

RESULTATS

RESULTATS

1. Regulació androgènica del gen S_A a ronyó de diverses soques de ratolí

El gen S_A murí està sota control androgènic en el ronyó de ratolí mascle. Les dades obtingudes fins ara s'han aconseguit a partir de ronyons de ratolins de la soca C57BL/6 (veure INTRODUCCIÓ).

Degut a les diferents necessitats o conveniències experimentals s'han hagut d'utilitzar mostres ja siguin comercials o no, provinents de diferents soques de ratolí. Per tant donat el fet de l'existència de diferències d'expressió segons l'edat, sexe o la soca de ratolí d'un mateix gen, es va examinar per *Northern-blot* si els andrògens intervenien en la regulació renal de l'expressió murina del gen S_A , en les soques consanguínies C57BL/6, 129SvJ i BALB/c.

Uns 15 μ g de RNA total de ronyó provinent de ratolins mascle normals i castrats de les diferents soques, es va analitzar per *Northern-blot*; l'hibridació dels filtres es realitzà amb una sonda específica de S_A corresponent a un fragment de 575 parell de bases en la posició 1145-1720 del cDNA de S_A .

Com es pot veure a la figura 25, l'expressió del gen S_A en el ronyó desapareix en els ratolins castrats en les tres soques testades, confirmant la diferència d'expressió renal del gen S_A en funció de la presència o no dels andrògens fins ara coneguda únicament en la soca C57BL/6.

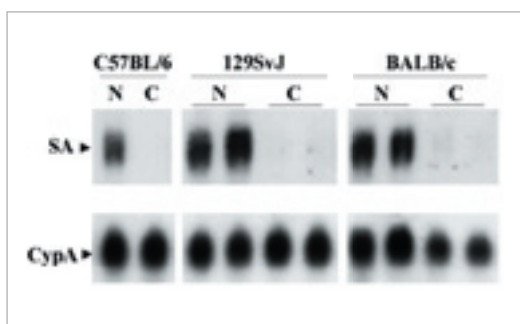


Fig. 25. Regulació androgènica del gen S_A en el ronyó de ratolí de diverses soques de ratolí. 15 μ g d'RNA total de ronyó (n=2) de ratolins mascle controls (N) i ratolins mascle castrat (C) de les soques C57BL/6, 129SvJ i BALB/c, es va analitzar per la tècnica de Northern blot. La hibridació es va realitzar amb una sonda de 575 pb corresponent al fragment de 1145-1720 del cDNA de S_A marcada amb 32 P, segons les condicions descrites en l'apartat mètodes. Es detecta un únic transcrit d'aproximadament 3 Kb solament en els mascles control. La càrrega de RNA es normalitza amb Ciclofilina A (mCypA) com a control intern.

Durant la resta de la feina que es presenta a continuació s'ha treballat exclusivament amb les soques C57BL/6 i 129SvJ, un cop comprovat que tenen un comportament similar al respecte.

2. Efecte dels estrògens en l'expressió del gen S_A murí en el ronyó i el fetge

Un cop establert els efectes que exercien els esteroides sexuals masculins sobre l'expressió del gen S_A , tant en mascles com en femelles, vam investigar quins serien els efectes que operarien els esteroides sexuals femenins, els estrògens, sobre l'expressió del gen S_A .

Vint-i-vuit ratolins de la soca C57BL/6 dividits en 8 grups es van sotmetre a tractament de DHT i 17 β -estradiol amb injeccions diàries durant sis setmanes segons l'apartat MÈTODES. Finalitzat l'experiment es van extreure els ronyons i els fetges per obtindre RNA total i

posterior anàlisi per *Northern-blot*. Les membranes es van hibridar amb una sonda de 645 nucleòtids obtinguda per PCR que pertany a un fragment del cDNA de S_A que va de la posició 606 fins a la 1251.

Els valors d'expressió del gen S_A estan normalitzats amb la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de ratolí (GAPDH). Els resultats obtinguts es presenten en la figura 26.

Resultats obtinguts en el ronyó

El tractament amb dosis farmacològiques de DHT fa augmentar fins a tres vegades l'expressió del gen S_A en els ratolins normals (mascles NT 0.6 *vs* DHT 1.9), recuperant-se els valors normals d'expressió després del tractament en els ratolins castrats (NT - *vs* DHT 0.8), (figura 26A). El tractament estrogènic produeix una disminució dràstica de l'expressió del gen S_A tant en els animals mascle no tractats (NT) com els que s'indueixen amb DHT, ja siguin normals o castrats.

Resultats obtinguts en el fetge

A diferència del ronyó, el gen S_A en fetge no pateix modificacions per part de cap de les dues hormones esteroidals; ni la castració ni el tractament amb estrògens disminueix la seva expressió i, tampoc el tractament amb dosis farmacològiques de DHT l'augmenta, (figura 26B).

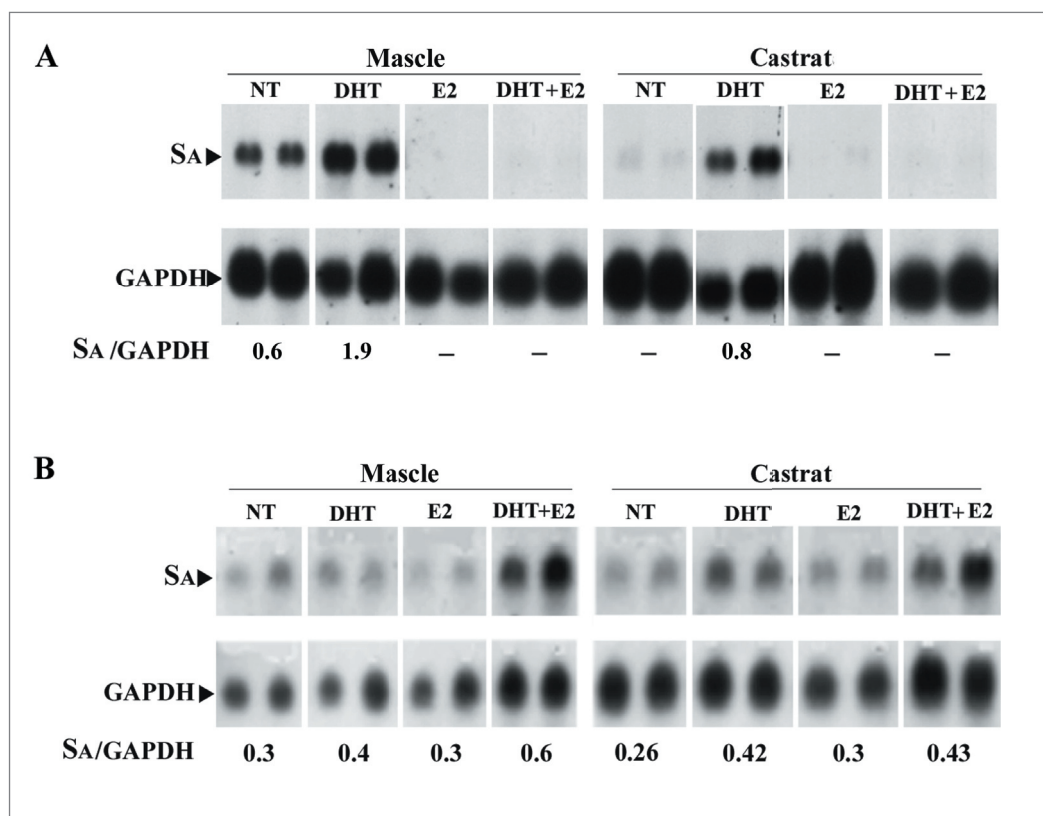


Fig. 26. Efecte de les hormones esteroidals sexuals en l'expressió del mRNA de S_A en el ronyó i el fetge de ratolí. 15 µg de RNA total obtinguts a partir de ronyons (A) i fetges (B) de ratolins mascle intactes control no tractats (NT), de ratolins mascle tractats amb dosis farmacològiques de DHT i E₂ (DHT i E₂, respectivament) i de ratolins mascle tractats ambdues hormones (DHT+E₂), van ser analitzats per Northern-blot; les mateixes mostres es van obtenir a partir de ratolins mascle castrats i analitzades d'igual forma. La membrana de nylon es va hibridar amb una sonda específica del cDNA de S_A de 645 pb (compresa entre les posicions 606-1251nt), marcada amb ³²P. La gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de ratolí (GAPDH) es va utilitzar com a control intern de càrrega i d'integritat del mRNA. Les autoradiografies es van analitzar per densitometria, calculant-se els *ratios* entre S_A i el control intern GAPDH (SA/GAPDH) representats a sota de cada panel.

Expressió del mRNA del gen S_A en ratolins femella ovariectomitzades

Tenint en compte que els estrògens inhibeixen l'expressió del gen S_A en ronyó de ratolins mascle, que les femelles no l'expressen i que ho fan únicament quan són tractades amb dosis farmacològiques de DHT, es postulà si podrien ser els estrògens els responsables de la no expressió en femelles. Per tal d'esbrinar-ho s'investigà l'expressió del gen S_A en ronyó de ratolins femella ovariectomitzades; cinc ratolins femella de la soca C57BL/6 es van dividir en dos grups control (NT) i ovariectomitzades (OVX), després d'una setmana d'establució es van extraure els ronyons per obtenir RNA total i posterior anàlisi per Northern blot. El resultat obtingut és que no hi ha expressió en ratolins femella lliures d'estrògens com es pot veure en la figura 27.

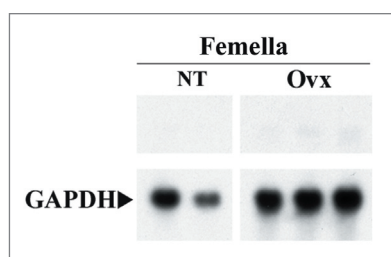


Fig 27. Efecte de l'absència dels estrògens sobre l'expressió del gen S_A murí. 15 μ g de RNA total de ronyons de ratolins femella intactes (NT) i femelles ovariectomitzades (Ovx) van ser analitzats per Northern-blot. La gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de ratolí (GAPDH) es va utilitzar com a control intern de càrrega i d'integritat del mRNA.

3. Expressió del gen S_A en diferents teixits de ratolí

Coneixem la representativitat del gen S_A en diferents teixits de ratolí femella amb i sense la presència dels andrògens (veure apartat INTRODUCCIÓ), per tant ens plantejarem investigar qualitativament, l'expressió del gen S_A a nivell de missatger per RT-PCR Southern, en un ampli ventall de teixits de ratolí mascle normal i mascle castrat.

La soca de ratolí escollida fou la soca 129/SvJ; les condicions d'amplificació estan optimitzades per assolir l'especificitat i obtenir el cDNA de S_A , tot i així vam transferir el producte de la RT-PCR a una membrana de nylon i es va hibridar amb una sonda específica corresponent al fragment de 575 pb comprès entre el 1145 al 1720 nucleòtid del cDNA de S_A .

Com a control intern d'amplificació i d'integritat del RNA missatger s'utilitzà el gen de la ciclofilina A (CypA), amplificant-se amb els seus primers corresponents (veure taula 10 MATERIALS).

En els teixits del ratolí mascle adult normal on es detecta l'expressió del gen S_A són, el ronyó, el fetge, l'estómac, el testicle, el pulmó, el cor, i de manera quasi inapreciable en glàndula prepuccial (Gl. Prep.) (veure figura 28A).

Tot i que la RT-PCR Southern no és quantitativa sinó qualitativa podem veure i afirmar que en un ratolí mascle castrat l'expressió del gen S_A desapareix en el pulmó i el cor i, disminueix considerablement en el ronyó, encara que sabem que per la tècnica de Northern-blot el gen S_A no es detecta en animals castrats i, que no hi han diferències significatives en el fetge

entre un ratolí normal i castrat. Respecte a l'estómac el gen S_A s'expressa tant en ratolins mascles normals com castrat tot i que no podem afirmar si hi pot haver alguna diferència (veure figura 28B).

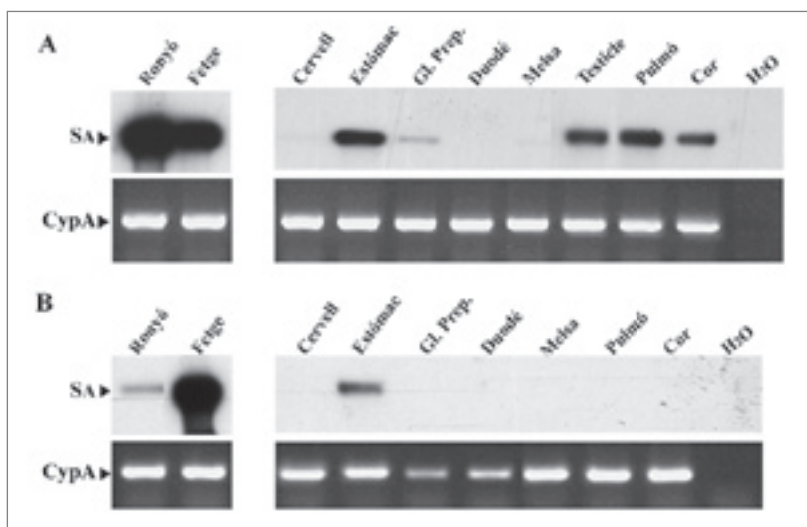


Fig. 28. Distribució tissular de l'expressió del mRNA de S_A . Patró d'expressió de S_A en diferents teixits de ratolins adults, analitzats per RT-PCR a partir de 500 ng de RNA total, per la reacció d'amplificació es van utilitzar els primers S_{A1} i S_{A2} (veure taula). El producte S_A resultant de la RT-PCR es va transferir a una membrana de nylon i es va hibridar amb una sonda específica del cDNA de S_A (575pb). Com a gen control s'ha utilitzat la ciclofilina A murina (mCypA). La CypA es representa en gel d'agarosa a l'1% i tenyida en EtBr. **A.** Representa el resultat obtingut a partir de teixits de ratolins mascle intactes i **B.** Resultat obtingut a partir de teixits de ratolins mascle castrats.

4. Clonatge i caracterització del Gen S_A murí

Donada la manca d'informació pel que feia al gen S_A murí en el moment en que es va realitzar aquesta part del treball, es va iniciar el clonatge del gen mitjançant una llibreria genòmica comercial construïda a partir de DNA genòmic de fetge de ratolí femella (4-8 setmanes d'edat) de la soca 129/SvJ, digerit parcialment amb *Sau3* AI i clonat en la diana *XhoI* del vector λ FIX[®]II. En el cribatge de la llibreria es va procedir a rastrejar aproximadament 1×10^6 clons distribuïts en 8-10 plaques de 24x24 cm, la sonda utilitzada és un fragment de 2.5Kb (escindit del plàsmid pADGal4- S_A , S_A -full length), corresponent als primers 2544 pb del cDNA de S_A de ratolí clonat per primer cop en el nostre laboratori (descriu en la INTRODUCCIÓ).

El rastreig de la llibreria genòmica es va dur a terme dues vegades per tant els resultats expressats a continuació corresponent als resultats obtinguts en els dos cribatges.

Després del cribatge primari (o primera ronda d'*screening*) s'identifiquen fins a un nombre de 14-29 presumptes clapes de lisi d'hibridació positiva. En cinc successives rondes de *re-infecció* i *re-cribatge* es van anar descartant fins a quedar-nos amb 10 d'elles (nombre total obtingut sumant els dos cribatges de la llibreria), els quals es van purificar fins a homogeneïtat. Els 7 clons finals positius i definitius aïllats, es van anomenar consecutivament com a λS_A 1-7, respectivament.

Es prepara doncs a partir de grans volums de lisat de cada un dels clons positius, DNA de fag en abundància, que serà sotmès a un mapatge per digestió enzimàtica, a un Southern-blot, i a una seqüenciació directa amb primers específics de la seqüència de cDNA de S_A .

Resultats preliminars per Southern-blot (no mostrats) determinaren que tots els clons positius podrien contenir tot o una part del gen S_A , ja que tots donaven positiu en la hibridació amb la sonda S_A -full length. Per facilitar la recerca i posterior seqüenciació dels fragment/s del gen continguts en cada clon s'hibridaren tots set, amb cinc sondes diferents amplifiades per PCR -anomenades sonda a', sonda a, sonda b, sonda c i sonda d- corresponents a diferents fragments del cDNA, tal com es representa en la figura 29, s'indica també els resultats obtinguts en els diferents Southern blot.



Fig. 29. Sondes utilitzades en el cribatge de la llibreria genòmica de ratolí. La figura de l'esquerra representa de manera esquemàtica la mida i posició dels diferents fragments del cDNA de S_A obtinguts per PCR utilitzats com a sonda en el cribatge de la llibreria i en la definició dels 7 clons positius. La figura de la dreta representa els resultats positius obtinguts en els Southern-blot de cada un dels clons amb les diferents sondes.

La seqüenciació dels set clons es va fer directament del DNA del fag, utilitzant primers específics dissenyats a partir del cDNA de S_A conegut. Es va resoldre la major part de l'organització exònica del gen S_A així com les unions amb els introns, la mida aproximada dels quals

es va determinar per PCR llarga utilitzant *primers* específics localitzats en els límits dels exons, descrits en la taula 10 (veure MATERIALS). En alguns casos per resoldre l'entrellat ens va ajudar l'elevada homologia que existeix entre els cDNA's de S_A de ratolí i l'humà, quan el genoma humà estava pràcticament resolt; finalment es comprovà l'organització exacta del gen S_A murí un cop es va presentar el genoma complet de ratolí generat pel consorci de seqüenciació del genoma murí, dades publicades en el *mouse genome database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi>), coincidint amb el que havíem resolt. L'estructura genòmica i l'organització intró/exò es mostra en la figura 30 i la taula 15, respectivament.

El gen presenta una mida d'unes 23Kb aproximadament i està format per 16 exons i 15 introns, l'inici de la traducció està present en l'exò 4; la mida dels exons varia des de 69 a 274 parells de bases, amb excepció de l'exò 16 que conté 616 *pb* i conté el codó stop TAG i la regió 3'-UTR amb un senyal de poliadenilació ATAAA.

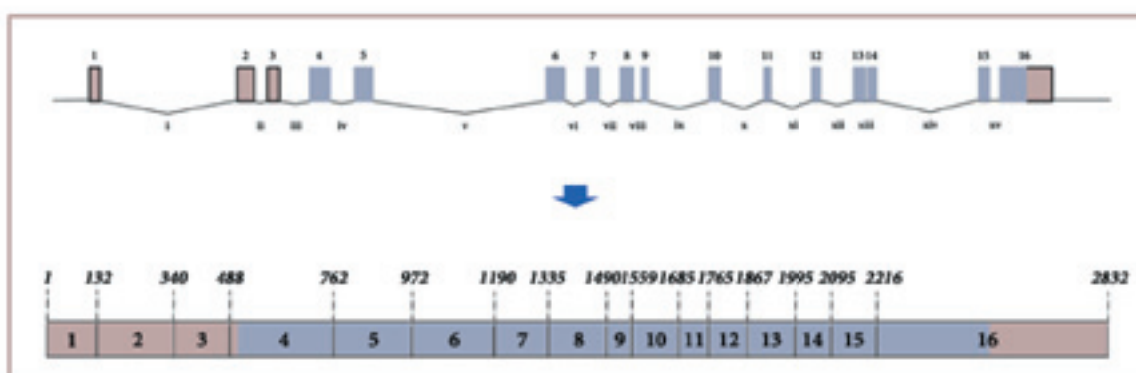


Fig. 30. Estructura genòmica del gen S_A murí. Representació esquemàtica del gen S_A i el corresponent mRNA, on s'indiquen les posicions dels inicis i finals de cada exò. Els exons estan numerats de l'1 al 16 representats com a rectangles i els exons anomenats de l'i al xv són les línies obliqües. Les regions de color blau i marró corresponent a la regió codificant i la no traduïda respectivament, tant en el gen com en el mRNA.

Taula 15. Organització Exò/Intrò del gen S_A murí

Exò	Mida exò (pb)	Donador d' <i>splicing</i> -5'	Intró	Mida intró (pb)	Acceptor d' <i>splicing</i> -3'
1	132	...TT TCC TGG / gtaagact....	i	4000	...ctcaacag / GCA ATG GA...
2	208	...CC ACT TGG / gtgagtgg....	ii	316	...tctttgca / GTG AAA GA...
3	148	...AG ATC CAT / gtaagaag....	iii	834	...gtctttta / CTG GAT TA...
4	274	...TG GAA AAG / gtatggag....	iv	626	...cctctcca / GCT GGA AC...
5	210	...CT CAA CAG / gtaagtat....	v	4714	...ttcctcta / GGA CAG TA...
6	218	...AT GAT GAA / gtgagtac....	vi	618	...cttcacag / ATA TGC CA...
7	145	...TG GAA GGT / attttccc....	vii	600	...ttatattc / AGG TTC TG...
8	155	...TC TTG CAA / gtaaggca....	viii	244	...aactgcag / ACC CTC TC...
9	69	...GA ATG ACA / aaaaaaaaa....	ix	1700	...attggaga / AGC TAT AA...
10	126	...CA GAA ACG / gtaactgc....	x	1202	...ttgcttag / GTG CTG AT...
11	80	...AT GTG AAG / gttggaat....	xi	1144	...tattctag / ATT TTA GC...
12	102	...AT TAT GTA / gtaagagc....	xii	923	...ttttgcag / GAT AAT CC...
13	128	...TC TTC TGG / gtaatttc....	xiii	90	...tttcttag / TTA CCG AA...
14	100	...GA GGA GAG / gtgaaaac....	xiv	2782	...cttcttta / AGG TAG TA...
15	121	...CC AGA AAG / gtaggcgt....	xv	304	...accaacag / GAT GAA TT...
16	616				

Les seqüències dels exons es mostren en majúscula i la dels introns en minúscula

Mapatge cromosòmic del gen S_A de ratolí mitjançant *Radiation Hybrid Mapping*

El gen S_A de rata ha estat el millor caracteritzat fins a la data d'avui degut a la seva possible vinculació amb la hipertensió, per tant es coneixia molt bé la seva organització genòmica així com la seva localització en el cromosoma 1 de rata; més tard es va mapar el gen S_A humà en el cromosoma 16. No estava descrita la localització cromosòmica del gen S_A murí, tot i que les regions cromosòmiques del gen S_A tant de la rata com de l'humana corresponen a les zones sintèniques del cromosoma 7 en ratolí, així que ens van plantejar mapar i comprovar la localització exacta del gen S_A de ratolí.

L'estratègia utilitzada va ser la de dissenyar uns primers específics pel gen S_A de la regió intrònica (entre el segon i el tercer exò) anomenats HRSAu3 i HRSA14 (veure taula 10 MATERIALS). Es va utilitzar un panell d'híbrids de radiació comercial, format per múltiples clons híbrids construïts amb DNA genòmic de ratolí i hamster (veure apartat MÈTODES). Es van realitzar les PCR corresponents i es van analitzar els resultats d'amplificació positiva/negativa, el resultat obtingut va ser que el gen S_A de ratolí es trobava aproximadament entre els marcadors D7Mit58 i D7Mit7 en el chr 7. Més tard i gràcies a la seqüenciació complerta del genoma de ratolí, es va localitzar exactament el gen S_A mitjançant un simple Blast, observant-se que coincidí amb els resultats obtinguts en el nostre anàlisi.

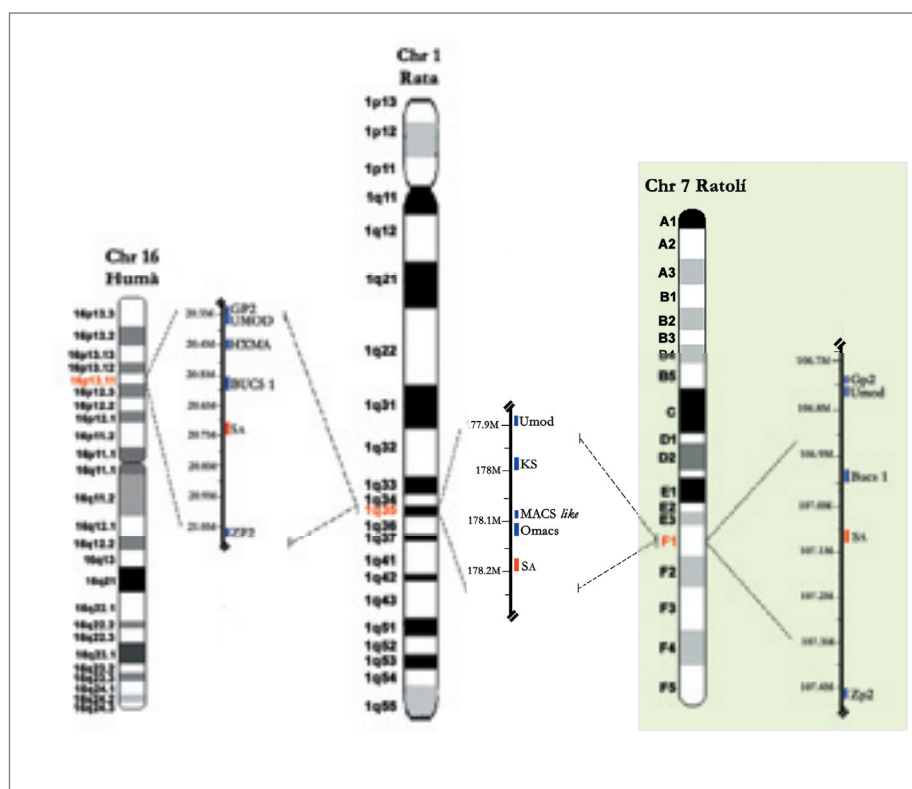


Fig 31. Localització cromosòmica del gen S_A en les tres espècies humana, rata i ratolí. La figura mostra el mapa comparatiu entre les tres espècies de la regió sintènica entre els diferents cromosomes on es troba el gen S_A i alguns gens propers a ell, en base a l'informació disponible en les bases de dades dels tres genomes en el NCBI.

5. Identificació de diferents inicis de transcripció del gen S_A

Un dels objectius principals d'aquest treball era identificar la regió promotora del gen S_A per entendre els mecanismes que el regulen. Paral·lelament a l'estudi de l'organització del gen vam començar la tasca d'identificació i clonatge de la regió promotora del gen S_A .

Aquest treball s'inicia amb la determinació del/s inici/s de transcripció del gen S_A utilitzant dues aproximacions; la tècnica de *Primer Extension* i la de 5'-RACE. Per acabar de resoldre els resultats obtinguts amb aquestes dos tècniques es va optar per la RT-PCR, utilitzant *primers* específics de la regió més 5' del cDNA de S_A . En els dos casos s'utilitzà com a motllo de partida mRNA de ronyó de ratolí de les soques C57BL/6 i 129SvJ.

Primer Extension

Pel *primer extension* es van utilitzar els *primers* E3 i E4 complementaris al tercer i quart exon respectivament, del cDNA. Els *primers* es marquen radioactivament amb ^{32}P i es realitza amb ells una reacció de transcripció inversa sobre mRNA de ronyó de diferents soques de ratolí. Com a marcador de tamany s'utilitzen aquests mateixos *primers* en una reacció de seqüenciació manual utilitzant com a motllo el cDNA de S_A clonat en un vector (en aquest cas el constructe S_A -FLAG (veure apartat 9 de RESULTATS)) i per tant de seqüència coneguda.

Les reaccions es purifiquen i els productes obtinguts es resolen en un gel d'acrilamida vertical de seqüenciació, tal i com està detallat en MÈTODES.

Amb el *primer* E3 es van obtenir tres productes d'extensió d'intensitat desiguals, de 132 nt, 167 nt i 259 nt, mentre que amb el *primer* E4 es va obtenir 1 producte de 282 nt, com podem veure en la figura 32A.

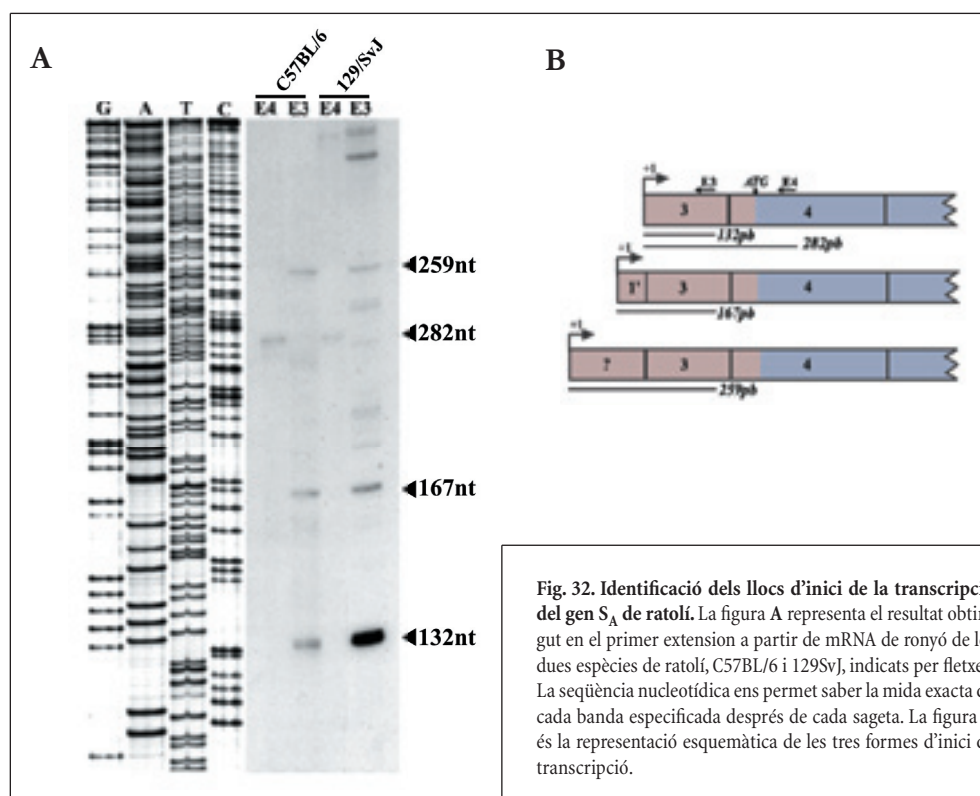


Fig. 32. Identificació dels llocs d'inici de la transcripció del gen S_A de ratolí. La figura A representa el resultat obtingut en el primer extension a partir de mRNA de ronyó de les dues espècies de ratolí, C57BL/6 i 129SvJ, indicats per fletxes. La seqüència nucleotídica ens permet saber la mida exacta de cada banda especificada després de cada sageta. La figura B és la representació esquemàtica de les tres formes d'inici de transcripció.

Tenint en compte la mida dels productes obtinguts amb el *primer* E3, les posicions de l'inici de transcripció designat com a +1 podrien ser tres, tant en la soca C57BL/6 com en la 129SvJ. El primer inici -corresponent al fragment de 132nt- i possiblement el majoritari començaria just a l'inici de l'exò 3; el segon fragment de 167nt correspondria al cDNA clonat en el nostre laboratori i per últim el fragment de 259nt representaria l'existència d'un nou exò o mRNA més llarg que el que coneixiem fins ara, tal com representa la part dreta de la figura 32. Això es va resoldre mitjançant la tècnica de 5'-RACE.

5'-RACE

Per confirmar els resultats obtinguts amb el *primer extension*, es realitzà el 5'-RACE, tècnica que també ens permet aproximar el lloc d'inici transcripcional d'un gen.

Per realitzar la RT, la PCR i la nested PCR es van utilitzar els primers E4, E3 i GSA2L respectivament, veure taula 10 de MATERIALS; es va obtenir una banda detectable per bromur d'etidi d'aproximadament 200pb. Els productes obtinguts es van subclonar i seqüenciar i vàrem obtenir una seqüència nova d'uns 130-135pb abans d'arribar a la cua de poliA; en la figura 33 es representa l'estratègia seguida en el 5'-RACE.

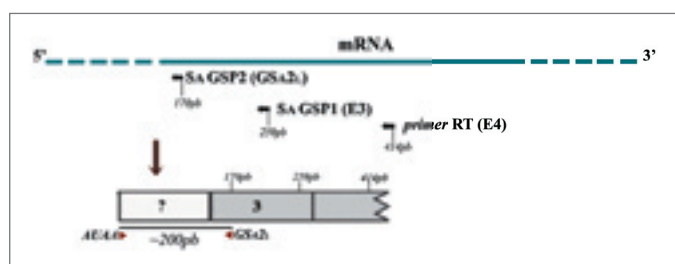


Fig. 33. Esquema de l'estratègia seguida en la realització del 5'-RACE per resoldre la regió 5' del gen S_A . Es mostren el disseny i les posicions dels primers utilitzats en l'experiment, així com el producte final amplificat.

En aquesta nova seqüència coincidien les primeres 35 pb dels 130 nt resolts en el 5'-RACE amb les 35 pb més 5' del cDNA clonat en el nostre laboratori (aquest fragment l'anomenàrem 1'). En un primer moment vam suposar que les 97 pb restants constituïen un nou exò del gen S_A , però mitjançant PCRs amb primers específics utilitzant com a motllo DNA genòmic vam comprovar que es tractava d'un únic exò; l'exò 1 (que anomenàrem 1'-1, per facilitar la comprensió de l'organització dels diferents transcrits descrits en l'apartat següent). Aquest exò conté una regió d'*splicing* intra-exònic. Finalment gràcies a les bases de dades del genoma de ratolí vam comprovar que efectivament es tractava d'un únic exò. En la figura 34 es mostra de manera esquemàtica el producte resultant obtingut amb la tècnica del 5'-RACE comparat amb el primer cDNA clonat en el nostre laboratori.

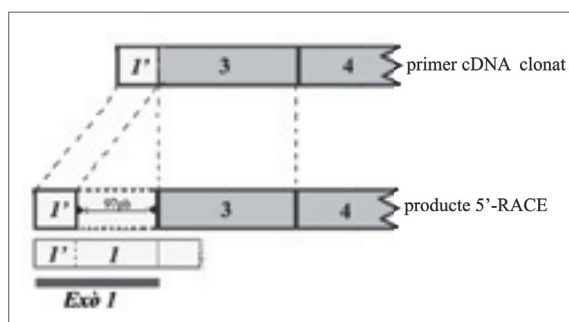


Fig.34. Il·lustració que representa la comparació entre el primer cDNA del gen S_A clonat en el nostre laboratori i el producte del 5'-RACE. Les primeres 35pb (1') són comunes en els dos transcrits i les 97 pb restants (1), corresponent al fragment que falta de l'exò 1. Entre el fragment 1' i 1' existeix una regió d'*splicing* intra-exònic. La suma d'1' i 1 equival a l'exò 1 complet.

La nova seqüència es va introduir al GenBank amb el número AY064696, la figura següent mostra els primers 640 nt de la seqüència que es van incloure en les bases de dades.

```

1  ggtccacttt gatccaccac caactactaaa gcagaggtga gaagttggct
51  ttctcttcca ttaagcgggt ctactatcac tccagctgtg tgggaagcag
101  tatctttagt gaggatccaa tttcttttcc tgggtgaaag acaaggaggt
151  tcaagctgga tgatctcaga gattcaaga tcaccgactc gtgaggttct
201  cacacaggaa gtggacacct ggagcgcgtg gatttcaaat gcatccattt
251  catcagcatg atgcctagcc accagatcca tctggattag tctgcatgga
301  aatctcacat gccaaaacat tcaacaacac tgatgctagc tagctcttgt
351  catcatggtg atgttactcc gtgctaggtg ttttcagcgc ctagcaattc
401  ctgacctat gagagtcttg tataaagatt acagaacagc gaccctcag
451  aacttttcca actatgagtc catgaacaa gacttcaaaa tagagattcc
501  agagtatttc aattttcaa aagatgtcct ggaccaatgg accaatatgg
551  aaaaggctgg aaagagactt tccaatccag ctttctgggt gatagatggg
601  aatggagaag agctgagatg gagtttttaa gaacttgggt .....

```

Fig.35. Seqüència resolta en el 5'-RACE. En blau es representa la nova seqüència de 97 pb de l'exò 1, en cursiva les 35 pb 5' de l'exò 1 comuna en els dos transcrits descrits en la figura 34. En vermell es mostra l'ATG que es troba en l'exò 4.

RT-PCRs

Alhora que realitzàvem la identificació de la regió 5' del gen S_A així com l'estudi de la seva organització genòmica, vam trobar una nova entrada en el Gen Bank (BC015248) d'un nou cDNA del gen S_A , que presentava una seqüència de 200 pb en situació 5' no descrita en els altres cDNAs identificats. Comparant aquesta seqüència amb el genoma de ratolí resolt fins a les hores vam poder veure que es tractava d'un nou exò i que es trobava més amunt de l'exò 3.

Aquest fet feia encara més complexa la regió 5' del gen S_A , ja que a més dels transcrits descrits fins ara hauria d'haver com a mínim un transcrit més que contingués l'exò 2; degut a que no l'havíem pogut veure tant per *primer extension* com per 5'-RACE, vam utilitzar l'aproximació de la RT-PCR, emprant *primers* específics complementaris al diferents exons 1, 2, 3 i 4 anomenats E1', E1, E2, E3 i E4, descrits en la taula 10 (MATERIALS) combinats entre ells; els productes de la RT-PCR es purificaven i es clonaven en *Topo-cloning* per ser seqüenciats posteriorment. Els resultats obtinguts es representen en la figura 36.

Mitjançant aquesta aproximació es van obtenir 4 transcrits nous a part dels dos transcrits ja coneguts. Alguns d'aquests transcrits contenien l'exò 2 sencer però, vam veure que a l'igual que l'exò 1, l'exò 2 també presentava una regió d'*splicing* intra-exònica ja que vam obtenir un parell de transcrit que solament contenien les 63pb més 3' de l'exò 2 (al que anomenarem 2'). La combinació dels fragments 1, 2, 1' i 2' dels exons 1 i 2 entre ells, seguits de l'exò 3 (sempre present), formen el conjunt dels diferents transcrits que vam obtenir per RT-PCR, tal com es presenta en la figura 36A. Els exons 1 i 2 del gen S_A contenen un donador i acceptor consens d'*splicing* AG-GT que defineix la unió 1'-1 i 2-2', tal com es representa en la figura 36B.

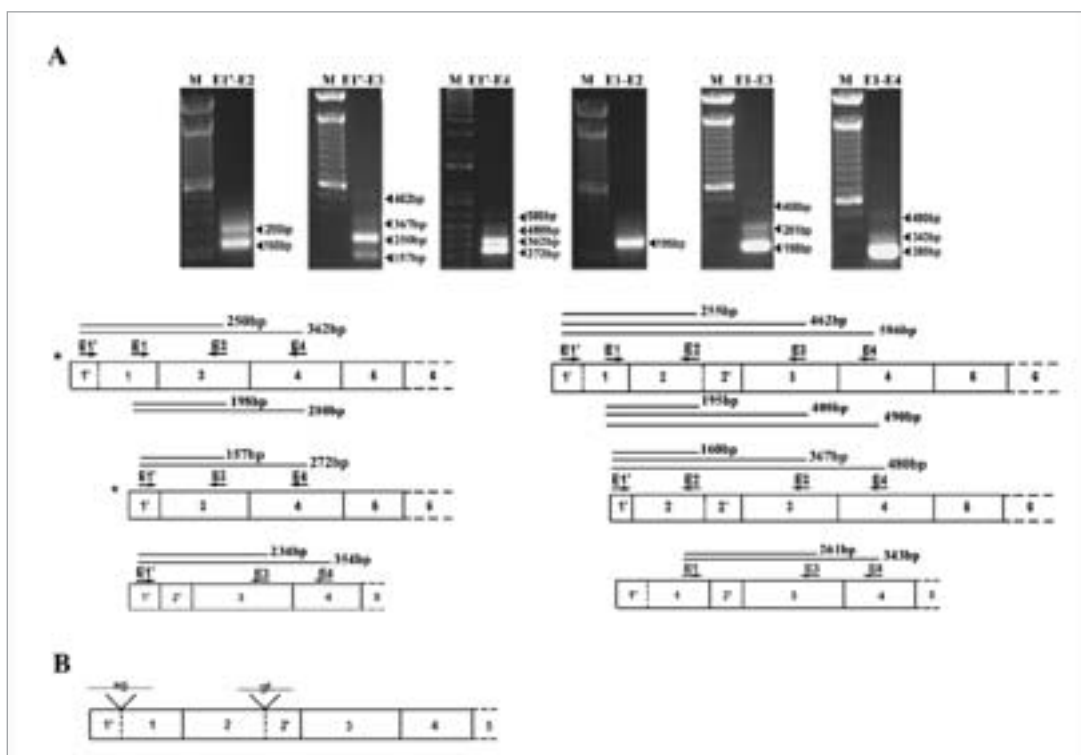


Fig. 36. Identificació dels diferents transcrits del gen S_A murí obtinguts per RT-PCR. Els transcrits es van obtenir per la tècnica de la RT-PCR a partir de mRNA de ronyó de ratolí. **A)** Els productes de la PCR es van obtenir utilitzant sis parelles de primers, E1'-E2, E1'-E3, E1'-E4, E1-E2, E1-E3 i E1-E4, els resultats obtinguts en la PCR es mostren en gels d'agarosa tenyits en EtBr en la part superior de la figura; (M i #M són els marcadors de 100pb i 1Kb respectivament de la casa Invitrogen). A sota es representa esquemàticament els productes de les RT-PCRs, s'indica mitjançant sagetes el lloc d'anellament aproximats dels primers utilitzats en la RT-PCR, les línies i la numeració indiquen les mides dels productes de PCR obtinguts amb la combinació dels diferents primers. La seqüència i per tant la presència de cada un dels exons es comprova mitjançant clonatge i seqüenciació de cada un dels productes de la RT-PCR. Els asterisks (*) indiquen el transcrit obtingut per 5'-RACE el primer, i el cDNA clonat inicialment en el nostre laboratori, el segon. **B)** Representació esquemàtica dels putatius llocs d'*splicing* intra-exònic trobats en l'exò 1 i 2 del gen S_A . Presenten un donador i acceptor d'*splicing* consens AG-GT.

En la figura 37 es representa la seqüència final i complerta del cDNA del gen S_A , que conté una regió 5'-UTR de 562 pb que inclouen l'exò 1 i 2 complerts, a diferència dels 274 pb de la regió 5'-UTR clonats inicialment (veure INTRODUCCIÓ).

```

1 ggtccacttt gatccaccac caacactaaa gcagagggtga gaagttggct
51 ttctcttcca ttaagcgggt ctactatcac tccagctgtg tgggaagcag
101 tatcttttagt gaggatccaa tttcttttcc tgggcaatgg acttgGCCaa
151 catcctaaag accagtgaaat ctctcacttg aacacagaaa cttgtgtgga
201 gaatattggt aaagatttaa tccattaact caactgatct tcagtgggac
251 ctaaagatta tgcacttctg acagggtgtcc aagtgggtgca gtggttcata
301 gaccataggc tctggatgag tggatctcca cttgggtgaa agacaaggag
351 gttcaagctg gatgatctca gagagttcaa gatcaccgac tcgtgagggt
401 ctcacacagc aagtggacac ctggagccgc tggatttcaa atgcatccat
451 ttcacagca tgatgcctag ccaccagatc catctggatt agtctgcatg
501 gaaatctcac atgccccaac attcaacaac actgatgcta gctagctctt
551 gtcacatgg tgatgttact ccgtgctagg tgttttcagc gcctagcaat
601 tcctgatcct atgagagtct tgtataaaga ttacagaaca gcgaccctc
651 agaacttttc caactatgag tccatgaaac aagacttcaa aatagagatt
701 ccagagtatt tcaattttgc aaaagatgtc ctggaccaat ggaccaatat
751 ggaaaaggct ggaagagac tttccaatcc agccttctgg tggatagatg
801 ggaatggaga agagctgaga tggagttttg aagaacttg gtgtttatcc
851 aggaattttg ccaacatact cacagaagcc tgctccctgc aaagaggaga
901 cagagtaatg gtgatactgc ccaagatccc agagtgggtg cttgcaaatg
951 tggcctgtct cgaacaggc acagttttaa ttccaggaac cactcagctg
1001 acccgaaaag acatcctcta tagactacaa tcttcaaaag ctaagtgcac
1051 tattaccgat gatactttgg cccagcagc agatgccgtg gcagctaaat
1101 gtgaaaatct ccaactccaa ttaattgtgt ctcagcactc cagagaaggc
1151 tgggggaacc tcaaggagat gatgaaatat gccagtgaca gccacacttg
1201 tgtggacaca aaacacgacg agatgatggc catctacttc accagtggac
1251 caactgggcc tcctaagatg attggacaca cccacagcag ctttggttta
1301 ggattgtctg tcaatggaag gttctggctg gatttgatag cctccgatgt
1351 gatgtggaat acttcagata caggctgggc aaagtctgca tggagtatgt
1401 ttttttctcc atggacccaa ggagcatgtg tttttgcaca ctatttgccc
1451 cgttttgaat caacttccat cttgcaaac ctctccaagt tccccatcac
1501 tgtcttctgt tctgcaccaa ctgcctaccg gatgcttgtt cagaatgaca
1551 tgagcagcta taagttcaac agtttgaagc actgtgtcag tgotggagaa
1601 cctattaacc ctgaagtgat ggaacaatgg agaaagaaga cgggcctaga
1651 catctatgaa ggatatggac agacagaaac ggtgctgatc tgtggaatc
1701 tcaaggggat gaaattaag cccggctcaa tgggaaagcc ttctcctgct
1751 tttgatgtga agattttaga tgaatgggt gccactcttc ctctggaca
1801 agaaggggat attgctcttc aagtctctcc tgagcgacca tttggccttt
1851 ttactcatta ttagataaat ccttccaaaa cggttcaac tctacgagg
1901 agtttctaca ttactgggga cagaggatat atggatgaa atggctattt
1951 ctggtttgtt gcaagatcag atgatatcat attatctct ggttaccgaa
2001 ttggaccatt tgaggtagaa agtgccctca tagaacatcc ttccatcgca
2051 gagtcagctg ttgtcagcag tccagacccc atcagaggag aggtagtaaa
2101 ggcttttat gtctgaatc ctgattacaa gtccccatgat caagagcaac
2151 tgaaaaagga gatccaggag cacgtgaaga agactacagc gccttcaaaa
2201 taccocagaa aggtagaatt tattgaagag ctgccgaaga ctgtcagttg
2251 gaaggtcaaa agaatgaac tgaggaaaaa ggaatgggta acaacttgaa
2301 ctctccccc taatcacctg ttagctata aacacagtgt ctacaagtct
2351 gcaggaacca cagattatgt gggcagactg ctttgaaact ggattgaaag
2401 tattttgtag ttatgacatc agagcctgaa ttctgaaatc aaataatcat
2451 tattgaatcc ttctgcatc atgtcaatgc tctgtaatc tgccaacata
2501 aatgaatgt cgcagatgc tgagatgtct taaaatttat tttaggagca
2551 gattctaac taaatctgta cccaggcatt ttcaaacat aactgaacaa
2601 ttctaataatg ctaatatata aatcagaaca aatcttcaaa ctttgaaaag
2651 aaccctattt ttaagaaact gtcataatc ttagaatatt tacctaaaa
2701 tttactagtc atatttttat tcaagtaatt taaaaatagt ttgaaatttg
2751 tttgaaggtc aaagtataag agaaagctgt cacattctgt ggctagttat
2801 taaatttaac ctaataaaca tggtttgtaa aaataaaaa aaaaaaaaa

```

Fig. 37. Seqüència final i complerta del cDNA del gen S_A . El cDNA complert presenta una mida de 2835 pb, conté les regions 5'-UTR i 3'-UTR de 563pb i 528pb, respectivament. En vermell es representa la regió codificant on l'ATG es troben en la posició 563 i el codó stop en la posició 2297.

6. Identificació i Anàlisi del promotor del gen S_A .

Un cop definit l'inici de la transcripció del gen, vàrem poder determinar el punt d'inici del promotor del gen S_A . Donat que el genoma de ratolí estava completament seqüenciat, va ser relativament fàcil obtenir la seqüència de 10 Kb de regió 5'-flanquejant respecte al punt d'inici de la transcripció del gen S_A .

Del fragment de promotor identificat, es van subclonar 2Kb en el vector *pGL3-basic*, anomenat -2000Luc, que compren de la posició -2005 pb de seqüència *upstream* fins a +40 pb de la regió UTR *downstream* des de l'inici de la transcripció. En la figura 38A es mostra un esquema del fragment subclonat indicant algunes dianes de restricció i, en la figura 38B es mostra la seqüència nucleotídica de les 2Kb *upstream* des de l'inici de la transcripció del gen S_A murí. L'anàlisi computacional d'aquesta seqüència amb el programa MatInspector i TFSEARCH han identificat varis llocs d'unió consens per a diferents factors de transcripció, com el SP1, diferents C/EBPs, varis GATAs, AP1s, SRYs, una caixa SREBP1 entre d'altres.

Aquest fragment de promotor presenta nombroses zones amb repeticions, entre elles varies regions riques en AT, que es mostren subratllades en la figura 38B i, un zona d'aproximadament 600 pb on el pentanucleòtid GCAA es troba repetit en tàndem a partir de la posició -1055, destacat mitjançant un recuadre de color verd.

A

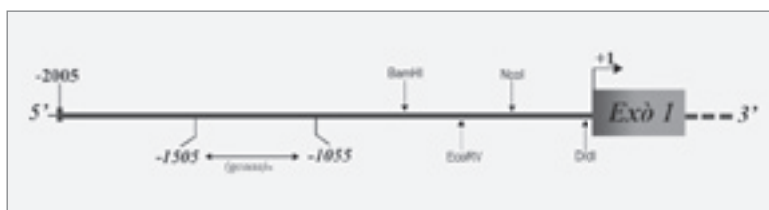


Fig.38. Seqüència de nucleòtids de la regió promotora del gen S_A de ratolí. A) Esquema parcial del mapa de restricció del fragment de 2Kb de la regió 5' del gen S_A , a partir de l'exò 1 i de l'inici de transcripció indicat per una fletxa. Es representa la posició de la zona de repeticions en tàndem del pentanucleòtid GCAA. La figura B) que es troba en la pàgina següent, representa la seqüència de la regió de promotor clonat. L'inici de la transcripció s'indica amb un asterisc i un +1 i per tant la numeració dels nucleòtids es realitza a partir d'aquest punt. Els nucleòtids subratllats corresponen a les regions riques en AT i, el requadre de color verd, a les 600 pb de repeticions en tàndem GCAA. També s'indiquen els llocs d'unió consens per varis factors de transcripció identificats computacionalment amb els programes MatInspector i TFSEARCH.

B

```

-2005 ggattaaaggcgtgcccacattgccagctggcctgcacttttctgaa
-1955 gtgaaaagagagcagtgtaactggggaagaggggagttggggaggttac
-1905 taggaggagtgaggaggaaagactgcagttggaatgcaactgaaaacag
-1855 aaaagaagaaaaagaaaagaaacattaagggttgctgtggaccaacata
-1805 tcaggagaagagagaaaagctgagttagtgaggataatgtggttaaaaaaa
-1755 aaaagcgctattttgacaaaaaacatataaaacaaacaaaaatcaaactc
-1705 catagatttcacctacaagaccatcaataacaaaaccacagctggcag
-1655 tagaactcactgtggaagcctcagtgcatcctacttttaggaaggaccaa
-1605 gaactccacttactgctccagtgtggatgccagccagagaaaataaggca
-1555 acaaagcaaagcaaaagcaaaagcaaatgcagagcggagcggagcggagcaga
-1505 gcagagcaaaagcaaaagcaaaagcaaatgcagagcagagcggagcagagcaga
-1455 gcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaatgcagagcagagcggagcggagcaga
-1405 gcagagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaa
-1355 gcagagcggagcggagcagagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaa
-1305 gcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaaagcaaa
-1255 gcaatgcagagcggagcggagcggagcagagcagagcaaaagcaaa
-1205 gcaaaagcaatgcagagcggagcggagcggagcggagcagagcagagcaaa
-1155 gcaaaagcaatgcagagcggagcggagcggagcggagcggagcagagcaaa
-1105 gcaaaagcaaagcaaaagcaaaagcaatgcagagcagagcggagtgaggaga

-1055 gcaaagaaaaacagcataaagatctgaaaggatgaaataaaactcactct

-1005 tcacacacagtggtgactatttacatagttaaattccagaaatcaaatttg
      OCT-1 (+)
-955 taaaagatcaattttttaaaggggaccaattcattttttgtttgcttgctgct
      HNF3b (+) SRY (-)
-905 tgcttgcttgtgtgacaggctcttactatgaaagccattgctgtcctag
      GATA-1 (-)
-855 aactcactgtgtacaccaggctagccctaaactctcagagatccacctgt
-805 ctctgcctcccaagcactgagattaaaagtatgggccaacgtgccagct
-755 tattaattccagtattttaagttggaatttgagttaaatttgagttggatt
-705 tttatcatatacaattggaagagccatctgttcacataatcacatgaaaca
      NFY E-box SREBP (+)
-655 tttactagatggctaacattgttactagttaatatctacactgaggatc
      SRY
-605 catcagtaataaagcaaaagtcttattttcaaagtcggtgttcagaaat
      C/EBP
-555 gaaaaaaaaatttttttaaaaaaggttaaaagcaggaaaaaaatcaatgaa
-505 gatttctaggttgggaagaaaggcctgggataggatatctcaccaaatga
      GATA-1 (+) C/EBP (+)
-455 ggctttggccgtgggaagaggttacagccgggagctcaaggatctctagg
      RBPF (+)
-405 ctggaacacgcctgtgtcttaggcaagcagcgggctgctgtgactacag
-355 cagagcaggaaggccgagcggtgaggctcgggtcagagagacaccatgg
      TR4 (+)
-305 cttgttacacttctctgaatcactggcaagctgagaaacactgcctccac
      AP-1 (+)
-255 ctctgaagggctgagtgaggcatgtgtaagccccgattccggttgcttt
      GATA-1, 2 (+)
-205 tcagcaagcctttccctcctagtaaaagcacacgcactgccttcccagcc
      OCT-1 (-)
-155 tactaaaactctgctgtgtgtacagataaacattacctgttaagaaggtta
      GATA-1 (+)
-105 agtaagacaggccagggttatgtaaacattcacgctcctcccaccatatat
      TATAlike C/EBPb (+) SP1 (-) TATAlike
-55 atccaccattaaaggaaaggcactgcccggcagctctgactcctccgtcaa
      *+1
-5 actccGTCCACTTTGATCCACCACCAACTAAAGCAGAGGTGAGAAGTT
GGCTTTCTCTTCCATTAAGCGGGTCTACTTACTCCAGCTGTGTGGGAA

```

6.1 Activitat transcripcional del promotor.

Per examinar la capacitat transcripcional de la regió identificada com a promotor del gen S_A , es va dur a terme una sèrie d'experiments de transfecció transitòria amb diferents fragments del promotor clonats en un vector que conté un gen reportador, en cèl·lules de túbul proximal renal PR10 i cèl·lules hepàtiques HepG2.

6.1.1 Anàlisi dels diferents fragments del promotor del gen S_A

Per poder evaluar quina regió del promotor del gen S_A podia ser la més rellevant per la transcripció basal es van fer una sèrie de construccions amb diferents fragments decreixents del promotor i es van subclonar en el vector plasmídic *pGL3-basic* que codifica per l'enzim luciferasa.

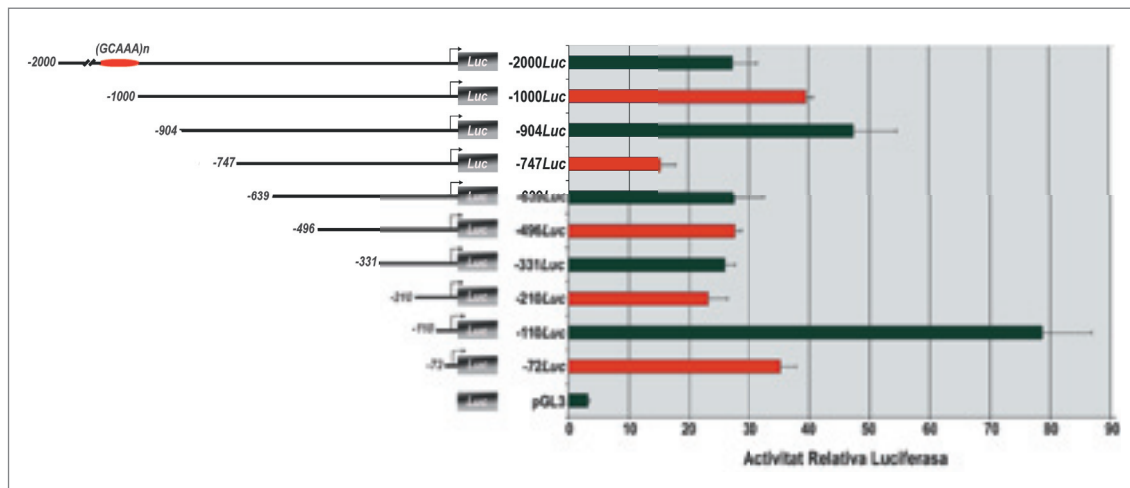
Els fragments del promotor es van generar per PCR, amb *primers forwards* diferents dissenyats a les distàncies corresponents, amb dianes Bgl II i Hind III; com a *primers reverse* s'utilitzà els mateixos en tots els casos el PROM1Kbl o el Prom2Kbl que presenten la mateixa seqüència però amb dianes Bgl II i Hind III respectivament, segons les necessitats (veure la taula 10 de MATERIALS). Els constructes -1000 L_{uc} i -2000 L_{uc} es van obtenir a partir de DNA genòmic de ratolí i l'amplificació dels diferents fragments es van realitzar utilitzant com a motllo el constructe -1000 L_{uc} . En tots els casos es va utilitzar una DNA polimerasa d'elevada fidelitat per evitar els errors d'amplificació en la seqüència i, també en tots els casos es va comprovar que les seqüències fossin correctes mitjançant la seqüenciació. En total es van generar 10 fragments representatius del promotor del gen S_A , que contenen des de les -2000 pb fins a -72 pb *upstream* del lloc d'inici transcripcional fins a la posició +40.

Les transfeccions es van realitzar en la línia cel·lular PR10 que correspon a cèl·lules epitelials derivades del túbul proximal murí concretament de la parts recta del túbul i, també en la línia cel·lular HepG2, cèl·lules hepàtiques tumorals humanes també de tipus epitelial. Per les transfeccions es va utilitzar el mètode comercial *Lipofectamine Plus* de la casa Invitrogen. Per normalitzar els valors deguts a la diferència en l'eficiència de transfecció, es cotransfecten les cèl·lules amb un vector d'expressió per l'enzim fosfatasa alcalina que es secreta al medi (SEAP), *pSEAP2*. Això ens permet mesurar alhora l'activitat luciferasa a partir dels lisats cel·lulars i l'activitat SEAP a partir del medi de cultiu ja que la proteïna SEAP és secretada. Els assajos de transfecció transitòria es van realitzar en plaques de 24 pous per facilitar la manipulació i la reproducibilitat. En general es realitzaren de 3-6 rèpliques de cada situació en almenys 3 experiments diferents. Les activitats luciferasa i SEAP es mesuren a les 48 h posttransfecció.

En la figura 39 es representen els resultats obtinguts en els assajos d'activitat transcripcional dels diferents fragments del promotor del gen S_A , en les línies cel·lulars PR10 i HepG2. De totes les construccions testades la màxima activitat luciferasa s'observà amb el fragment -110 L_{uc} en les dos línies cel·lulars PR10 i HepG2 amb increments de ~ 24.3 i 22.8 vegades més respecte al vector pGL3 buit; tot i que podem veure induccions de 10.8 i 8.6 vegades amb tant sols -72 pb de promotor en les cèl·lules PR10 i HepG2, respectivament. A mesura que pujem en la seqüència del promotor els valors de luciferasa disminueixen en ambdues línies cel·lulars, tant sols afegim 100 pb de promotor (-210 L_{uc}) aconseguim increments en les activitats promotores de 7 vegades més respecte al pGL3 buit. Aquests valors d'inducció es mantenen més o

menys fins a les -747 pb de promotor on hi ha un nou descents d'activitat promotora, assolint valors al voltant de 4 vegades més respecte al vector buit en les dos línies cel·lulars. En canvi a l'augmentar el tamany del promotor, constructes -904*Luc* i -1000*Luc*, tornem a tenir induccions incloses en el rang de 8-14 vegades més respecte al vector buit, tornant a disminuir a increments de 2-8 vegades l'activitat promotora amb 2Kb de promotor (-2000*Luc*), respecte al vector buit.

A



B

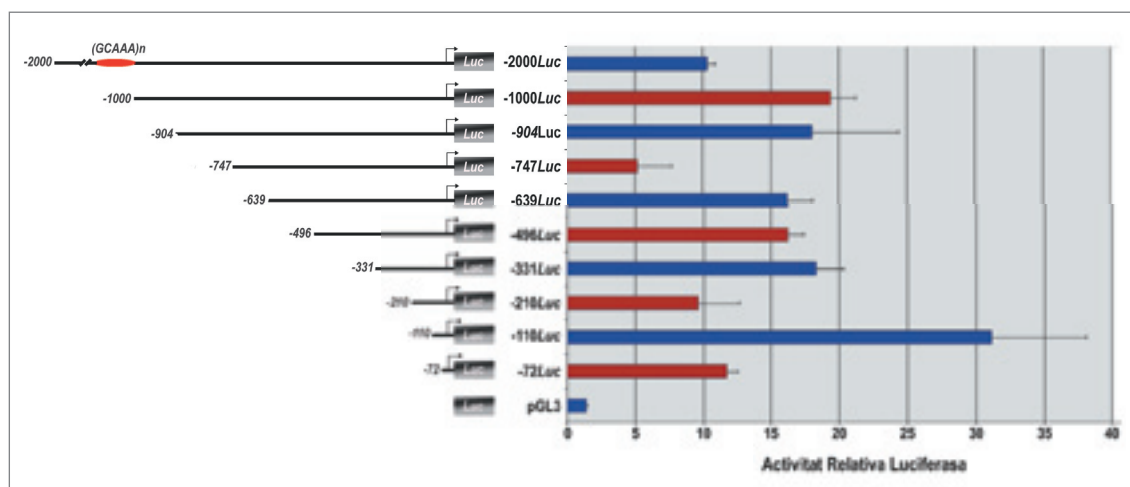


Fig. 39. Anàlisi de l'activitat transcripcional del promotor del gen S_A murí. Varies construccions de diferents fragments del putatiu promotor del gen S_A fusionats al gen de la luciferasa (es representen mitjançant un esquema a la part esquerra de les figures) es van transfectar transitoriament en les línies cel·lulars PR10 (A) i HepG2 (B) per valorar les activitats transcripcionals (representades a la dreta de les figures com Activitat Relativa Luciferasa). Per normalitzar l'eficiència de la transfecció, les cèl·lules es van cotransfectar amb el vector *pSEAP2* i, els valors luciferasa estan normalitzats en front les activitats de la fosfatasa alcalina secretada al medi (SEAP). Els valors expressen la mitjana \pm SD de diferents transfeccions realitzats per triplicat com a mínim.

D'entre totes les construccions testades la màxima activitat luciferasa es troba en el fragment -110*Luc* tant en les cèl·lules renals com en les hepàtiques, amb induccions de 24 a 22 cops, respectivament; indicant possiblement que en aquest segment es troben els elements mínims necessaris per dirigir *in vitro* l'expressió basal del gen S_A de ratolí. També és destacable que el fragment de 747 pb és el menys actiu en ambdues línies, suggerint la possibilitat que en aquest

fragment es trobin elements reguladors negatius o repressors, efecte molt més evident en la línia cel·lular hepàtica ja que en la línia renal aquesta disminució en l'activitat no és tant dràstica, essent la regió promotora que va de la posició -210 a -747 pb la que té una activitat més uniforme en les cèl·lules PR10.

6.1.2 Anàlisi de la resposta del promotor del gen S_A de ratolí al receptor d'andrògens murí (mAR).

El següent pas en l'estudi del promotor del gen S_A va ser investigar si la regulació androgènica que es dona *in vivo* es reflectia *in vitro* per la inducció del promotor del gen S_A pels andrògens.

El sistema que s'ha utilitzat principalment és la línia cel·lular PR10, derivades de túbul proximal de ratolí. Treballs recents realitzats en el nostre laboratori han demostrat que les PR10 són vàlides per analitzar l'activitat transcripcional de promotors dependents d'andrògens (Montse *et al*, 2002). Aquest model, doncs, s'ha transfectat transitòriament amb totes les construccions del promotor del gen S_A , definides en l'apartat anterior, amb la finalitat de mapar la/es regió/ns que responen a andrògens. És necessari cotransfectar juntament amb les construccions anteriors, un plàsmid que conté el receptor d'andrògens murí (*pmAR*), per obtenir una major activitat transcripcional. La resposta androgènica dels constructes deguda al mAR, va ser testada en presència o absència del receptor i del seu lligand la DHT, incubant les cèl·lules amb $1\mu\text{M}$ de DHT.

En la figura 40 es mostra els resultats obtinguts en aquest experiment. Els fragments -72 i -110 no presenten cap canvi en l'activitat transcripcional, en canvi a partir de -210 pb

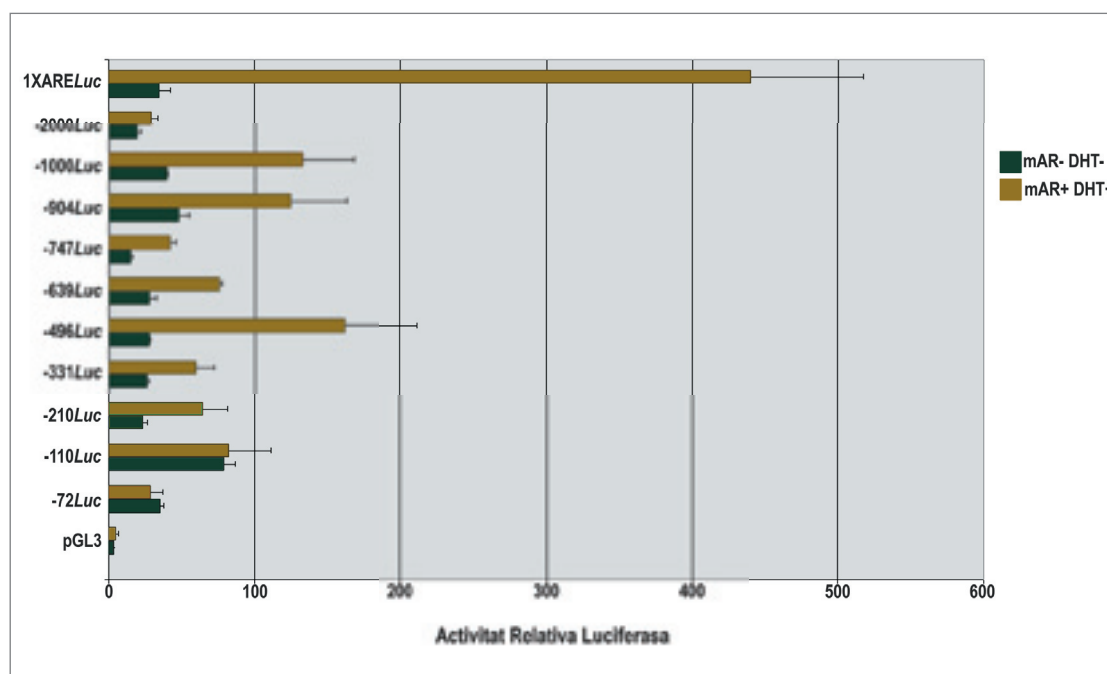


Fig. 40. Resposta del promotor del gen S_A murí al receptor d'andrògens de ratolí (mAR). El mateix grup de construccions del promotor de S_A representats en la figura anterior, van ser cotransfectats en les cèl·lules PR10, juntament amb el plàsmid que codifica pel receptor d'andrògens murí (pmAR). Les barres verd fosc representen els resultats obtinguts sense receptor ni DHT, i les barres verd clar en presència del receptor i de $1\mu\text{M}$ de DHT. Els valors estan normalitzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja \pm SD de diverses transfeccions realitzades per triplicat.

s'observa una resposta mínima de x2 vegades aproximadament, assolint la màxima inducció (~x4.5 vegades) en el fragment de -496 pb. L'activitat transcripcional torna a valors d'inducció de x2 vegades en els fragments de 639 i 747 pb i experimenta un lleuger augment a nivells de x2.6 i x2.9 en 904 i 1000 pb de promotor respectivament. En el fragment de 2000 pb no s'observa un canvi significatiu en l'activitat transcripcional del promotor.

S'utilitza com a control positiu de l'inducció, el "1XARECyp98Luc", es tracta d'una construcció quimèrica en la qual s'ha inserit una còpia de l'element de resposta a andrògens consens (ARE), davant d'un fragment de 98 pb del promotor mínim del *Cyp4b1* (Isern *et al*, 2003). Amb aquest control s'aconsegueix una inducció del gen reportador d'aproximadament 10 vegades, mentre que el plàsmid pGL3-*basic* buit no mostra cap diferència significativa en l'activitat luciferasa.

Anàlisi de la resposta del fragment de promotor, -496Luc, al receptor d'andrògens (mAR), en diferents línies cel·lulars.

Per evaluar si la resposta als andrògens mostrada pel promotor en PR10 era específica o podia reproduir-se en altres tipus cel·lulars, es va testar aquesta resposta androgènica en altres línies renals com MDCK, CV-1 i HEK293 i, en la línia cel·lular hepàtica HepG2. El constructe de promotor utilitzat és el -496Luc degut a que és el que més respon en les cèl·lules PR10. El procediment és el mateix que l'indicat en l'apartat anterior, i consisteix en contranfectar el constructe -496Luc en absència o presència del receptor d'andrògens murí i 1µM de DHT. En tots els casos s'ha emprat el constructe 1XARE com a control positiu.

En la figura 41 es representen els resultats obtinguts en aquest experiment. El fragment de promotor -496Luc en presència del mAR i DHT presenta la mateixa inducció d'aproximadament x3.7 vegades respecte a l'absència de receptor i hormona en les línies cel·lulars MDCK i HepG2, els dos tipus cel·lulars però, responen molt be als andrògens ja que l'1XARE en presència del receptor i l'hormona s'indueix x89 i x148 en les MDCK i HepG2, respectivament. En la línia cel·lular HEK293 el promotor de S_A no presenta una inducció significativa tot i que l'1XARE tant sols s'indueix x4 vegades, en canvi en les CV-1 línia renal de primat el fragment de -496pb s'indueix significativament, aproximadament unes 19 vegades respecte a l'absència de receptor i hormona, en aquest cas també es produeix una bona resposta per part de l'1XARE, d'un 126 vegades.

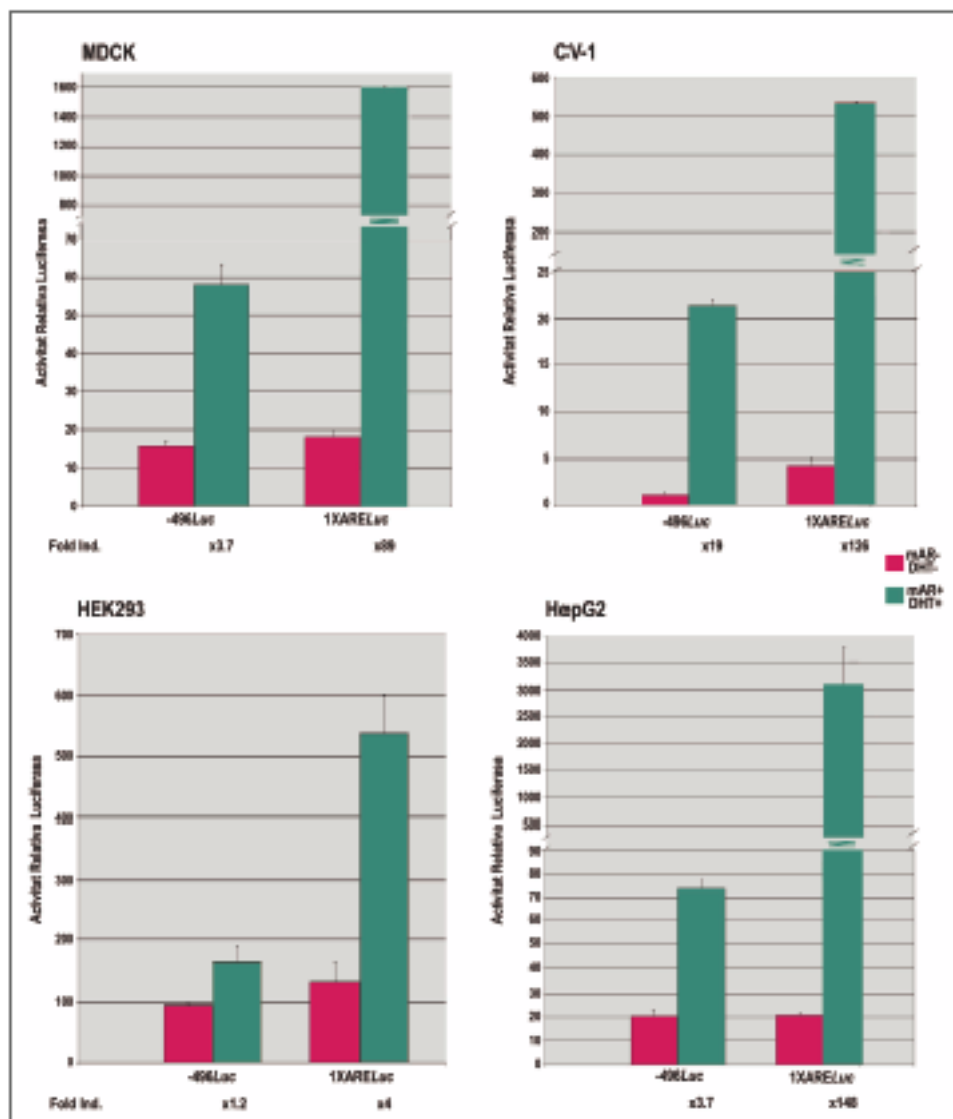


Fig. 41. Resposta del fragment de promotor -496Luc al receptor d'andrògens murí (mAR) en diferents línies cel·lulars. El constructe -496Luc es va transfectar en les línies cel·lulars MDCK, CV-1, HEK293 i HepG2 en absència i presència del plàsmid que codifica pel receptor d'andrògens murí (pmAR) i de 1 μ M de DHT. Els valors estan normalitzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra presenta la mitja \pm SD de varies transfeccions realitzades per triplicat.