, la "veterana" per excel·lència, exemple de voluntat i maduresa; la Montse, companya de viatge doctoral, amb el seu característic segell "Made in Montse" personal i intransferible. També una petita menció per les noves generacions, Marta, Glòria i Neus, tot i que gairebé no hem coincidit –no haureu tingut que sofrir-me!–, vagi una salutació i uns ànims.

I passem *especialment* ara als que m'heu hagut se suportar més temps o més d'aprop (*i que d'alguna manera m'heu aconseguit deixar empremta...*), l'Olga, la laboriositat personificada, oceà de voluntat i perseverança: no perdís mai aquest esperit!; la Cristina Aresté, què dir de la *Meri Cris?*, la ponderació, el discret encant, la serenitat, la *nostra* Cher!, ens portem només 4 dies naturals (ella és tan sols 96 hores més gran) i de manera imaginària, seria sens dubte com la millor germana siamesa que jo pogués modestament pretendre vanament postular (...jo però, seria el germà idealitzat *Quasimodo!*); el Lluís, la temperança, l'exquisida correcció, el caràcter i la fidelitat: m'obligues a que m'hagi de treure el barret, *si en portés...*, el *Lou*, component destacat d'aquell històric equip de "Copa Davis-arravalera" que va doblegar en un mític doble als totpoderosos "jedais"..., militant juntament amb mi de l'oprimida "antiestrogens league", en un corral arrebossat de fèmines guerreress, no podré mai agrair-te suficientment el teu càlid oferiment de sostre en el meu últim periple de transhumància. I amb un carinyu especial, un modest –però grandíssim– lloc reservat per a la Cristina, millor *Ally*, protagonista d'una cançó de Tomeu Peña; la personalitat, la conjunció d'un esperit del tipus *pionero* amb una sensibilitat inquieta i generosa, *risueña*, també la màxima exponent de

l'estil "Cebrian-Ligero", expeditiu, entranyable; què haurien estat aquests anys sense aquelles discussions-espectacle sobre temes metacientífics, patafísics o simplement quotidians..., la brillant antagonista, la sincera consellera, la diplomàtica pràctica, també pou de paciència per suportar-me i potser inclús per algun moment comprendre'm (malgrat ni jo mateix ho aconseguiria!), *gràcies*.

Un capítol dedicat requereixen, gravat en el pit al vermell viu (espero que per sempre), les dues fogoses estrelles del voluntariós i atlètic '*team vall d'hebron*' (no em pronuncio sobre qui hauria d'ocupar la part més elevada del podi: ho haureu de decidir a la pista, a l'esgrima o a les cartes), veterans supervivents del vietnam i dels anys "obscur", amb vosaltres he passat estones i "campanyes" difícils d'oblidar i que em retornen un regust agradable en el moment d'escriure aquestes paraules de gratitud.

L'Òscar, àlies '*Coach*', el responsable que –talment un miratge– per uns instants pogué arribar a figurar-me (com aquells gripaus que secretament i vana somien convertir-se en prínceps) que estava encarnat en un Filípides antiorgàsmic, retornant victoriós cap a Atenes al trot incansable, sota la pluja minuciosa; ara mateix acudeixen a la memòria amb un somriure de complicitat, mil successos i situacions simpàtiques com *per ex.* les protagonitzades per deixebles inclassificables com el "perla".

I el David, el campió de la PCR!, si algú mereix (per mi) ser considerat en aquest període com a esperit fulgurant i *alma mater* de la planta, no la dels rètols i els organigrames, d'una planta elemental, la que es despertava amb la tènue llum de l'albada i el bronzit dels ultracongeladors, la que vibrava de matinada amb el "gigi-langostino", la que coneix el significat de la paraula "cinc minuts", la sentida com una segona llar, en aquests anys inoblidables de travessia científica i humana, ets tu; els passadissos deserts al capvespre conservaran imaginàriament per molt temps els ecos de els teves decidides passes, el ritme animós "*FLAIX-like*" aliè a parets, murs i habitacions, sobtats obrirs i tencars de congeladors, de calaixos, viatges circulars a la maquina de gel, la sacralitzada "ronda final"...; com correspondre a la desinteressada hospitalitat oferta per tu i la Solange, als ànims, a la confiança?. Repetit també sense artificis ni subterfugis (com a tu t'agrada): han estat uns anys meravellosos, *gràcies*.

Voldria agrair també a tantes persones que durant i, abans inclús de la meva arribada a l'hospital, m'han regalat la seva companyia, saviesa i generosos ensenyaments,

A la Carme de Bolós, amb la qual vaig iniciar vertaderament l'aprenentatge en el món de la recerca, i que va acceptar aquell tremolós estudiant de pràctiques que acudia vacilant però il·lusionat a l'entrevista. Als ex-companys de l'IMIM, Santi, Fausto, Víctor, Nour, amb alguns dels quals he tingut la sort de poder continuar gaudint de la seva fraternitat: al Víctor, amb el qual formàvem a la facultat la parella de pràctiques ("Díaz-Isern") més 'repel·lent' i rompetechos; al Nour, amb el que he pogut apreciar la llum, la riquesa i la bondat d'una altra mirada possible, *rahmak Allah*.

També voldria no deixar de citar especialment a la Sílvia Gómez, persona d'una desbordant vitalitat i coratge, i que des d'aquí aprofito per agrair el seu suport i càlida generositat en una intensa etapa que ens va tocar compartir, de la qual conservo especialment la irradiació de la seva personalitat; i entre aquelles persones també unes paraules per en David Navarro, que em va ensenyar alguns dels simples secrets del món dels subclonatsges i la biol. molec.

Un record també per la resta de "la comunitat" de la planta 14, i agradables companys de feina, membres de la resta de laboratoris, infermeres, "staff", etc; als veterans i als més recents, Patricia, Arnau, Andreu, Marta Valeri, Jesús, Mariano, etc.; i també pels "d'abaix", Tòfol, Ricardo, Israel, Haffid. Reconèixer la cordialitat de Joan López-Hellin, Toni Andreu, i la labor de la Núria Prim, entre d'altres. Al Dr. Tovar, per la seva qualitat i sincera proximitat, amb qui lamento no haver pogut passar més estona per participar dels seus coneixements i de la seva persona.

Especialment a nivell científic, valorar el lab. del Dr. Palacín en el qual, sota les pacients instruccions de la Marta Pineda, vaig poder realitzar una breu introducció al món del transport i del oècits. També, agrair al Prof. Peter Meier, a Bruno Hagenbuch i Bruno Stieger, l'oportunitat d'estada en el seu laboratori, situat a les vaporoses valls helvètiques, una intensíssima experiència vital i d'aprenentatge difícil d'oblidar; vagi també una menció per qui potser mai més tindrà la sort casual de coincidir, però que al seu moment van fer un xic

més portable i enriquidora –encara més– l'estada, Robert, Valentino, Flavia, Manfred.

Una petita nota pel conjunt de la família Sola-Leiva, que tan desinteressadament m'han acollit i recolzat, i per l'Eva, sense el concurs, la dedicació i el suport logístic de la qual no hagués arribat a temps!

I a la manera de cloenda,

Al Jaume, company des de fa tants i tants anys d'un orb recorregut, d'una invisible recerca de *blade-runners*, de *Perseguidores*, una marxa incerta i metafòrica, apoep tòica, com potser ha murmurat la cançó “...*dans l'hiver et dans la nuit ...dans le ciel où rien ne luit*”; acàs, mereixes ser l'únic *alter ego* personal possible que podria imaginar, amb admiració.

Estic rellegint el que he abocat fins ara a la pàgina i temo haver caigut en una espècie de grandiloqüència i pretenciositat que pot estar enterbolint i malogrant l'esperit que la impulsa, posar aquí caldria recordar aquell lema eternament vigent del 'Que he fet avui?' o potser recuperar el més realista del “no acabaré...”. Però sembla que sí, que després de tants mesos i mesos això s'acaba (tot i que jo m'en resisteixi a prova de pàgines i pàgines!)

No sé si aquí és el moment i el lloc de fer balanç, en qualsevol cas el rendiment seria plenament favorable. Enllà queden diluïdes, dissipant-se en el conjunt, les estones confuses amb cert regust a malaurena, la dialèctica de l'enèsima repetició (a la qual, mudament n'esperarà una altra, i una altra i un\_ ), aquells moments de desesperança, els petits fracassos i malentesos, renovats sota mil formes diverses, la contumàcia dels experiments que es neguen a convertir-se en resultats; la prodigació de les moltes mancances, les mans sempre sapastres, els films velats, els instants irrecuperables –tants!– que immediatament precedeixen a la manifestació d'aquell resultat no reeixit, també els rabiosos udols successius.

Queda una certa simpatia –potser connivència– amb el ronyó, aquell òrgan que el ratolí converteix en mongeta i la rata guarneix de fava; un vel de complicitat amb tot lo renal, que espero no m'abandoni (malgrat això, encara sóc incapaç d'extreure satisfacció al devorar un ronyonet de xai a la planxa)

Quedo, per acabar, amb una certa impressió de que m'he deixat de citar a tantes persones dignes de menció, que si en faltés una més, *no hi cabrien*.

**És per tot això, i per tot el que hi falta –doncs–, que em resta només reiterar una única paraula: *gràcies***

\* \* \*

*P.D.*, aquest pretensió ball d'adjectius (tal vegada extensible a tot el volum al qual clausura) no hauria estat possible sense la dòcil companyia d'en 'S. Pey DICCIONARI DE SINÒNIMS I ANTÒNIMS. Amb vocabulari de barbarismes' de teide; –Ai! si hagués sabut abans de l'existència de l'edició electrònica de l'Alcover-Moll...