

DISCUSSIÓ

El nostre laboratori ha estat interessat tradicionalment en l'estudi dels mecanismes de regulació androgènica en el ronyó.

Un dels gens regulats per andrògens i d'expressió pràcticament exclusiva de túbul renal, és el gen que codifica per a la *Kidney androgen regulated protein* (KAP), és un dels gens d'expressió renal més abundant en ratolins mascles (Toole *et al.*, 1979; Takenaka *et al.*, 1998) i el que ha estat estudiat amb més profunditat en el nostre laboratori (Solé *et al.*, 1994; Solé *et al.*, 1996; Ouar *et al.*, 1998; Cebrián *et al.*, 2001; Soler *et al.*, 2002). Existeixen però, altres gens regulats pels andrògens a ronyó de ratolí com l'*Odc* (Ornitina descarboxilasa) o l'*Adh-1* (alcohol deshidrogenasa-1), entre d'altres (Berger *et al.*, 1989), tal com s'explica en la introducció; malgrat tot això es desconeix gran part dels mecanismes moleculars involucrats en aquesta regulació específica així com el seu significat fisiològic.

En el nostre laboratori es va iniciar un projecte amb l'objectiu d'obtenir nous models gènics de regulació androgènica al ronyó utilitzant dos tècniques complementàries la RAP-PCR (*Random Arbitrarily Primed*) i la RDA (*Representational Difference Analysis of cDNA*). En aquests experiments es va analitzar mRNA de ronyó obtingut a partir de ratolins femella C57BL/6 control i ratolins femella de la mateixa soca tractades amb Dihidrotestosterona (DHT) durant 8 dies. Amb les dues tècniques es van obtenir una sèrie de fragments de cDNA d'intensitats diferents entre les dues situacions abans esmentades, que van ser clonats i seqüenciats.

Entre aquests fragments identificats es van trobar la KAP, la gp130 (*Interleukin-6 signal transductor*), la testosterona 16- α -hidroxilasa, un fragment homòleg al transportador d'anions orgànics (Oatp-1) de rata, la citocrom P450 4b1 i un fragment de cDNA amb una seqüència sense cap homòleg a les bases de dades de l'època, al qual s'anomenà MJAM però que més tard es va identificar com Oatp-D (Isern *et al.*, 2001). Per últim, es va obtenir dos fragments de cDNA de 148 i 67 nt amb homologia amb el gen S_A humà i de rata. El gen S_A s'havia relacionat amb la hipertensió en rates i humans (veure INTRODUCCIÓ), el fet d'observar que el gen S_A de ratolí estava regulat per andrògens ens va suggerir una possible relació funcional entre els andrògens, la hipertensió i el gen S_A . Es va clonar el cDNA complet del gen S_A murí i es va aprofundir en l'estudi de la seva regulació androgènica i la seva possible relació amb la hipertensió. El gen de l'angiotensinògen era l'únic gen relacionat amb hipertensió i, sota control androgènic en el túbul proximal de ronyó de rata, per tant el gen S_A representava un nou i interessant model d'estudi per relacionar andrògens, túbul proximal i hipertensió. Per aquest propòsit es va produir un model d'hipertensió mitjançant l'administració del L-NNA a rates i ratolins i, es va estudiar els efectes que exercien els andrògens i la hipertensió, sobre l'expressió del gen S_A de ratolí i rata. Els resultats obtinguts amb aquest sistema van ser poc informatius i a més força contradictoris, tant en ratolins com en rates. Publicacions posteriors van excloure definitivament el gen S_A com a responsable de l'hipertensió (Hübner *et al.*, 1999; St Lezin *et al.*, 2000; Clemitson *et al.*, 2002), per tant el camí a seguir en l'estudi de la regulació en l'expressió del gen S_A es va redirigir en la determinació de l'especificitat en la resposta androgènica així com en la recerca dels mecanismes implicats en l'expressió del gen S_A murí. Els resultats més rellevants obtinguts en el treball anterior es troben en la introducció; la continuació del treball realitzat és la base d'aquesta tesi doctoral, objectius de la qual es troben exposats en la pàgina 69.

Expressió del gen S_A en altres teixits de ratolí i la seva regulació per les hormones sexuals.

Tradicionalment els treballs realitzats en rata han mostrat que el gen S_A s'expressa fonamentalment a ronyó i fetge (Yang *et al*, 1996) localitzat més tard en el cervell i el testicle. En el ronyó s'expressa en el túbul proximal renal de manera específica en la part convoluta en les rates de la soca SD, al llarg de tot el túbul en les SHR i tant sols en la parts recta en les WKY (Yang *et al*, 1996). En canvi, no es coneix pràcticament res de la regulació gènica del gen S_A de rata, ja que tots els estudis s'han centrat en esbrinar si el S_A podria estar involucrat en el control de la pressió arterial, mitjançant estudis de cosegregació i recerca de polimorfismes.

El gen S_A murí presenta una expressió diferencial entre mascles i femelles. En femelles i mascles castrats el gen no s'expressa, en canvi, en presència de dosis farmacològiques de DHT, els nivells de mRNA apareixen i es recuperen en femelles i mascles castrats respectivament. Encara que inicialment s'havia localitzat exclusivament en el ronyó i més concretament en el túbul proximal renal, els nostres resultats indiquen que el gen S_A també s'expressa de forma important en el fetge, essent detectable per Northern-blot. La tècnica de la RT-PCR Southern també ens ha permès detectar el gen S_A en l'estómac, el testicle, el pulmó, el cor i de manera molt feble en la glàndula prepucial. La regulació andrògena no tant sols es dona en el ronyó sinó que l'absència de testosterona disminueix l'expressió del gen en pulmó i cor.

En el fetge però, el gen S_A està fora del control hormonal, l'administració de dosis farmacològiques de DHT i estrògens no produeix cap canvi en l'expressió del seu mRNA. En canvi al ronyó l'augment significatiu que es dona en presència de DHT és inhibit per la presència d'estrògens; efecte que s'observa tant a dosis fisiològiques com farmacològiques de l'hormona. Aquest comportament del gen S_A no representa un cas aïllat doncs, s'han descrit dos gens d'expressió renal regulats per ambdues hormones sexuals amb efectes antagonics, són l'OAT1 i el CYP2J5. L'OAT1 és un transportador renal de la p-aminohippurat, s'expressa molt més en els túbuls corticals de rates mascle que de femelles, la castració disminueix significativament la seva expressió recuperant-se en presència de testosterona i inhibint-se en presència d'E₂ (Ljubojevic *et al*, 2004); el CYP2J5 és molt abundant en ronyó i està involucrat en el metabolisme de l'àcid araquidònic. Després de la pubertat CYP2J5 es troba molt més expressat en ratolins mascles que en femelles, la castració disminueix la seva expressió; el tractament amb DHT de ratolins mascle castrats i femelles augmenta l'expressió del gen fins als nivells normals d'expressió, el tractament amb E₂ disminueix de manera espectacular l'expressió del gen tant en ratolins mascle castrats com en femelles ovariectomitzades (Ma *et al*, 2004). No existeix però en la literatura, gens acil-CoA sintetasa regulats per les hormones sexuals. S'ha identificat una LACS (*long-chain acyl-CoA synthetase*) de rata regulada positivament per la gonadotropina i negativament per la LH (hormona luteinizant) en les cèl·lules de Leidig (Tang *et al*, 2001)

Està ampliament descrit que el ronyó és un òrgan diana pels andrògens, però estudis recents han demostrat que els estrògens també exerceixen una acció sobre el ronyó. En un ratolí transgènic que porta un gen reportador com la luciferasa sota control de tres EREs (*estrogen-response elements*) acoplats a una TATA *box* s'ha observat que de tots els teixits testats en presència d'estrògens l'òs i el ronyó presenten màxima activitat luciferasa, essent signifi-

cativa en el fetge, el testicle, el cervell, la pròstata, el còlon i la pituitària (Lemmen *et al*, 2004). Uns altres autors van realitzar un *microarray* a partir de mRNA obtingut de ratolins femella wt i ER β KO, ovariectomitzades i tractades amb estrògens durant sis setmanes, el ronyó va ser un dels òrgans amb més afectació pels estrògens ja que van trobar 26 gens induïts pels estrògens i 4 reprimits per l'hormona, a diferència del fetge on van trobar 2 gens induïts per l'estrògen. L'acció induïda pels estrògens es dona a través l'ER α mitjançant un acció específica gen-dependent, ja que l'acció del receptor a través del seu mecanisme AF1 o AF2 varia segons el gen i és teixit-específica, es postula que hi juguen un paper important en aquest fenomen els diferents coactivadors (Jelinsky *et al*, 2003).

Estudis recents han demostrat que existeixen interaccions entre els receptors d'androgen i estrogen alpha (AR i ER α respectivament), la interacció del domini LBD del ER α amb la regió N-terminal del AR es tradueix en una disminució en l'activitat transcripcional del AR (Panet-Raymond *et al*, 2000); els efectes oposats entre les dues hormones també es produeix en els preadipòcits de rata, ja que els andrògens exerceixen un efecte anti-adipogènic al contrari dels estrògens que esdevé un factor pro-adipogènic a través de PPAR γ (Dieudonne *et al*, 2000).

És òbvia l'extrema complexitat en la regulació gènica exercida per les hormones sexuals sobre els seus gens diana, essent el ronyó un dels òrgans diana amb un claríssim dimorfisme sexual tan morfològic com fisiològic, encarregat del manteniment de l'homeòstasi metabòlica en funció de les necessitats d'ambdós sexes. Caldria realitzar però, més estudis per esbrinar quins són els mecanismes concrets pels quals els andrògens i els estrògens exerceixen la seva acció antagonica sobre el gen S_A i determinar quina és la seva implicació fisiològica.

En femelles, l'expressió del gen S_A obtinguda per la tècnica del Northern-blot és nul·la en un ampli ventall de teixits, s'indueix però en presència de DHT en el ronyó (Melià *et al*, 1998). L'absència però, dels estrògens mitjançant ovariectomia, no permet l'expressió del gen S_A en ratolins femella indicant que l'expressió del gen no és constitutiva i reprimida per estrògens en femelles sinó induïda per andrògens en el ronyó de ratolins mascles. És necessària, però, una tècnica més sensible per veure expressió de S_A en femelles, ja que en el nostre laboratori hem pogut amplificar el gen S_A tant en el ronyó com en el fetge de ratolins femella mitjançant una RT-PCR (dades no mostrades); per tat no és descartable que el gen S_A pogués està influenciat pels estrògens en el ronyó de ratolins femella.

Està clar que el gen S_A en tots dos òrgans -ronyó i fetge- segueix un patró de regulació hormonal molt diferent; a més el fet que tant la proteïna com el mRNA del S_A segueixin el mateix patró de regulació hormonal en el ronyó murí, suggereix que les diferències d'expressió renal entre sexes i situacions hormonals es donen principalment a nivell transcripcional a ronyó. Els anticossos produïts en el nostre laboratori contra pèptids específics de la proteïna S_A deduïda, no ens permeten visualitzar la proteïna en el fetge i per tant no podem saber si a nivell de proteïna, la S_A en fetge podria estar influenciada per l'acció hormonal.

La regulació androgènica exercida sobre el gen S_A en el ronyó de ratolins mascle no és soca dependent ja que hem pogut veure que en varies soques murines, la castració inhibeix l'expressió del gen. Aquesta acció androgènica no és exclusiva dels ratolins, ja que en ronyons de rates SD (*Sprague Dawley*) castrades, l'expressió del gen S_A també disminueix, encara que no desapareix, com es dona en ratolins (Resultats de la tesi doctoral de la Dra. M^a Jesús Melià). Es desconeix però, si això es pot donar en humans tot i que també s'expressa en el ronyó

(Samani *et al*, 1994).

Clonatge del gen S_A i inici de la transcripció

El gen S_A murí presenta una mida de 23Kb i consta de 16 exons i 15 introns. La mida dels exons varia des de 69 a 616pb, es troba localitzat en el cromosoma 7 de ratolí entre els gens Umod i ZP2 i, coincideix amb les regions sintèniques dels cromosomes 1 i 16 de rata i humà respectivament, també localitzats entre els gens Umod i ZP2. Molt a prop del gen S_A hi trobem gens que codifiquen per altres enzims acil-CoA sintetasa per a àcids grassos de cadena mitja. En el cromosoma 16 humà hi trobem l'HXMA (*xenobiotic/medium chain acyl-CoA sintetasa*), la Bucs1 (*Butiril-CoA sintetase*); en el cromosoma 1 de rata hi trobem la KS (*kidney specific protein*), la MACS like (*medium-chain acyl-CoA syntehtase like*) i l'Omacs (*olfactory medium-chain acyl-CoA syntehtase*) i, en el cromosoma 7 de ratolí hi trobem el Bucs1 i una MACS1 amb una elevada homologia amb la proteïna S_A, suggerint un possible origen comú, posterior duplicació i evolució.

A diferència del gen S_A murí, els gens S_A de rata i humà contenen 15 i 13 exons, respectivament. És interessant ressaltar que la diferència més important coneguda fins ara radica en la regió 5' ja que el gen S_A murí conté tres exons no codificants, el gen S_A de rata en conté dos i en el gen humà, no n'hi ha cap. L'ATG es troba en els exons 4, 3 i 1 en el gens S_A de ratolí, rata i humà, respectivament. També varia la mida dels introns, sobretot en el gen humà.

L'exò 1 del gen de rata coincideix amb les 65 pb més 3' de l'exò 1 de ratolí, l'exò 2 del gen de ratolí desapareix en el gen de rata. Amb les tècniques utilitzades per resoldre la regió 5' del gen S_A murí, descrites en l'apartat RESULTATS hem observat que el transcrit que conté l'exò 2 és el menys representat. En el gen S_A humà no hi trobem exons no codificants en 5' ni tampoc un fragment 3'UTR en l'exò 13. Tots els exons codificants però, en les tres espècies presenten aproximadament la mateixa mida. En la figura 66 es representa el gen S_A de les tres espècies rata, ratolí i humana.

L'homologia que existeix entre el gen S_A de rata i ratolí és molt elevada fins i tot a nivell de seqüència intrònica, ja que presenten una homologia del 80-88% depenent de l'intrò. En canvi el gen S_A humà difereix molt del gen dels rosegadors, únicament són homòlegs els exons al voltant del 84%, divergint molt en les zones intròniques, tant en la mida com en

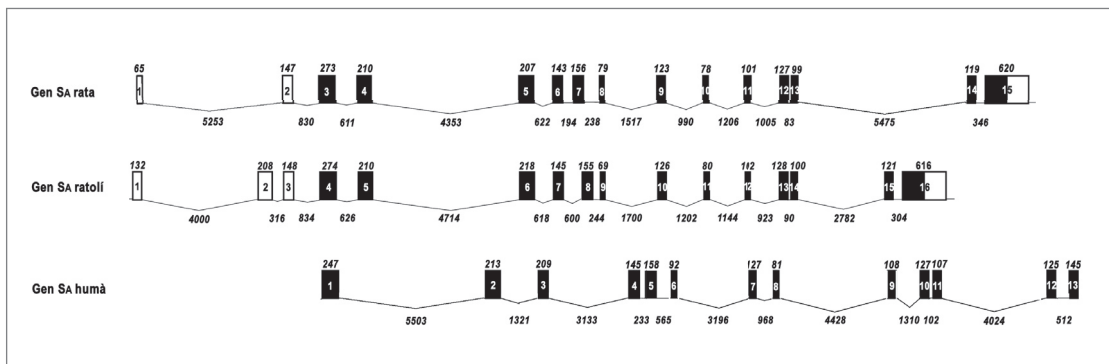


Fig.66. Representació esquemàtica del gen S_A de les tres espècies rata, ratolí i humana. Les caixes colorejades en negre de cada un dels gens pertanyen als exons codificants, les caixes en blanc pertanyen a la regió no codificant. En lletra cursiva s'indiquen les mides en nt dels exons (a sobre de cada caixa) i dels introns (sota les línies).

la seqüència.

Les diferents formes del mRNA del S_A murí podrien ser el resultat d'una regulació diferencial del gen, els estudis de funció promotora s'han realitzat amb la seqüència *upstream* a partir de l'exò 1, per tant no es descarta la possibilitat de l'existència d'altres elements reguladors localitzats entre el primer i el quart exò. Anteriorment es va descriure una acil-CoA sintetasa que conté tres exons no codificants en posició 5' precedits cada un d'ells d'un promotor que dirigeix l'expressió d'un o altre transcrit atribuït a aquest gen expressió diferencial de manera teixit-específica (Suzuki *et al*, 1995). Aquest fet però no és aïllat, existeixen un gran nombre de gens que contenen diverses regions reguladores en els seus gens que els hi confereixen un expressió diferencial, recentment s'ha descrit que el gen de l'acil-CoA sintetasa 6 de ratolí codifica per a varis transcrits amb una elevada heterogeneïtat en la regió 5', tot i que no han descrit la seva funció (Lee *et al*, 2005).

La importància de la regió 5' en aquests gens es desconeix, es podria per tant, hipotetitzar l'existència de diversos llocs en aquesta regió implicats en la regulació del gen, essent la causa de la diferència en l'expressió i regulació del gen en cada una de les espècies. Frantz *et al* van observar durant l'estudi de regulació del gen S_A en el ronyó de rates WKY que hi havien transcrits addicionals que no estaven presents ni en el ronyó ni en el fetge de les rates SHR, aquests transcrits presentaven repeticions en tandem de varis exons específics (Frantz *et al*, 1999). Mitjançant la tècnica de RT-PCR van obtenir dos transcrits, el transcrit A i el B que contenien l'exò 2 repetit en tandem i duplicacions dels exons 2-4, respectivament. El transcrit A no altera la pauta de lectura en canvi el transcrit B resulta en una proteïna truncada de 157 aminoàcids; el significat d'això es desconeix ja que no se sap quin paper fisiològic té la proteïna S_A . Els mateixos autors van veure a més que les cèl·lules que expressaven les noves isoformes de mRNA de S_A en el ronyó de les rates WKY no presentaven cap mena de reorganització en el gen del S_A , suggerint que podria tractar-se d'un procés postgenètic (Frantz *et al*, 1999).

La repetició en tandem d'exons en el mRNA es va descriure per primer cop en dos gens de rata la COT (*Carnitine octanoyl transferasa*) (Caudevilla *et al*, 1998) i el gen S_A (Frantz *et al*, 1999); estudis recents han demostrat que les repeticions exòniques d'ambdós gens es donen exclusivament en la soca WKY i no en la soca SHR, possiblement degudes a l'existència de factors *trans* o *cis-splicing* diferents, propis dels alels dels dos gens en cada soca. Aquesta propietat al·lèlica es va identificar com un polimorfisme d'un únic nucleòtid en l'exò 3 del gen S_A i, per tant donada per una acció *cis* (Rigatti *et al*, 2004). La implicació funcional d'aquest fenomen, però, es desconeix.

Nosaltres hem clonat varis transcrits per al gen S_A murí, l'organització dels quals ve donada per la combinació entre els exons 1 i 2 ja que l'exó 3 sempre hi és present, tant l'exó 1 com el 2 presenten dos llocs *intra-splicing* que a més confereixen la possibilitat d'obtenir altres transcrits; en cap cas però afecta a la pauta de lectura de la proteïna. No hem observat però, exons repetits en els transcrits resolts per RT-PCR. La repetició en tandem dels exons en el gen S_A de rata a més, és soca-específica, per tant caldrien més estudis per saber si aquest fenomen pot donar-se en altres soques de ratolí; tot i que podria ser un fenomen espècie-específica.

La importància funcional dels diferents transcrits en el gen S_A murí es desconeix tot i que faltaria saber si en el fragment del gen que compren de l'exó 1 al 4 no existeix cap regió reguladora que determini la presència d'un o altre transcrit com ja hem exposat anteriorment.

Està ampliamet descrit que la regió 5'UTR és molt important en la determinació i regulació de l'inici de traducció d'un mRNA, la seqüència 5' determina l'inici de la traducció oferint al ribosoma el codó AUG; la mida del 5'UTR, la posició i el contexte on es troba el codó d'inici, l'adició de l'estructura m7G cap i l'estructura adoptada per el mRNA representen els paràmetres crítics en la traducció del mRNA (Gray *et al*, 1998; Mignone *et al*, 2002; Wilkie *et al*, 2003), per tant no es pot descartar un mecanisme de regulació pretraduccional, a nivell de mRNA, donada la diversitat existent en el 5'UTR descrits per al gen S_A .

Del gen S_A humà no es coneix gaire cosa a part de la seqüència genòmica, els estudis realitzats fins ara s'han centrat en la localització de polimorfismes relacionats amb patologies com l'obesitat, la hipertensió i la hipolipidèmia (Iwai *et al*, 2002; Benjafield *et al*, 2003). S'han clonat varis transcrits per al gen S_A humà, la variant 1 (Gen Bank NM_005622) i la variant 2 (Gen Bank NM_202000 i BC002790) donant un parell de proteïnes truncades de les que es desconeix la seva implicació funcional, ja que fins ara no s'ha fet cap estudi al respecte. En el cromosoma 16 humà es poden localitzar dos gens S_A , on suposadament un d'ells correspondria a un pseudogen. El gen S_A dels rosegadors es de còpia única ja que tant sols hi trobem un únic gen en els cromosomes 1 i 7 de rata i ratolí, respectivament. (dades obtingudes amb el programa BLAST de les bases de dades, on hi trobem el genoma complet de cada una de les espècies).

Anàlisi del promotor del gen S_A

La resolució de l'exò 1 i per tant la determinació de l'inici de transcripció determinat per les tècniques de *primer extension*, 5'-RACE i RT-PCR ens va permetre obtenir l'inici de la putativa regió promotora del gen S_A de ratolí. En la posició -48 i -60 hem identificat dos possibles caixes TATA, (AATTAA) i (AATATAT), aquesta última flanquejant a una caixa de reconeixement per a Sp1. Utilitzant els programes TFSEARCH i MatInspector disponibles en les bases de dades s'han identificat possibles llocs d'unió a diferents factors, que inclouen C/EBP, GATA1 i 2, AP1, SRY i el SREBP entre d'altres. No està clar però quins d'aquests o d'altres encara per identificar jugarien un paper rellevant en la regulació transcripcional del gen S_A .

Quan es coloquen en front d'un gen reporter, el promotor S_A és capaç d'iniciar la transcripció gènica basal tant en cèl·lules renals, PR10, com en cèl·lules hepàtiques HepG2, els valors luciferasa però, són majors en les cèl·lules renals. El conjunt de fragments del promotor segueixen un patró d'activitat similar en ambdues línies cel·lulars essent la construcció -110 L_{uc} la que ofereix una activitat luciferasa màxima que disminueix amb només 72 pb de promotor tot i que també s'obté una inducció significativa. L'anàlisi seqüencial de les -72 pb de promotor revelen l'existència, a part de les dos possibles caixes TATA, d'un lloc GC-box d'unió a Sp1, situat en posició -60.

El Sp1 és un factor de transcripció ubiqüo típic de la família dels factors *Cys2His2 zinc finger*. Alguns promotors de gens codificants per a proteïnes mitocondrials presenten varies caixes GC funcionals. En molts casos la unió del Sp1 a aquests gens és necessària per una inducció transcripcional significativa (Nelson *et al*, 1995; Zaid *et al*, 1999) a més, l'expressió d'aquests gens no està estrictament relacionada amb el nombre o localització de llocs Sp1

(Zaid *et al*, 1999). Tot i així, el paper de Sp1 en l'adaptació del contingut proteic mitocondrial d'una cèl·lula segons les condicions fisiològiques, encara està per dilucidar.

Els elements mínims necessaris per dirigir *in vitro* l'expressió basal del gen S_A murí es troben en el fragment de 110 nucleòtids em ambdues línies cel·lulars PR10 i HepG2, quan afegim 100 nucleòtids més de promotor (-210 L_{uc}), l'expressió basal disminueix a nivells inclús inferiors al fragment de -72, indicant que hi podria haver algun tipus de represor; els nivells de transcripció es mantenen més o menys uniformes fins al nucleòtid -639, efecte que es dona molt més accentuat en les cèl·lules renals, perquè en les cèl·lules hepàtiques el fragment -331 L_{uc} és capaç de superar aquesta inhibició mantenint-se fins al nucleòtid -639. Això suggereix que en les cèl·lules HepG2 existeix algun factor que reconeix aquest fragment de promotor capaç d'anul·lar la repressió exercida sobre la transcripció, factor que en principi o no es troba en les cèl·lules PR10 o no es donen les condicions adequades per a que es dongui aquesta interacció amb el promotor. Existeixen varis factors de transcripció reconeguts pels programes de rescua en el fragment de -331 L_{uc} , entre els que destaquem l'AP-1, GATA-1 i 2 i un lloc d'unió al receptor de la vitamina D (VDR), és molt difícil hipotetitzar quin d'aquests factors o d'altres, podrien donar una resposta teixit-específica en el gen S_A de ratolí, ja que estan relacionats amb l'activació o inhibició de quantitat de gens d'expressió en un ampli ventall de teixits; per tant s'haurien de realitzar molts més estudis.

Un altre punt destacable es troba en el fragment -747 L_{uc} , ja que es produeix una nova disminució en l'activitat transcripcional del promotor en ambdues línies cel·lulars; és en aquest fragment on hi trobem la putativa caixa SREBP. Tot i que hem demostrat per la tècnica de *Band Shift* que no és reconeguda per la proteïna SREBP1c; sí que és específica per algun factor de transcripció present en un extracte nuclear de ronyó i de fetge. No es descarta però que es tractés d'un altre subtipus de SREBP com l'1a, o el SREBP2. Tot i que està demostrat que tots ells són capaços de reconèixer la mateixa seqüència (Ammemiya-Kudo *et al*, 2002; Zeng *et al*, 2004), petites variacions en la seqüència consens, podria comportar l'especificitat per diferents factors de la mateixa família.

La seqüència analitzada per *band shift* conté una caixa *E-box* que també podria ser reconeguda per altres factors de transcripció com per exemple l'USF (*Upstream stimulatory factor*). Aquest factor de transcripció d'expressió ubiqua està relacionat amb el metabolisme lipídic ja que s'ha descrit la seva acció sobre una *fatty acid synthase* (FAS), enzim clau en la via lipogènica. També s'ha descrit que la unió del factor USF-1 a la caixa E-box és necessària per la inducció mediada per la insulina en el gen FAS (Sul *et al*, 2000).

Quan s'ha evaluat la resposta androgènica per part del promotor S_A , les induccions detectades han estat bastant discretes en tots els fragments testats menys en el -496 L_{uc} . S'han assolit induccions de x4.5 vegades respecte a l'absència del receptor i l'hormona, el control positiu quimèric 1XARECyp98Luc (Isern *et al*, 2003) dona una resposta de x10 vegades. Això pot estar relacionat amb l'absència dels factors necessaris per la inducció del gen S_A en aquestes cèl·lules, tot i que la línia cel·lular PR10 s'ha descrit com a model vàlid per l'estudi de la regulació androgènica (Soler *et al*, 2002). L'activitat transcripcional del fragment -496 L_{uc} en front als andrògens en les línies cel·lulars CV-1 i HepG2, que han estat descrites com a bons models de resposta androgènica (Barbulescu *et al*, 2001; Hartig *et al*, 2002; Cho *et al*, 1997), podem veure que el valor màxim obtingut pel -496 L_{uc} en presència del AR i la DHT es troba en la línia cel·lular renal CV-1, en canvi la línia hepàtica HepG2 tot i que respon molt be als

La proteïna S_A

Des que es va clonar per primer cop el cDNA de S_A de rata (Iwai *et al*, 1991) es va observar que la corresponent proteïna S_A deduïda presentava homologia amb les acil-CoA sintetases (ACS). La comparació aminoacídica de múltiples proteïnes ACS, tant de procariotes com d'eucariotes, entre les que s'inclou la proteïna S_A de rata, ratolí i humana, han revelat l'existència de 8 dominis molt conservats entre elles, localitzats des del centre de les proteïnes fins a la regió C-terminal, aquestes regions podrien jugar un paper en l'activitat enzimàtica o formar part del lloc catalític de les proteïnes (Karan *et al*, 2001). Els mateixos autors van veure mitjançant un estudi filogenètic, que la S_A estava més estretament relacionada amb les ACS procaritotes que les eucariotes, aquestes similituts es van interpretar com l'existència d'un ancestre comú en els procariotes. La identificació de set dels dominis conservats suggerien d'una manera clara que l'origen dels gens eucariotes ACS, entre els que trobem els S_A de les tres espècies, era mitocondrial i en última instància d'un origen procariota, tenint en compte que les mitocondries provenen dels procariotes (Karan *et al*, 2001).

Els àcids grassos han de ser "activats" formant els CoA tioesters abans de participar en les diferents reaccions catabòliques o anabòliques. Aquesta activació està catalitzada per les acil-CoA sintetases, també anomenades *acid:CoA ligases (AMP-forming)* (EC 6.3.1.x). Les acil-CoA sintetases es classifiquen en funció de la mida de les cadenes hidrocarbonades dels àcids grassos que reconeixen. Durant l'última dècada s'ha revelat que existeix més d'un enzim diferent per a un tipus de mida d'àcid gras. Per exemple s'han descrit set membres de VLCS (*very long-chain acyl-CoA synthetase*) en humans (Watkins *et al*, 1999), i cinc membres de LCS (*long chain acyl-CoA synthetase*) en rates (Suzuki *et al*, 1990; Fujino *et al*, 1992; Fujino *et al*, 1996; Kang *et al*, 1997; Oikawa *et al*, 1998).

Un tret unificador entre aquests enzims és el domini d'unio a AMP (PROSITE PS00455) present en tots els enzims ACS, aquest domini altament conservat consisteix en un motiu de 10-12 aminoàcids descrit per primer cop fa aproximadament una mica més d'una dècada (Babbitt *et al*, 1992).

Com ja s'ha comentat existeixen però altres dominis conservats entre les diferents ACS, alguns autors però han proposat que existeix un domini d'uns 22 aminoàcids comú en tots el enzims ACS però amb petits trets diferenciadors entre els diversos membres que determina l'especificitat de reconeixement en la mida dels àcids grassos (Steinberg *et al*, 2000). Aquests mateixos autors postulen per estudis d'homologia amb la única proteïna identificada fins a les hores com a MACS (*medium-chain acyl-CoA synthetase*), la *Xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase from XL-III* de vedella (Vessey *et al*, 1997), que les proteïnes S_A (rata, ratolí, humana), la KS (*kidney specific protein*) de rata i una proteïna humana identificada com a "human unknown protein" pertanyien a la família de les MACS (Steinberg *et al*, 2000).

La proteïna S_A s'ha identificat definitivament com una MACS (*fatty acid medium-chain acyl-CoA synthetase*) localitzada en la matriu mitocondrial (Fujino *et al*, 2001). S'han identificat dos substractes específics per a la proteïna S_A, un és l'àcid isobutirat amb una Km de 0.05mM, activitat enzimàtica que requereix CoA i l'hidròlisi de l'ATP per formar AMP (Fujino *et al*, 2001), estudis d'incorporació d'àcids grassos marcats amb ¹⁴C suggereixen que el S_A juga un paper en la degradació dels àcids grassos de cadena mitja amb la finalitat de produir energia, ja que el ¹⁴C s'incorpora al CO₂ i no als lípids (Fujino *et al*, 2001). L'àcid octanòic és el segon compost

identificat com a substracte de la proteïna S_A (Iwai *et al*, 2002). Aquests mateixos resultats hem obtingut amb els nostres experiments, ja que en les cèl·lules PR10 transfectades amb el constructe S_A-FLAG i incubades amb àcid octanoic marcat amb ¹⁴C, s'ha produït un augment de l'incorporació del ¹⁴C en el CO₂ i no en els triglicèrids.

Morszeck *et al* van postular l'existència d'un nou motiu, anomenat domini M, que podria estar involucrat en definir l'especificitat de l'ACS pels àcids grassos de cadena mitja, van trobar similituds molt elevades entre el domini M de la proteïna Mig (*macrophag-induced gene*) identificada com una MACS amb altres enzims acil-CoA sintetasa per als àcids grassos de cadena mitja. Aquest domini es troba menys conservat en les LCS (Morszeck *et al*, 2001).

Nosaltres hem intentat identificar aquest domini M, en la proteïna SA, mitjançant un estudi computacional. La zona de la proteïna comprés de l'aminoàcid 454 al 488 és el que presenta una elevada homologia amb altres dominis M de diverses ACS, alguns identificats com a tals i d'altres no. Els estudis de mutació realitzats en la proteïna S_A han mostrat que dels sis aminoàcids estudiats, la glicina en posició 463 és fonamental doncs, la seva substitució per una alanina anul·la totalment l'activitat enzimàtica. Estudis mutacionals realitzats en una proteïna *fatty acyl-CoA synthetase* d'*E. coli* (ECACS), la substitució d'algun dels aminoàcids que comprenen el domini d'unió als àcids grassos o *FACS signature motif*, per una alanina, produïen varis efectes sobre l'activitat enzimàtica, augmentant o disminuint l'afinitat per diferents substractes o inhibint-la (Black *et al*, 1997). La regió C-terminal de tots els enzims acil-CoA sintetasa presenten una elevada homologia; en aquesta zona hi trobem la seqüència d'aminoàcids que formen els dominis FACS o M segons es tracti d'un acil-CoA sintetasa per àcids grassos de cadena llarga o mitja, respectivament. El *FACS signature motif* conté 25 aminoàcids (que numerarem de l'1-25) i el domini M de 35 aminoàcids (numerats de l'1-35) els dos dominis es troben en la mateixa regió C-terminal en cada un dels enzims de la família coincidint els primers 19 aminoàcids del domini M amb els 19 últims del domini FACS, tal com es representa en la figura 68.

ECAS (FACSmotif)	431	NGWLHT GD IAVM DEEG FLRIVDRKK	455
SA (domini M)	454	GDRGYMDE D GYFWFVARSDDIILSSGYRIGPFEVE	488

Fig.68. Comparació entre el motiu FACS i el domini M. El motiu FACS pertany a la proteïna ECACS (*Fatty Acyl-CoA synthetase* de *E.coli*) i el domini M pertany a la proteïna S_A murina, amb un asterisc s'indica la glicina 463. Ambdues seqüències presenten homologies molt elevades en tots els enzims acil-CoA sintetasa.

La glicina en posició 10 i 16, en el domini M i FACS, respectivament, es troba en tots els membres de la família de les *fatty acyl-CoA synthetases* independentment de la preferència de substracte, la mutació d'aquesta glicina provoca la inactivació completa de l'activitat enzimàtica de la proteïna ECACS (Black *et al*, 1997), es postula que aquesta glicina participa en l'estructura de la proteïna mantenint l'àcid gras unit a la butxaca catalítica. En la proteïna S_A aquesta glicina és la que es troba en posició 463, la mutació de la qual inactiva la proteïna.

La proteïna S_A s'ha identificat en altres espècies de mamífer que no són les clàssiques (rata, ratolí i humana), com l'orangutà i el gos. Com era d'esperar la proteïna S_A de l'orangutà presenta una major homologia amb la proteïna S_A humana que amb la dels rosegadors. La proteïna S_A en les quatre espècies presenta una senyal de translocació a

mitocòndria en posició N-terminal, aquest pèptid senyal, d'uns 30 aminoàcids, és hidrolitzat un cop la proteïna es troba en la mitocòndria o durant el seu transport; el pes molecular de la proteïna deduïda del cDNA és de 65.5kD en canvi en un western-blot presenta una mida de 62kD, degut a que la proteïna madura no presenta el pèptid senyal (Fujino *et al*, 2001). Aquest fet però, és propi en els proteïnes de localització mitocondrial; el pèptid senyal de translocació a mitocòndria presenta una estructura específica que es reconeguda per chaperones citosòliques encarregades de conduir la proteïna fins als receptors i translocadors situats en la superfície de la membrana externa de la mitocòndria (Pfanner *et al*, 1997; Endo *et al*, 2002; Pfanner *et al*, 2002). El pèptid senyal mitocondrial, pot estar situat en posició N-terminal o en una zona central de la proteïna, està descrit que aquest fenomen indica la localització específica de la proteïna dins la mitocòndria (Pfanner *et al*, 2002); el pèptid senyal en posició N-terminal és típic de proteïnes de la matriu mitocondrial, com és el cas de la proteïna S_A.

La seqüència peptídica presenta varis aminoàcids de càrrega positiva que li confereixen una estructura tridimensional particular, concretament una α -helix amfipàtica, on els residus amb càrrega positiva són alineats en un cantó de l'helix, mentre que els residus hidrofòbics sense càrrega es troben alineats de manera oposada en la mateixa hèlix, el conjunt confereix l'estructura reconeguda per a les proteïnes chaperones i els receptors de la membrana mitocondrial. Si intentem reproduir l'estructura helix amb el pèptid senyal de la proteïna S_A veiem que més o menys adquireix la forma descrita, pròpia del pèptid senyal mitocondrial, aquesta estructura hipotètica es representa en la figura 69.



Fig.69. Representació hipotètica de l'estructura alpha-helix del pèptid senyal de la proteïna S_A murina. En vermell es representen els aminoàcids de càrrega positiva, els aminoàcids apolars es representen en groc.

Hem observat que la presència d'una proteïna relativament gran com la GFP en posició N-terminal en la proteïna S_A, impedeix la seva translocació a mitocòndria, això podria ser degut a que la GFP impedeix la formació de l'estructura tridimensional del pèptid senyal, impossibilitant la unió a les proteïnes chaperones; una altra possibilitat seria que la GFP pot estar obstaculitzant la unió de la proteïna als receptors de la membrana externa de la mitocòndria per ser translocada. És necessari per la translocació de la proteïna a la mitocòndria que el precursor estigui en una conformació no plegada facilitat per les chaperones citosòliques, la presència de la seqüència N-terminal en les proteïnes recent sintetitzades podria prevenir el seu plegament i prolongar l'associació de la proteïna a la chaperona (Lain *et al*, 1995), aquest

fet podria estar impedit per la presència de la GFP en posició N-terminal.

Hem demostrat mitjançant l'assaig de marcatge metabòlic que la proteïna S_A té una vida mitja intracel·lular de més de 26 hores. S'ha de dir però, que els assajos de marcartge metabòlic s'han realitzat mitjançant transfecció transitòria de S_A en la línia cel·lular renal PCT3. Aquestes cèl·lules, tot i que presenten les característiques pròpies de cèl·lula epitelial proximal renal, podrien manca de factors específics que condicionessin la traducció i el processament de la S_A endògena al ronyó. Igualment, la sobre-expressió de la proteïna en el model cel·lular pot alterar significativament el processament normal de la mateixa.

Regulació del gen S_A pels receptors PPAR

Existeixen molts aspectes relacionats de manera directa o indirecta amb el metabolisme dels àcids grassos així com del contingut o homeòstasi intracel·lular dels lípids que estan subjectes al control transcripcional per la família dels PPAR. Molts gens amb un paper crucial en el metabolisme dels àcids grassos presenten un element de resposta als PPAR (PPRE) en les seves seqüències reguladores (Geneviève *et al*, 1997). Alguns dels PPRE més ben caracteritzats corresponen a gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos com el gen que codifica per la MCAD (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*) (Gulick *et al*, 1994) o els gens implicats en la β -oxidació peroxisomal com el gen *Acyl-CoA oxidase* (ACO) (Dreyer *et al*, 1993; Tugwood *et al*, 1992). Els PPAR s'uneixen al PPRE d'aquests gens formen heterodímers amb els receptors de l'àcid 9-cis-retinoic, el RXR per ser funcionals.

Els nostres resultats mostren activitat transcripcional del promotor S_A en presència dels receptors PPAR/RXR amb activitats màximes en els constructes de $-210L_{uc}$, $-639L_{uc}$ i $-2000L_{uc}$ en la línia cel·lular renal PR10. Malauradament, mentre realitzàvem aquests estudis vam examinar reiterativament el promotor de S_A amb els programes de recerca de factors de transcripció disponibles en les bases de dades i no vam trobar cap element de resposta als PPAR. En una recerca molt recent amb el programa MatInspector hem pogut identificar dos elements de resposta al PPAR α /RXR en posició +20 i -1050 i un lloc d'unió al receptor de la vitamina D (VDR), receptor que pertany a la mateixa superfamília de receptors nuclears que els PPAR i que també heterodimeritza amb el receptor RXR. En la figura 70 es representa la posició i seqüències de cada un dels elements de resposta per

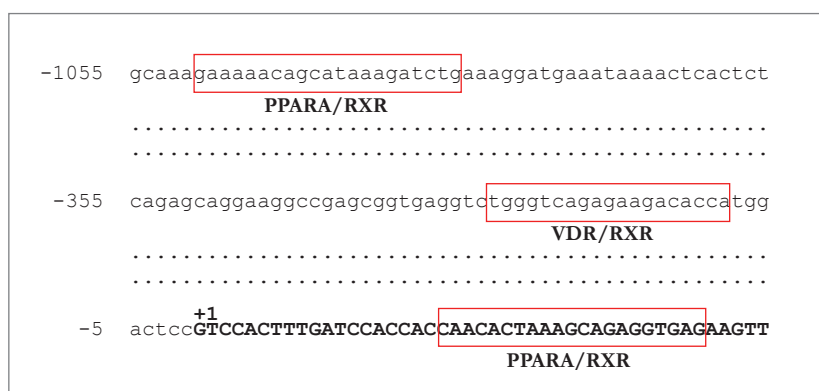


Fig.70. Presència d'uns possibles elements de resposta als receptors PPAR α i al VDR en la seqüència promotora del gen S_A . Dades obtingudes amb el programa MatInspector.

aquests receptors. El fet que no hagués estat reconegut abans és degut a que aquests programes s'actualitzen a mesura que s'identifiquen nous elements consens per als diferents factors de transcripció.

Tot i que falten molts estudis per comprovar si realment aquests putatius PPRE són funcionals, els resultats obtinguts amb els assajos d'activitat promotora mitjançant transfecció transitòria ens fa pensar que podrien ser responsables de l'activació transcripcional del promotor de S_A en presència dels receptors PPAR i RXR. Com mostren els nostres resultats, el constructe $-72L_{\mu c}$ ($-72/+40$) respon a la presència d'ambdós receptors el PPAR α i el RXR, en canvi no ho fa de manera significativa amb els PPAR γ /RXR ni el PPAR δ /RXR, aquest fet podria explicar-se per la presència d'aquest element de resposta en posició +20 respecte a l'inici de transcripció del gen.

En totes les línies cel·lulars obtenim certa resposta transcripcional amb el constructe $-639L_{\mu c}$ en presència del receptor RXR sol, sobretot en les PR10 i PCT3, això podria ser degut a que el RXR heterodimeritza amb PPARs d'expressió endògena tot i que no sabem si s'expressen en aquestes línies cel·lulars, també podria heterodimeritzar amb altres factors endògens com el receptor de la vitamina D (VDR) tenint en compte que s'ha identificat un element de resposta per aquest factor en posició -327. El constructe $-210L_{\mu c}$ respon molt poc al RXR a diferència dels resultats obtinguts amb el $-639L_{\mu c}$, per tant en aquest cas el RXR no respon a través del putatiu VDR sinó d'un altre factor endògen com podrien ser els propis PPAR endògens.

En les cèl·lules HepG2, la inducció del constructe $-639L_{\mu c}$ per part del RXR és menor, l'expressió dels PPAR en aquesta línia cel·lular és molt baixa, per fer estudis d'activitat promotora d'elements de resposta (PPREs) és necessari la transfecció dels PPAR, ja que l'expressió induïda per aquests receptors només és significativa quan són cotransfectats (Palmer *et al*, 1998; Gervois *et al*, 1999), per tant és d'esperar que la resposta donada pel RXR en les HepG2 sigui deguda a la seva heterodimerització amb un altre factor de transcripció endògen.

L'activitat transcripcional dels diferents subtipus de PPAR és induïda per multitud de compostos químics inclosos els propis àcids grassos, les thiazolidinediones (agents antidiabètics) com el ciglitzone; les prostaglandines, els proliferadors de peroxisomes i els fibrats (drogues hipolipèmiques) com el clofibrat.

El WY14,643 és un potent agonista de PPAR α , malgrat això, en cap de les línies cel·lulars testades no hem obtingut més inducció transcripcional dels constructes $-639L_{\mu c}$ i $-210L_{\mu c}$ en presència de l'agonista que la que dona el pròpi PPAR α . Sí que hem observat però que el ciglitzone agonista del PPAR γ activa al receptor, donant una inducció major que l'obtinguda amb el receptor RXR sol, en les cèl·lules HepG2. L'activitat promotora deguda a la presència del PPAR γ /RXR/CTZ però, és major en la línia renal MDCK. L'acció del PPAR γ /RXR sobre aquest fragment de promotor és lligant-depenent ja que per sí mateix no és capaç de induir activitat promotora. En les cèl·lules PR10 i PCT3 però, el ciglitzone ha resultat ser tòxic; s'ha demostrat en cèl·lules mesangials que el ciglitzone bloqueja el cicle cel·lular inhibint la formació de ciclina D1 (Ghosh *et al*, 2003) i que produeix apoptosi en cèl·lules de càncer de còlon HT-29 (Yang *et al*, 2001), aquests efectes però es duen a terme independentment del PPAR γ i, no totes les línies cel·lulars estudiades són sensibles a la droga, com també hem pogut observar en els nostres experiments.

Amb la recent identificació dels dos possibles elements de resposta a PPAR s'haurien de

realitzar més estudis amb un enfoc més dirigit, ja que ens hauriem de limitar a estudiar els constructes correctes com el $-2000L_{uc}$ o el $-72L_{uc}$ que engloben dos o un dels elements PPRE, realitzar estudis d'activitat promotora amb els PPREs mutats i estudis de Band Shift o Supershift per comprovar l'especificitat dels PPAR per aquests PPRE.

Alguns dels estudis realitzats *in vivo*, són comparables als resultats obtinguts *in vitro*, en canvi d'altres divergeixen. El WY14,643 no produeix cap canvi en l'expressió del gen S_A tant en el ronyó com en el fetge, en canvi un altre agonista de PPAR α , el clofibrat augmenta l'expressió del gen en el ronyó però la disminueix en el fetge, no sabem però quin efecte produiria el clofibrat sobre l'activitat transcripcional en assajos de transfecció transitoria ja que no s'ha provat. El ciglitazone agonista de PPAR γ produeix una disminució en l'expressió del mRNA de S_A en ronyó. Està àmpliament descrit que el PPAR α s'encarrega d'activar molts dels enzims implicats en l'oxidació dels àcids grassos a diferència del PPAR γ amb una clara funció lipogènica, això suggereix que el S_A en el ronyó jugaria un paper dins de la via oxidativa dels àcids grassos de cadena mitja en les mitocondries renals, via PPAR α . El clofibrat indueix significativament els enzims de la β -oxidació en el còrtex renal, incloent el LCAD (*long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), la MCAD (*mediu-chain acyl-CoA dehydrogenase*) i l'ACO (*Acyl-CoA oxidase*), suggerint que el PPAR α renal juga un paper important en la resposta adaptativa a la dieta lipídica en el ronyó i a la seva utilització (Gun *et al* 2001). Per una altra banda l'expressió del mRNA de S_A no es veu afectada en presència del WY14,643 un potent agonista de PPAR α per tant no podem afirmar que el gen S_A estigui controlat de manera directa per aquest receptor, el clofibrat però és un agent hipolipidèmic, per tant l'activació del gen S_A en aquest contexte ens permet suggerir el seu paper en l'oxidació dels àcids grassos a ronyó via PPAR α però d'una manera indirecta, es a dir l'activació de la via oxidativa per part del PPAR α en un contexte hipolipidèmic en el ronyó, activaria d'una manera directa un conjunt de gens que produirien una cascada de reaccions metabòliques compensatòries amb la que es posa en marxa l'activació o inhibició de tot un grup d'altres gens en els que hi trobem al gen S_A . Aquest fet però no es dona en el fetge, sinó tot el contrari, ja que el clofibrat disminueix l'expressió del gen S_A , així doncs el gen S_A en el fetge i en aquest mateix contexte fisiològic, tendria una regulació i un paper molt diferent. En la figura 71 es presenta un esquema hipotètic de l'acció del clofibrat sobre l'expressió del gen S_A en el ronyó.

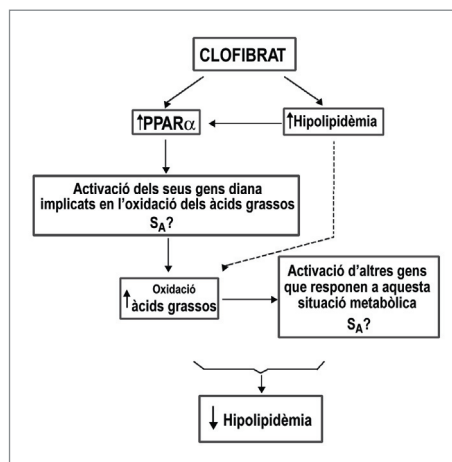


Fig. 71. Representació hipotètica de l'acció del clofibrat sobre l'expressió del gen S_A en el ronyó. El PPAR α pot ser activat directament pel clofibrat o indirectament a conseqüència dels efectes hipolipidèmics produïts pel fibrat. Amb una línia discontinua es mostra la possible via d'acció del clofibrat independentment del PPAR α

Discussió General

El gen S_A codifica per un enzim mitocondrial identificat com una *medium-chain acyl-CoA synthetasa* (MACS) reconegut en varies espècies de mamífer tot i que possiblement també es troba en altres espècies no mamíferes. La proteïna S_A és un enzim acil-CoA synthetasa (ACS) amb afinitat per un tipus de compostos lipídics o xenobiòtics amb cadenes hidrocarbonades d'una mida concreta resultat de l'evolució d'una ACS, ancestre comú per a tots els enzims de la família, d'origen procariota.

El gen S_A s'expressa fonamentalment en el ronyó i fetge dels rosegadors, rata i ratolí; tot i que en el ratolí el podem trobar en altres teixits com en l'estómac, el cor, el pulmó, el testicle i la glàndula prepuccial. En el ronyó però, és d'expressió exclusiva en el túbul proximal d'ambdues espècies; en aquest segment de la nefrona és on es concentra la major activitat de reabsorció de soluts orgànics i nutrients essencials. El túbul proximal està format de varis segments morfològicament diferents formats per cèl·lules epitelials amb un elevat contingut de mitocondries (veure INTRODUCCIÓ) i per tant amb una elevada activitat metabòlica, aquest tret condiciona l'expressió de determinats gens que li confereixen les seves característiques funcionals.

Existeixen molts mecanismes de regulació de l'expressió gènica que confereixen característiques morfològiques i funcionals específiques a un teixit, com les hormones sexuals; està ampliament descrit que el ronyó és un òrgan diana pels andrògens regulant un gran nombre de gens, entre ells el que codifica per la proteïna S_A . Només en presència d'andrògens es pot visualitzar l'expressió d'aquest gen a ronyó per tècniques de northern-blot, indicant una forta dependència androgènica per a la seva expressió. En les rates en canvi la regulació androgènica exercida sobre el gen S_A en el ronyó no és tant dràstica, resultats obtinguts en el nostre laboratori ens mostren que la castració produeix una lleugera disminució en l'expressió del gen tot i que és força variable entre individus de la soca SD (Sprague Dawley). Semblaria doncs, que el grau de dependència androgènica del gen S_A , podria variar segons l'espècie.

Els estrògens exerceixen una acció antagònica sobre la regulació androgènica en el gen S_A inhibint la seva expressió inclús en presència de dosis farmacològiques de dihidrotestosterona. Tots aquests fenòmens però són exclusius del ronyó ja que en el fetge cap de les dues hormones exerceix canvis en l'expressió del gen; el significat funcional d'això es desconeix però està clar que en el ronyó de ratolí el gen S_A presenta un dimorfisme sexual amb una clara transcendència fisiològica, encara per determinar.

El ronyó presenta dimorfisme sexual essent un dels òrgans més andrògen-depenent (Lund *et al* 1991); dins el ronyó, el lloc principal d'acció dels andrògens recau sobre les cèl·lules epitelials del túbul proximal. L'hormona estimula l'hipertrofia del túbuls proximals i de les cèl·lules de la càpsula de Bowman (Berger *et al*, 1989). Aquest procés ve acompanyat per canvis estructurals i morfològics en els òrgans subcel·lulars sobretot a nivells de mitocondries i del sistema lisosomal (Koenig *et al*, 1980). Existeix dimorfisme sexual en el metabolisme i l'excreció d'anions i cations orgànics en el ronyó murí, en general la secreció renal d'anions orgànics en mascles és superior que en femelles, molts xenobiòtics són secretats de l'organisme més ràpidament en animals mascle que en animals femella. Una de les primeres MACS (*medium-chain acyl-CoA synthetase*) identificades en el ronyó de ratolí és responsable de la conjugació de la glicina (Kasuya *et al*, 1999), essent aquesta una de les vies més importants

de detoxificació, no tant sols del xenobiòtics sinó també d'àcids endògens. El ronyó és el màxim responsable en la conjugació de la glicina, ja que es dona molt poc en el fetge. En els homes el 68% de la conjugació de la glicina és renal i el 32% hepàtica (Von Lehmann *et al*, 1973).

Les MACS accepten com a substrates els àcids grassos de cadena mitja, àcids aromàtics, àcids arilacètics i d'altres àcids carboxílics xenobiòtics com l'àcid salicílic (Kasuya *et al*, 1999), per tant poden estar implicats en diverses vies metabòliques des de l'oxidació o síntesi dels àcids grassos fins a la detoxificació de diversos xenobiòtics; no es coneix però per molts dels gens que codifiquen per les MACS els factors implicats en la seva regulació gènica; en aquests darrers anys s'han identificat noves MACS que presenten característiques bioquímiques semblants i localització mitocondrial, però tenen una distribució tissular molt diferent (Vessey *et al*, 2003; Oka *et al*, 2003); per exemple l'O-MACS està expressada exclusivament en les mitocondries de l'epiteli olfatori de rata (Oka *et al*, 2003), presenta una elevada homologia amb la proteïna S_A i una gran afinitat per l'hexanoat i l'octanoat, no es coneix però, res de la seva regulació gènica. En última instància totes aquestes dades semblen suggerir que l'expressió d'aquests enzims i localització tissular ve donada per l'especificitat de substrate així com el destí del producte catalitzat de llurs enzims, ja sigui dintre del metabolisme lipídic o detoxificació de xenobiòtics, en funció de les necessitats i funció de cada teixit.

Els àcids grassos de cadena mitja (MCFAs) són molt abundants en la llet, l'oli de coco i varis olis sintètics. Els MCFAs a diferència dels de cadena llarga (LCFA) són absorbits ràpidament per l'estómac essent oxidats per la mitocondria, també d'una manera molt més ràpida, ja que no necessiten del sistema carnitina per travessar les membranes mitocondrials.

El trànsit dels MCT (*medium-chain triglycerids*) precursors dels MCFAs (C_{6:0}, C_{8:0}, C_{10:0}) es dona d'una manera més ràpida i eficient en el mateix estómac que els LCT (*long-chain triglycerids*). En la figura 72 es representa d'una manera esquemàtica el transport, la distribució i el destí del MCT així com el seu metabolisme en l'hepatòcit, on ha estat més ben estudiat. En tots els teixits, la mitocondria és l'òrganella principal en l'oxidació dels MCFAs (Bach *et al*, 1996), són activats per les MACS i oxidats per la β-oxidació en l'hepatòcit; la majoria dels acetyl-CoA produïts com a resultat de l'oxidació dels MCFAs són directament utilitzats per la producció de cossos cetònics i la resta per la síntesi de novo de LCFAs els quals són incorporats als triglicèrids o a altres complexos lipí-

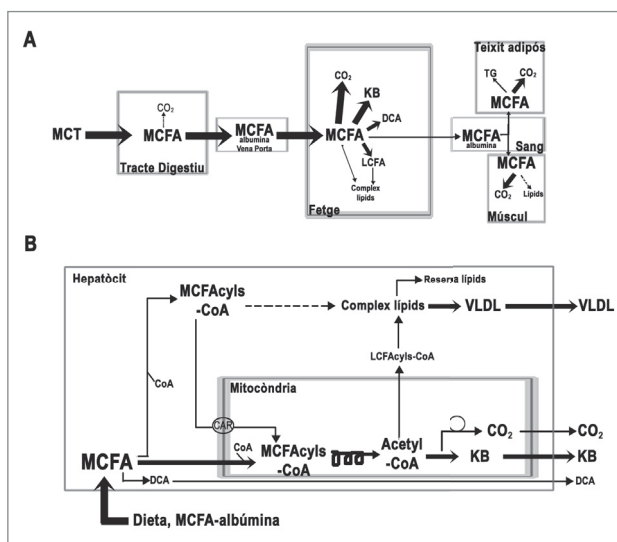


Fig.72. Via metabòlica dels àcids grassos de cadena mitja. A. Transport, distribució i destí metabòlic dels triglicèrids de cadena mitja (MCT). B. Metabolisme dels àcids grassos de cadena mitja (MCFAs) en l'hepatòcit. KB, cossos cetònics; LCFA, *long-chain fatty acids*; TG, triglicèrids; DCA, àcids dicarboxílics; CAR, carnitina; CoA, coenzim A; VLDL, *very low density lipoproteins*. El gruix de les línies de les sagetes reflexa la importància relativa de cada via. Adaptada i modificada de: Bach *et al* 1996.

dics (Christensen *et al*, 1989; Bach *et al*, 1996)

Els PPARs estan involucrats en la regulació del metabolisme lipídic i la seva activitat està modulada per lligants endògens derivats dels lípids. El PPAR α incrementa l'oxidació dels àcids grassos i la formació de cossos cetònics, el PPAR γ incrementa la reserva de triglicèrids i millora la sensibilitat a la insulina. Totes aquestes dades però es coneixen gràcies a l'existència dels lligants sintètics com les TZD i els fibrats ja que l'activació de llurs receptors en situacions fisiològiques i fisiopatològiques degudes als lligants endògens són molt poc conegudes, això en part explica les discrepàncies que es donen en l'estudi de la regulació dels gens que responen als PPAR quan s'utilitzen aquests lligants sintètics (Ferre, 2004).

El PPAR α s'expressa entre d'altres teixits en el fetge i el ronyó predominantment en el túbul proximal i el tub distal i, contribueix a l'expressió dels gens peroxisomals i mitocondrials de la β -oxidació induïts per la dieta lipídica en aquests segments (Ouali *et al*, 1998). El PPAR γ és d'expressió casi exclusiva de teixit adipós tot i que també el trobem expressat en el ronyó sobretot en el tub colector; en canvi en el fetge s'expressa molt poc.

Els fibrats agonistes de PPAR α disminueixen els nivells de triglicèrids en plasma, augmenta la producció del colesterol HDL i són compostos molt hipolipidèmics; com ja s'ha comentat els enzims mitocondrials MCAD encarregat del primer pas de la β -oxidació i la HMG-CoA sintetasa (*Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*) involucrada en la producció de cossos cetònics, són diana de PPAR α .

El fet que el gen S_A s'indueixi en presència del clofibrat ja sigui per la seva acció sobre el PPAR α o pels seus efectes hipolipidèmics suggereix que el gen S_A pot estar involucrat en l'oxidació lipídica en el ronyó; assajos funcionals de la proteïna S_A en cèl·lules renals murines confirmant aquest supòsit, doncs la S_A participa en la β -oxidació mitocondrial. La funció de la proteïna S_A , estaria doncs relacionada amb l'obtenció energia i/o d'una possible producció de cossos cetònics destí majoritari dels àcids grassos de cadena mitja. En el fetge però, l'efecte produït pel clofibrat en l'expressió del gen S_A és totalment el contrari suggerint, que els àcids grassos de cadena mitja activats pel S_A podrien destinar-se a la síntesi de lípids de cadena més llarga o complexos lipídics. Com era d'esperar el ciglitazone agonista de PPAR γ , receptor clarament lipogènic, disminueix l'expressió de S_A en el ronyó, afirmant encara més la hipòtesi d'un paper en l'oxidació lipídica per part del S_A , en el ronyó.

El gen S_A presenta una expressió teixit-específica en funció de les necessitats metabòliques de cada teixit. En el fetge el gen S_A s'expressa d'una forma independent de les hormones sexuals, mentre que en el ronyó està sotmés a un control hormonal afavorit pels andrògens. Alguns estudis han demostrat que les rates femella responen menys que les rates mascle a alguns efectes produïts pels fibrats, incloent l'increment de la mida del fetge, la proliferació peroxisomal, la β -oxidació peroxisomal així com canvis en les activitats d'alguns enzims (Svododa *et al*, 1969; Hawkins *et al*, 1987; Kawashima *et al*, 1989; Kawashima *et al*, 1989b; Yamada *et al*, 1991; Sundseth *et al* 1992; Sugiyama *et al*, 1994). Estudis realitzats en ratolins indiquen que el mascles responen més que les femelles als proliferadors peroxisomals (Nakajima *et al*, 2000). L'hormona de creixement (GH) juga un paper important en la regulació del dimorfisme sexual en les funcions sensibles a PPAR α , la GH administrada com una infusió continua i el tractament amb estrògens impedeix la inducció de la β -oxidació produïda pel clofibrat, pel contrari la hipofisectomia i el tractament amb testosterona de les rates femella presenten l'efecte contrari (Kawashima *et al*, 1989; Sugiyama *et al*, 1994). Aquests resultats suggereixen

que les dos hormones sexuals i la GH participen en els trets diferenciadors de la resposta als proliferadors peroxisomals en fetge de rata, tot i que en aquest model moltes funcions que presenten dimorfisme sexual estan exclusivament sota control de la GH (Jansson *et al*, 1985), aquestes funcions inclouen la composició dels àcids grassos i fosfatidilcolina (Oscarsson *et al*, 1988), síntesi de triglicèrids i la secreció de les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) (Sjöberg *et al*, 1996).

Els nivells de PPAR α en el fetge de rata són significativament majors en mascles que en femelles, en canvi l'increment en l'expressió del mRNA de PPAR α degut al dejú, es dona més o menys amb la mateixa intensitat entre els mascles i les femelles; en els mascles els nivells de PPAR α incrementen un 72% i en femelles un 52% respecte als no dejunats (Jalouli *et al*, 2003).

La inhibició de la β -oxidació mitocondrial amb etomoxir resulta en una acumulació massiva de lípids en el fetge i una hipoglicèmia en els ratolins PPAR α -/- en mascles i en femelles; encara que el 100% de ratolins mascle moren després d'aquest tractament a diferència del 25% de mortalitat en femelles (Djouadi *et al*, 1998). Els ratolins PPAR α -/-femella presenten una secreció de triglicèrids i nivells d'apolipoproteïna B major que els mascles knock-out, aquestes diferències però, no es donen en els animals wild-type (Lindén *et al*, 2001). Aquests resultats suggeririen que el PPAR α i les hormones gonadals interactuen en la regulació del metabolisme. Aquests estudis però tant sols s'han realitzat en el fetge, el cor i el múscul esquelètic, seria molt interessant comprovar quins efectes tendrien les hormones sobre l'expressió de PPAR α i si l'expressió del gen S_A podria estar regulada en combinació d'ambdós factors en el ronyó de ratolí.

El gen S_A murí constitueix un model d'estudi molt valuós per comprendre de quina manera la via de senyalització dels PPARs i la via d'acció de les hormones sexuals conflueixen en el control de processos fisiològics propis del ronyó. El futur coneixement dels mecanismes moleculars que controlen la seva expressió a fetge i a ronyó, així com la identificació dels substrates específics d'aquest acil-CoA sintetasa d'àcids grassos de cadena mitja seran de gran rellevància per aprofundir en la comprensió dels processos metabòlics i fisiopatològics hepato-renals.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'expressió renal del gen S_A està sota control androgènic en diferents soques de ratolí, C57BL/6, BALB/C i 129/Sv.
2. El mRNA del gen S_A murí s'expressa majoritàriament en el ronyó i en el fetge, es detectable però, en l'estómac, el testicle, el pulmó, el cor i la glàndula prepuccial. L'expressió del S_A també està sota control androgènic en el pulmó i en el cor.
3. Els estrògens inhibeixen l'expressió del gen S_A a dosis fisiològiques i farmacològiques d'andrògens, en el ronyó. Els nivells i localització de la proteïna S_A es correlacionen amb els de mRNA.
4. L'absència d'estrògens en ratolins femella no permet l'expressió del gen S_A en el ronyó, per tant l'expressió del gen S_A no és constitutiva i reprimida per estrògens en femelles sinó induïda per andrògens en el ronyó de ratolins mascle.
5. L'acció de les hormones sexuals sobre el gen S_A és teixit-específica ja que en el fetge l'expressió del gen S_A no es veu modificada per l'acció de la DHT ni del E_2 .
6. El gen S_A murí localitzat en el cromosoma 7 presenta una mida d'aproximadament 23Kb i està format per 16 exons. Conté tres exons no codificants, l'exò 1, 2 i 3, l'ATG es troba en l'exò 4. La transcripció del gen S_A dona lloc a varis transcrits, que difereixen en la regió 5' degut a la combinació dels 3 primers exons, la presència de dos llocs de *splicing* intraexònic, en l'exò 1 i 2 confereixen més complexitat a la regió 5' no codificable del mRNA de S_A .
7. En assajos de transfecció transitoria i luciferasa, el promotor del gen S_A mostra activitat transcripcional en diferents línies cel·lulars, entre elles les PR10 derivades del túbul proximal murí i les HepG2 cèl·lules hepàtiques humanes. El fragment de -110/+40 ofereix la màxima activitat luciferasa en ambdues línies cel·lulars. La màxima inducció promotora deguda a la presència del mAR i el seu lligand DHT recau sobre el fragment de -496/+40 tant en les cèl·lules PR10 com en la línia renal CV-1.
8. S'ha identificat un element de resposta a SREBP que conté una caixa E-box. Aquesta seqüència és reconeguda específicament per un factor de transcripció present en un extracte nuclear de ronyó i fetge de ratolins mascle normals i castrats. La seva naturalesa resta per determinar.
9. La proteïna S_A té un pes molecular aparent de 62 kDa i una localització en la mitocondria degut al pèptid senyal.
10. La proteïna S_A és una *medium-chain acyl CoA synthetase* (MACS) amb afinitat per l'àcid octanoic. Intervé en l'oxidació d'àcids grassos de cadena mitja i no en la síntesi de triglicèrids.

11. La proteïna S_A presenta un domini d'unió a AMP i un motiu de reconeixement de substrate (domini M). La mutació de varis aminoàcids en el domini M produeix una disminució en l'activitat enzimàtica de la proteïna S_A en presència de l'àcid octanoic, essent clau la substitució d'una glicina en posició 463 que inhibeix per complet l'activitat enzimàtica de S_A .
12. El promotor del gen S_A respon al receptor $PPAR\alpha$ en assajos de transfecció transitòria en varies línies cel·lulars (PR10, PCT3, MDCK i HepG2). *In vivo*, la presència de clofibrat augmenta l'expressió del gen S_A en el ronyó o disminueix en el fetge. Pel que fa al $PPAR\gamma$, el promotor de S_A també respon però amb menor intensitat i la presència *in vivo* de l'agonista ciglitazone disminueix l'expressió del gen S_A en el ronyó però no té efectes en el fetge.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

A

Aarnisalo P, Palvimo JJ and Janne OA (1998) CREB-binding protein in androgen receptor mediated signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2122-2127.

Abdul KM, Terada K, Yano M, Ryan MT, Streimann I, Hoogenraad NJ and Mori M (2000) Functional analysis of human metaxin in mitochondrial protein import in cultured cells and its relationship with the Tom complex. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 1028-1034.

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I and Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-616.

Adler AJ, Scheller A and Robins DM (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), 6326-6335.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002) Molecular biology of the cell. 4th ed. New York.

Aldridge TC, Tugwood JD and Green S (1995) Identification and characterization of DNA elements implicated in the regulation of CYP4A1 transcription. *Biochem J* 306, 473-479.

Alvarez-Dolado M, Gonzalez-Moreno A, Valencia A, Zenke M, Bernal J and Muñoz A (1999) Identification of a mammalian precursor protein import receptor as a thyroid hormone-regulated gene in specific brain regions. *J Neurochem* 73, 2240-2249.

Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S and Yamada N (2002) Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterol genes. *J Lipid Res* 43, 1220-1223.

Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA and Grimaldi PA (1995) Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 270, 2367-2371.

Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasathya C and Avadhani NG (2001) Mitochondria-to-nucleus stress signalling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J* 20, 1910-1920.

Anderson SP, Yoon L, Richard EB, Dunn CS, Cattley RC and Corton JC (2002) Delayed liver regeneration in peroxisome proliferator-activated receptor- α -null mice. *Hepatology* 36, 544-554.

Araneo BA, Dowell T, Diegel M and Daynes RA (1991) Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5 and gamma-interferon but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood* 78, 688-699.

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frerling V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M and Vidal H (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46, 1319-1327.

B

Babbitt PC, Kenyon GL, Martin BM, Charest H, Slyvestre M, Scholten JD, Chang KH, Liang PH, Dunaway-Mariano D (1992) Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry* 31, 5594-5604.

Bach AC, Ingenbleek Y and Frey A (1996) The usefulness of dietary medium chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J Lipid Res* 37, 708-726.

Barbulescu K, Geserick C, Schüttke I, Scheleuning WD and Haendler B (2001) New androgen response elements in the murine Pem promoter mediate selective transactivation. *Mol Endocrinol* 15(10), 1803-1816.

Bardin CW, Brown TR, Mills NC, Gupta C and Bullock LP (1978) The regulation of the betaflucoronidase gene by androgens and progestins. *Biol Reprod* 18(1), 74-83.

Bardin CW and Catterall JF (1981) Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science* 211(4488), 1285-1294.

Bardot O, Aldridge TC, Latruffe N and Green S (1993) PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 37-45.

Barettino D, Ruiz MdmV and Stunnenberg HG (1994) Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of the thyroid hormone receptor. *EMBO J* 13, 3039-3049.

Bauer MF, Gempel K, Reichert AS, Rappold GA, Licht-

ner P, Gerbitz KD, Neupert W, Brunner M and Hoffman S Genetic and structural characterization of the human mitochondrial inner membrane translocase. *J Mol Biol* 289, 69-82.

Bauer MF, Rothbauer U, Mühlenbein N, Smith RJH, Gerbitz KD, Neupert W, Brunner M and Hoffman S (1999) The mitochondrial Tim22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett* 464, 41-47.

Beato M (1998) Gene Regulation by steroid hormones. *Cell* 56(3), 335-344.

Beato M and Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3), 225-236

Benjafeld AV, Iwai N, Ishikawa K, Wang WYS and Morris BJ (2003) Overweight, but not hypertension, is associated with SAH polymorphisms in Caucasians with essential hypertension. *Hypertens Res* 26, 591-595.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M and Scherer PE (2001) The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7, 947-953.

Berger FG and Watson G (1989) Androgen-regulated gene expression. *Annu Rev Physiol* 51, 51-65.

Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, Saperstein R, Smith RG and Leibowitz MD (1996) Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology* 137, 4189-4195.

Berger J and Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53, 409-435.

Berger J, Tanen M, Elbrecht A, Hermanowski-Vosatka A, Moller DE, Wright SD and Thieringer R (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit adipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *J Biol Chem* 276(16), 12629-12635.

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(29), 133-140.

Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery DM and Parker MG (1999) The AF-1 and AF-2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol* 19, 8383-8392.

Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD, Anandatheerthavarada HK, Vijayasathya C, Zaidi M, Kothkoff M and Avadhani NG (1999) Retrograde Ca⁺⁺ signalling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress; a novel mode of interorganellar crosstalk. *EMBO J* 18, 522-533.

Black PN, Zhang Q, Weimar JD and DiRusso CC (1997) Mutational analysis of a fatty acyl-Coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J Biol Chem* 272, 4896-4903.

Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H and Moras D (1995) Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 375, 359-360.

Bowman HM and Hook JB (1972) Sex differences in organic ion transport by rat kidney. *Proc Soc Exp Biol Med* 141(1), 258-262.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M and Wahli W (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354-366.

Brandt JM, Djouadi F and Kelly DP (1998) Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 273, 23786-23792.

Brock TG, McNish RW and Peters GM (1995) Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. *J Biol Chem* 270, 21652-21658.

Brown PJ, Winegar DA, Plunket KD, Moore LB, Lewis MC, Wilson JG, Sundseth SS, Koble CS, Wu Z, Chapman JM, Lehmann JM, Kliewer SA and Willson TM (1999) A ureido-thioisobutyric acid (GW9578) is a subtype-selective PPAR alpha agonist with potent lipid-lowering activity. *J Med Chem* 42, 3785-3788.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engelstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson J-A and Carlquist M (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758

C

Camp HS and Tafuri SR (1997) Regulation of peroxisome proliferation-activated receptor γ activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 10811-10816.

Cato AC, Porta H and Herrlich P. (1992) Regulation of

- gene expression by steroid hormones. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 43, 1-36.
- Castelein H**, Declercq PE and Baes M (1997) DNA binding preferences of PPAR alpha/RXR alpha heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* 233(1), 91-95.
- Castelein H**, Gulick T, Declercq PE, Mannaerts GP, Moore DD and Baes MI (1994) The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J Biol Chem* 269, 26754-26758.
- Catterall JF**, Kontula KK, Watson CS, Seppanen PJ, Funkenstein B, Melanitou E, Hickok NJ, Bardin CW and Janne OA (1986) Regulation of gene expression by androgens in murine kidney. *Recent Prog Horm Res* 42, 71-109.
- 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, 695-704.
- Caudevilla C**, Serra D, Miliar A, Codony C, Asins G, Bach M and Hegardt FG (1998) Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12185-12190.
- Cebrián C**, Aresté C, Nicolás A, Olive P, Carceller A, Piu-lats 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), 29410-29419
- Chang CS**, Kokontis J and Liao ST (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240(4850) 324-326.
- Chawla A**, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P and Evans RM (2001) PPAR γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 7, 48-52.
- Chen JD** and Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548), 454-457.
- Chewawiwat N**, Yano M, Terada K, Hoogenraad NJ and Mori M (1999) Characterization of the novel mitochondrial protein import component, Tom34, in mammalian cells. *J Biochem* 125, 721-727
- Chinetti G**, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J and Staels B (1998) Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273, 25573-25580.
- Cho H** and Lim IK (1997) Expression of androgen receptor and its implication in hepatoma cells. *Cancer Lett* 115, 135-140.
- Christensen E**, Hagve TA, Gronn M and Christophersen BO (1983) β -Oxidation of medium chain (C8-C14) fatty acids studied in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1004, 187-195.
- 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
- Clemmison JR**, Pratt JR, Frantz S, Sacks S and Samani NJ (2002) Kidney specificity of rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus region. *Hypertension* 40, 292-297.
- Cleutjens KB**, Van Der Korput HA, Van Eekelen CC, Van Rooij HC, Faber PW 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), 148-161.
- Cleutjens KB**, Van Eekelen CC, Van Der Korput HA, Brinkmann AO 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), 6379-6388.
- Combs TP**, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE and Moller DE (2002) Induction of Acp30 levels by PPAR γ agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143, 998-1007.
- Corton JC**, Fan LQ, Brown S, Anderson SP, Bocos C, Cattley RC, Mode A and Gustafsson JA (1998) Down-regulation of cytochrome P450 2C family members and positive acute-phase response gene expression by peroxisome proliferators chemicals. *Mol Pharmacol* 54, 463-473.
- Craig EE**, Chesley A and Hood DA (1998) Thyroid hormone modifies mitochondrial phenotype by increasing protein import without altering degradation. *Am J Physiol* 275, C1508-C1515.

Crozier GL (1988) Medium-chain triglyceride feeding over the long term: the metabolic fate of [1-¹⁴C] octanoate and [1-¹⁴C] oleate in isolated rat hepatocytes. *J Nutr* 118, 297-304.

D

Darne CH, Morel L, Claessens F, Manin M, Fabre S, Veysièrè G, Rombauts W and Jean CL (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.

Davis JF and Felder MR (1993) Mouse ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1) characterization of cDNA clones and testosterone induction in kidney tissue. *J Biol Chem* 268, 16584-16589.

Delerive P, DeBosscher K, Vanden Berghe W, Fruchart JC, Haegeman G and Staels B (2002) DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Mol Endocrinol* 16, 1029-1039.

Delerive P, Fruchart J-C and Staels B (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 169, 453-459.

Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM and Singer S (1999) Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 30, 3951-3956.

Denner LA, Weigel NL, Maxwell BL, Schrader WT and O'Malley BW (1990) Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250, 1740-1743

Deslypere JP, Young M, Wilson JD and McPhaul MJ (1992) Testosterone and 5-alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol* 88, 15-22

Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ and Wahli W (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384, 39-43.

Diaz-Chico B y Navarro D (1996) Estructura y función de los receptores de hormonas esteroideas. Receptores esteroideos y mecanismo de acción hormonal. *Ed. Mirpal* 15-52.

Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC and Giudicelli Y (2000) Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-

related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Endocrinology* 141(2), 649-656.

Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ and Kelly DP (1998) A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 102, 1083-1091.

Dowell P, Peterson VJ, Zabriskie TM and Leid M (1997) Ligand-induced peroxisome proliferator-activated receptor a conformational change. *J Biol Chem* 272, 2013-2020.

Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G and Wahli W (1993) Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* 77, 67-76.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G and Wahli W (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, 879-887.

DuBois RN, Gupta R, Brockman J, Reddy BS, Krakow SL and Lazar MA (1998) The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* 19, 49-53.

Dudkowska M, Stachurska A, Chmurzyska W, Grzelakowska-Sztabert B and 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(Pt2), 317-323.

Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R and Chambon P (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and the influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J* 13, 5370-538.

E

Eaton S, Bartlett K and Pourfarzam (1996) Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 320, 345-357.

Edgar AD, Tomkiewicz C, Costet P, Legendre C, Aggerbeck M, Bouguet J, Staels B, Guyomard C, Pineau T and Barouki R (1998) Fenofibrate modifies transaminase gene expression via a peroxisome proliferator activated receptor alpha-dependent pathway. *Toxicol Lett* 98, 13-23.

Elbrecht A, Chen Y, Adams A, Berger J, Griffin P, Klatt

- T, Zhang B, Menke J, Zhou G, Smith RG and Moller DE (1999) L-764406 is a partial agonist of human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. The role of Cys313 in ligand binding. *J Biol Chem* 274, 7913-7922.
- Elbrecht A**, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz M, Moller DE and Berger J (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors γ 1 and γ 2. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 431-437.
- Ellison KE**, Igelfinger JR, Pivor M and Dzau VJ (1989) Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J Clin Invest* 83(6), 1941-1945.
- Elstner E**, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D and Koeffler HP (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8806-8811.
- Endo T** and Kohda D (2002) Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1592, 3-14.
- Escher P**, Braissant O, Basu-Modack S, Michalik K, Wahli W and Desvergne B (2001) Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 142(10), 4195-4202.
- Evans RM** (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854), 889-895.
- F**
- Fajas L**, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Widal H and Auwerx J (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272, 18779-18789.
- Fajas L**, Fruchart JC and Auwerx J (1998) PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438(1-2), 55-60.
- Fan LQ**, Cattley RC and Corton JC (1998) Tissue-specific induction of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV by peroxisome proliferator chemicals is dependent on the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Endocrinol* 158, 237-246.
- Fang Y**, Fliss AE, Robins DM and Caplan AJ (1996) Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J Biol Chem* 271, 28697-28702.
- Farre P** (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53, S43-S50.
- Felder MR**, Watson G, Huff MO and Ceci JD (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), 1453-1452.
- Forman BM**, Chen J and Evans RM (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4312-4317.
- Forman BM**, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM and Evans RM (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83(5), 803-812.
- Frantz S**, Clemitson JR, Bihoreau MT, Gauguier D and Samini NJ (2001) Genetic dissection of region around the SA gene on rat chromosome 1: evidence for multiple loci affecting blood pressure. *Hypertension* 38 (2), 216-221.
- Frantz SA**, Kaiser M, Gardiner SM, Gauguier D, Vincent M, Thompson JR, Bennett T and Samani NJ (1998) Successful isolation of a rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus in reciprocal congenic strains. *Hypertension* 32, 639-646.
- Frantz SA**, Thiara AS, Lodwick D, Ng LL, Eperon IC and Samani NJ (1999) Exon repetition in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5400-5405.
- Frantz SA**, Thiara AS, Lodwick D and Samani NJ (1996) A major polymorphism in the rat SA gene caused by the insertion of a LINE element. *Mamm Genome* 7(11), 865-866.
- Frohnert BI**, Hui TY and Bernlohr DA (1999) Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem* 274, 3970-3977.
- Fronsdal K**, Engedal N, Slagsvol T and Saatcioglu F (1998) CREB binding protein is a coactivator for the androgen receptor that mediates cross-talk with AP-1. *J Biol Chem* 273, 31853-31859.
- Fruchart JC**, Duriez P and Staels B (1999) Molecular mechanism of action of the fibrates. *J Soc Biol* 193, 67-75.
- Fruebis J**, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson

MR, Yen FT, Bihain BE and Lodish HF (2001) Proteolytic cleavage product of 30kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2005-2010.

Fryer CJ and Archer TK (1998) Chromatin remodeling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* 393, 88-91.

Fujino T, Kang MJ, Suzuki H, Iijima H and Yamamoto T (1996) Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3. *J Biol Chem* 271, 16748-16752.

Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K and Yamamoto TT (2001) Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem* 276, 11420-11426.

Fujino T, Takei YA, Sone H, Ioka RX, Kamataki A, Magoori K, Takahashi S, Sakai J and Yamamoto TT (2001) Molecular identification and characterization of two medium-chain Acyl-CoA synthetase, MACS1 and the SA gene product. *J Biol Chem* 276, 35961-35966.

Fujino T and Yamamoto T (1992) Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. *J Biochem* 111, 197-203.

G

Geliebter A, Torbay N, Bracco EF, Hashim SA and Van Itallie TB (1983) Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *Am J Clin Nutr* 37, 1-4.

Geneviève M, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B and Auwerx J (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPAR α and PPAR γ activators. *J Biol Chem* 272, 28210-28217.

Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V and Staels B (1999) Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 13(3), 400-409.

Ghosh SS, Gehr TWD, Ghosh S, Fakhry I, Sica DA, Lyall V and Schoolwerth AC (2003) PPAR γ ligand attenuates PDGF-induced mesangial cell proliferator: role of MAP kinase. *Kidney Int* 64, 52-62.

Ghyselinck NB, Dufaure I, Lareyre JJ, Rigaudiere N, Mattei MG and Dufaure JP (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), 258-272

Giguère V (1999) Orphan nuclear receptor: from gene to function. *Endocr Rev* 20(5), 689-725

Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM, Christian RE, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt D and Weber MJ (2002) Androgen receptor phosphorylation regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 277, 29304-29314.

Goldstone A, Koenigh H and Lu C (1982) Testosterone-dependent sexual dimorphism of the mouse kidney in mediated by polyamines. *Biochem Biophys Res Commun* 104(1), 165-172.

Goping IS, Millar DH and Shore GC (1995) Identification of the human mitochondrial import receptor, huMas20p. complementation of delta mas20 in yeast. *FEBS Lett* 373, 45-50.

Gorlich D and Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 195-202.

Gottlicher M, Widmark E, Li Q and Gustafsson JA (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4653-4657.

Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.

Gratzner S, Lithgow T, Bauer RE, Lamping E, Paltauf F, Kohlwein SD, Haucke V, Junne T, Schatz G and Horst M (1995) Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J Cell Biol* 129, 25-34.

Griffin JE and Wilson JD (1998) Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Williams Textbook of Endocrinology (Wilson JD, Foster DW et al eds) 9th ed, Saunders, Philadelphia.

Gu L, Dene H and Rapp JP (1995) Possible alternative splicing of the rat SA gene. *Mamm Genome* 6(9), 683-684.

Guan Y and Breyer MD (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int* 60, 14-30.

Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD and Kelly DP (1994) The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11012-11016.

- Guo W**, Choi JK, Kirkland JL, Corkey BE and Hamilton JA (2000) Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. *Biochem J* 349, 463-471.
- Guo W**, Lei T, Wang T, Corkey BE and Han J (2003) Octanoate inhibits triglyceride synthesis in 3T3-L1 and human adipocytes. *J Nutr* 133, 2512-2518.
- H**
- Hachiya N**, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G and Lithgow T (1995) Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature (Lond.)* 376, 705-709.
- Haketa A**, Soma M, Nakayama T, Sato M, Kosuge K, Aoi N and Matsumoto K (2004) Two medium-chain acyl-coenzyme A synthetase genes, SAH and MACS1, are associated with plasma high-density lipoprotein cholesterol levels, but they are not associated with essential hypertension. *J Hypertens* 22, 1903-1907.
- Ham J**, Thomson A, Needham M, Webb P and Parker M (1988) Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumor virus. *Nucleic Acids Res* 16 (12), 5263-5276.
- Han J**, Farmer SR, Kirkland JL, Corkey BE, Yoon R, Pirtskhalava T, Ido Y and Guo W (2002) Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 132, 904-910.
- Hanson B**, Nuttal S and Hoogenraad NJ (1996) A receptor for the import of proteins into human mitochondria. *Eur J Biochem* 235, 750-753.
- Harrap SB**, Samani NJ, Lodwick D, Connor JM, Fraser R, Davies DK, Lever AF, Foy CJ and Watt GC (1995) The SA gene: predisposition to hypertension and renal function in man. *Clin Sci (Colch)* 88(6), 665-670.
- Harris EL**, Dene H and Rapp JP (1993) SA gene and blood pressure cosegregation using Dahl Salt-sensitive rats. *Am J Hypertens* 6, 330-334.
- Harris PK** and Kletzien RF (1994) Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol Pharmacol* 45, 469-445.
- Hartman DJ**, Hoogenraad NJ, Condron R and Hoj PB (1992) Identification of a mammalian 10-kDa heat shock protein, a mitochondrial chaperonin 10 homologue essential for assisted folding of trimeric ornithine transcarbamylase in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3394-3398.
- Hartig PC**, Bobsein KL, Britt BH, Cardon MC, Lambright CR, Wilson VS and Gray Jr LE (2002) Development of two androgen receptor assays using adenoviral transduction of MMTV-Luc reporter and/or hAR for endocrine screening. *Toxicol Sci* 66, 82-90.
- Hawkins JM**, Jones WE, Bonner FW and Gibson GG (1987) The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. *Drug Metab Rev* 18, 441-515.
- He B**, Kempainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H and Wilson EM (1999) Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates inter-domain communication with the NH2-terminal domain. *J Biol Chem* 274, 37219-37225.
- Heemers H**, Vanderhoydonc F, Roskams T, Shechter I, Heyns W, Verhoeven G and Swinnen JV (2003) Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 205(1-2), 21-31.
- Heemers H**, Verrijdt G, Organe S, Claessens F, Heyns W, Verhoeven G and Swinnen JV (2004) Identification of an androgen response element in intron 8 of the sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein gene allowing direct regulation by the androgen receptor. *J Biol Chem* 279, 30880-30887.
- Heery DM**, Kalkhoven E, Hoare S and Parker MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- Heinlein CA** and Chang C (2002) Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocrine Reviews* 23, 175-200.
- Heinlein CA** and Chang C (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16(10), 2181-2187.
- Hertz R**, Bishara-Shieban J and Declercq PE (1995) Mode of action of peroxisome proliferators: a hypolipidemic drug suppresses apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* 270, 13470-13475.
- Hess R**, Staubli W and Riess W (1965) Nature of hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* 208, 856-858.
- Hilgers KF**, Ngaraj SK, Karginova EA, Kazakova IG, Chevalier RL, Carey RM, Pentz ES and Gomez RA (1998) Molecular cloning of KS, a novel rat gene expressed exclusively in the kidney. *Kidney Int* 54, 1444-1454.
- Hingorani AD** and Brown MJ (1996) Identifying the

gens for human hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 11, 575-586.

Hohfeld J and Jentsch S (1997) GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J* 16, 6209-6216.

Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS and Spiegelman BM (1994) Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134, 264-270.

Holla VR, Adas F, Imig JD, Zhao X, Price E, Olsen N, Kovacs WJ, Magnuson MA, Keeney DS, Breyer MD, Falck JR, Waterman MR and Capdevilla JH (2001). Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp4a monooxygenases cause hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(9), 5211-5216.

Holness MJ, Smith ND, Bulmer K, Hopkins T, Gibbons GF and Sugden MC (2002) Evaluation of the role of peroxisome-proliferator-activated receptor α in the regulation of cardiac pyruvate dehydrogenase kinase 4 protein expression in response to starvation, high-fat feeding and hyperthyroidism *Biochem J* 364, 687-694.

Hoogenraad NJ, Ward LA and Ryan MT (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1592, 97-105.

Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T and Matsuzawa Y (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1595-1599.

Hsu MH, Palmer CN, Song W, Griffin KJ and Johnson EF (1998) A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J Biol Chem* 273(43), 27988-27997.

Hu E, Kim JB, Sarraf P and Spiegelman BM (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 274, 2100-2103.

Hübner N, Lee YA, Lindpaintner K, Ganten D and Kreu-

tz 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, 643-648.

Hunter J, Kassam A, Winrow CJ, Rachubinski RA and Capone JP (1996) Crosstalk between the thyroid hormone and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating peroxisome proliferator-responsive genes. *Mol Cell Endocrinol* 116(2), 213-221.

I

Iizuka M and Stillman B (1999) Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 274, 23027-23034.

Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W and Desvergne B (1997) Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR/Retinoid X Receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem* 272, 20108-20117.

Ikonen T, Palvimo JJ and Janne OA (1997) Interaction between the amino and carboxyl terminal regions of rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators *J Biol Chem* 272, 29821-29828.

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* 32(1), 255-262.

Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T and Katayama S (1998) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 370-374.

Isern J, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ and Meseguer A (2001) Function analysis and androgen-regulated expression of mouse organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp 1) in the kidney. *Biochim Biophys Acta* 1518, 73-78.

Isern J and Meseguer A (2003) Hormonal regulation and characterisation of mouse Cyp4b1 gene 5'-flanking region. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 139-147.

Ishihara N and Mihara K (1998) Identification of the protein import components of the rat mitochondrial inner membrane, rTIM17, rTIM23, and rTIM44. *J Biochem* 123, 722-732.

Ishinaga Y, Nabika T, Shimada T, Hiraoka J, Nara Y and Yamori Y (1997) Re-evaluation of the SA gene in spon-

- taneously hypertensive and Wistar-Hyoto rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24(1),17-22.
- Issemann I** and Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-649.
- Issemann I**, Prince R, Tugwood J and Green S (1992) A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferator?. *Biochem Soc Trans* 20, 824-827.
- Iwai N** and Inagami T (1991) Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension* 17, 161-169.
- Iwai N** and Inagami T (1992) Identification of a candidate gene responsible for the high blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10(10), 1155-1157.
- Iwai N**, Inagami T and Kinoshita M (1994) Molecular genetics of the SA gene. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21(11), 913-914.
- Iwai N**, Katsuya T, Mannami T, Higaki J, Ogihara T, Kokame K, Ogata J and Baba S (2002) Association between SAH, an Acyl-CoA synthetase gene, and hypertriglyceridemia, obesity and hypertension. *Circulation* 105,41-47.
- Iwai N**, Krutz TW and Inagami T (1992) Inther evidence of the SA gene as a candidate gene contributing to the hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 188(1), 64-69.
- Iwai N**, Ohimichi N, Hanai K, Nakamura Y and Kiroshita M (1994) Human SA gene locus as a candidate locus for essential hypertension. *Hypertension* 23(3), 375-380.
- 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, 636-638.
- J**
- Jalouli M**, Carlsson L, Améen C, Lindén D, Ljungberg A, Michalik L, Edén S, Wahli W and Oscarsson J (2003) Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α expression: influence of pituitary and gonadal hormones. *Endocrinology* 144(1), 101-109.
- Jansson JO**, Edén S and Isaksson O (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 6(2), 128-150.
- Jean-Faucher C**, Berger M, Gallon C, DeTurckheim M, Veysiére G and Jean C (1987) Sex related differences in renal size in mice: ontogeny and influence of neonatal androgens. *J Endocrinol* 115(2), 241-246.
- Jelinsky SA**, Harris HA, Brown EL, Flanagan K, Zhang X, Tunkey C, Lai K, Lane MV, Simcoe DK and Evans MJ (2003) Global transcription profiling of estrogen activity: estrogen receptor alpha regulates gene expression in the kidney. *Endocrinology* 144(2), 701-710.
- Jensen FJ** et al (1964) Infection of human and simian tissue cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 52, 53-59.
- Jenster G**, Trapman J and Brinkmann AO (1993) Nuclear import of the androgen receptor. *Biochem J* 293, 761-768.
- Jenster G**, van der Korput HAGM, Trapman J and Brinkman AO (1995) Identification of two transcription activation units in teh N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 270, 7341-7346.
- Jindal S**, Dudami AK, Singh B, Harley CB and Gupta RS (1989) Primary structure of a human mitochondrial protein homologue to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol* 9, 279-2283.
- Johnson EF**, Palmer CN, Griffin KJ and Hsu MH (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation. *EASEB J* 10, 1241-1248.
- Jones DC**, Ding X and Daynes RA (2002) Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem* 277, 6838-6845.
- Juge-Aubry C**, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA and Desvergne B (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 272, 25252-25259.
- Juge-Aubry CE**, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin WW, Burger AG and Meier CA (1999) Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* 274, 10505-10510.

K

- Kaisaki PJ**, Rouard M, Danoy PAC, Robert HW, Collins SC, Rice M, Levy ER, Lathrop M, Bihoreau MT and Gauguier D (2000) Detailed comparative gene map of rat chromosome 1 with mouse and human genomes and physical mapping of an evolutionary chromosomal breakpoint. *Genomics* 64, 32-43.
- Kaiser MA**, Lodwick D and Samani NJ (1994) The rat SA gene shows genotype-dependent tissue-specific expression. *Clin Sci (Lond)* 87, 1-4.
- Kalousek F**, Isaya G and Rosenberg LE (1992) Rat, liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J* 11, 2803-2809.
- Kanazawa M**, Terada K, Kato S and Mori M (1997) HSDJ, a human homolog of DnaJ, is farnesylated and is involved in protein import into mitochondria. *J Biochem* 121, 890-895.
- Kang H-Y**, Yeh S, Fujimoto N and Chang C (1999) Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the mediated prostate cancer growth. *J Biol Chem* 277, 4609-4617.
- Kang MJ**, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H and Yamamoto TT (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2880-2884.
- Karan D**, David JR and Capy P (2001) Molecular evolution of the AMP-forming Acetyl-CoA synthetase. *Gene* 265, 95-101.
- Kasuya F**, Igarashi K and Fujui M (1999) Characterization of a renal medium chain acyl-CoA synthetase responsible for glycine conjugation in mouse kidney mitochondria. *Chem Biol Interact* 118(3), 233-246.
- Kasuya F**, Igarashi K, Fujui M and Nokihara K (1996) Purification and characterization of a medium chain acyl-coenzyme A synthetase. *Drug Metab Dispos* 24, 879-883.
- Kasuya F**, Yamakoa Y, Igarashi K and Fujui M (1998) Molecular specificity of medium chain Acyl-CoA synthetase for substrates and inhibitors. *Biochem Pharmacol* 55(11), 1769-1775.
- Kawashima Y**, Uy-Yu N and Kosuya H (1989)a Sex-related differences in the enhancing effects of perfluoro-octanoic acid on stearoyl-CoA desaturase and its influence on the acyl composition of phospholipid in rat liver. Comparison with clofibrilic acid and tiadenol. *Biochem J* 263, 897-904.
- Kawashima Y**, Uy-Yu N and Kosuya H (1989)b Sex-related difference in the inductions by perfluoro-octanoic acid of peroxisomal β -oxidation, microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase and cytosolic long-chain acyl-CoA hydrolase in rat liver. *Biochem J* 261, 595-600.
- Keller ET**, Ershler WB and Chang C (1996) The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Front Biosci* 1, d56-d71.
- Keller H**, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K and Wahli W (1993) Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2160-2164.
- Keller H**, Givel F, Perroud M and Wahli W (1995) Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 9(7), 794-804.
- Kelly LJ**, Vicario P, Thompson GM, Candelore MR, Dobber TW, Ventre J, Wu MS, Meurer R, Forrest MJ, Conner MW, Cascieri MA and Moller DE (1998) Peroxisome proliferator-activated receptors γ and α mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 139, 4920-4927.
- Kerner J** and Hoppel C (2000) Fatty acid import into mitochondrial. *Biochim Biophys Acta* 1486, 1-17.
- Kersten S**, Desvergne B and Wahli W (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421-424.
- Kersten S**, Mandard S, Escher P, Gonzalez FJ, Tafuri S, Desvergne B and Wahli W (2001) The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *FASEB J* 15, 1971-1978.
- Kersten S**, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B and Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103, 1489-1498.
- King D**, Sun YH and Lingrel JB (1986) Amino acid sequence of the testosterone-regulated mouse kidney RP2 protein deduced from its complementary DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 14(13), 5159-5170.
- Kleinman KI**, Loewenstein L and Goldstein L (1966) Sex difference in the transport of p-aminohippurate by the rat kidney. *Endocrinology* 78, 403-406.
- Kletzien RF**, Clarke SD and Ulrich RG (1992) Enhance-

ment of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 41, 393-398.

Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K and Evans RM (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7355-7359.

Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC and Lehmann JM (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83(5), 813-819.

Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM and Lehmann JM (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4318-4326.

Knopf JL, Gallagher JF and Held WA (1983) Differential multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene family in the liver. *Mol Cell Biol* 3(12) 2232-2240.

Knudsen KE, Cavenee WK and Arden KC (1999) D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res* 59, 2297-2301.

Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T and Schatz G (1999) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2141-2146.

Koenig H, Goldstone A, Blume G, and Lu CY (1980) Testosterone mediated sexual dimorphism of mitochondria and lysosomes in mouse kidney proximal tubules. *Science* 209(4460), 1023-1026.

Kok T, Wolters H, Bloks VW, Havinga R, Jansen PL, Staels B and Kuipers F (2003) Induction of hepatic ABC transporter expression is part of the PPARalpha-mediated fasting response in the mouse. *Gastroenterology* 124, 160-171.

Komiya T, Rospert S, Schatz G and Mihara K (1997) Binding of mitochondrial precursor proteins to cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. *EMBO J* 16, 4267-4275.

Komiya T, Sakaguchi M and Mihara K (1996) Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria. *EMBO J* 15, 399-407.

Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG and Wahli W (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11(6), 779-791.

Krey G, Keller H, Mahfoudi A, Medin J, Ozato K, Dreyer C and Wahli W (1993) Xenopus peroxisome proliferator-activated receptor: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 65-73.

Kroetz DL, Yook P, Costet P, Biachi P and Pineau T (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem* 273, 31581-31589.

Krotkiewski M (2001) Value of VLCDD supplementation with medium-chain triglycerides. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 1393-1400.

L

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 (I) antigen hybrid gene *J Cell Sci* 104, 705-712.

Lain B, Iriarte A, Mattingley JL, Moreno JI and Martinez CM (1995) Structural features of the precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase responsible for binding to Hsp70. *J Biol Chem* 270, 2473-2739.

Lamb JF, Ingram CG, Johnston IA and Pitman RM (1988) Fundamentos de Fisiología, 2n ed., Ed. Acribia, pp 231-235.

Lee DK, Duan HO and Chang C (2000) From androgen receptor to the general transcription factor TFIID: identification of cdk activating kinase (CAK) as an androgen receptor NH2-terminal associated coactivator. *J Biol Chem* 275, 9308-9313.

Lee EJ, Kim HC, Cho YY, Byun SJ, Lim JM and Ryoo ZY (2005) Alternative promotion of the mouse acyl-CoA synthetase 6 (mAcsl6) gene mediates the expression of multiple transcripts with 5'-end heterogeneity: genetic organization of mAcsl6 variants. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 84-93.

Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R and Auwerx J (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in

C57BL/6J-APCMin⁺ mice. *Nat Med* 4, 1053-1057.

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM and Kliewer SA (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272, 3406-3410.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkinson WO, Willson TM and Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270, 12953-12956.

Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE and Auwerx J. (2000) Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* 19, 333-336.

Lemmen JG, Arends RJ, van Boxtel AL, van der Saag PT and van der Burg B (2004) Tissue- and time- dependent estrogen receptor activation in estrogen reporter mice. *J Mol Endocrinol* 32, 689-701.

Leone RC, Weinheimer CJ and Kelly DP (1999) A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7473-7478.

Lin H-K, Yeh S, Kang H-Y and Chang C (2001) Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7200-7205.

Lindén D, Alsterholm M, Wennbo H and Oscarsson J (2001) PPAR α deficiency increases secretion and serum levels of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 42, 1831-1840.

Lindpaintner K, Hilbert P, Ganten D, Nadal-Ginard B, Inagami T and Iwai N (1993) Molecular genetics of the SA-gene: cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. *J Hypertens* 11, 19-23.

Lithgow T, Ryan M, Anderson RL, Hoj PB and Hoogenraad NJ (1993) A constitutive form of heat-shock protein 70 is located in the outer membrane from rat liver. *FEBS Lett* 332, 277-281.

Litwack G and Norman AW (1997) Hormones 2nd ed, Academic Press, San Diego.

Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G and Sabolic I (2004) Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F124-F138.

Lu S, Liu M, Epner DE, Tsai SY and Tsai MJ (1999) Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Mol Endocrinol* 13(3), 376-384.

Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS and Wilson EM (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240 (4850), 327-330

Lund SD, Gallgher PM, Wang B, Porter SC and Ganschow RE (1991) Androgen responsiveness of the murine beta-glucuronidase gene is associated with nucleic hypersensitivity, protein binding, and haplotype-specific sequence diversity within intron 9. *Mol Cell Biol* 11(11), 5426-5434.

M

Ma J, Graves J, Bradbury JA, Zhao Y, Swope DL, King L, Qu W, Clark J, Myers P, Walker V, Lindzey J, Korak KS and Zeldin DC (2004) Regulation of mouse renal CYP2J5 expression by sex hormones. *Mol Pharmacol* 65, 730-743.

Madin SH and Darby Jr NB (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Bio Med* 98, 574-576.

Mandard S, Müller M and Kersten S (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor target genes. *Cell Mol Life Sci* 61, 393-416.

Mangelsdorf DJ, Thumel C, Beato M, Herrlich P, Shultz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M and Chambon P (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 93(6), 835-839.

Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B and Auwerx J (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPAR alpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272, 28210-28217.

Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P and Plutzky J (2002) PPAR activators as anti-inflammatory mediators in human T Lymphocytes-implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* 90, 703-710.

Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marreo PF, Hegardt FG and Haro D (1998) Control of human muscle-type carniti-

- ne palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273, 8560-8563.
- McCallister LP** and Page E (1973) Effects of thyroxin on ultrastructure of rat myocardial cells: a stereological study. *J Ultrastruct Res* 42, 136-155.
- McCarthy LC**, Terrett J, Davis ME, Knights CJ, Smith AL, Critcher R, Schmidt K, Hudson J, Spurr NK and Goodfellow PN (1997) A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. *Genome Res* 7, 1153-1161.
- McEwan IJ** and Gustafsson J (1997) Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIB. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8485-8490.
- Meertens LM**, Miyata KS, Cechetto JD, Rachubinski RA and Capone J (1998) A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPAR alpha. *EMBO J* 17, 6972-6978.
- Melià MJ**, 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, 688-695.
- Memon RA**, TEcott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C and Feingold KR (2000) Up-Regulation of Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARa) and PPARg messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPARg-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141, 4021-4031.
- Meseguer A** and Catterall JF (1987) Mouse kidney androgen-regulated protein messenger ribonucleic acid is expressed in the proximal convolute tubules. *Mol Endocrinol* 1(8), 535-541.
- Meseguer A** and Catterall JF (1990) Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control. *Mol Endocrinol* 4(8), 1240-1248.
- Meseguer A**, Watson CS and Catterall JF (1989) Nucleotide sequence of kidney androgen-regulated protein mRNA and its cell-specific expression in Tfm/Y mice. *Mol Endocrinol* 3(6), 962-967.
- Metges CC** and Wofram G (1991) Medium- and long-chain triglycerides labeled with ¹³C: a comparison of oxidation after oral or parenteral administration in humans. *J Nutr* 121, 31-36.
- Mignone F**, Gissi C, Liuni S and Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3, 4.
- Miles PDG**, Romeo OM, Higo K, et al (1997) RNF-alpha induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 46, 1678-1683.
- Mizzen LA**, Chang C, Garrels JI and Welch WJ (1989) Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the Hsp 70 family and Hsp58, a homolog of bacterial GroEL protein. *J Biol Chem* 264, 20664-20675.
- Moller DE** and Greene DA (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ agonists for diabetes, *In Drug Discovery-Advances in Protein Chemistry*, ed E Scolnick, pp 181-212. London: Harcourt.
- Mori M**, Muira M, Tatibana M and Cohen PP (1980) Characterization of a protease apparently involved in processing of pre-ornithine transcarbamylase of rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 7044-7048.
- Morsczech C**, Berger S and Plum G (2001) The macrophage-induced gene (mig) of Mycobacterium avium encodes a medium-chain acyl-coenzyme A synthetase. *Biochim Biophys Acta* 1521, 59-63.
- Motojima K**, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ and Latruffe N (1998) Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273, 16710-16714.
- Muerhoff AS**, Griffin KJ and Johnson EF (1992) The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibrate. *J Biol Chem* 267, 19051-19053.
- Mukherjee R**, Jow L, Noonan D and McDonnell DP (1994) Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51, 157-166.
- Murakami K** and Mori M (1990) Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. *EMBO J* 9, 3201-3208.
- Murakami K**, Tanase S, Morina Y and Mori M (1992) Presequence binding factor-dependent and-independent

import of proteins into mitochondria. *J Biol Chem* 297, 13119-13122

Murtha P, Tindall DJ and Young CY (1993) Androgen inductions of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochemistry* 32(25), 6459-6464.

N

Nabika T, Bonnardeaux A, James M, Julier C, Jeunemaitre X, Corvol P, Lathrop M and Soubrier F (1995) Evaluation of the SA locus in human hypertension. *Hypertension* 25, 6-13.

Nagata J, Kasai M, Watanabe S, Ikeda I and Saito M (2003) Effects of highly purified structured lipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid on lipid profiles in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(9), 1937-1943.

Nakajima T, Kamijo Y, Usuda N, Liang Y, Fukushima Y, Kametani K, Gonzalez FJ and Aoyama T (2000) Sex-dependent regulation of hepatic peroxisome proliferation in mice by trichloroethylene via peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *Carcinogenesis* 21, 677-682.

Nakshatri H and Bhat-Nakshatri P (1998) Multiple parameters determine the specificity of transcriptional response by nuclear receptors HNF-4, ARP-1, PPAR, RAR and RXR through common response elements. *Nucleic Acids Res* 26(10), 2491-2499.

Narita I, Saito N, Goto S, Shirasaki A, Morioka Y, Jin S, Omori K, Sakatsume M, Arakawa M and Gejyo F (2002) Role of genetic polymorphism in the SA gene on the blood pressure and prognosis of renal function in patients with immunoglobulin A nephropathy. *Hypertens Res* 25(6), 831-836.

Naylor DJ, Ryan MT, Condron R, Hoogenraad NJ and Hoj PB (1995) Affinity-purification and identification of mitochondrial GrpE homologues from mammalian sources. *Biochim Biophys Acta* 1248, 75-79.

Nelson BD, Luciakova K, Li R and Betina S (1995) The role of thyroid hormone and promoter diversity in the regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins. *Biochem Biophys Acta* 1271, 85-91.

Nelson SA and Robins DM (1997). Two distinct mechanisms elicit androgen-dependent expression of the mouse sex-limited protein mRNA in its cell-specific expression in Tfm/Y mice. *Mol Endocrinol* 3(6), 962-967.

Niidome T, Kiatada S, Shimobata K, Ogishima T and Ito

A (1994) Arginine residues in the extension peptide are required for cleavage of a precursor by mitochondrial processing peptidases. Demonstration using synthetic peptide as a substrate. *J Biol Chem* 269, 24719-24722.

Nishiki K, Ericinska M, Wilson DF and Cooper S (1978) Evaluation of oxidative phosphorylation in hearts from euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 235, C212-C219.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK and Milburn MV (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Nature* 395, 137-143.

Nuttal SD, Hanson BJ, Mori M and Hoogenraad NJ (1997) hTom34: a novel translocase for the import of proteins into human mitochondria. *DNA Cell Biol* 16, 1067-1074.

O

Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM and Ljung B (2001) Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 50, 1158-1165

Oberfield JL, Collins JL, Holmes CP, Goreham DM, Cooper JP, Cobb JE, Lenhard JM, Hull-Ryde EA, Mohr CP, Blanchard SG, Parks DJ, Moore LB, Lehmann JM, Plunket K, Miller AB, Milburn MV, Kliewer SA and Willson TM (1999) A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6102-6106.

Ogishima T, Niidome T, Shimokata K, Kitada S and Ito A (1995) Analysis of elements in the substrate required for processing by mitochondrial processing peptidases. *J Biol Chem* 270, 30322-30326.

Ohno Y, Tanase H, Nabika T, Otsuka K, Sasaki T, Suzawa T, Morii T, Yamori Y and Saruta T (2000) Selective genotyping with epistasis can be utilized for a major quantitative trait locus mapping in hypertension in rats. *Genetics* 155, 785-792.

Oikawa E, Iijima H, Suzuki T, Sasano H, Sato H, Kamataki A, Nagura H, Kang MJ, Fujino T, Suzuki H and Yamamoto TT (1998) A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cell and proliferating preadipocytes. *J Biochem* 124, 679-685.

Oka Y, Kobayakawa K, Nishizumi H, Miyamichi K, Hirose S, Tsuboi A and Sakano H (2003) O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-

specific manner. *Eur J Biochem* 270, 1995-2004.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptors superfamily. *Science* 270(5240), 1354-1357.

Oscarsson J and Edén S (1988) Sex differences in fatty acid composition of rat liver phosphatidylcholine are regulated by the plasma pattern of growth hormone. *Biochim Biophys Acta* 959, 280-287.

Osumi T, Wen JK and Hashimoto T (1991) Two cis-acting regulatory sequences in the peroxisome proliferator-responsive enhancer region of rat acyl-CoA oxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 175, 866-871.

Ou WJ, Ito A, Okazaki H and Omura T (1989) Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J* 8, 2605-2612.

Ouali F, Djouadi F and Bastin J (2002) Effects of fatty acids on mitochondrial beta-oxidation enzyme gene expression in renal cell lines. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(2), 328-234.

Ouali F, Djouadi F, Merlet-Bénichou C and Bastin J (1998) Dietary lipids regulate beta-oxidation enzyme gene expression in the developing rat kidney. *Am J Physiol* 275, F777-F784.

Ouali F, Djouadi F, Merlet-Bénichou C, Riveau B and Bastin J (2000) Regulation of fatty acid transport protein and mitochondrial and peroxisomal b-oxidation gene expression by fatty acids in developing rats. *Pediatr Res* 48, 691-696.

Ouar Z, Sole E, Bens M, Rafestin-Oblin ME, Meseguer A and Wandewalle A (1998) Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immoetalized mouse proximal tubule cells. Technical note. *Kidney Int* 53, 59-66.

P

Paek I and Axel R (1987) Glucocorticoid enhance stability of human growth hormone mRNA. *Mol Cell Biol* 7(4), 1496-1507.

Pajunen AE, Isomaa VV, Janne OA and Bardin CW (1982) Androgenic regulation of ornithine carboxylase activity in mouse kidney and its relationship to changes in cytosol and nuclear androgen receptor concentrations. *J Biol Chem* 257, 8190-8198.

Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Raucy JL and Johnson EF (1998) Peroxisome proliferator activated receptor-alpha

expression in human liver. *Mol Pharmacol* 53, 14-22.

Panet-Raymond V, Gottlieb B, Beitel LK, Pinsky L and Trifiro A (2000) Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transactivational properties. *Mol Cell Endocrinol* 167, 139-150.

Papamandjaris AA, White MD, Raicini-Sarjaz M and Jones PJ (2000) Endogenous fat oxidation during medium chain versus long chain triglyceride feeding in healthy women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 1158-1166.

Pascall JC (1997) Post-transcriptional regulation of gene expression by androgens: recent observations from the epidermal growth factor gene. *J Mol Endocrinol* 18(3), 177-180.

Patel HR, Thiara AS, Eest KP, Lodwick D and Samani NJ (1994) Increased expression of the SA gene in the kidney of the spontaneously hypertensive rat is localized to the proximal tubule. *J Hypertens* 12, 1347-1352.

Payvar F, Wrangle O, Carlstedt-Duke J, Okret S, Gustafsson JA and Yamamoto KR (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), 6628-663.

Pegorier JP, Duec PH, Herbin C, Laulan PY, Blade C, Peret J and Girard J (1988) Fatty acid metabolism in hepatocytes isolated from rats adapted to high fat diets containing long- or medium-chain triglycerides. *Biochem J* 249, 801-806.

Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD and Gonzalez FJ (2000) Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor β (δ). *Mol Cell Biol* 20, 5119-5128.

Pfanner N and Geissler A (2000) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 339-349.

Pfanner N and Meijer M (1997) Mitochondrial biogenesis: The TOM and TIM machine. *Current Biology* 7, R100-R103.

Pfanner N and Wiedemann N (2002) Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol* 14, 400-411.

Piña B, Bruggemeier V and Beato M (1990) Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* 60(5), 719-731.

Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F and Prince HM (2001) Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1840-1845.

Q

Quamby VE, Yarbrough WG, Lubahn DB, French FS and Wilson EM (1990). Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 4, 22-28.

R

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K and Granger JP (1999) Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats. Role of androgens and androgen receptor. *Hypertension* 34(part 2), 920-923.

Ren B, Thelen A and Jump DB (1996) Peroxisome proliferator-activated receptor α inhibits hepatic S14 gene transcription. Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor α as the mediator of polyunsaturated fatty acid regulation of S14 gene transcription. *J Biol Chem* 271, 17167-17173

Rennie PS, Bruchowsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA, Cheng H, Snoek R, Hamel A, Bock ME, Macdonald BS 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.

Reue K, Leff R and Breslow JL (1988) Human apolipoprotein C III gene expression is regulated by positive and negative cis-acting elements and tissue-specific protein factors. *J Biol Chem* 263, 6857-6864.

Revelli A, Massobrio M and Tesarik J (1998) Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19(1), 3-17.

Reyes JL, Melendez E, Alegria A and Jaramillo-Juarez F (1998). Influence of sex differences on the renal secretion of organic anions. *Endocrinology* 139(4), 1581-1587.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ and Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.

Rigatti R, Jia JH, Samani NJ and Eperon IC (2004) Exon repetition: a major pathway for processing mRNA of some genes is allele-specific. *Nucleic Acids Research* 32, 441-446.

Roche PJ, Hoare SA and Parker MG (1992) A consensus

DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 6(12), 2229-2235.

Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly JM and Chambon P (1997) Stimulation of RAR α activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90, 97-107.

Roeder RG (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-335.

Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FC and Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthetase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269, 18767-18772.

Rosignoli C, Nicolas JC, Jomard A and Michel S (2003) Involvement of the SREBP pathway in the mode of action of androgens in sebaceous glands in vivo. *Exp Dermatol* 12, 480-489.

Rothbauer U, Hofmann S, Mühlenbein N, Paschen SA, Gerbitz KD, Neupert W, Brunner M and Bauer MF (2001) Role of the DDP-1-hTim13 complex in import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 276, 37327-37334.

Rush GF, Newton JF and Hook JB (1983) Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: the role of intrarenal glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther* 227(3), 658-662.

Russell DW and Wilson JD (1994) Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63, 26-61.

Ryan MT, Hoogenraad NJ and Hoj PB (1994) Isolation of a cDNA clone specifying rat chaperonin 10, a stress-inducible mitochondrial matrix protein synthesized without a cleavable presequence. *FEBS Lett* 337, 152-156.

S

Saad Y, Garrett MR, Lee SJ, Dene H and Rapp JP (1999) Localization of a blood pressure QTL on rat chromosome 1 using Dahl rat congenic strains. *Physiol Genomics* 1, 119-125.

Samani NJ and Lodwick D (1995) SA gene and hypertension. *J Hum Hypertension* 9(6), 501-503.

Samani NJ, Lodwick D, Vincent M, Dubay C, Kaiser MA, Kelly MP, Lo M, Harris J, Sassard J, Lathrop M et al (1993) A gene differentially expressed in the kidney of the spontaneously hypertensive rat cosegregates with increased blood

pressure. *J Clin Invest* 92(2), 1099-1103.

Samani NJ, Whitmore SA, Kaiser MA, Harris J, See CG, Callen DF and Lodwick D (1994) Chromosomal assignment of the human SA gene to 16p13.11 and demonstration of its expression in the kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 862-868.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW and Meier CA (1996) The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137, 4499-4502.

Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shiner D and Rodan GA (1992) Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol* 6, 1634-1641.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B and Auwerx J (1996) PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15, 4336-4348.

Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T and Auwerx J (1995) Induction of the Acyl-Coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a Peroxisome Proliferator Response Element in the C promoter. *J Biol Chem* 270, 19269-19276.

Schwabe AD, Bennett LR and Bowman LP (1964) Octanoic acid absorption and oxidation in humans. *J Appl Physiol* 19, 335-337.

Seas IB, MacGinnite MA, Kovacs LG and Graves RA (1996) Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 16, 3410-3419.

Seki N, Moczko M, Nagase T, Zufall N, Ehmann B, Dietmeier K, Schafer E, Nomura N and Pfanner N (1995) A human homolog of the mitochondrial protein import receptor Mom19 can assemble with the yeast mitochondrial receptor complex. *FEBS Lett* 375, 307-310.

Seyle H (1939) The effect of testosterone in the kidney. *Journal of Urology* 42, 637-641.

Sheffield WP, Shore GC and Randall SK (1990) Mitochondrial precursor protein. Effects of 70-kilodalton heat shock protein on polypeptide foldins, aggregation, and import competence. *J Biol Chem* 265, 11069-11076.

Sheflin LG and Spaulding SW (2000) Testosterone and dihydrotestosterone regulate AUF1 isoforms in a tissue-specific fashion in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(1), E50-E57.

Sheflin LG, Zhang W and Spaulding SW (2001) Androgen regulates the level and subcellular distribution of the AU-rich ribonucleic acid-binding protein HuR both in vitro in vivo. *Endocrinology* 142(6), 2361-2368.

Sher T, Yi H-F, McBride OW and Gonzalez FJ (1993) cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598-5604.

Shild C, Claret FX, Wahli W and Wolffe AP (1993). A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the Xenopus vitellogenin B1 promoter in vitro. *Embo J* 12, 423-433.

Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W and Brunner M (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature (Lond)* 391, 912-915.

Sjöberg A, Oscarsson J, Borén J, Edén S and Olofsson SO (1996) Mode of growth hormone administration influences triacylglycerol synthesis and assembly of apolipoprotein B-containing lipoproteins in culture rat hepatocytes. *J Lipid Res* 37, 275-289.

Smith SA (2002) Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochem Society Transactions* 30, 1086-1090.

Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V and Svalstedt B (2001) Thiazolidinediones (PPAR γ agonists) but not PPAR α agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB J* 15, 215-220.

Smolen TN, Brewer JA and Weber WW (1993) Testosterone modulation of N-acetylation in mouse kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 264(2), 854-855.

Solé E, Calvo R, Obregon MJ 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(2), 2120-2129.

Solé E, Calvo R, Obregon MJ and Meseguer A (1996)

Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney. *Mol Cell Endocrinol* 119(2), 147-159.

Soler M, Tornavaca O, Sole E, Menoyo A, Hardy D, Catterall JF, 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 Pt3, 757-766.

Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai M and O'Malley BW (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 387, 194-198.

St Lezin E, Liu W, Wang JM, Wang N, Kren V, Krenova D, Musilova A, Zdobinska M, Zidek V, Lau D and Pravenec M (1997) Genetic isolation of a chromosome 1 region affecting blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 30(4), 854-858.

St Lezin E, Liu W, Wang JM, Yang Y, Qi N, Kren V, Zidek V, Kurtz TW and Pravenec M (2000) Genetic analysis of rat chromosome 1 and the SA gene in spontaneous hypertension. *Hypertension* 35[part 2], 225-230.

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J and Tedgui A (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393, 790-793.

Steinberg SJ, Morgenthaler J, Heinzer AK, Smith KD and Watkins PA (2000) Very long-chain Acyl-CoA synthetases. Human "Bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 275, 35162-35169.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS and Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.

St-Onge MP, Ross R, Parsons WD and Jones PJH (2003) Consumption of a functional oil containing medium chain triglycerides by overweight men increases energy. *Obes Res* 11, 395-402.

Stryer L (1995) Bioquímica. 4arta ed. Ed. REVERTÉ.

Stubbs RJ, Johnstone AM, Harbron CG and Reid C (1998) Covert manipulation of energy density of high carbohydrate diets in 'pseudo free-living' humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22, 8885-8892.

Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD (1999) A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 104, 383-389.

Sugden MC, Bulmer K, Gibbons GF and Holness MJ (2001) Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the mechanism underlying changes in renal pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 protein expression in starvation and after refeeding. *Arch Biochem Biophys* 395, 246-252.

Sugiyama H, Yamada J and Suga T (1994) Effects of testosterone, hypophysectomy and growth hormone treatment on clofibrate induction of peroxisomal β -oxidation in female rat liver. *Biochem Pharmacol* 47, 918-921.

Sul HS, Latasa MJ, Moon Y and Kim KH (2000) Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J Nutr* 130, 315S-320S.

Sundseth SS and Waxman DJ (1992) Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid ω -hydroxylases. Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *J Biol Chem* 267, 3915-3921.

Suzuki H, Kawarabayasi Y, Kondo J, Abe T, Nishikawa K, Kimura S, Hashimoto T and Yamamoto T (1990) Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 265, 8681-8685.

Suzuki H, Okazawa Y, Komiya T, Saeki K, Mekada E, Kitada S, Ito A and Mihara K (2000) Characterization of rat Tom40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 275, 37930-37936.

Suzuki H, Watanabe M, Fujino T and Yamamoto T (1995) Multiple promoters in rat acyl-CoA synthetase gene mediate differential expression of multiple transcripts with 5'-end heterogeneity. *J Biol Chem* 270, 9676-9682.

Svejstrup JQ, Vichi P and Egly JM (1996) The multiple roles of transcription/repair factor THIIIH. *Trends Biochem Sci* 21, 346-350.

Svoboda D, Azarnoff D and Reddy J (1969) Microbodies in experimentally altered cells. II. The relationship of microbody proliferator to endocrine glands. *J Cell Biol* 40, 734-746.

Swank RT, Davey R, Joyce L, Reid P and Macey MR

(1997) Differential effect of hypophysectomy on the synthesis of beta-glucuronidase and other androgen-inducible enzymes in mouse kidney. *Endocrinology* 100(2), 473-488.

Swinenn JV, Ulix W, Heyns W and Vehoeven G (1997) Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12975-1980.

Syken J, de-Medina T and Munger K (1999) T1D1 a human homolog of the Drosophila tumor suppressor 1(2) tid, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8499-8504.

Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N and Inagami T (1993) Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene. *J Hypertension* 11(9), 919-925.

T

Takenaka M, Imai E, Kaneko T, Ito T, Moriyama T, Yamauchi A, Hori M, Kwamoto S, and Okubo K (1998) Isolation of genes identified in mouse renal proximal tubule by comparing different gene expression profiles. *Kidney Int* 53, 562-572.

Tan JA, Marschke KB, Ho KC, Perry ST, Wilson EM and French FS (1992) Response elements of the androgen-regulated C3 gene. *J Biol Chem* 267, 4456-4466.

Tang PZ, Tsai-Morris CH and Dufau ML (2001) Cloning and characterization of a hormonally regulated rat long chain acyl-CoA synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6581-6586.

Terada K, Kanazawa M, Bukua B and Mori M (1997) The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase folding. *J Cell Biol* 139, 1089-1095.

Terada K and Mori M (2000) Human DnaJ homologs dj2 and dj3, and bag-1 are positive cochaperones of hsc70. *J Biol Chem* 275, 24728-24734.

Terada K, Ueda I, Ohtsuka K, Oda A, Ichiyama A and Mori M (1996) The requirement of heat shock cognate 70 protein for mitochondrial import varies among precursor proteins into and depends on precursor length. *Mol Cell Biol* 16, 6103-6109.

Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Mollen DE, Wright SD and Berger J (2000) Activation of peroxisome proli-

ferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol* 164, 1046-1054.

Thorp JM and Waring WS (1962) Modification and distribution of lipids by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate. *Nature* 194, 948-949.

Tisher CC and Madsen KM (1996) Anatomy of the kidney In: The Kidney (Brenner, BM,ed.), 5th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, vol.1, pp22-24.

Tontonoz P, Graves R, Budavari A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P and Spiegelman BM (1994)(1) Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucleic Acids Res* 22, 5628-5634.

Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG and Spiegelman BM (1995) PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15, 351-357.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI and Spiegelman BM (1994) mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8, 1224-1234.

Tontonoz P, Hu E and Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-1156.

Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM and Spiegelman BM (1997) Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 237-241.

Toole JJ, Hastie ND and Held WA (1979) An abundant androgen-regulated mRNA in the mouse kidney. *Cell* 17, 441-448.

Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E and Chambon P (1989) The human estrogen receptor has two independent non acidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477-487.

Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK and Rosenfeld MG (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-684.

Truss M, Bartsch J, Schelbert A, Hache RJG and Beato (1995) Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV

promoter in vivo. *EMBO J* 14, 1737-1751.

Tsai MJ and O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-486.

Tugwood JD, Isseman I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL and Green S (1992) The mouse peroxisome-proliferator-activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 11, 433-439

U

Urakami Y, Nakama 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), 339-342.

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), 173-176.

V

Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldani AV and Reddy JK (1996) Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 271, 2147-2155.

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), 2496-2502.

Vessey DA (2001) Isolation and preliminary characterization of the medium-chain fatty acid:CoA ligase responsible for activation of short- and medium-chain fatty acids in colonic mucosa from swine. *Dig Dis Sci* 46(2), 438-442.

Vessey DA and Kelley M (1997) Purification and partial sequencing of the XL-I form of xenobiotic-metabolizing medium chain fatty acid:CoA ligase from bovine liver mitochondria, and its homology with the essential hypertension protein. *Biochim Biophys Acta* 1346, 231-236.

Vessey DA, Kelley M and Warren RS (1999) Characterization of the CoA ligases of human liver mitochondria catalyzing the activation of short- and medium-chain fatty acids and xenobiotic carboxylic acids. *Biochim Biophys Acta* 1428, 455-462.

Vessey DA, Kelley M and Warren RS (2004) Characterization of Triacsin C inhibition of short-, medium-, and long-chain fatty Acid:CoA ligases of human liver. *J Biochem*

Mol Toxicol 18,100-106.

Vessey DA, Lau E, Kelley M and Warren RS (2003) Isolation, sequencing, and expression of a cDNA for the HXM-A form of xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase from human liver mitochondria. *J Biochem Mol Toxicol* 17, 1-6.

Von Lehmann B, Wan SH, Riegelman S and Becker C (1973) Renal contribution to overall metabolism of drugs. IV. Biotransformation of salicylic acid to salicylic acid in man. *J Pharm Sci* 62, 1483-1486.

Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B and Auwerx J (1995) Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 96, 741-750.

W

Wada J and Kanwar YS (1998) Characterization of mammalian translocase of inner mitochondrial membrane (Tim44) isolated from diabetic newborn mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 144-149.

Wahli W, Braissant O and Desvergne B (1995) Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol* 2, 261-266.

Walsh V, Somody L, Farrel A, Zhang B, Brown J, Pritchard C, Vincent M and Samani NJ (2003) Analysis of the role of the SA gene in blood pressures regulation by gene targeting. *Hypertension* 41, 1212-1218.

Watkins PA, Pevsner J and Steinberg SJ (1999) Human very long-chain acyl-CoA synthetase and two human homologs: initial characterization and relationship to fatty acid transport protein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60, 323-328.

Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM and Kliewer SA (2001) Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142, 1269-1277.

Wilkie GS, Dickson KS and Gray NK (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28(4), 182-188.

Williams SP and Sigler PB (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393,

392-396.

Willnow TE and Nykjaer A (2002) Pathways for kidney-specific uptake of the steroid hormone 25-hydroxyvitamine D3. *Curr Opin Lipidol* 13, 255-260.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD and Henke BR (2000) The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 43, 527-550.

Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA and Lehmann JM (1996) The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem* 39(3), 665-668.

Wilson CM and McPhaul (1996) A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Biol* 120, 51-57.

Winrow CJ, Kassam A, Miyata KS, Marcus SL, Hunter J, Capone JP and Rachubinski RA (1996) Interplay of the peroxisome proliferator-activated receptor and the thyroid hormone receptor-signaling pathways in regulating peroxisome proliferator-responsive genes. *Ann N Y Acad Sci* 804, 214-230.

Wolf DA, Herzinger T, Hermeking H, Blaschke D and Hertz W (1993). Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol* 7, 924-936

Wu FC (1997) Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin Chem* 43(7), 1282-1292.

X

Xhu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA and Milburn MV (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3, 397-403.

Y

Yamada J, Sakuma M, Ikeda T, Fukuda K and Suga T (1991) Characteristics of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator. *Biochim Biophys Acta* 1092, 233-243.

Yamazaki K, Kuromitsu J and Tanaka I (2002) Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1114-1122.

Yang T, Hassan A, Singh I, Smart A, Brosius FC, Holzman LB, Schnermann JB and Briggs JP (1996) SA gene expres-

sion in the proximal tubule of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 27(3 Pt 2), 541-551.

Yang T, Michele DE, Park J, Smart AM, Lin Z, Brosius III FC, Schnermann JB and Briggs JP (1999) Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney. *Am J Physiol* 277 (Renal Physiol 46), 966-973.

Yang WL and Frucht H (2001) Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 22, 1379-1383.

Yano M, Hoogenraad N, Terada K and Mori M (2000) Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria. *Mol Cell Biol* 20, 7205-7213.

Yano M, Kanazawa M, Terada K, Namchai C, Yamaizumi M, Hanson B, Hoogenraad N and Mori M (1997) Visualization of mitochondrial protein import in cultured mammalian cells with green fluorescent protein and effects of over expression of the human import receptor Tom20. *J Biol Chem* 272, 8459-8465.

Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R and Livingston DM (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10626-10631.

Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I and Yamamoto KR (1992) Roles of SW11, SW12 and SW13 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* 258, 1598-1604.

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M and Lazar MA (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270, 23975-23983.

Z

Zaid A, Li R, Luciakova K, Barath P, Nery S and Nelson BD (1999) On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr* 31, 129-135.

Zeng L, Liao H, Liu Y, Lee TS, Zhu M, Wang X, Stemberman MB, Zhu Y and Shyy JY (2004) Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem* 279, 48801-48807.

Zhang B, Marcus SL, Fereydoun GS, Alvares K, Janardan

KR, Subramani S, Rachubinski RA and Capone JP (1992) Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7541-7545.

Zhyvoloup A, Nemazanyy I, Panasyuk G, Valovka T, Fenton T, Rebholz H, Wang ML, Foxon R, Lyzogubov V, Usenlo V, Kyyamova R, Gobenko O, Matsuka G, Filonenko V and Gout IT (2003) Subcellular localization and regulation of coenzyme A synthetase. *J Biol Chem* 278, 50316-50321.

Zhou Z-X, Sar M, Simental JA, Lane MV and Wilson EM (1994) A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. *J Biol Chem* 269, 13115-13123.

Zhu Y, Qi C, Calandra C, Rao MS and Reddy JK (1996) Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr* 6, 185-195.

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS and Reddy JK (1997) Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 272, 25500-25506.

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS and Reddy JK (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7921-7925.

Zierath JR, Ryder JW, Doebber T, Woods J, Wu M, Ventre J, Li Z, McCrary, Berger J, Zhang B and Moller DE (1998) Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer action. *Endocrinology* 139, 5034-5041.

ANNEX

Sex steroid regulation and identification of different transcription units of the S_A gene in mouse kidney

Cristina Aresté, M Jesús Melià, Joan Isern, José Luis Tovar¹ and Anna Meseguer

Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

¹Servei de Nefrologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

(Requests for offprints should be addressed to A Meseguer; Email: ameseguer@vhebron.net)

Abstract

Although the S_A gene was first identified as a putative candidate gene to understand the molecular basis of hypertension in rat and humans, the concept has not been supported in recently generated S_A -null mice. We had first identified the mouse S_A gene on the basis of its strong androgenic regulation in mouse kidney and further characterized its genomic organization, transcription start site and chromosomal location. Northern blot, RT-PCR and *in situ* hybridization assays determined mouse strain, tissue distribution, sex-hormone dependence and cell expression of the S_A mRNA. Kidney and liver constitute the main expression sites of the S_A gene; in particular it is expressed in epithelial proximal tubule cells in the presence of androgens. This androgen-dependent expression is abrogated when estrogens are also present. By using the sensitive RT-PCR technique, minor S_A expression sites, corresponding to testes, stomach, heart and lung, have also appeared. Like in kidney, expression of the S_A

gene in heart and lung is androgen-dependent. Production of rabbit antibodies against S_A -synthetic peptides identified the S_A protein, a moiety of unknown function, which has been defined as a member of the acyl-CoA synthetase family. We have determined that the S_A protein follows the same distribution and regulation as its corresponding mRNA. Transient transfection assays followed by confocal microscopy identified the mitochondria of proximal tubule-derived PCT3 cells as the subcellular location of the S_A protein. Different transcriptional units produced by splicing events, occurring before the translation initiation site, have been identified from mouse kidney. This work provides the basis to further understand the molecular mechanisms that control the sex-steroid-dependent expression of the S_A gene in mouse kidney, heart and lung, where S_A is also expressed in an androgen-dependent manner.

Journal of Endocrinology (2004) **183**, 101–114

Introduction

Understanding the processes by which extracellular stimuli modulate the expression of specific genes in a temporal and/or tissue-specific manner is crucial for unravelling the molecular mechanisms underlying cellular growth, homeostasis, differentiation and development. The molecular nature of tissue-specific gene regulation by androgens has not been well defined, partly as a result of the variable expression and incomplete regulation of currently available gene models. To overcome this problem we aimed to establish more informative models by identifying alternative genes whose expression would be tightly and co-ordinately regulated by androgens. By means of the subtractive hybridization techniques of Random arbitrarily printed (RAP)-PCR and representative differential analysis of cDNA (cDNARDA) we isolated differentially expressed genes from kidneys of female C57BL/6 mice dosed with dihydrotestosterone

(DHT). In addition to well-characterized androgen-regulated genes (e.g. kidney androgen related protein), we demonstrated the differential expression of other genes previously not known to be under androgen control (Melià *et al.* 1998). Among them, and because the physiological significance of androgen-inducible gene expression in the kidney is quite unknown, we were particularly interested in the S_A gene, since it was initially identified on the basis of its marked overexpression in kidneys of spontaneously hypertensive rats compared with the normotensive Wistar-Kyoto rats (Iwai & Inagami 1991). S_A gene markers were subsequently shown to co-segregate with blood pressure (BP) in F₂ cohorts of different rat crossings (Iwai and Inagami 1992, Iwai *et al.* 1992, Harris *et al.* 1993, Lindpaintner *et al.* 1993). Other authors not only demonstrated co-segregation of the gene with BP, but also that genotype at the S_A locus determined the level of expression of the S_A mRNA in kidney (Samani *et al.* 1993, Kaiser *et al.* 1994). Further evidence of its putative

association with BP was provided by mapping the S_A locus on to the chromosome 1 linkage group (Lindpaintner *et al.* 1993), a well-characterized chromosomal region that contains several genes of potential relevance to cardiovascular function that is syntenic to the human chromosome 16, where the S_A gene was also mapped (Samani *et al.* 1994). Although association between a polymorphism at the S_A locus and hypertension has remained controversial (Iwai *et al.* 1994, Harrap *et al.* 1995), it has recently been reported that different alleles of the S_A gene are associated with multiple risk factors including hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, obesity and hypertension (Iwai *et al.* 2002). A genetic polymorphism in the S_A gene has also been related to BP and prognosis of renal function in patients with immunoglobulin A nephropathy (Narita *et al.* 2002). Finally, the S_A locus has been found positively linked with loci regulating water and sodium metabolism and membrane ion transport in essential hypertension (Chu *et al.* 2002). Different reports on chromosome-transfer studies in congenic strains, to isolate chromosome regions that contain the BP quantitative trait locus (QTL) in the region around the S_A gene from different rat strains, have also provided controversial data (St Lezin *et al.* 1997, Frantz *et al.* 1998, Iwai *et al.* 1998, Hübner *et al.* 1999, Saad *et al.* 1999, St Lezin *et al.* 2000, Frantz *et al.* 2001). In a recent paper, Walsh *et al.* (2003) have shown direct evidence of the lack of S_A involvement in the regulation of either basal or salt-related BP in S_A -null mice, demonstrating that the absence of differential BP in these animals is not the consequence of compensatory activation of the renin-angiotensin system.

The S_A -encoded protein is significantly homologous to bovine xenobiotic-metabolizing medium-chain fatty acid:CoA ligase (Vessey & Kelley 1997) and recent studies have identified the S_A protein as a medium-chain acyl-CoA synthetase (MACS; Fujino *et al.* 2001a, 2001b). Acetyl-CoA synthetase (ACS; also called acetate-CoA ligase) is an enzyme of energy metabolism known to be present in mitochondria and responsible for acetate production accompanied by ATP generation. The S_A and ACS genes probably derived from duplication of an ancestral gene, but acquired different functions (Karan *et al.* 2001) which are not completely understood for the S_A gene. It remains important to understand the physiological function of this highly restricted tissue-specific gene to gain insight into the physiological effects of sexual steroids in the kidney. In this report, we further explored the tissue distribution and sex-steroid regulation of the mouse S_A gene and compared them with the protein profile obtained using specific antibodies raised against S_A -derived synthetic peptides. Moreover, we determined the genomic organization of the mouse S_A gene and identified its transcription start units. This work forms the basis for further study of molecular mechanisms that control the androgen-dependent and kidney-restricted expression of the mouse S_A gene.

Materials and Methods

Animals and treatments

C57BL/6, BALB/c and 129/SvJ mice were obtained from IFFA CREDO (L'Arbresle, France) at 6 weeks of age and housed in animal facilities as described elsewhere (Melià *et al.* 1998). Male mice were castrated at the age of 8 weeks under droperidol and midazolam anesthesia and allowed to recover for 1 week post-surgery. Male and castrated mice were treated for 6 weeks with DHT and 17- β -estradiol (Sigma) with subcutaneous injections of 120 and 240 μ g/day, respectively. Control mice received vehicle alone (95% sesame oil/5% ethanol). After treatment, animals were killed by cervical dislocation. Several tissues were collected and immediately frozen in liquid N₂.

RNA extraction and Northern blot analysis

Total RNA was extracted from different tissues using the guanidium thiocyanate/acid phenol method (Chomczynski & Sacchi 1987). Total RNA (15 μ g) was electrophoresed in 6.5% formaldehyde/1.4% agarose gel, transferred to ZetaProbe membranes (Bio-Rad) and hybridized at 42 °C overnight with random-primed [α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech)-labeled cDNA probes, washed following the membrane manufacturer's instructions and exposed to Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech). A probe corresponding to cDNA of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as an internal control on each hybridization. Where noted, band intensity was measured by densitometric scanning of the resultant autoradiograph using the Bio-Rad GS700 image densitometer and Molecular Analyst 1.40 program.

RT-PCR and Southern blotting

Total RNA from various tissues of male 129/SvJ mice was isolated using the total RNA preparation kit (Qiagen) and subjected to RT-PCR analysis. A total amount of 500 ng of each tissue was reverse-transcribed using specific primers (see Table 1) and the SuperScript One-Step system (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. RT-PCRs were performed under linear conditions with respect to RNA input and the number of amplification cycles. PCRs using SA1 and SA2 primers were determined as linear for 25 cycles and those performed with primers E1', E1, E2, E3 and E4 were determined as linear for 35 cycles. Cyclophilin A was amplified as a control for RNA amount and integrity. Amplification products were separated on 2% agarose gel and transferred to ZetaProbe membranes (Bio-Rad). The blots were probed with specific random primed [α -³²P]dCTP-labeled cDNA. Hybridization, washes and exposure were performed as above.

Table 1 Specific primers used in S_A fragment amplification

Primer name	Orientation	Sequences
E1'	Upper	5'-GATCCACCACCAACTAAA-3'
E1	Upper	5'-GTACTATCACTCCAGCTGTG-3'
E2	Lower	5'-GTGCATAATCTTTAGGTCCC-3'
E3	Lower	5'-GGCTAGGCATCATGCTGATG-3'
E4	Lower	5'-GAAAACACCTAGCACGGAG-3'
SA1	Upper	5'-gtcgacGATGTTACTCCGTGC-3'
SA2	Lower	5'-gtcgacAGTGATTAGTGGGAGGAG-3'

Amplified products were subcloned into the TopoTA cloning pCR2.1 vector (Invitrogen) and sequenced in both directions.

Synthesis of riboprobes and in situ hybridization histochemistry

^{35}S -labeled sense and antisense transcripts from a Bluescript plasmid containing 148 bp fragment of the mouse S_A cDNA were prepared as previously described (Melià *et al.* 1998). Preparation of renal sections, hybridization protocol and autoradiographic analysis were all performed as reported (Meseguer & Catterall 1990, 1992).

Primer-extension analysis

Two S_A -specific primers, located within the 5' region of the cDNA – E4, 4–24 upstream, and E3, 109–89 downstream from the ATG initiating codon – were end-labeled with [γ - ^{32}P]ATP. Labeled primer (200 fmol) was annealed to 15 μg mouse kidney total RNA in a 12 μl reaction by heating at 90 °C for 2 min and then cooling to 58 °C at 1 °C/min. The annealing reaction was held at 58 °C for 30 min then snap-chilled on ice. Annealed primers were extended at 42 °C for 2 h by the addition of 200 U of Superscript II reverse transcriptase (Gibco-BRL), 1 μl RNasin, 1 μl 10 mM dNTPs, 4 μl 5 \times first-strand reaction buffer and nuclease-free water to 20 μl . The reaction was terminated by the addition of 3 μl 0.2 M EDTA (pH 8.0), and the RNA was degraded by the addition of 1 μl RNase A followed by incubation at 37 °C for 30 min. The primer-extension reaction was then ethanol-precipitated and the pellet resuspended in 5 μl loading buffer. Samples were heated at 75 °C for 10 min prior to loading on a sequencing gel. A sequencing reaction for comparison with the primer-extension product was performed with the Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (USB, Cleveland, OH, USA) according to the manufacturer's protocol. The SeqSa6 low primer was used as a template. Labeled cDNAs were

separated through a 6% polyacrylamide/8 M urea gel. Dried gel was exposed to Kodak X-Omat AR film for 48 h at –80 °C.

Intron/exon mapping

A 129/SvJ mouse genomic library Lambda FIX II vector (Stratagene) was screened with a 2.0 kb probe corresponding to mouse S_A full-length cDNA. Briefly, approximately 500 000 independent clones were plated and transferred to nitrocellulose membranes (Duralose-UV, Stratagene, Saint Quentin en Yvelines, France). Prehybridization was carried out for a minimum of 2 h at 42 °C in the same hybridization buffer consisting of 50% formamide, 2 \times Pipes, 0.5% SDS and salmon sperm DNA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). ^{32}P -random primed labeled probe was added to the hybridization solution (1 \times 10⁶ c.p.m./ml) and incubated overnight at 42 °C. The next day, filters were washed twice in 1 \times SSC/0.1% SDS for 5 min at room temperature, followed by three high-stringency washes in 0.1 \times SSC/0.1% SDS for 15 min at 65 °C. Plaque filters were then exposed to autoradiographic films (X-Omat; Kodak) at –70 °C for approximately 20 h. Positive plaques were identified and after four further rounds of purification of phage DNA, five genomic clones – designated λSA1 , λSA2 , λSA3 , λSA4 and λSA5 – were isolated. Genomic DNA from positive clones was isolated with the QIAGEN Lambda MiniKit and Maxi Kit. Double-stranded DNA was sequenced using ABI Prism Big Dye terminator chemistry (PE Applied Biosystems). Exon sizes were determined by nucleotide sequencing and intron sizes determined by either nucleotide sequencing or estimation from the size of the corresponding PCR-generated DNA fragments using exon-specific primers.

Production of anti- S_A polyclonal antibodies

A short peptide, pSA, corresponding to amino acids NH₂-CGNFKGMKIKPGSMGK-COOH from position 380 to 395, was selected on the basis of its putative immunogenicity and synthesized in the Servei de Síntesi

de Pèptids, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. Two New Zealand male rabbits (261 and 262) were immunized on days 0, 14 and 28 and boosted at days 55 and 84 with 200 µg doses of pSA peptide conjugated with keyhole limpet hemocyanin. Antisera containing the anti-peptide antibody were tested by Western blot.

Western blot analysis

Tissues were homogenized by N_2 cavitation in RIPA buffer (0.5% Na-deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS and protease inhibitors in $1 \times$ PBS). For Western blot analysis, samples were normalized for protein concentration using the Bradford assay (Bio-Rad), adjusted for equal protein levels, and separated on 10% polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions. Proteins were transferred to PVDF (Shleicher & Schuell) membranes and blots blocked overnight at 4 °C in 5% non-fat dried milk in PBS. Primary polyclonal antibodies were tested at different concentrations; the best results were obtained with the 261 antiserum diluted at 1:350 in blocking buffer. Washes were performed following the membrane manufacturer's instructions and secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit; Dako A/S), diluted 1:5000, incubated for 1 h at room temperature. After washing, bands were detected using the ECL+ chemiluminescence detection method (Amersham Pharmacia Biotech) and exposed to Hyperfilm.

Cell culture and transfection assays

Proximal convoluted tubule cells PKSV-PCT (PCT3 clone) were cultured as described previously (Lacave *et al.* 1993, Soler *et al.* 2002). The pFLAG-CMV-5a-SA construct was obtained by cloning the open reading frame of the mouse S_A cDNA in the Sall site of the pFLAG-CMV-5a expression vector from Sigma.

Transient transfections were performed using LipofectAMINE PLUS reagent kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded at 8×10^5 cells in a 60 mm dish and transfected 18 h later with 6 µg of the pFLAG-CMV-5a-SA construct. The DNA-liposome mixture was added to cell culture dishes containing an appropriate volume of OPTIMEM I Reduced Serum Medium (Life Technologies). At 3 h of incubation at 37 °C, complete fresh medium was added. Twenty-four hours after transfection, cells were trypsinized and seeded onto glass slides for immunocytochemistry assays.

Immunofluorescence analyses

Trypsinized transfected cells were grown on glass slides for 24 h. After two washes in cold Tris-buffered saline (TBS), cells were fixed in cold acetone/methanol (1:1) for 1 min

and washed again in TBS three times. Slides were incubated for 1 h at room temperature with 10 µg/ml anti-FLAG primary antibody (Sigma) in TBS buffer. Upon washing, cells were incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody (FITC-conjugated goat anti-mouse Fab-specific; Sigma) diluted 1:200. Slides were dehydrated and mounted in Aquatex (Merck). Fluorescence labeling was visualized using a Leica DM IRBE confocal microscope.

Mitochondrion-specific staining

For mitochondrial location, living cells grown on glass slides were incubated for 90 min at 37 °C with 500 nM MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) diluted in complete medium. MitoTracker-loaded cells were fixed in cold acetone/methanol (1:1) for 1 min, washed and visualized under a Leica DM IRBE confocal microscope.

Results

Androgen-dependent expression and cell specificity of the S_A gene in different mouse strains

An initial report from our laboratory first described the mouse counterpart of human and rat S_A genes (GenBank accession number AF068246) on the basis of their profound androgenic regulation, at the mRNA level in mouse kidney (Melià *et al.* 1998). Since S_A gene expression in rat kidney was not completely prevented by castration (MJ Melià & A Meseguer, unpublished observations), we wondered whether the strong androgenic control observed in mice was a general phenomenon in mice or an isolated event occurring in the C57BL/6 strain used. Northern blot assays of kidney RNA from castrated and control C57BL/6, 129/SvJ and Balb/c male mice showed that S_A expression is not completely abolished in castrated males but perhaps only undetectable using Northern blot analysis (Fig. 1A). Moreover, *in situ* hybridization of frozen kidney sections using sense- and antisense-specific probes demonstrated that this gene is expressed in epithelial cells of the early (S1 and S2) and late (S3) segments of proximal convoluted tubules (Fig. 1B), as determined by periodic acid shift counterstaining (results not shown). S_A mRNA was first located in the rat proximal tubule by Samani's group using *in situ* hybridization (Patel *et al.* 1994) and by Yang *et al.* (1996) using RT-PCR in cDNAs prepared from microdissected nephron segments. While in intact mice the first report on S_A mRNA location was made by Takanaka *et al.* (1998), we demonstrate here that castration prevents expression in all segments of the tubules and DHT replacement restores the expression in castrated mice.

Distribution and androgen regulation of S_A mRNA in mouse tissues

Although tissue specificity of S_A mRNA has previously been stated (Melià *et al.* 1998), the more-sensitive

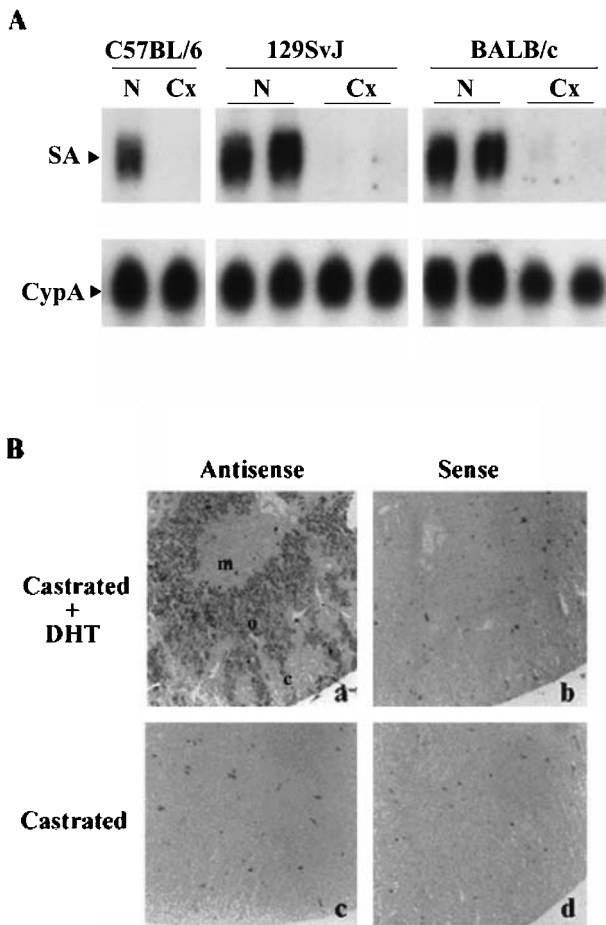


Figure 1 (A) Northern blot analysis of S_A mRNA in kidneys of different inbred mouse strains. Total RNA (15 μ g) from intact (N) and castrated (Cx) male kidneys of C57BL/6, 129/SvJ and BALB/c strains was electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with mouse S_A cDNA under the conditions described in the Materials and Methods section. A mouse cyclophilin A probe was used as an internal control for loading and integrity of RNA. A single 3.0 kb transcript was significantly detected only in intact males in all three mouse strains tested. (B) *In situ* hybridization analysis of S_A mRNA in mouse kidney. Longitudinal kidney sections from castrated males treated with pharmacological doses of DHT (a and b) and castrated males (c and d) were hybridized with strand-specific 35 S-labeled RNA probes (antisense, a and c; sense, b and d). After hybridization, sections were exposed to photographic emulsion for 4 weeks. After developing, slides were mounted and examined under a light microscope. The magnification chosen ($\times 25$) allows visualization of the three major compartments of the kidney (c, cortex; o, outer medulla; m, inner medulla; see A) and determination of the spatial location of S_A mRNA. Kidney sections shown in the panels were each analyzed in a single experiment. Consequently, slides were exposed to the same conditions throughout the procedure, and levels of S_A mRNA expression on different slides were comparable. Photomicrographs shown in this figure were selected from similar results obtained in different experiments using animals from different litters.

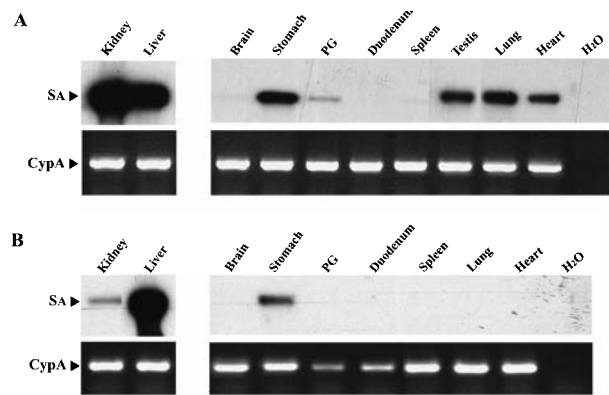


Figure 2 Tissue distribution of S_A mRNA expression. (A) Expression profile of S_A in intact male mouse tissues analyzed by RT-PCR. Total RNA (500 ng) from various murine tissues (indicated at the top) was reverse-transcribed and PCR-amplified using specific S_A primers (S_{A1} and S_{A2} ; see Table 1). As an internal control, mouse cyclophilin A (CypA) primers were used in (B). Expression profile of S_A in castrated male mouse tissues analyzed by RT-PCR, under the same experimental conditions described in (A).

RT-PCR/Southern blot technique was used and distribution of S_A mRNA determined in a wider panel of tissues including kidney, liver, brain, stomach, prepuccial gland, duodenum, spleen, testis, lung and heart. Results in Fig. 2A, showing a saturated image on X-ray film after 3 h exposure (left-hand panel), corroborate the concept that kidney and liver tissues are those where the S_A gene is expressed preferentially. Moreover, expression in stomach, testis, lung and heart was also detected on overnight exposure of the autoradiographic film (Fig. 2A, right-hand panel), and was completely neglected in brain, duodenum and spleen. While Northern blot assays were sensitive enough to detect expression in liver, testes and brain in rat tissues (Iwai and Inagami 1991, Kaiser *et al.* 1994), no expression in brain was observed in mice by RT-PCR. Although kidney and liver remain the preferential expression sites for the S_A gene, our results demonstrate that it exhibits tissue distribution wider than that reported previously in mice (Melià *et al.* 1998). Some assays performed in castrated male mice indicate that the S_A gene appears to be under androgenic control not only in kidney but also in heart and lung. The liver and stomach appear to express the gene in an androgen-independent manner (Fig. 2B).

Estrogenic effects on S_A expression in kidney and liver

We aimed to determine whether estrogens could also exert an effect on S_A gene expression. To do so, we performed Northern blot assays using total RNA from kidneys and livers of mice treated with DHT, estrogens or both hormones simultaneously and compared S_A expression levels with those obtained in untreated control animals. Results were normalized with the endogenous

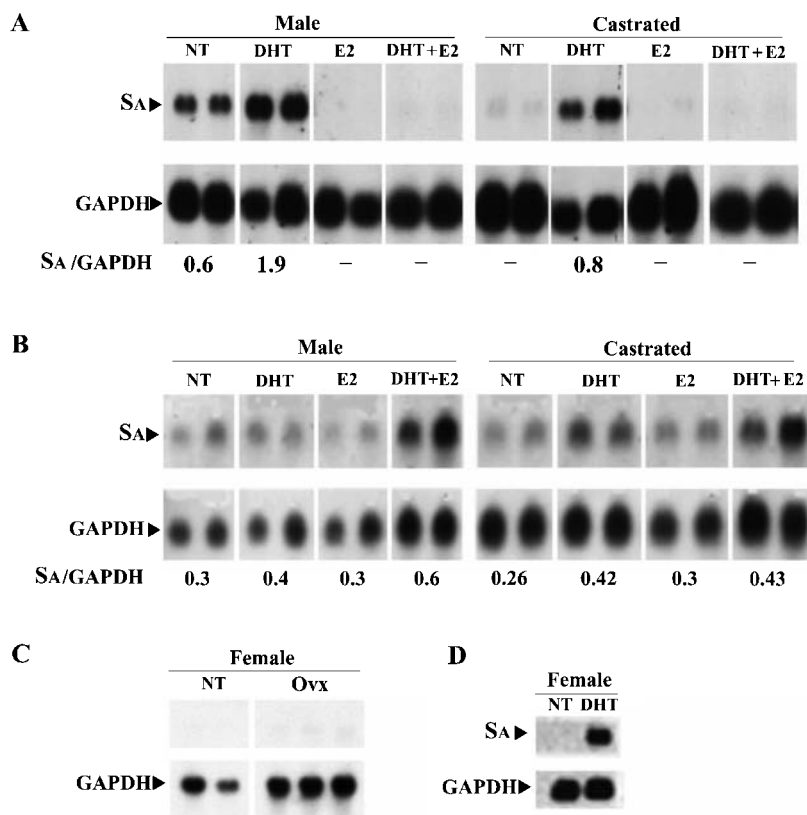


Figure 3 Effects of sex steroid hormones on S_A mRNA expression in mouse kidney and liver total RNA (15 μ g) from kidneys (A) and livers (B) of intact non-treated males (NT), or males treated with pharmacological doses of DHT (DHT), estrogens (E2) and both hormones together (DHT+E2; left-hand panel), and similar samples obtained from castrated male mice under the same hormonal treatments (right-hand panel) were electrophoresed and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with mouse S_A cDNA under the conditions described in the Materials and Methods section. A mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) probe was used as an internal control for loading and integrity of RNA. Non-saturated autoradiographs were analyzed by densitometry and the ratios between S_A and the *GAPDH* internal control gene were calculated as shown under each lane. Samples from kidneys of intact non-treated (NT) and ovariectomized (Ovx) (C) or intact non-treated (NT) and DHT-treated females (DHT) (D) were analyzed using the same experimental procedure described for (A) and (B).

control *GAPDH* gene and densitometric analysis performed in non-saturated X-ray films. The S_A /*GAPDH* ratios expressed in arbitrary units are depicted at the bottom of Fig. 3A. The same treatments and assays were also made in castrated male mice (Fig. 3A). Results from these experiments revealed that pharmacological doses of DHT can induce further expression of the S_A gene in untreated control male mice and that levels in castrated males are restored upon treatment, which indicates that the gene responds to androgens in a dose-dependent manner. Estrogenic treatment of control males or DHT-induced intact male mice resulted in a very drastic down-regulating effect on S_A mRNA expression, even in the presence of pharmacological doses of androgens (Fig. 3A).

Expression of S_A mRNA in liver was completely independent of steroid hormones, as neither castration nor induction with pharmacological doses of DHT and/or estrogens modified the levels attained by control male mice (Fig. 3B). Since estrogens exerted a powerful negative effect on S_A kidney expression, we wondered whether an estrogenic-dependent repression was responsible for the lack of expression in female kidney (Melià *et al.* 1998).

Ovariectomized females failed to express the S_A gene in kidney (Fig. 3C) and respond to DHT stimulation (Fig. 3D), indicating that although estrogens can repress the gene, its kidney expression is fully androgen-dependent. Previous data from our laboratory demonstrated that the effects are mediated by the androgen receptor since



Figure 4 Genomic structure of the murine S_A gene. Schematic representation of the S_A gene. Exons (numbered 1–16) are represented by boxes and oblique-horizontal lines indicate intronic regions (numbered I–XV). White and black boxes represent untranslated and protein-coding regions, respectively.

flutamide-treated mice do not express the gene (Melià *et al.* 1998). These results indicate that there are tissue-specific mechanisms underlying S_A expression and, therefore, that this gene constitutes an excellent model for understanding the basis of androgen regulation of specific gene expression in kidney.

Genomic organization of the mouse S_A gene and identification of different S_A transcriptional units

As an initial approach to elucidating the mechanisms regulating S_A gene expression, we identified genomic clones through screening a mouse genomic library, using its full-length cDNA as a probe and characterized transcription units of the mouse S_A gene. Several positive clones were isolated, cloned until homogeneity and sequenced with specific primers derived from the cDNA sequence of the gene. The genomic structure and intron/exon organization of the mouse S_A gene are shown in Fig. 4 and Table 2, respectively. The gene spans approximately 23 kb and consists of 16 exons and 15 introns (Fig. 4) and has been annotated at mouse chromosome 7 (ENSMUSG00000030935) at the Ensemble Genome Browser. The translation initiation site is present in exon 4. Exon sizes range from 69 to 274 bp, with the exception of exon 16, which is 616 bp and contains the TAG stop codon and 3' untranslated region, including the polyadenylation signal. The size of the introns was deter-

mined by either direct DNA sequencing or long-distance PCR with exon-specific primers; in some cases, alignment with mouse genomic traces from the mouse genome sequencing database was also used to verify and determine the length of some introns. All exon/intron boundaries conform to canonical splice donor and acceptor consensus AG–GT sequences (Mount 1982). The transcription initiation site of the S_A gene was mapped by primer extension and 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends). For primer extension, a pair of reverse primers was tested (E3 and E4; see Table 1), complementary to the third and fourth exons, respectively. Primer E3, situated 89 nucleotides from the translation initiation ATG codon, rendered three products of 132, 167 and 259 nt which indicated the existence of three transcription start sites, with the smallest being the most prominent, mainly in the 129/SvJ strain (Fig. 5A). Results were confirmed using primer E4, which gave a single product of 240 bp corresponding to the 132 site obtained with E3. Results were the same in both mouse strains. From these experiments we located three major potential transcription start sites at 221, 256 and 348 bp upstream from the translation initiation ATG codon. The right-hand panel of Fig. 5A depicts the transcriptional units obtained by primer extension that were further confirmed by 5'-RACE. Sequencing of the products revealed that the previously cloned cDNA (Accession number AF068246) corresponds to the 167 product; the 259 band includes 35 bp from the 5' site of

Table 2 Genomic organization of murine S_A gene

Exon	Exon Size (bp)	5'-Splice donor	Intron Size (bp)	Intron	Intron 3'-Splice receptor	Exon
1	132	...TT TCC TGG / gtaagact...	4000	i	...ctcaacag / GCA ATG GA...	2
2	208	...CC ACT TGG / gtgagtg...	316	ii	...tcttgca / GTG AAA GA...	3
3	148	...AG ATC CAT / gtaagaag...	834	iii	...gtctttaa / CTG GAT TA...	4
4	274	...TG GAA AAG / gtaaggag...	626	iv	...cctccta / GCT GGA AC...	5
5	210	...CT CAA CAG / gtaagtat...	4714	v	...ttcctcta / GGA CAG TA...	6
6	218	...AT GAT GAA / gtgagtac...	618	vi	...cttcacag / ATA TGC CA...	7
7	145	...TG GAA GGT / attttccc...	600	vii	...ttatattc / AGG TTC TG...	8
8	155	...TC TTG CAA / gtaaggca...	244	viii	...aactgcag / ACC CTC TC...	9
9	69	...GA ATG ACA / aaaaaaaa...	1700	ix	...attggaga / AGC TAT AA...	10
10	126	...CA GAA ACG / gtacctgc...	1202	x	...ttgcttag / GTG CTG AT...	11
11	80	...AT GTG AAG / gtttgaat...	1144	xi	...tattctag / ATT TTA GC...	12
12	102	...AT TAT GTA / gtaagagc...	923	xii	...ttttgcag / GAT AAT CC...	13
13	128	...TC TTC TGG / gtaatttc...	90	xiii	...tttcctag / TTA CCG AA...	14
14	100	...GA GGA GAG / gtgaaac...	2782	xiv	...cttctta / AGG TAG TA...	15
15	121	...CC AGA AAG / gtaggcgt...	304	xv	...accaacag / GAT GAA TT...	16
16	616					

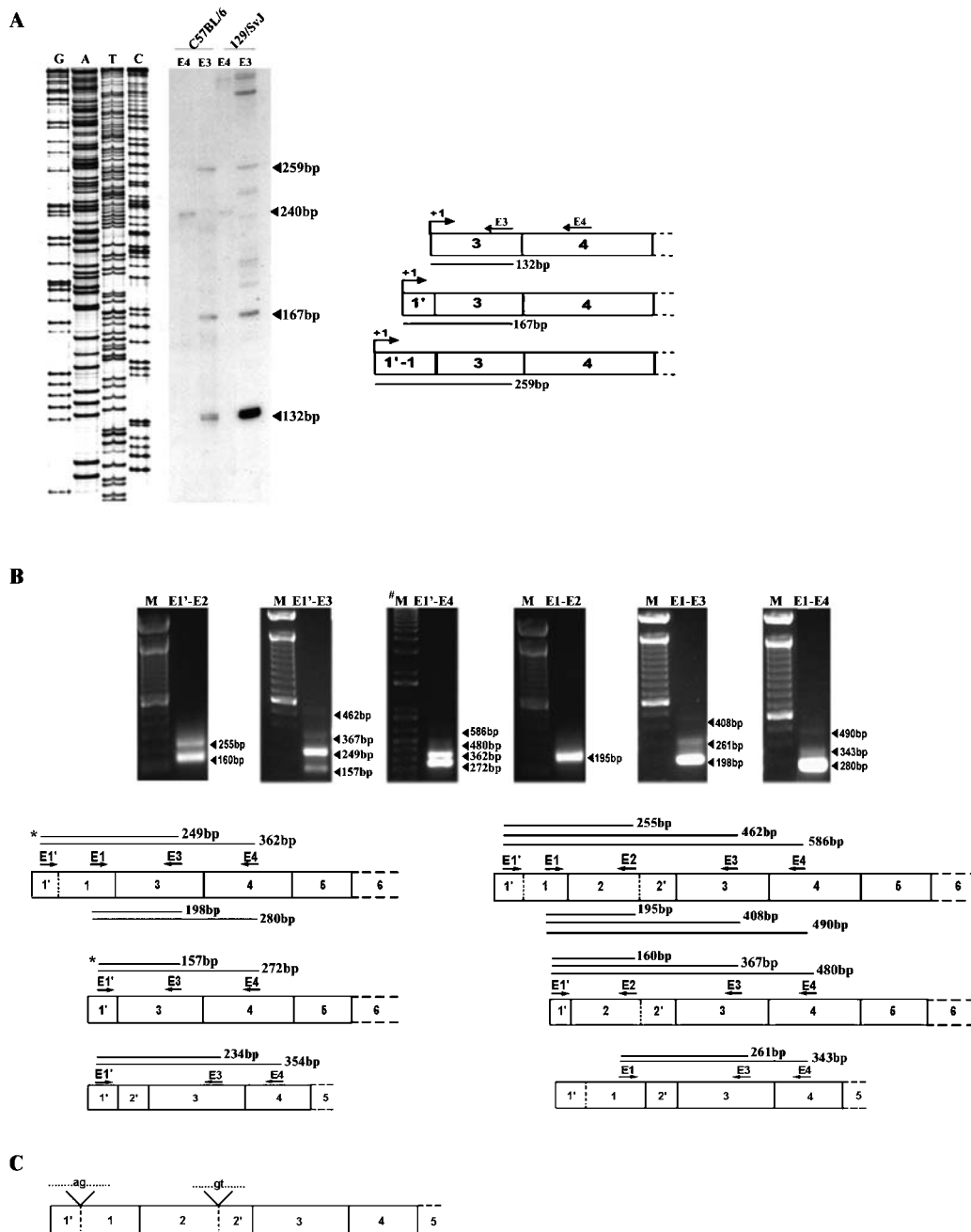


Figure 5 Identification of the transcriptional start sites of the mouse *S_A* gene. (A) The nucleotide sequence flanking the transcription initiation sites is illustrated on the left, with transcription initiation sites obtained by primer extension (arrowheads). The arrows represent the major transcription start sites common to C57BL/6 and 129/SvJ mouse strains as mapped by primer extension, obtained using primers E3 and E4 and mouse kidney total RNA as a template. The sizes of the extended bands are indicated. For further details see the Materials and Methods section. The right-hand side of the figure shows the three major forms and the nature of the exons included. (B) RT-PCR amplification of the mRNAs of mouse kidney *S_A*. PCR products were obtained using six sets of primers, E1'-E2, E1'-E3, E1'-E4, E1-E2, E1-E3 and E1-E4. Representative agarose gels of PCR products obtained with the six sets of primers are shown at the top of the figure. M indicates the molecular DNA markers used (M is 100 bp and #M is 1 kb ladder markers from Invitrogen). A schematic representation of the possible origin of PCR products appears at the bottom. Arrows indicate the annealing regions of the PCR primers, lines above indicate the sizes for the different moieties obtained upon cloning and sequencing of the PCR products. (C) Schematic representation of the splicing cryptic sites found in exons 1 and 2 of the *S_A* gene.

exon 1 (also present in the 167 and named for convenience 1') and an additional 92 bp situated further down from 1' that complete the entire exon 1. This new form was also deposited in the GenBank database under accession number AY064696.

Apart from the transcripts obtained in our laboratory, other authors identified a new unit of S_A cDNA, which included 208 bp of exon 2 and no sequences from exon 1 (accession number BC015248). At that point, we aimed to determine whether other S_A mRNA products could also exist in our kidney mRNA samples. By performing RT-PCR assays using different sets of primers, indicated at the top of each gel (Fig. 5B, upper panel), we obtained a variety of products that upon cloning and sequencing revealed an even more complex organization of the 5' untranslated region of the S_A gene. There are two forms on the lower panel of Fig. 5B that correspond to the 167 and 259 fragments of Fig. 5A (marked with an asterisk). Both forms have skipped exon 2 and contain either the full exon 1 (1'-1), or exon 1' Apart from these forms, we obtained four new products which show different combinations of exons 1, 2, 1' and 2' (the latter corresponds to the 63 bp from the most 3' part of exon 2), followed by exons 3 and 4. These splicing variants are generated from canonical splice donor and acceptor consensus AG-GT sequences located in exons 1 and 2 of the S_A gene that define the boundaries between exon 1'-1 and exon 2-2' (Fig. 5C). By comparing the genomic structure and intron/exon organization of the mouse S_A gene (see Fig. 4 and Table 2) with rat S_A genomic sequences (GenBank accession number AY456695) we have observed as the main difference that the rat gene is lacking mouse exon 2. It contains, therefore, 15 exons instead of 16, which share 86–98% homology with the mouse sequence. The translation initiation site and the stop codon are located at exons 3 and 15, respectively. Moreover, rat exon 1 lacks what we have named exon 1' in mouse; the remaining 65 bp of rat exon 1 share 95% homology with the 3' end of mouse exon 1. The main differences between the rat and mouse S_A genes correspond to the 5' region, before the translation initiation site, which indicates that both proteins will be very similar.

Location and hormonal control of the S_A protein

Polyclonal antibodies raised against S_A -specific peptides revealed the appearance of four different molecular species by Western blot assays (Fig. 6). From them, the 62 and 118 kDa products disappeared in castrated males and appeared in DHT-treated castrated mice, indicating that their expression is androgen-dependent (Fig. 6A, left-hand panel). Assays performed in the presence of specific S_A -blocking peptide showed that the 62 kDa protein disappears, while the other three remain under this condition (Fig. 6A, right-hand panel). We postulate that the protein of apparent molecular mass 62 kDa corresponds to

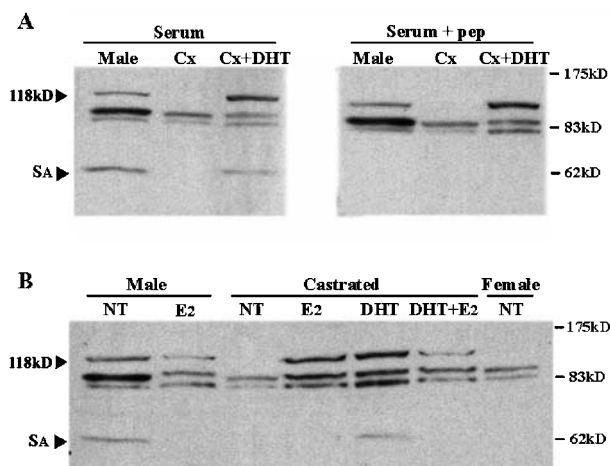


Figure 6 Western blot analysis of crude homogenates from mouse kidney. (A) Crude kidney homogenates (100 µg/lane) from intact non-treated males (NT), castrated (Cx) or castrated males treated with pharmacological doses of DHT (Cx+DHT) were analyzed by Western blot using rabbit antiserum raised against S_A synthetic peptide (left-hand panel). Preabsorbing the antibody with an excess of the antigenic peptide proved the specificity of the reactions (right-hand panel). Arrow points to the 62 kDa apparent-molecular-mass product that corresponds to the S_A protein. (B) In this experiment, crude kidney homogenates from intact or castrated males treated with estrogens (E2) or with estrogens and DHT (DHT+E2) were included. Non-treated female kidney homogenates were also studied using the experimental approach described for (A).

S_A because (i) 62 kDa is close to the expected size of the deduced S_A protein, taking the ATG codon in exon 4 as the translation initiation codon, (ii) it disappears in the presence of the specific blocking peptide, (iii) its expression is androgen-dependent and (iv) the anti- S_A antibody recognizes the same moiety as the anti-FLAG antibody in cells transiently expressing the S_A -FLAG fusion protein (results not shown).

To further explore whether expression of the protein parallels that of the mRNA, we studied the effects of estrogen treatment on S_A protein levels. As shown in Fig. 6B, estrogens inhibit expression at physiological and pharmacological doses of androgens, i.e. in control males and in DHT-induced castrated males. In conclusion, the protein follows the same sex steroid-dependent expression pattern as its corresponding mRNA. The nature of the 118 kDa product which follows an androgen-dependent but estrogen-independent pattern of expression is unknown and might not necessarily be related to the S_A protein. The mouse S_A protein presents high homology with the human and rat S_A , 86 and 94%, respectively. Alignment of the three sequences (Fig. 7) reveals several functional motifs that include 29 amino acids on the N-terminal region, which corresponds to a mitochondrial translocation signal (see boxed sequence in Fig. 7) and an AMP-binding domain, according to the PROSITE

```

mSA 1  --MLLRARCFQRLAIPDPMRVLYKDYRTATPQNFSNYESMKQDFKIEIPEYFNFAKDVLD
rSA 1  MAMLLRARCFRLAIPDRRRLYKDYRTAPQNFNSNYESMKHDPKIEIPEYFNFAKDVLD
hSA 1  --MLRRARCFQRLAIPGSVRALHKDNRTATPQNFSNYESMKQDFKLGIPEYFNFAKDVLD

mSA 59 QWTNMEKACRRLSNPAFWIDGNGEELWRSFELGLSRKFANLTEACSLRQRDRVMVI
rSA 61 QWTNEKTGRRLSNPAFWVDGNGEEVRWSFELGLSRKFANLTEACSLRQRDRVMVI
hSA 59 QWTDRKEKAGKKPENPAFWINRNGEEMRWSFELGLSRKFANLSEACSLRQRDRVLTI

mSA 118 LPKIPEWLANVACLRTGTVLIPGTTQLTQKDILYRLQSSKAKCITDDTLAPAVDAVAA
rSA 121 LPKIPEWLANVACLRTGTVLIPGTTQLTQKDILYRLQSSKAKCITDDTLAPAVDIVAA
hSA 119 LRRVPRWLANVACLRTGTVLIPGTTQLTQKDILYRLQSSKANCITNDVLAPAVDAVAS

mSA 178 KCENLHSKLIVSOHSREGWGNLKEMMKYASDSHTCVDTKHDEMMAIYFTSGTGPFKMIG
rSA 181 KCENLHSKLIVSOHSREGWGNLKEMMKYASDSHTCVDTKHNEDMAIYFTSGTGPFKMIG
hSA 179 KCENLHSKLIVSENSREGWGNLKEDMKHASDSHTCVTKHNEDMAIFTSATSGVFKMSA

mSA 238 HTHSSFGLGLSVNGRFWLDLIASDVMWNTSDTGWAKSAWSSVFSPWTOGACVFAHYLPRF
rSA 241 HTHSSFGLGLSVNGRFWLDLIASDVMWNTSDTGWAKSAWSSVFSPWTOGACVFAHYLPRF
hSA 239 HTHSSFGLGLSVNGRFWLDLIFSDVMWNTSDTGWAKSAWSSVFSPWHOGACVFHLPRF

mSA 298 ESTSILQTLSKFPITVFCSAPTAYRMLVQNDMSYKFNSLKHCVSAGEPINPEVMEQWRK
rSA 301 DSTSILQTLSKFPITVFCSAPTAYRMLIQNDITSYKFNSLKHCVSAGEPINPEVMEQWRK
hSA 299 EPTSILQTLSKVPITVFCSAPTVYRMLVQNDITSYKFKSLKHCVSAGEPITPDVTEKWRN

mSA 358 KTGLDIEGYGQTETVLICGNFKGMKIKPGSMGKPSPAFDVKILDENGATLPPGQEGDIA
rSA 361 KTGLDIEGYGQTETVLICGNFKGMKIKPGSMGKPSPAFNVILDENGTILPPGQEGDIA
hSA 359 KTGLDIEGYGQTETVLICGNFKGMKIKPGSMGKPSPAFDVKIVDVNGNVLPPGQEGDIG

mSA 418 LQVLPRPFGLFHYVDNFSKTASTLRGSFYITGDRGYMDEDGYFWFVARSDDILSSGY
rSA 421 LQVLPRPFGLFHYVDNFSKTASTLRGNFYITGDRGYMDEDGYFWFVARSDDILSSGY
hSA 419 LQVLPRPFGLFHYVDNFSKTASTLRGNFYITGDRNYMDRDGYFWFVARADDVILSSGY

mSA 478 RIGPFEVESALIEHPSIAESAVVSSPDPIRGEVVKAFIVLNPDYKHSDQELKKEIQEHV
rSA 481 RIGPFEVESALIEHPSIAESAVVSSPDPIRGEVVKAFIVLNPDYKHDQELKKEIQEHV
hSA 479 RIGPFEVENALNEHPSVAESAVVSSPDPIRGEVVKAFVVLNPDYKHSDQELKKEIQEHV

mSA 538 KKTTAPYKYPRKVEFIELPKTVSGKVKRNELRKKEWVTT
rSA 541 KKTTAPYKYPRKHEFIELPKTVSGKVKRNELRKKEWATT
hSA 539 KKTTAPYKYPRKVEFIQELPKTVSGKTKRNELRKKEWKTT

```

Figure 7 Amino acid sequences of human, rat and mouse S_A . The amino acid sequences of mouse (mSA), human (hSA) and rat (rSA) deduced from cDNAs were compared (GenBank accession numbers: mSA, AF068246; hSA, D16350; rSA, AY456695). Amino acids are numbered on the left and identical amino acids are highlighted in solid black. The potential mitochondrion-targeting sequence found at the N-terminus of mouse, human and rat S_A is denoted with open boxes. A conserved AMP-binding domain is indicated by a solid underline.

program (see underlined sequence in Fig. 7). The differences between the 65.5 kDa predicted molecular mass of the mouse S_A protein and the estimated 62 kDa size found in Western blot assays suggested that the predicted mitochondrial targeting signal is cleared during transportation of the enzyme into the mitochondrial matrix. S_A -FLAG expression vectors were transfected into PCT3 cells and location of the fusion protein was determined by immunocytochemistry using anti-FLAG antibodies. By performing double-labeling confocal fluorescence imaging, using the mitochondrial marker dye MitoTracker Red in transfected S_A -FLAG cells, we were able to co-locate both fluorescence signals, demonstrating the location of the S_A protein in the mitochondria (Fig. 8).

Discussion

The mouse S_A gene was first described in our laboratory as a kidney-restricted androgen-dependent gene (Melià

et al. 1998). By using the subtractive technique of representative differential analysis of cDNA, we aimed to find informative models for studying the nature of tissue-specific gene regulation in kidney. Furthermore, we were also hoping that new target genes might provide insight into the largely unknown physiological significance of androgen-inducible gene expression in the kidney. Apart from S_A , other coordinately expressed genes belonging to the organic-anion-transporting (OATP) and cytochrome (Cyp4) families were also identified and characterized (Isern *et al.* 2001, Isern & Meseguer 2003). As mentioned above, the S_A gene has been characterized as a proposed candidate gene for essential hypertension in rat and humans (Iwai & Inagami 1991, Harris *et al.* 1993, Lindpaintner *et al.* 1993, Iwai *et al.* 1994, Harrap *et al.* 1995, Nabika *et al.* 1995). Its highly restricted and abundant expression in kidney, a key organ in BP regulation (Guyton *et al.* 1990, Retting *et al.* 1993) and its dependence on androgens for expression in mouse kidney, suggested that the S_A gene might be involved in a

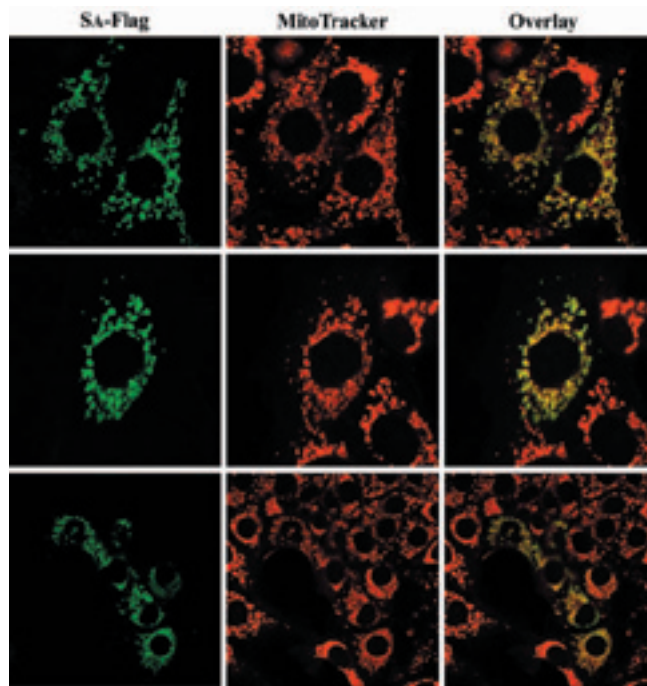


Figure 8 Subcellular location of the recombinant S_A protein. Transfected S_A -FLAG fusion protein in PCT3 cells was labeled with anti-FLAG antibodies and recombinant protein visualized with FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (S_A -Flag). MitoTracker Red CMXRos was used to stain PCT3 mitochondria (MitoTracker) and analyzed using a confocal microscope. Green fluorescence signals for the recombinant S_A protein were overlapped with the red fluorescence signals for mitochondria (overlay).

metabolic pathway with regulatory effects on renal vascular resistance, impaired renal hemodynamics and hypertension. A large subset of human hypertension is sexually dimorphic, i.e. more severe in males than in females, with the differences being minimized after menopause (Mantzoros *et al.* 1995, Chen 1996, August 1999, Garbers & Dubois 1999, Reckelhoff & Granger 1999). In the spontaneously hypertensive rat model, a sexual dimorphism in BP has also been observed (Chen & Meng 1991, Turner *et al.* 1991, Phillips *et al.* 1997, Reckelhoff *et al.* 1999). Despite the scarce information on sex-related BP differences in mice, a recent report from Holla *et al.* (2001) described lower BPs in female than in age-matched male mice in controls and in the hypertensive phenotype of *Cyp4a14*-knockout mice, which these authors have developed (Walsh *et al.* 2003). Despite this evidence Samani's group have clearly shown that S_A is not involved in the regulation of either basal or salt-related BP using S_A -null mouse.

Predictions based on its amino acid sequence similarity included the S_A protein in the acyl/acetyl-CoA synthetase family (Karan *et al.* 2001). Later studies confirmed a medium-chain acyl-CoA synthetase nature for the S_A protein by means of enzymatic assays using a purified

recombinant mouse S_A protein heterologously expressed in COS cells. Two reports demonstrated that the S_A protein plays a role in the degradation of medium-chain fatty acids for the production of energy. While Fujino *et al.* (2001b) concluded that isobutyrate constitutes a specific substrate for S_A , Iwai *et al.* (2002) described octanoate as the preferred substrate for CO_2 and ATP production. While these reports address a putative function for the S_A protein, it remains to be determined what the real substrates and function of this protein are *in vivo*.

In this report we confirm previous data referring to kidney as the main site for S_A mRNA synthesis followed by liver, but also other sites for minor S_A production including stomach, testis, lung and heart. Of these, kidney, heart and lung express S_A mRNA in an androgen-dependent fashion, indicating that S_A constitutes a specific male enzyme for most of the tissues in which it is expressed and that its function must necessarily be important for males. Interestingly, we found a profound negative effect of estrogens on S_A kidney mRNA levels since they block the action of androgens at physiological and pharmacological doses. Since ovariectomy in females does not permit S_A expression in kidney, and DHT-induction triggers the S_A gene in females, we conclude that it is a

truly androgen-dependent gene. In order to explain the inhibitory role of estrogens in S_A expression, we might speculate as to the presence of a common co-activator for sex steroid receptors, in proximal tubule cells, which becomes unavailable to the androgen receptor in our experimental conditions; alternatively, a newly synthesized estrogen-dependent repressor might be interfering with the mechanisms triggered by androgens, precluding expression. In any event, isolation and functional assays of the proximal promoter of the S_A gene will provide insight into the elements and mechanisms governing the sex steroid-controlled expression of the S_A gene in kidney and those that permit constitutive expression of the same gene in liver. To this end, we first determined the transcription initiation site by primer-extension analysis, 5'-RACE and RT-PCR, and found multiple forms of S_A mRNAs which upon cloning and sequencing appeared to be the result of complex alternative-splicing events which included usage of 19 cryptic internal sites in exons 1 and 2. Although we cannot rule out trans-splicing events, there is no exon repetition that could indicate that this phenomenon is occurring in the mouse S_A gene, as has been described for its rat orthologue (Frantz *et al.* 1999) and the rat carnitine octanoyltransferase gene (Caudevilla *et al.* 1998). As for the rat S_A gene, Frantz *et al.* (1999) reported exon 2 and exon 2–4 repetition in kidney mRNA from Wistar–Kyoto rats not present in the spontaneously hypertensive strain, which was shown not to correspond to duplications of these specific exons or to the entire gene in the Wistar–Kyoto germ line. Exon 2 is located upstream of the putative translation start site and therefore the presence of the duplication would not be expected to alter the protein product. However, the exon 2–4 duplication would alter the reading frame, resulting in a truncated, altered product of 157 amino acids. Although the physiological significance of these modified transcripts has not been established, the transcripts have also been detected in Milan hypertensive and Dahl salt-sensitive rat strains (Frantz *et al.* 1999). In mouse, we found no alternative transcript of the S_A gene compromising the putative translation initiation site which has been predicted to be in exon 4; Western blot analyses of mouse kidney extracts show that the single moiety that disappears upon blocking the antibody with the specific peptide corresponds to a product with the expected S_A protein size. This result indicates that the splicing events occurring further up exon 4 have no impact on the correct synthesis of the S_A protein. The biological role, if any, of our findings is unknown but might relate to the use of alternative promoters which might be located on the intronic sequences before exon 4 and upwards, which in turn could contribute to the differential regulation of the gene in kidney and liver. Studies currently being conducted in our laboratory using different reporter gene constructs in transient transfection assays may aid understanding of the complexity of S_A gene expression in mouse tissues.

Acknowledgements

We deeply thank Dr A. Vandewalle for providing us with the parental PKSV-PCT and PKSV-PR cells, Dr Juan Carlos López-Talavera for helpful discussions and Miss Christine O'Hara for English revision of the manuscript.

Funding

This work was supported by grant no. SAF2000-0158 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de I+D. C A and J I are recipients of predoctoral fellowships from 'Institut Fundació per a la Recerca Biomèdica i la Docència de la Ciutat Sanitària i Universitaria Vall d'Hebron' and from 'Universitat Autònoma de Barcelona', respectively.

References

- August P 1999 Hypertension in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 3451–3454.
- Caudevilla C, Serra D, Miliar A, Codony C, Asins G, Bach M & Hegardt FG 1998 Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *PNAS* **95** 12185–12190.
- Chen YF 1996 Sexual dimorphism of hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **5** 181–185.
- Chen YF & Meng QC 1991 Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sciences* **48** 85–96.
- Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156–159.
- Chu SL, Zhu DL, Xiong MM, Wang GL, Zhang WZ, Zhou HF, Shen D, Gao PJ, Zhan YM & Jin L 2002 Linkage analysis of twelve candidate gene loci regulating water and sodium metabolism and membrane ion transport in essential hypertension. *Hypertension Research* **25** 635–639.
- Frantz SA, Kaiser M, Gardiner SM, Gauguier D, Vincent M, Thompson JR, Bennett T & Samani NJ 1998 Successful isolation of a rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus in reciprocal congenic strains. *Hypertension* **32** 639–646.
- Frantz SA, Thiara AS, Lodwick D, Ng LL, Eperon IC & Samani NJ 1999 Exon repetition in mRNA. *PNAS* **96** 5400–5405.
- Frantz S, Clemitson JR, Bihoreau MR, Gauguier D & Samani NJ 2001 Genetic dissection of region around the SA gene on rat chromosome 1. *Hypertension* **38** 216–221.
- Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K & Yamamoto TT 2001a Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *Journal of Biological Chemistry* **276** 11420–11426.
- Fujino T, Takei YA, Sone H, Ioka RX, Kamataki A, Magoori K, Takahashi S, Sakai J & Yamamoto TT 2001b Molecular identification and characterization of two medium-chain acyl-CoA synthetases, MACS1 and the Sa gene product. *Journal of Biological Chemistry* **276** 35961–35966.
- Garbers DL & Dubois SK 1999 The molecular basis of hypertension. *Annual Review of Biochemistry* **68** 127–155.
- Guyton AC, Hall JE, Coleman TG & Manning RD 1990 The dominant role of the kidneys in long-term arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. In *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, pp 1311–1326. Eds JH Laragh & BM Brenner. New York: Raven Press.

- Harrap SB, Samani NJ, Lodwick D, Connor JM, Fraser R, Davies D L, Lever AF, Foy CJ & Watt GC 1995 The SA gene: predisposition to hypertension and renal function in man. *Clinical Science* **88** 665–670.
- Harris EL, Dene H & Rapp JP 1993 SA gene and blood pressure cosegregation using Dahl Salt-Sensitive rats. *American Journal of Hypertension* **6** 330–334.
- Holla VR, Adas F, Imig JD, Zhao X, Price E Jr, Olsen N, Kovacs WJ, Magnuson MA, Keeney DS, Breyer MD *et al.* 2001 Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp4a monooxygenases cause hypertension. *PNAS* **98** 5211–5216.
- Hübner N, Lee YA, Lindpaintner K, Ganten D & 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** 643–648.
- Isern J & Meseguer A 2003 Hormonal regulation and characterisation of the mouse Cyp4b1 gene 5′-flanking region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307** 139–147.
- Isern J, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ & Meseguer A 2001 Functional analysis and androgen-regulated expression of mouse organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) in the kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* **1518** 73–78.
- Iwai N & Inagami T 1991 Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertension. *Hypertension* **17** 161–169.
- Iwai N & Inagami T 1992 Identification of a candidate gene responsible for the high blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* **10** 1155–1157.
- Iwai N, Kurtz TW & Inagami T 1992 Further evidence of the SA gene as a candidate gene contributing to the hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **188** 64–69.
- Iwai N, Ohmichi N, Hanai K, Nakamura Y & Kinoshita M 1994 Human SA gene locus as a candidate locus for essential hypertension. *Hypertension* **23** 375–380.
- Iwai N, Tsujita Y & Kinoshita M 1998 Isolation of a chromosome 1 region that contributes to high blood pressure and salt sensitivity. *Hypertension* **32** 636–638.
- Iwai N, Katsuya T, Mannami T, Higaki J, Ogihara T, Kokame K, Ogata J & Baba S 2002 Association between SAH, an Acyl-CoA synthetase gene, and hypertriglyceridemia, obesity, and hypertension. *Circulation* **105** 41–47.
- Kaiser MA, Lodwick D & Samani NJ 1994 The rat SA gene shows genotype-dependent tissue-specific expression. *Clinical Science* **87** 1–4.
- Karan D, David JR & Capy P 2001 Molecular evolution of the AMP-forming acetyl-CoA synthetase. *Gene* **265** 95–101.
- Lacave R, Bens M, Cartier N, Vallet V, Robine S, Pringault E, Kahn A & Vandewalle A 1993 Functional properties of proximal tubule cell lines derived from transgenic mice harboring L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *Journal of Cell Science* **104** 705–712.
- Lindpaintner K, Hilbert P, Ganten D, Nadal-Ginard B, Inagami T & Iwai N 1993 Molecular genetics of the SA-gene: cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. *Journal of Hypertension* **11** 19–23.
- Mantzoros CS, Georgiadis EI, Young R, Evagelopoulou C, Khoury S, Katsilambros N & Sowers JR 1995 Relative androgenicity, blood pressure levels, and cardiovascular risk factors in young healthy women. *American Journal of Hypertension* **8** 606–614.
- Melià MJ, Bofill N, Hubank M & Meseguer A 1998 Identification of androgen-regulated genes in mouse kidney by representational difference analysis and random arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Endocrinology* **139** 688–695.
- Meseguer A & Catterall JF 1990 Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control. *Molecular Endocrinology* **4** 1240–1248.
- Meseguer A & Catterall JF 1992 Effects of pituitary hormones on the cell-specific expression of the KAP gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* **89** 153–162.
- Mount SM 1982 A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research* **10** 459–472.
- Nabika T, Bonnardeaux A, James M, Julier C, Jeunemaitre X, Corvol P, Lathrop M & Soubrier F 1995 Evaluation of the SA locus in human hypertension. *Hypertension* **25** 6–13.
- Narita I, Saito N, Goto S, Shirasaki A, Morioka Y, Jin S, Omori K, Sakatsume M, Arakawa, M & Gejyo F 2002 Role of genetic polymorphism in the SA gene on the blood pressure and prognosis of renal function in patients with immunoglobulin A nephropathy. *Hypertension Research* **25** 831–836.
- Patel HR, Thiara AS, West KP, Lodwick D & Samani NJ 1994 Increased expression of the SA gene in the kidney of the spontaneously hypertensive rat is localized to the proximal tubule. *Journal of Hypertension* **12** 1347–1352.
- Phillips GB, Jing TY & Laragh JH 1997 Serum sex hormone levels in postmenopausal women with hypertension. *Journal of Human Hypertension* **11** 523–526.
- Reckelhoff JF & Granger JP 1999 Role of androgens in mediating hypertension and renal injury. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **26** 127–131.
- Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K & Granger JP 1999 Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor. *Hypertension* **34** 920–923.
- Rettig R, Schmitt B, Pelz B & Speck T 1993 The kidney and primary hypertension: contributions from renal transplantation studies in animals and humans. *Journal of Hypertension* **11** 883–891.
- Saad Y, Garrett MR, Lee SJ, Dene H & Rapp JP 1999 Localization of a blood pressure QTL on rat chromosome 1 using Dahl rat congenic strains. *Physiological Genomics* **1** 119–125.
- Samani NJ, Lodwick D, Vincent M, Dubay C, Kaiser MA, Kelly MP, Lo M, Harris J, Sassard J, Lathrop M & Swales JD 1993 A gene differentially expressed in the kidney of the spontaneously hypertensive rat cosegregates with increased blood pressure. *Journal of Clinical Investigation* **92** 1099–1103.
- Samani NJ, Whitmore SA, Kaiser MA, Harris J, See CG, Callen DF & Lodwick D 1994 Chromosomal assignment of the human SA gene to 16p13-11 and demonstration of its expression in the kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199** 862–868.
- Soler M, Tornavaca O, Solé E, Menoyo A, Hardy D, Catterall JF, Vandewalle A & Meseguer A 2002 Hormone-specific regulation of the kidney androgen-regulated gene promoter in cultured mouse renal proximal-tubule cells. *Biochemical Journal* **366** 757–766.
- St Lezin E, Liu W, Wang JM, Wang N, Kren V, Krenova D, Musilova A, Zdobinska M, Zidek V, Lau D & Pravenec M 1997 Genetic isolation of a chromosome 1 region affecting blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **30** 854–858.
- St Lezin E, Liu W, Wang JM, Yang Y, Qi N, Kren V, Zidek V, Kurtz TW & Pravenec M 2000 Genetic analysis of rat chromosome 1 and the SA gene in spontaneous hypertension. *Hypertension* **35** 225–230.
- Takenaka M, Imai E, Kaneko T, Ito T, Moriyama T, Yamauchi A, Hori M, Kawamoto S & Okubo K 1998 Isolation of genes identified in mouse renal proximal tubule by comparing different gene expression profiles. *Kidney International* **53** 562–572.
- Turner ME, Johnson ML & Ely DL 1991 Separate sex-influenced and genetic components in spontaneously hypertensive rat hypertension. *Hypertension* **17** 1097–1103.
- Vessey DA & Kelley M 1997 Purification and partial sequencing of the XL-I form of xenobiotic-metabolizing medium chain fatty acid:CoA ligase from bovine liver mitochondria, and its homology with the essential hypertension protein. *Biochimica et Biophysica Acta* **1346** 231–236.

Walsh V, Somody L, Farrell A, Zhang B, Brown J, Pritchard C, Vincent M & Samani NJ 2003 Analysis of the Role of the SA gene in blood pressure regulation by gene targeting. *Hypertension* **41** 1212–1218.

Yang T, Hassan SA, Singh I, Smart A, Brosius FC, Holzman LB, Schnermann JB & Briggs JP 1996 SA gene expression in the

proximal tubule of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **27** 541–545.

Received 22 June 2004

Accepted 2 July 2004