

2. *Oatp1*

2.1. Clonatge i caracterització del cDNA sencer murí de *Oatp1*

Dels clons parcials diferencialment expressats per acció dels andrògens a ronyó identificats prèviament al laboratori [133], un d'ells –designat com a 7.1RDA– passà seguidament a ocupar el nostre interès, convertint-se en el nou candidat a ser clonat. L'exploració de les bases de dades disponibles aquell moment va revelar que el clon no coincidia significativament amb cap cDNA conegut encara a ratolí, però alhora sí que presentava una elevada homologia (83% a nivell de nucleòtids) amb un cDNA de rata, l' *Oatp1*. Aquest gen de rata, identificat i clonat inicialment pel grup de P. Meier i col·laboradors (Jacquemin *et al.*, [190]), corresponia a un membre de la família de transportadors d'anions orgànics, proteïnes transportadores expressades en molts teixits –entre ells el ronyó, i de les quals es coneixien també alguns representants en humans (OATP-A, PGT).

2.1.1. Procés de clonatge

A fi de clonar i caracteritzar aquest possible homòleg murí del *Oatp1* de rata (o si més no, un nou membre de la família), es va escometre el *screening* d'una llibreria de cDNA de ratolí (la mateixa utilitzada per el gen *Cyp4b1*, veure apartat RESULTATS 1.4).

Screening d'una llibreria de cDNA

La sonda amb la qual es rastrejà la llibreria fou el fragment *PstI-SpeI* de ~0,3 kb extret del clon 7.1RDA, i que en constitueix la totalitat del seu insert. En total es rastrejaren aproximadament uns 100.000 clons independents. El *screening* primari va retre 2 positius candidats, dels quals només s'aconsegüí conservar-ne un en les successives rondes de *screening* (fins a un total de quatre rondes realitzades).

El fet de que el clon isolat (anomenat oatp 9/8) fos impossible de seqüenciar des de cap dels dos extrems i que al digerir-lo preliminarment van aparèixer vàries bandes d'intensitats desiguals, com si es tractés d'una mostra contaminada amb vàries poblacions de plasmidis, va suggerir-nos de que es podia tractar de una mostra no homogènia. L'estratègia que es va seguir llavors va ser identificar mitjançant *Southern-blot* les bandes digerides, que contenien el fragment de DNA responsables de l'hibridació positiva, per tal d'intentar subclonar-les a continuació i facilitar-ne l'anàlisi. Es va retallar una banda de unes 3 kb obtinguda digerint el clon amb *EcoRI+XbaI* (veure figura 49, pàg. següent) que hibridava fortament amb la sonda 7.1RDA (no es mostra). Es va procedir a subclonar a continuació aquest fragment en el vector *pBluescriptII* (obert per *EcoRI/XhoI*) per tal de poder-lo analitzar millor. Un cop subclonat (rebatejat com a clon 3oatp/BS) es procedí a seqüenciar-lo íntegrament; la seqüenciació inicial dels dos extrems del insert va confirmar que s'havia clonat un cDNA altament homòleg a l'*Oatp1* de rata, probablement el seu ortòleg de ratolí o si més no un nou representant de la família de transportadors d'anions orgànics, encara no descrit en aquesta darrera espècie.

Degut a les dificultats inicials que es presentaren en la manipulació i l'anàlisi del clon positiu oatp 9/8, es va repetir el *screening* de nou. Es plaquejà la llibreria de cDNA novament i es repetí el procés de manera idèntica, amb la mateixa sonda 7.1RDA utilitzada en el previ. Dels 4 nous positius que van aparèixer en la primera ronda, 3 van ser descartats en repetides tandes d'hibridació, fins a quedar-se finalment amb un de sol –el *oatp SY*– d'un 1,4 kb de grandària; l'insert rescatat d'aquest clon també va ser subclonat a *pBSII* per facilitar-ne la seqüenciació. La comparació del clon oatp9/8 amb aquest últim oatp SY, confirmà

que ambdós eren representatius del mateix cDNA, però diferint en la llargada de l'extrem 3'-UTR, molt més extens en el primer clon; d'altra banda, en cap cas es va lograr identificar una pauta de lectura suficientment gran per pensar que ja es disposava del cDNA complet en qualsevol dels dos clons. En la figura 49 es representen esquemàticament els diferents clons isolats de la llibreria i les seves dimensions en relació amb el que finalment esdevindrà el *full-length*, descrit en les línies següents.

5'-RACE

Com que cap dels diferents clons aïllats contenien un ORF sencer, calgué realitzar una aproximació de 5'-RACE per tal d'estendre i completar el fragment més llarg aconseguit de 3 kb (que provenia del clon oatp 9/8). A tal efecte es varen dissenyar *primers antisense* dins d'una regió d'aproximadament 300 pb a

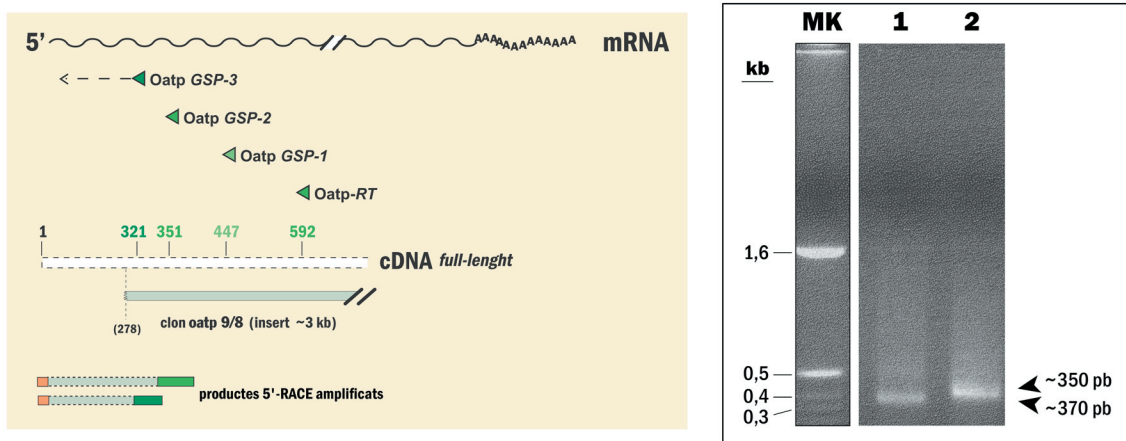


FIG 48. Il·lustració esquemàtica del 5'-RACE realitzat per completar el cDNA de Oatp1 murí. A la part esquerre de la figura es mostren el disseny i les posicions dels primers utilitzats en el 5'-RACE, així com els productes amplificats; també s'indica la mida relativa del clon parcial oatp 9/8 i del cDNA full-length. A la part dreta de la figura es mostra el gel d'agorosa corresponent a la segona netsd-PCR del 5'race; en el carril 1, la banda obtinguda utilitzant com a primer específic el oatp-GSP3 i en el carril 2, la banda obtinguda utilitzant el oatp-GSP2

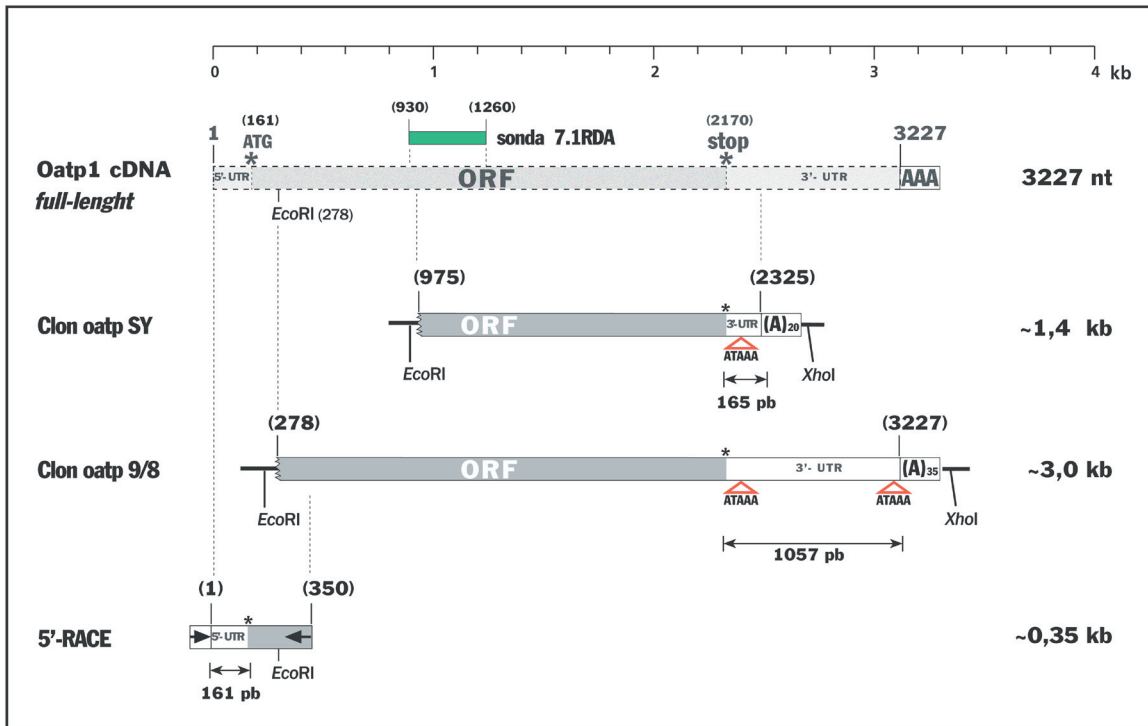


FIG 49. Esquema dels diferents clons de cDNA obtinguts en el procés de clonatge del cDNA complet de Oatp1. Es mostren tan les mides i característiques més rellevants dels clons aïllats de la llibreria renal com els productes obtinguts amb el 5'-RACE, tots ells utilitzats per consruir el cDNA full-length final. També s'indica la posició relativa de la sonda 7.1RDA utilitzada en el screening

l'extrem 5' de la seqüència del clon conegut. Es seguí el protocol de RACE partint de RNA poly(A)⁺ renal i realitzant varies PCR amb *primers* interns, per tal d'augmentar l'especificitat.

A la *figura 48*, s'il·lustra esquemàticament l'estratègia utilitzada i les bandes que es varen obtenir amb els corresponents *primers* GSP2 i GSP3, que varen ser subclonades i seqüenciades.

Composició del clon sencer definitiu

La construcció del cDNA definitiu de *Oatp1* que inclogués la totalitat de llur seqüència codificant, es va realitzar fusionant en un sol clon –per restricció i lligació– els dos fragments obtinguts independentment: per una banda el segment de 3 kb (derivat de la llibreria) i per l'altra el segment corresponent a l'extrem més 5' del cDNA (obtingut per 5'-RACE); amb aquesta estratègia va quedar constituït el cDNA *full-length* de *Oatp1* definitiu (*Fig. 49*).

El clon obtingut es va seqüenciar en la seva totalitat per les seves dos cadenes per comprovar l'absència d'errors i per establir la seqüència definitiva del nou cDNA de ratolí clonat (*Genbank*TM *accession n° AF223067*).

Característiques del cDNA de *Oatp1*

En la *figura 50* (*pàg. següent*) s'exposa la seqüència complerta dels 3227 nucleòtids, 3267 si s'hi afegeix la cua poli(A), que componen el cDNA sencer de *Oatp1* clonat a partir de ronyó murí, amb la corresponent seqüència aminoacídica derivada. El cDNA isolat, està compost per unes regions no codificants 5'-UTR i 3'-UTR de 161 pb i 1057 pb de longitud, respectivament; en aquest últim segment es localitzen varies senyals putatives de poliadenilació (AAUAAA), concretament en les posicions 2293, 2996, 3023 i 3174, fet que suggereix la possible existència de variabilitat en la mida dels extrems 3' dels transcrits d'*Oatp1*. L'evidència que durant el screening de la llibreria s'identifiqués un clon positiu parcial d'*Oatp1*, dotat d'un extrem 3'-UTR de mida reduïda (165 pb) amb la corresponent cua poli(A) (*veure figura 49*), afegit al fet esmentat de la identificació en la seqüència de cDNA de múltiples llocs putatius de poliadenilació, pot reforçar la idea d'una possible coexistència de transcrits amb longituds variables d'aquesta regió.

L'anàlisi per *northern-blot* va revelar que la hibridació de RNA renal amb el cDNA clonat, provocava l'aparició de varies espècies de mRNA d'intensitats i grandària diferent, similar al que succeeix amb altres representants de la família dels *Oatps* [190, 201, 205]. Una possible interpretació d'aquest fet podria consistir en la cross-hibridació inespecífica amb altres membres de la família expressats també en el teixit, i amb qui podria compartir una homologia significant. Per aclarir aquesta qüestió i per resoldre si la variabilitat a l'extrem 3'-UTR contribuïa a la diversitat de mides, es va hibridar consecutivament el mateix filtre de RNA renal murí amb una sonda central, situada dins de la regió codificant (*nt 930-1260*) i una altra representativa de l'extrem més 3' del clon *full-length* de ~3,2 kb (sonda 3'-UTR distal, *nt 2796-3101*); s'observà que amb la sonda més distal -3' desapareixia el transcrit més petit (de ~2,5 kb), detectat per la sonda més interna (*veure figura 52*). Per tant, es pot inferir que la banda de ~2,5 kb correspondria a un

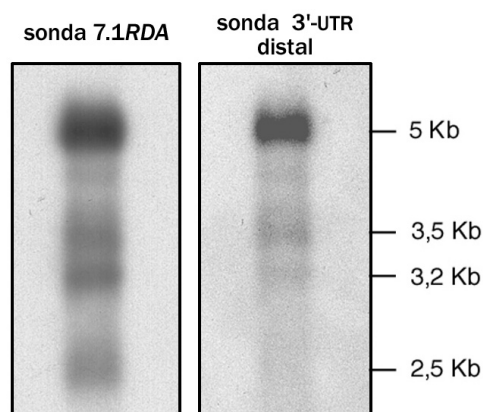


FIG 51. Multiplicitat de transcrits i diferents llargades de 3'UTR. Anàlisi per *northern-blot* d'un filtre de RNA poli(A)⁺ renal hibridat consecutivament amb la sonda 7.1RDA (*nt 936-1274*) i la sonda 3'-UTR distal (*nt 2796-3101*), respectivament. Notar la desaparició de la banda inferior (~2,5 kb) en el *northern* hibridat amb la segona sonda.

missatger d'*Oatp1* amb una regió 3' no traduïda curta. Aquest resultat indicaria que com a mínim algunes de les varies espècies de mRNAs que apareixen en els assaigs de *northern-blot* corresponen a transcrits d'*oatp1* de mida variable en llur extrems 3' no traduïts, més que a altres membres de la família dels *oatps* murina o a diferents llargades dels ORFs.

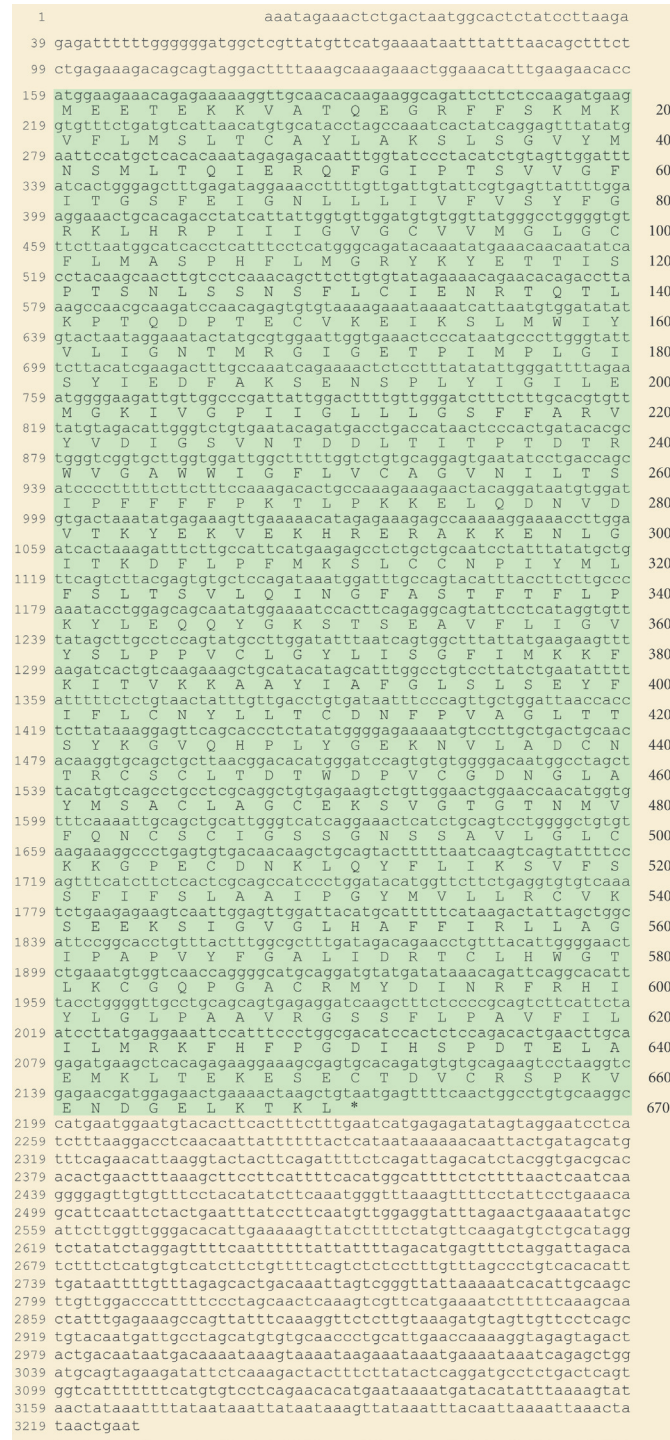


FIG 50. Seqüència corresponent al cDNA murí de *Oatp1*. L'esmentada seqüència ha estat dipositada al *GenBank*™ amb el número d'accés AF223067. S'indica la corresponent seqüència proteïca deduïda a partir del cDNA. L'asterisc (*) simbolitza el codó de terminació o de *stop*

La major pauta de lectura identificada en el cDNA defineix un ORF de 2010 *pb*, que s'extén des de l'ATG en la posició 161, fins a la posició 2170 on trobem dos codons de stop consecutius en fase. Aquest ORF codifica per una proteïna deduïda de 760 *aa*, amb un pes molecular calculat de 74 *kDa* (Fig. 52).

A continuació s'il·lustra esquemàticament el cDNA complet del Oatp1 murí, amb les regions no traduïdes (UTR's), la regió codificant (ORF) i la proteïna derivada per traducció d'aquest ORF –representada en el dibuix en forma de proteïna de membrana politòpica.

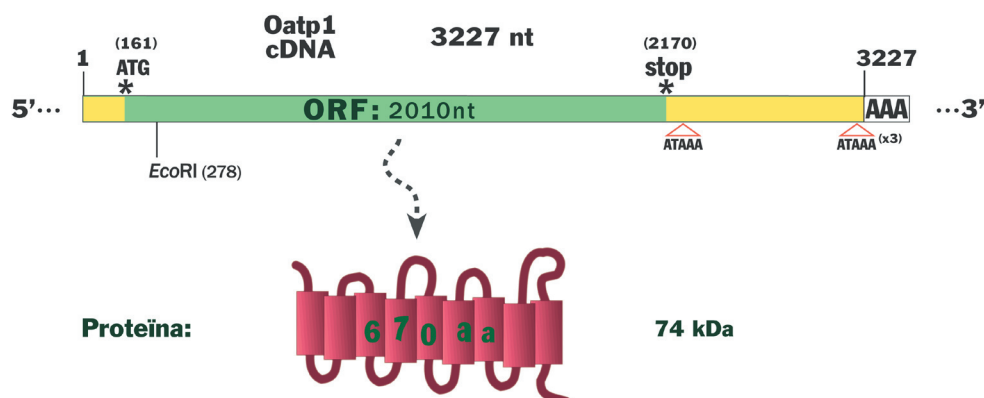


FIG. 52. Il·lustració de l'estructura del cDNA murí de Oatp1. Representació esquemàtica del cDNA complet de ratolí del gen *Oatp1*, amb el seu ORF (*open reading frame*) corresponent (en verd), i un dibuix aproximat de la proteïna integral de membrana codificada pel mateix. També es mostren els trets més rellevants com els codons d'iniciació i terminació, els putatius llocs de poliadrenilació i les regions UTR (en groc)

En un estudi inicial, la nova proteïna murina deduïda presentava una màxima homologia del 81% amb l'Oatp1 de rata [190] i de un 68% amb l'OATP-A humà [226]. Dins de la família de transportadors d'anions orgànics existeix una variable homologia entre els diferents membres presents en rosegadors i humans, segons el grau de conservació i la correspondència entre gens no ortòlegs (veure figura 53, que mostra l'arbre filogenètic dels Oatps murins). La taula XXV sumaritza les identitats globals (en aminoàcids) entre Oatp1 murí –identificat en aquest treball– i alguns Oatps escollits d'humans, rata i ratolins (a partir de les seqüències disponibles actuals).

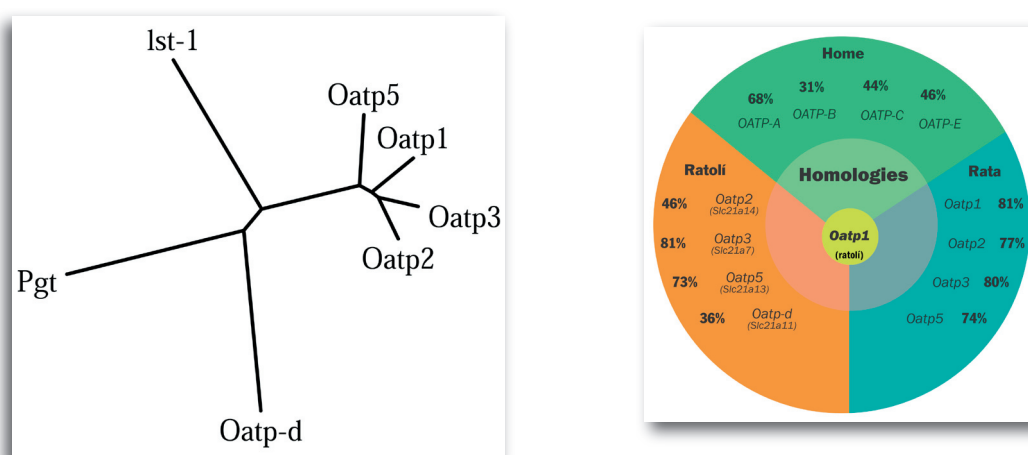


FIG. 53. Arbre filogenètic radial del Oatp1 de ratolí. Representació del dendrograma resultant de la comparació filogenètica de diversos membres de la família murina dels Oatp's. S'ha construït utilitzant el programa PHYLIP <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>

TAULA XXV. Homologies entre Oatp1 de ratolí i altres membres de la família dels Oatp's. taula circular que mostra els percentatges d'homologia (en aminoàcids) entre diferents representants dels transportadors d'anions orgànics i l'Oatp1 murí

Finalment, la figura 54 compara les seqüències d'aminoàcids en forma d'alineament múltiple entre Oatp1 i les proteïnes OATP-A i Oatp1 de rata, utilitzant l'algoritme CLUSTALW.

```

mouse_oatp1 1 MBEETEKRVATQEGRFESKMKVFLMSLTCAFLARSLSGVYMNMSMLTOIERQFIPTSVVGF
rat_oatp1 1 MBEETEKKITATQEGRFESKMKVFLMSLTCAFLARSLSGVYMNMSMLTOIERQFDIPTSVAAGL
human_OATP-A 1 MGETEKRIEHRIRICLSKLMFLLAITCAFLARSLSGVYMNMSMLTOIERQFNIFPTSVAAGL

mouse_oatp1 61 IINGSFIEIGNLLLVFVSYFGKRLHRRPIHIGVGCVVMLGCLFMAISPHFLMGRVRYETTIS
rat_oatp1 61 IINGSFIEIGNLPIIVFVSYFGTKLHRPVVIGIGCVMLGCLFMSLPHFLMGRVRYETTIS
human_OATP-A 61 IINGSFIEIGNLLIIFVSYFGTKLHRPIMIGIGCVVMGLGCLFMSLPHFLMGRVRYETTIS

mouse_oatp1 121 PISNLSNSFLCENRRTQTLKPTQDPPECVKEIKSLMWIYVVLGNIMRIGIETPIIPLGI
rat_oatp1 121 PTGNLSSNSFLCMENRTQTLKPTQDPPECVKEIKSLMWIYVVLGNIMRIGIETPIIPLGI
human_OATP-A 121 VSGNLSSNSFLCMENRTQTLKPTQDPPECVKEIKSLMWIYVVLGNIVRIGIETPIIPLGI

mouse_oatp1 181 SYIEDFAKSENSPLYIGILEMCKIIGPIIGLLLSGSEFARVYVDIGSVNTDLDLITPTDTR
rat_oatp1 181 SYIRDFAKSENSPLYIGILEMCKVAGPIIGLLLSGSEFARVYVDIGSVNTDLDLITPTDTR
human_OATP-A 181 SYIEDFAKSENSPLYIGILEMCKIIGPIIGLLLSGSEFARVYVDIGSVNTDLDLITPTDTR

mouse_oatp1 241 WVGAWWIGFLVCAGVNLTSIPFFFEPKTLPKKBLQDNDVDTREKVEKRRBRKAKENLG
rat_oatp1 241 WVGAWWIGFLVCAGVNLTSIPFFFLPKALPKKGGQENVAVTRDCKVEKYGGOAREENLG
human_OATP-A 241 WVGAWWIGFLVCAGVNLTAIPFFFLNNTLPPKGGQENVAVTRDCKVEKRRBRKAKENLYG

mouse_oatp1 301 IITKDFLFFMKSLCCNPIYMLFSLTSVLQINGFASTFTPLPKYLEQQYQKSTSEAVFLIGV
rat_oatp1 301 IITKDFLFFMKRLFCNPIYMLFSLTSVLQINGFINRFTPLPKYLEQQYQKSTSEAVFLIGV
human_OATP-A 301 IITKDFLFFMKSLCCNPIYMLFLLVGVHGFNFAVNMISFTPLPKYLEQQYQKSTSEAVFLIGV

mouse_oatp1 361 YSLPPVCLGYLISGFIIMKKFKITVKKAAVIAFGCLSLSEYIFILCNVLLTCDNPPVAGLTT
rat_oatp1 361 YSLPPICLGYLISGFIIMKKFKITVKKAAVIAFGCLSVFHYLLFLCHFMILTCDNAAVAGLTT
human_OATP-A 361 YNLPPICLGYLISGFIIMKKFKITVKKAAHIGCWLSELVYLLVFLSFLMTCENSSVVGENT

mouse_oatp1 421 SYKGVQHPLYGKKNVLDACNTRCSCLEDTWDVPVCGDNGLAYMSACLAGECKSVGTGTNMV
rat_oatp1 421 SYKGVQHPHVEISKVLDACNTRCSCSEMTWDVPVCGDNGLAYMSACLAGECKSVGTGTNMV
human_OATP-A 421 SYKGVQHPDLYVENDLFDACNVDCNCFEKTWDVPVCGDNGLAYMSACLAGECKSVGTGTNMV

mouse_oatp1 481 FQNCSCIQSSGNSSAVLGLCKKGPEDNKLQYFLIKSVFSSFIISLAAIPGYMVLRLCVK
rat_oatp1 481 FQDCSCIQSSGNSSAVLGLCKKGPEDNKLQYFLILTIISFIYSLTAIPGYMVLRLCVK
human_OATP-A 481 FQNCSCIQSSGNSSAVLGLCKKGPEDCLMLQYFLILSAMSSFIYSLAAIPGYMVLRLCMK

mouse_oatp1 541 SBEKSLGVGLHTFCIRVLAGIPAPVYFGALIDRTCLHWGTLKCGOPGACRMYDINFRHI
rat_oatp1 541 SBEKSLGVGLHTFCIRVLAGIPAPVYFGALIDRTCLHWGTLKCGORGACRMYDINFRHI
human_OATP-A 541 SBEKSLGVGLHTFCIRVLAGIPAPVYFGALMDSTCLHWGTLKCGRSGACRMYDINFRVI

mouse_oatp1 601 YLGLPAALRGSSFLPAVFIILIMRRFHPFGDTHSPDTELAEMKLEKESECTDVCRSFQV
rat_oatp1 601 YLGLPAALRGSSFLPAVFIILIMRRFHPFGDTHSPDTELAEMKLEKESECTDVCRSFQV
human_OATP-A 601 YLGLPAALRGSSFLPAVFIILILIMRRFHPGENASSGTELEHTEVKKRENECRDLYQKSTV

mouse_oatp1 661 ENDGELKTKL
rat_oatp1 661 ENDGELKTKL
human_OATP-A 661 LKDPDELKTKL
    
```

FIG 54. Alineament entre les proteïnes Oatp1 (ratolí), OATP-A (humà) i Oatp1 (rata). Comparació entre la seqüència d'aminoàcids predita per Oatp1 murí amb les seqüències peptídiques dels transportadors OATP-A i Oatp1 d'humans i de rata, respectivament. Els residus ressaltats amb negre indiquen les posicions idèntiques entre les tres proteïnes, mentre que els ressaltats amb gris corresponen a substitucions conservatives. L'alineament s'ha realitzat utilitzant el programa CLUSTALW disponible als servidors del EBI.

2.1.2. Traducció in vitro mitjançant lisats de reticulòcit

El cDNA clonat d'Oatp1 es va sotmetre a una traducció *in vitro* amb el sistema de reticulòcit de conill, per tal de verificar la funcionalitat de la seva regió codificant. Es va utilitzar un kit comercial (TnT) de la casa PROMEGA, que permet partir directament de DNA plasmídic realitzant-se simultàniament en un sol tub les reaccions de transcripció i traducció *in vitro* de manera acoblada. La presència a la barreja de metionina marcada radioactivament amb Sofre-35, al incorporar-se al polipèptid naixent, possibilita la posterior detecció de la proteïna generada *de novo*. A la figura 55 es mostra el resultat dels experiments de traducció *in vitro* realitzats sobre el clon corresponent al cDNA sencer de oatp1 com a motlle. Com es pot apreciar a la figura, en presència de la seqüència codificant, es sintetitza un polipèptid d'una grandària aparent de ~56 kDa (carril 2) que no apareix en el corresponent control negatiu (carril 1), on s'ha obviat de incloure el cDNA. La utilització de microsomes en la reacció de traducció no va aportar diferències significatives en els productes obtinguts (no es mostra).

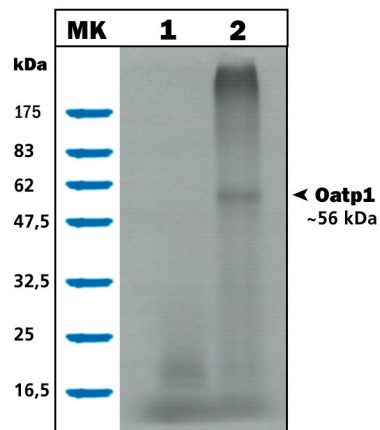


FIG 55. Traducció *in vitro* del cDNA de Oatp1. S'ha utilitzat el sistema dels lisats de reticulòcit de conill, amb traducció acoblada a la transcripció. En el carril 2 s'ha utilitzat com a motlle el cDNA clonat de Oatp1, mentre que en el carril 1 s'ha substituït per H₂O (correspon al control negatiu)

2.1. Expressió del mRNA de *Oatp1* en els teixits de ratolí

La distribució tissular de *Oatp1* s'estudià qualitativament per RT-PCR a partir de RNA de diferents teixits murins adults, extrets de ratolins mascle de la soca 129/SvJ. La reacció s'optimitzà per tal d'aconseguir la màxima especificitat en l'amplificació pel gen *Oatp1* (taula XXVI) utilitzant els primers descrits a MÈTODES, corresponents a la regió 351-1234 del cDNA. La identitat dels productes obtinguts es verificà per seqüenciació. Com a gen de referència amb una expressió constitutiva en tots els teixits s'utilitzà la ciclofilina A (*mCypA*). A la figura 56 s'observa el patró d'expressió obtingut de *Oatp1*, detectant una banda únicament a fetge i a ronyó. Per corroborar aquest patró, es transferí el gel de la RT-PCR a una membrana de niló i es realitzà un "RT-PCR/Southern-blot", hibridant el filtre amb una sonda del cDNA de *Oatp1* (no es mostra). Aquesta tècnica ofereix una major sensibilitat encara que la PCR podent arribar a detectar quantitats ínfimes d'expressió. els resultats de l'experiment foren els mateixos: només apareixia senyal a fetge i a ronyó, reforçant la idea de que principalment es tracta d'un gen d'expressió renal i hepàtica .

TAULA XXVI. Característiques i condicions de la RT-PCR

primers (5'→3')	Amplicó	Motlle	Condicions (abreujades)
<i>mOatp1</i> 10f - GAAACCTTTTGTGGATTGTATTTCG	~0,9 kb	500 ng de RNA _T ratolí ♂ 129/SvJ	RT @50°C , PCR @58°C ; 40 cicles
<i>mOatp1</i> 6r - CCTATGAGGAATACTGCCTC			

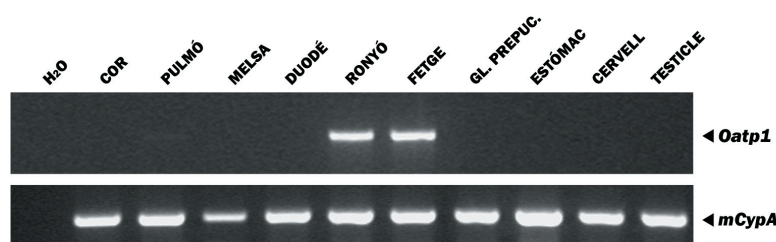


FIG 56. Expressió de *Oatp1* a diferents teixits de ratolí. Patró d'expressió de *Oatp1* en diferents teixits murins adults, analitzats per RT-PCR. 500 ng de RNA total dels teixits indicats (H₂O: control negatiu de la reacció), van ser transcrits inversament i amplificats utilitzant els primers específics per *oatp1* 10f / *oatp1* 6r. Com a gen de referència s'han usat primers per la ciclofilina A de ratolí (*mCypA*). (veure MÈTODES); els productes d'amplificació obtinguts es varen resoldre en un gel d'agarosa al 2% i visualitzats amb EtBr.

2.4. Regulació de l'expressió de *Oatp1*

Regulació androgènica de *Oatp1* a ronyó

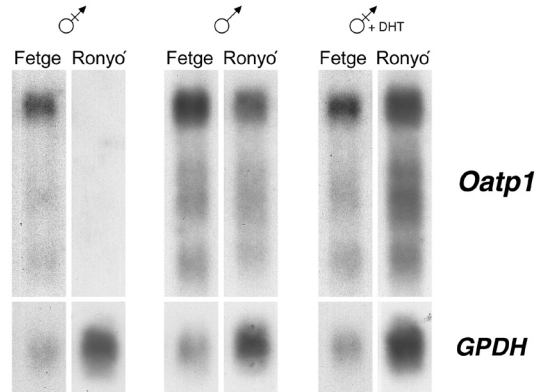
Per analitzar la possible existència de diferències sexuals d'expressió, i per determinar si els andrògens estan implicats en la regulació de *Oatp1* en aquests teixits, es va examinar a continuació l'efecte de la castració i el restabliment androgènic farmacològic sobre els nivells d'expressió del mRNA d'*Oatp1*, mitjançant implants subcutanis alliberadors de *dihidrotestosterona* (DHT).

Es va preparar RNA poli(A)⁺ a partir de fetge i de ronyó d'animals control (intactes), animals castrats i d'animals castrats tractats amb DHT durant vuit dies, analitzant-se l'expressió de *Oatp1* mitjançant assaigs de *northern-blot*. Com pot observar-se a la figura 57, la gonadectomia resulta en una abolicció de l'expressió del mRNA d'*Oatp1* a ronyó , mentre que a fetge la seva expressió es manté (amb un lleu davallada apreciable a nivell qualitatiu). En els animals castrats administrats amb el potent andrògen

no aromatitzable DHT, s'observa una restitució dels nivells renals d'expressió d'*Oatp1* presents en els animals control, mentre que provoquen un efecte mínim en els nivells hepàtics.

Cal dir que aquesta sobrerregulació induïda pels andrògens així com la pèrdua d'expressió renal suscitada per l'eliminació dels andrògens circulants amb la castració, afecta tot els transcrits observats de manera coordinada, sense que prevalgui el guany o la davallada d'intensitat de cap banda en particular.

FIG. 57. Influència dels andrògens en l'expressió d'*Oatp1* a fetge i ronyó mitjançant anàlisi per northern-blot. Els RNAs poli(A)⁺ renals i hepàtics de ratolins mascle C57BL/6 castrats, castrats i tractats amb DHT i, ratolins intactes, van ser separats electroforèticament i transferits a un filtre de nil·ló, sotmetent-se a hibridació amb una sonda corresponent al cDNA d'*Oatp1* murí (*Oatp1*), tal com es descriu a MÈTODES. La sonda corresponent al gen de la gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa (*GPDH*) es va utilitzar com a control intern d'integritat i càrrega del poli(A)⁺



Anàlisi en diferents soques murines

Donat que poden existir diferències d'expressió entre espècies i –dins del ratolí– entre soques diferents, per avaluar si el dimorfisme sexual observat en l'expressió renal de *Oatp1* a C57BL/6 era extensible a d'altres soques murines, ratolins mascle adults (7-8 setmanes) de les soques consanguínies BALB/c i 129/Sv (juntament amb la C57BL/6) varen ser gonadectomitzats i, un cop recuperats de l'operació, es va aïllar el RNA total a partir dels seus ronyons així com el d'animals control intactes. Un *northern-blot* d'aquests RNAs va ser hibridat amb una sonda corresponent al segment 3'-UTR del cDNA de *Oatp1*, per examinar la davallada d'expressió corresponent.

Com es pot observar a la figura 58, en els animals control apareixen varis transcrits (amb un de majoritari d'unes ~5 kb, veure fig. 31, pàg. 92) la intensitat dels quals decau considerablement en els animals castrats fins a nivells aparentment indetectables. La normalització de càrrega s'indica amb la banda corresponent al RNA

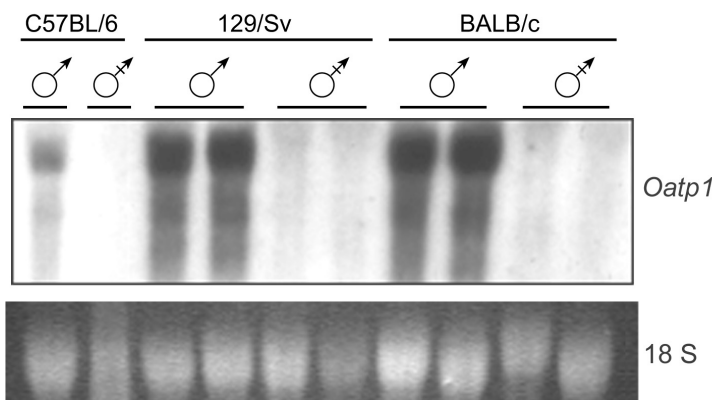


FIG. 58. Dependència androgènica de l'expressió renal de *Oatp1* en varies soques murines. Anàlisi per *northern-blot* del mRNA de *Oatp1*, en el ronyó de tres soques consanguínies. 15 µg d'RNA total de ronyó (dos animals per situació) de mascles intactes i castrats, de les soques C57BL/6, 129/Sv i BALB/c, van ser sotmesos a electroforesi en un gel de formaldehid i transferits a membranes de nil·ló. La hibridació va realitzar-se amb el cDNA (nt's 1994-2575) de *Oatp1* marcat amb ³²P sota les condicions descrites al corresponent apartat dels MÈTODES. Varies transcrits (d'entre 5 i 2,5 kb) es detecten en els mascles control intactes, mentre que són inapreciables en els ronyons dels mascles castrats. La senyal d'hibridació va ser normalitzada amb el control intern de ciclofilina A (mCypA). Es mostra també la banda del RNA ribosomal 18 S (tenyida amb EtBr prèvia transferència, com indicador de càrrega

ribosomal 18 S, captat al transiluminador prèviament a la transferència del gel. Si comparem entre les diferents soques, es pot apreciar qualitativament que els nivells basals d'expressió renal de *Oatp1* del mascle C57BL/6 són inferiors que els corresponents als mascles BALB/c i 129/SvJ (que mostren nivells pròxims entre ells), pero en

algun tipus de funció reguladora.

No disposem d'informació sobre el punt (o punts) exactes de iniciació transcripcional del gen, amb què es podria definir acuradament la regió promotora, ni tampoc si aquesta regió pot conferir activitat a un gen reporter en experiments de transfecció transitòria, com els duts a terme amb el cas del promotor del gen *Cyp4b1*.

2.5. Estudi funcional de *Oatp1*: expressió i assaigs de transport en oòcits de *Xenopus*

Les característiques funcionals de l' *Oatp1* murí referents a llurs capacitats de transport, van ser estudiades en un sistema heteròleg d'expressió utilitzant les tècniques d'expressió en oòcits de *Xenopus laevis*.

NOTA. Tots els experiments relatius als estudis funcionals de transport realitzats en oòcits (tan de *Oatp1* i *Oatp-D/MJAM*), han estat duts a terme pel doctorant al laboratori del professor Peter Meier a Zürich, Suïssa, sota la supervisió dels Drs. Bruno Hagenbuch i Bruno Stieger.

El cDNA del *Oatp1* murí es va expressar funcionalment en oòcits, mitjançant microinjecció en els mateixos del corresponent cRNA sintetitzat *in vitro*. Les activitats de transport degudes a *Oatp1* van ser llavors monitoritzades a través de la mesura de la incorporació de substrats escollits marcats radioactivament (indicats a la *taula XXVII*). La captació basal/inespecífica es va mesurar igualment en oòcits injectats amb H₂O estèril. La captació o *uptake*, es va realitzar en un medi sense ions Na⁺ i a pH

TAULA XXVII. Substrats. Especificitat de substrat per *Oatp1*

Substrat	(conc.)	Uptake (fmol/oòcit)		
		H ₂ O	<i>Oatp1</i>	RATIO
E ₂ 17βG	(0,2 μM)	189 ± 39	2570 ± 466	14
PGE ₂	(25 nM)	0,6 ± 0,1	5,8 ± 1,3	10
DHEAS	(0,2 μM)	4,3 ± 0,8	266 ± 43	60
E3S	(0,5 μM)	15 ± 2	980 ± 76	67
Testosterona	(40 nM)	72 ± 44	73 ± 24	1
Cortisol	(30 nM)	16 ± 3	27 ± 10	1,7
Aldosterona	(10 nM)	3,6 ± 0,6	5,8 ± 0,8	1,6
Melatonina	(60 nM)	11 ± 2	10 ± 2	1,1

Els experiments de *uptake* s'han realitzat a les concentracions de substrat indicades durant 30 min a 25°C. Els valors representen les mitges ± S.D. de 8-12 determinacions; (conc.), concentracions.

7,5, per un període de 30 min, tot plegat en les condicions descrites a materials i mètodes.

La captació i transport (en les concentracions indicades) dels següents substrats: E₂17βG, DHEAS, PGE₂ i E3S, va resultar considerablement superior en els oòcits injectats amb el cRNA que en els injectats amb H₂O, mentre que amb la resta de substrats testats (*testosterona*, *aldosterona*, *melatonina*, *cortisol*) les diferències van ser mínimes o nul·les.

D'acord amb aquests resultats, l'expressió del transportador murí *Oatp1* facilitaria la captació dels conjugats esteroidals aniònics *estradiol-17β-glucurònid* (E₂17βG) i del sulfat de *dihidroepiandrosterona* (DHEAS), en addició al sulfat d'estrone (E3S), prèviament reportat ([240]). En contrast amb aquests substrats àvidament incorporats dins l'oòcit injectat amb *Oatp1*, els esteroides neutres sense conjuguar, com la *testosterona* i el *cortisol*, o l'hormona pineal indòlica *melatonina*, no son transportats significativament. Pel que respecta al eicosanoide *prostaglandina E₂* (PGE₂), que no és substrat de

TAULA XVIII. Comparació de les K_m aparents (μM) entre Oatp1 de ratolí i de rata, per varis substrats seleccionats, determinades en oòcits de *Xenopus laevis*

Substrat	Oatp1 (ratolí)	Oatp1 (rata)
Taurocolat	12 [240]	50 [143]
E ₃ S	5 [240]	4,5 [268]
DHEAS	8 ¹	5 [269]
E ₂ 17 β G	4,9 ¹	3 [268]

¹Valors determinats en aquest treball

l'Oatp1 de rata [191], s'observa que el seu transport es 10 vegades superior que en els oòcits control.

Si bé les propietats de transport entre l'Oatp1 de rata i el de ratolí són força similars (veure *taula XVIII*), unit al fet que ambdós accepten com a substrat al *gadoxetat* –no transportat per els altres membres de la família en rata–, llur característiques d'especificitat i afinitat no són completament extrapolables (notar les diferències de K_m aparent entre els dos pel substrat *taurocolat*, –*taula XVIII*– o el

cas esmentat del transport diferencial de la *PGE₂*). Aquestes inconsistències poden advertir-nos de que, tot i ser possiblement gens ortòlegs, no comparteixin el 100% de substrats i que hagin desenvolupat o s'hagin adaptat funcionalment de manera matitzadament diferent en les dues espècies de rosegadors.

La caracterització funcional va prosseguir pels substrats *E₂17 β G*, *DHEAS* i *PGE₂*, pels quals es va seguir el comportament de la seva captació al llarg del temps (en un període de 30 min), trobant-que pels tres casos a concentracions baixes de substrat, l' *uptake* s'incrementava paulatinament seguint un comportament lineal. Pel *E₂17 β G* i la *DHEAS*, també es va enregistrar a concentracions elevades de substrat, observant-se un comportament similar, sense arribar-se a la saturació en aquell interval de temps considerat (veure *figura 60 corresponent*). Constatat el fet que durant els primers 30 min –i per les concentracions indicades– el transport inicial dels dos substrats anteriors no es saturava, es va passar a

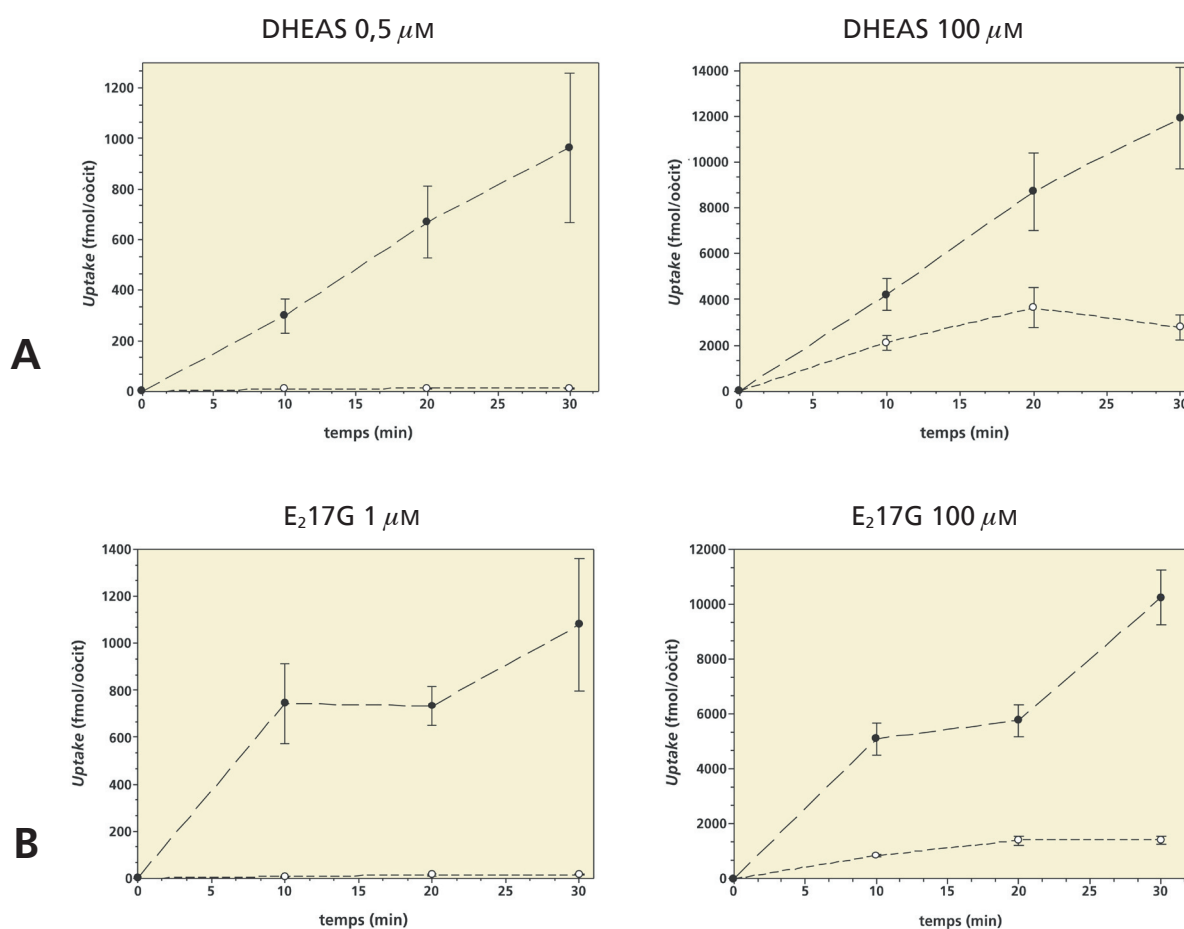


FIG 60. (Continua a la pàg. següent).

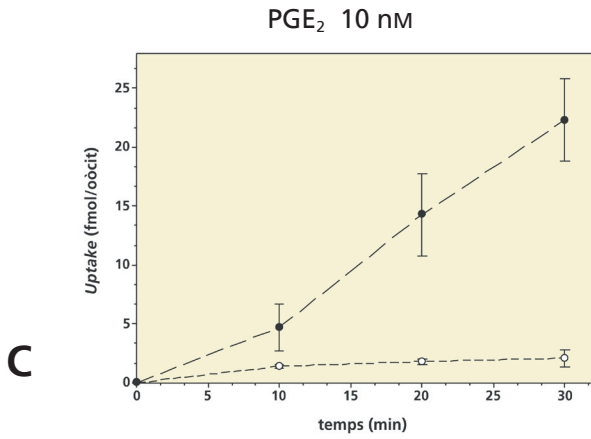


FIG 60. (Continuació). Cinètica temporal (*time-course*) per varis substrats de Oatp1. *Time-course* del transport de diferents substrats en oòcits de *Xenopus* injectats amb H₂O (○) o cRNA d'oatp1 (●), a les concentracions indicades; substrats: DHEAS (A), E₂17G (B) i PGE₂ (C)

realitzar un estudi cinètic del transport dels dos conjugats hormonals mediat per l' Oatp1 murí.

Finalment, a la *figura 61* es descriu gràficament la captació saturable dependent de la concentració de E₂17βG i de DHEAS, mediada per Oatp1; ambdues corbes exhibeixen un comportament michaelià amb unes constants K_m aparents respectives de ~4,9 μM i ~8,2 μM.

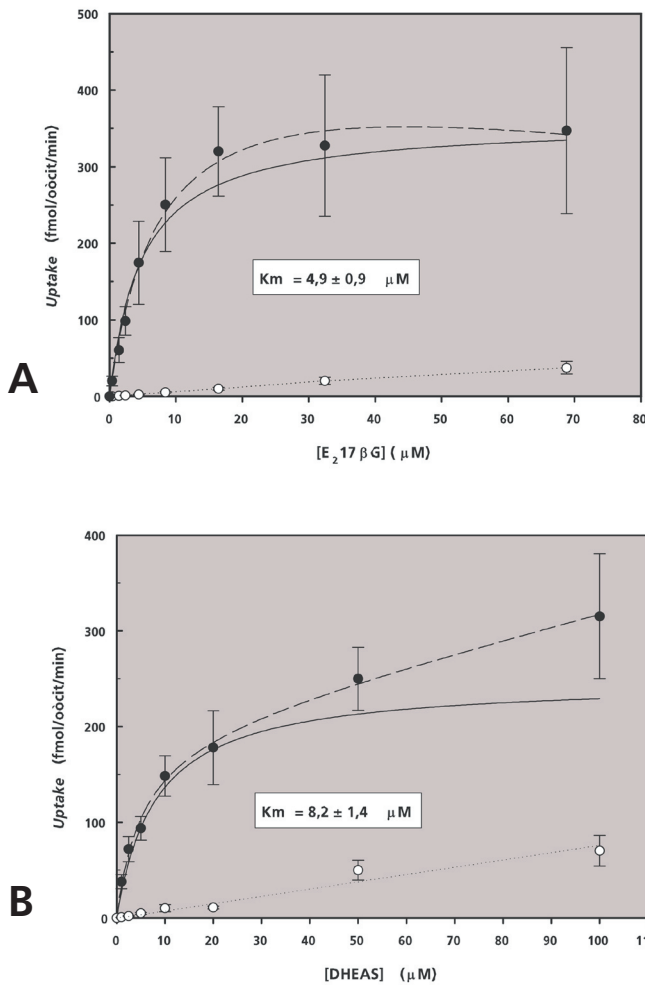


FIG 61. Cinètiques del transport de E₂17βG (A) i de DHEAS (B) mediat per Oatp1 en oòcits de *X. laevis*. Anàlisi cinètic del transport independent de Na⁺ per part de l'oatp1 de ratolí, dels substrats indicats. Els experiments d' *uptake* inicial (30 min), van ser realitzats amb oòcits injectats amb H₂O (○) o injectats amb el cRNA de Oatp1 murí (●), en presència de concentracions creixents dels substrats triats. Cada punt de individual de la gràfica, representa la mitja ± S.D. de 8-12 determinacions. La Línia contínua representa l'*uptake* específic un cop feta la subtracció dels valors corresponents als oòcits control. S'indiquen les constants de Michaelis-Menten aparents (K_m) per cada substrat, estimades a partir de la regressió no-lineal