

andrògens de les cèl.lules, es va repetir en paral.lel el mateix experiment amb pCAT1430 (133), plàsmid *reporter* amb un fragment de 1430 bp del promotor del gen del pepsinogen C humà amb dos elements de resposta reconeguts per glucocorticoïdes, progesterona i andrògens (Fig.7).

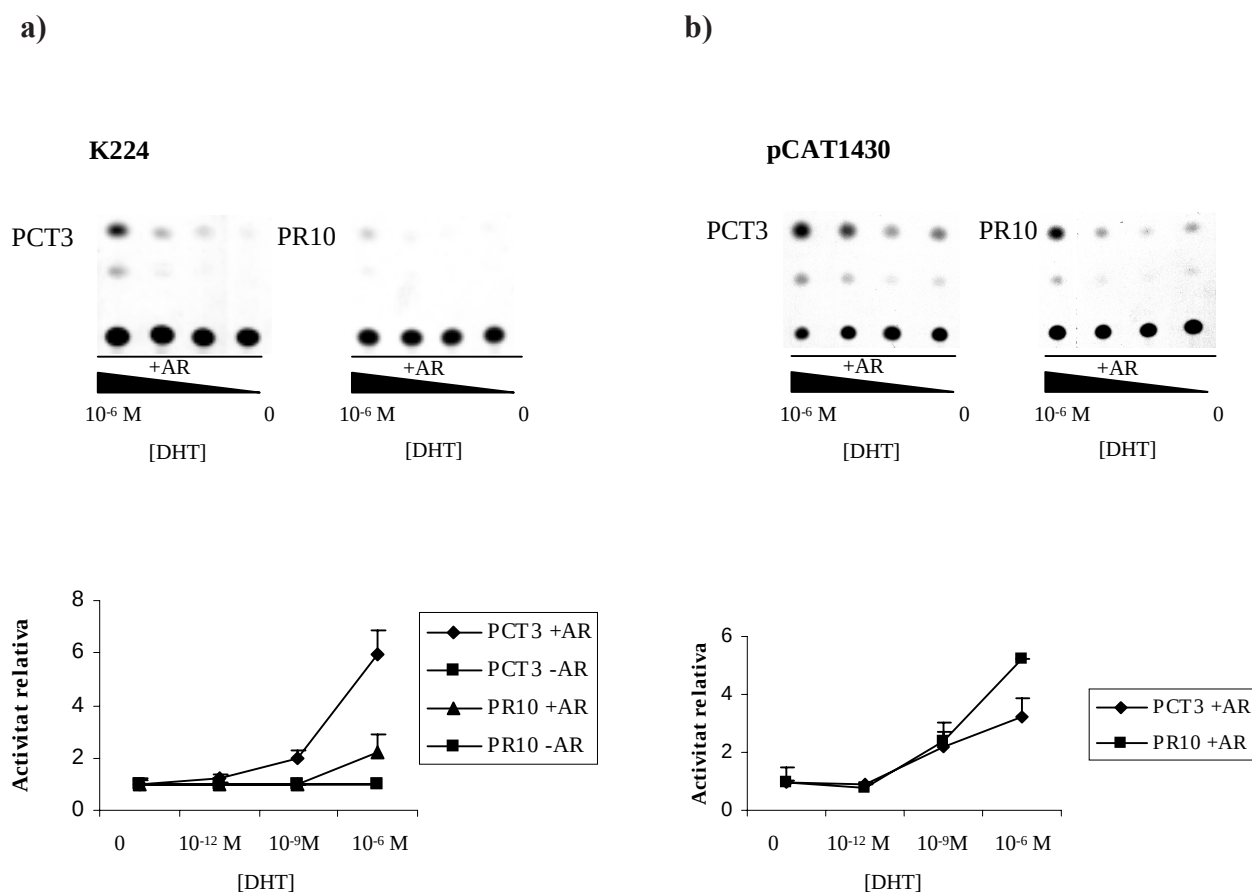


Fig.7. Dosi-resposta del fragment K224 i pCAT1430. Les cèl.lules PCT3 i PR10 van ser transfectades amb 2 µg de K224 (a) o pCAT1430 (plàsmid control) (b) i 0,5 µg de hAR (en les situacions indicades), i tractades amb les dosis de DHT indicades o vehicle, en medi de cultiu depleccionat d'andrògens. En la part superior de la figura, es mostren les autoradiografies dels assaigs CAT corresponents als homogenats de les cèl.lules transfectades. L'activitat CAT, prèviament normalitzada per l'activitat β-galactosidasa (pCH110) de cada mostra, està expressada com la inducció respecte el nivell basal, que és la condició sense hAR i andrògens. S'obté el mateix resultat en PCT3 i PR10 per K224 sense la cotransfecció d'hAR.

Com es pot apreciar en la figura 7, l'activitat CAT/ β -gal relativa mostra que l'eficiència màxima es produeix a la dosi de DHT 10^{-6} M (amb la cotransfecció de l'hAR), per ambdós construccions (K224 i pCAT1430) en PCT3. Aquesta mateixa concentració ha estat utilitzada per estudiar el promotor pCAT1430 en cèl·lules humanes de càncer de mama (133). Finalment, en PR10, es pot apreciar, com a diferència del que succeeix amb la inducció dubtosa de K224, a DHT 10^{-6} M, que la inducció de pCAT1430 és gairebé el doble de l'observada en PCT3.

III.c. Especificitat cel·lular del promotor del gen del KAP

A continuació varem voler observar si els diferents fragments del promotor del gen del KAP responien als andrògens de la mateixa manera en diferents tipus cel·lulars. Per tal de contestar a dita qüestió, es van assajar els fragments de -224, -638 i -1542 bp del promotor del KAP en N2a, CV-1, PCT3 i PR10, amb o sense transfecció de l'hAR. Aquest assaig era interessant de fer perquè es coneixia que el fragment de promotor de 1542 bp tenia les seqüències necessàries per a dirigir l'expressió d'un gen heteròleg de forma teixit i cel·lula específica, sota la dependència dels andrògens en animals transgènics (146). Els plàsmids controls del tractament amb DHT foren el pCAT1430 (fragment del promotor natural del pepsinogen C) i el pMSG5CAT (plàsmid induïble per andrògens) (Fig.8).

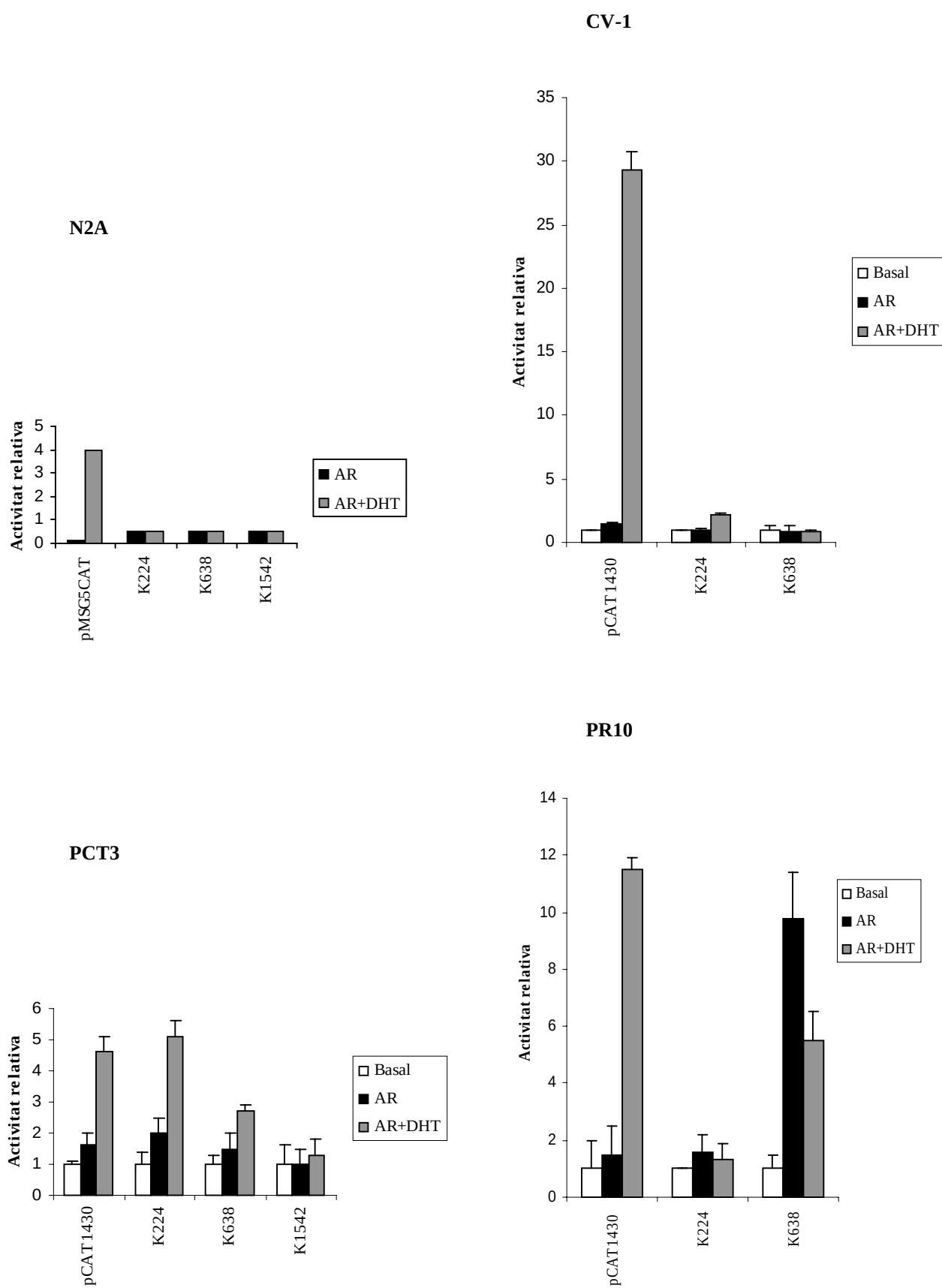


Fig.8. Activitat dependent d'andrògens de les construccions del promotor del KAP en diferents línies

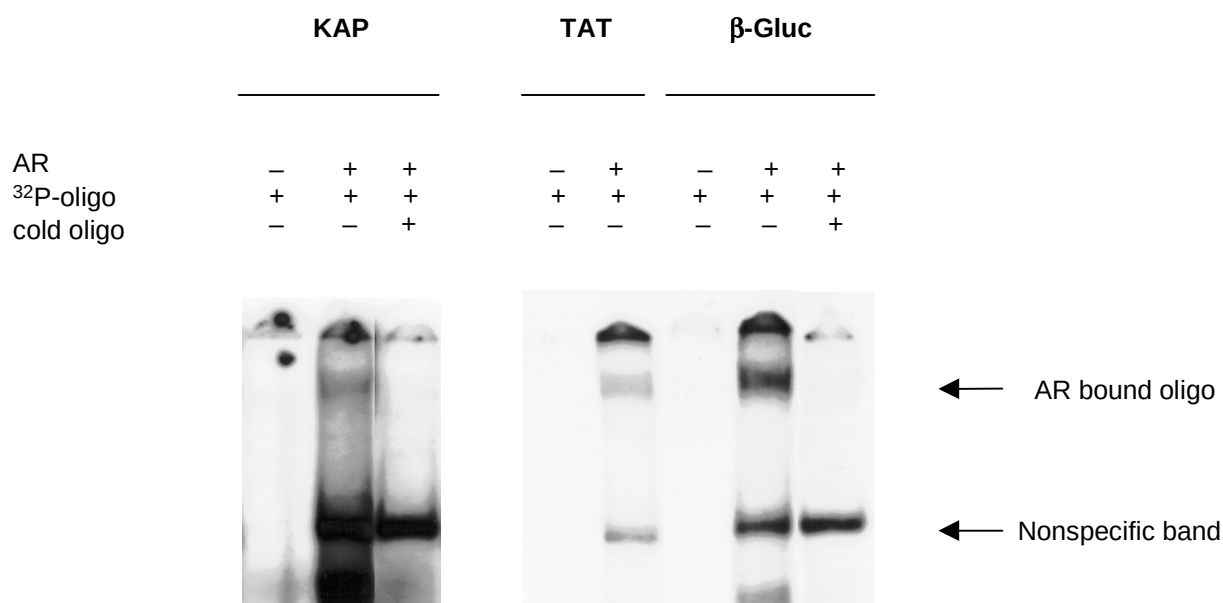
cel.lulars. Es transfecten a N2a, CV-1, PCT3 i PR10, 2 µg de K224, K638, K1542 en presència o absència de 0,5 µg de pSVAR0 i DHT 10^{-6} M durant 48 h. L'activitat CAT dels diferents fragments es mesura com s'ha descrit anteriorment i es compara amb la dels plàsmids control pCAT1430 (CV-1, PCT3 i PR10) i pMSG5CAT (N2a).

En la figura 8, es representa gràficament, el promig dels duplicats d'almenys tres experiments independents. En N2a, el promotor del gen del KAP no s'indueix per andrògens, mentre que PMSG5CAT amb la cotransfecció de l'hAR i DHT 10^{-6} M incrementava, aproximadament, 4 vegades respecte el nivell basal. En CV-1, l'activació androgènica del promotor és de 2 vegades mentre que la del pCAT1430 és de 29,3 vegades. No obstant, en PCT3, en presència d'hAR i DHT, s'estimulava en la mateixa magnitud el fragment de 224 bp del promotor de KAP que el pCAT1430 (aproximadament, 5 vegades), encara que la resposta disminuïa en K638 i K1542. En PR10, només es detectava l'activació independent de lligand i dependent de l'hAR de K638, mentre que pCAT1430 incrementava 11,5 vegades, en presència d'hAR i DHT.

III.d. Assaig de retardament en gel del putatiu element de resposta a andrògens (ARE)

Tant els experiments *in vivo*, en els que Ding *et al* (146) demostraven la capacitat de transactivació regulada pels andrògens del fragment de 1542 pb del promotor del gen del KAP en el túbul proximal renal, com els experiments *in vitro* presentats en aquest treball, conduïen a fer l'assaig de retardament en gel de la seqüència GGTACAggaTGTATA. (Fig.9). Dita seqüència, localitzada en la posició -39 respecte l'origen de transcripció del

promotor del gen del KAP, va ser identificada per computació com a un possible lloc d'unió de l'hAR.



*Fig.9. Assaig de retardament en gel de l'ARE. Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per l'assaig de retardament en presència o absència del rAR són: TAT: ctctgc**TGTACAggaTGTGCT**agcgact; KAP: gggaga**GGTACAggaTGTATA**aaaag; G91: cgacctgga**AGAGTCacaTGTTCT**cgagagaa; G93: cgagtaag**AGTACTtgtTGTTCT**tacagag. La seqüència de l'element de resposta a andrògens està indicada en negreta. Els mateixos oligonucleòtids freds en excés amb ser utilitzats per l'assaig de competició. Figura cedida amablement pel Dr. J. F. Catterall (132).*

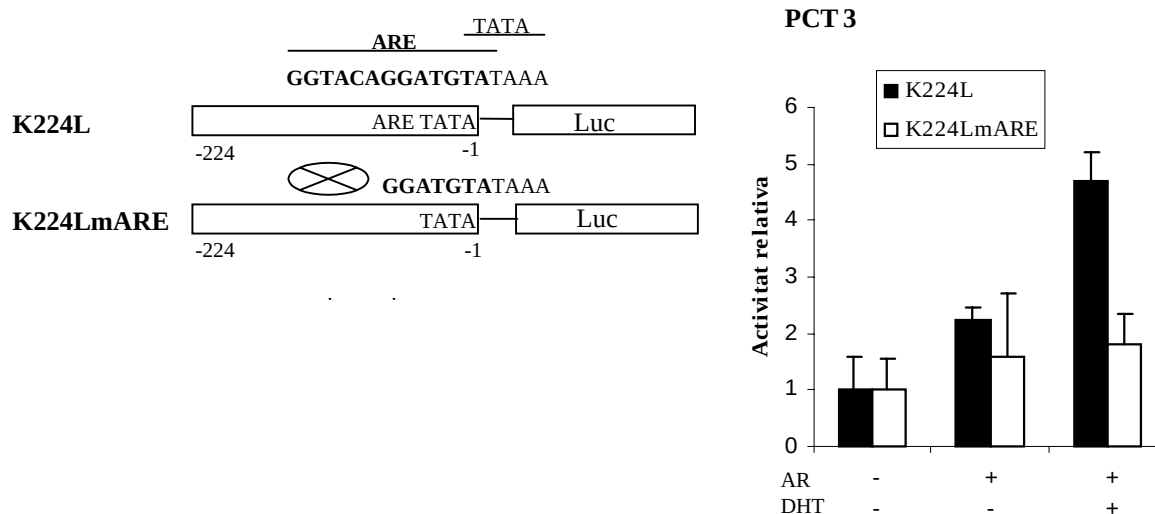
Com es pot apreciar en la figura 9, en els carrils senyalitzats per KAP, el rAR provoca l'aparició d'una banda, que és del mateix tamany que la descrita per l'ARE de la regió promotora del gen de la tirosina aminotransferasa de rata (TAT) (130). Aquest resultat es

confirma pel fet que dita banda, també apareix quan s'incuba el rAR amb la seqüència GRE de la regió promotora proximal del gen de la β -glucuronidasa (G91) (resultats no mostrats) i amb la seqüència ARE (G93) present en la novena seqüència intrònica del mateix gen. Els assajos de competició demostren l'especificitat de la banda retardada (131).

III.e. Assaig funcional de l'element de resposta a andrògens (ARE)

Finalment, per tal de determinar si la seqüència GGTACAggaTGTATA (possible ARE), amb la que prèviament s'havia comprovat la unió de l'AR *in vitro*, era funcional, es van transfectar cèl·lules PCT3 amb una nova construcció de K224, en la que es va delecionar la seqüència subratllada GGTACA (K224LmARE) i, es va comparar la seva capacitat d'inducció per andrògens respecte a la que s'obtenia amb la construcció que conservava la seqüència ARE intacta (K224L).

La figura 10 demostra que la deleció de la seqüència esmentada reprimeix l'acció dels andrògens sobre el promotor de KAP. Per tant, la seqüència GGTACAggaTGTATA constitueix un ARE funcional del promotor del gen del KAP.



*Fig.10. Assaig funcional de K224LmARE respecte K224L. A l'esquerra de la Fig s'indiquen els nucleòtids delecionats de la seqüència nativa. A la dreta, es representen les activitats de 1 µg de K224L (promotor natiu) i 1 µg de K224LmARE (promotor mutat), en presència de 0,5 µg de hAR , en PCT3, induïdes amb DHT 10^{-6} M durant 48 h. L'activitat luciferasa està normalitzada per l'activitat de 20 ng de pRL-TK (*Renilla lucifera*) transfectats en la mateixa mostra. El resultat de la comparació de les activitats relatives d'ambdues construccions, expressades com la inducció respecte el nivell basal, es recull en forma de gràfica.*