
Clonado y determinación de la estructura genómica del receptor de retinoides humano RXR α

Cloning and determination of the genome structure of the receptor of human retinoids RXR α

I. Encío¹, C. de Miguel², A. Arrazola¹, J.G. Páez²

INTRODUCCIÓN

La vitamina A y algunos de sus derivados, tanto naturales como sintéticos, ejercen efectos esenciales en el desarrollo y diferenciación¹. El mecanismo por el que los retinoides ejercen sus efectos está basado en la regulación de la expresión de genes determinados. La regulación se lleva a cabo a través de su interacción con receptores específicos. El aislamiento de distintos subtipos de receptores, tres (RAR α , RAR β y RAR γ) para la forma *trans* del ácido retinoico y otros tres (RXR α , RXR β y RXR γ) para la forma *9-cis*, ha mostrado que todos ellos son miembros de la familia de receptores nucleares y constan de un dominio central a través del cual enlazan DNA, un dominio carboxilo terminal de unión al ligando y un dominio amino terminal que ejerce un efecto modulador en la transactivación².

En estudios realizados sobre la embriogénesis del ratón se ha observado un patrón de expresión restringido espacial y

temporalmente para los distintos receptores, lo que sugiere que los diferentes subtipos poseen distintas funciones y que podrían regular genes diferentes³. En adición a esta idea se han descrito varias isoformas de mRNA para cada uno de los distintos subtipos de RAR, existiendo dos isoformas para el RAR α y RAR γ y cuatro para el RAR β . Las diferentes isoformas de cada subtipo, que están conservadas entre especies y presentan un patrón de expresión específico para cada estadio y tejido durante el desarrollo, derivan del uso diferencial de dos promotores y del procesamiento alternativo del extremo amino terminal de la proteína⁴. De forma similar se ha descrito la existencia de isoformas que difieren en su extremo amino terminal para el RXR β , pero no para el RXR α y el RXR γ ⁵. En general el RXR α y el RXR β parecen expresarse ubicuamente durante los estados tempranos de la embriogénesis del ratón, mientras que en los mismos estudios el RXR γ y los tres RAR muestran patrones de expresión restringidos y muy

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 75-83

1. Departamento Ciencias de la Salud. Universidad Pública de Navarra.
2. Departamento de Bioquímica. Universidad de Navarra.

Correspondencia:

I. Encío Martínez
Departamento Ciencias de la Salud
Universidad Pública de Navarra
31008 Pamplona
Tfno. 948 270000
Fax 948 270902
E-mail: ignacio.encio@si.upna.es

diferentes. La expresión del RXR α durante la organogénesis tardía, así como en el adulto, se vuelve más localizada (hígado, piel y epitelio del tracto digestivo), mientras que el RXR β sigue siendo ubícuo a niveles reducidos³.

Los homodímeros RAR y RXR, así como los heterodímeros RAR-RXR, reconocen y enlazan con los correspondientes elementos de respuesta en los promotores de los genes diana, cuya transcripción queda así regulada de forma dependiente de la hormona. Asimismo se ha demostrado que los receptores de la vitamina D y las hormonas tiroideas requieren RXR como proteína auxiliar, por lo que se acepta que los receptores RXR afectan a la transducción de señales mediada por retinoides, vitamina D y hormonas tiroideas⁶.

Ya que los acontecimientos que afecten a los genes de los receptores tendrán un efecto multiplicativo en las etapas subsiguientes de la cascada de transducción de señales es de vital importancia que la regulación de los mismos tenga lugar de modo preciso y en el momento oportuno. Se ha descrito que la hormona tiroidea regula positivamente en la rata los niveles hepáticos del mRNA del RXR β y negativamente los del mRNA del RXR γ , pero no modifica los del RXR α . Los estudios realizados sobre el control de la velocidad de transcripción de estos genes en núcleos hepáticos aislados, y el tratamiento con inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida) o de RNA (actinomicina D), han mostrado que la hormona tiroidea regula la transcripción del gen RXR β , mientras que su efecto negativo sobre la expresión del gen RXR γ es postranscripcional⁷. Mientras estos resultados indican que la hormona tiroidea regula la transducción de señales tanto a través de su propio receptor como de los de retinoides y vitamina D, en parte gracias a su acción sobre la regulación de la expresión del RXR β y RXR γ , aún se carece de datos acerca de cómo se regula la expresión del RXR α , y de si los retinoides y la vitamina D afectan a la transmisión de señales a través de estos receptores mediante el control de sus niveles. En este trabajo se describe el clonado y caracterización de las estructuras genómicas de los receptores hRXR α y hRXR β ,

que permitirá posteriormente la identificación de sus elementos cis y trans-reguladores, así como el análisis del posible papel de las formas todo-trans y 9-cis del ácido retinoico, de la hormona tiroidea y de la vitamina D sobre la regulación de la transcripción de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción y purificación de DNA

El DNA genómico se obtuvo a partir de sangre periférica humana empuando el *kit Genomix* (Talent) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la extracción y purificación de DNA, tanto de cósmido como de plásmido, se realizaron minpreparaciones empleando el sistema *WizardTM Miniprep* comercializado por Promega.

Restricción, electroforesis e hibridación de DNA

El análisis de DNA por hibridación se realizó por *Southern blot*. Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción se realizaron en un tampón específico para cada enzima según las recomendaciones del fabricante. La temperatura de incubación en la mayoría de las enzimas utilizadas fue de 37 °C, y el tiempo de digestión, así como la cantidad de enzima añadida, dependió de la cantidad de DNA a digerir, siendo habituales las digestiones de al menos 3 h, utilizando 2 unidades de enzima por mg de DNA. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% y la transferencia a membrana por capilaridad. Las membranas se prehibridaron durante 4 h a 42 °C, se lavaron con 5 \times SSC y se incubaron durante 16 h a 42 °C con una solución de hibridación que contenía la sonda marcada radiactivamente (2 \times 10⁶ cpm/ml). Posteriormente los filtros se lavaron con sucesivas disoluciones que contenían desde 2 \times SSC/SDS 0,1% hasta 0,1 \times SSC/SDS 0,1%, a temperaturas crecientes desde 25°C hasta 60 °C, y se expusieron durante 1 a 6 días a una película autorradiográfica *Kodak-X-Omat AR*, con pantallas intensificadoras y a -70 °C.

Screening

El aislamiento de fragmentos de DNA específicos para el gen HRXRA se llevó a

cabo por medio de tres rondas de *screening* por el método convencional de hibridación de colonias de DNA genómico de placenta humana en pWE15 (Clontech). Como sondas se emplearon oligonucleótidos marcados radiactivamente con una actividad específica $>10^8$ cpm/ μ g.

Diseño y marcaje de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos empleados como sondas en los experi-

mentos de hibridación de ácidos nucleicos, así como los utilizados como cebadores en las amplificaciones de DNA por PCR y en las reacciones de secuenciación, se llevó a cabo con el programa *OLIGO*TM versión 4.0 para PC. Los distintos oligonucleótidos se muestran en la tabla 1.

Los oligonucleótidos se marcaron por transferencia de un grupo fosfato radiactivo desde el [γ -³²P]ATP al extremo 5'-OH del oligonucleótido, mediante la acción de la

Tabla 1. Sondas de *screening* y cebadores de PCR. 's': sentido, 'a': antisentido. Algunos cebadores se sintetizaron en ambas orientaciones y se nombran con el sufijo s y a. ²Con respecto a la secuencia del CDNA a menos que se indique lo contrario.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Tm (°C)	Orientación ¹	Posición ²
JGP02	CATGAAGCGGGAAGCCGTGCAGGAGGAGCGG CAGCGTGGCAAGGACCGGAACGAGAATGA	60	78	s	672-731
JGP03	CCTGGAACATCTCTTCTTCTTCAAGCTCAT CGGGGACACACCCATGACACCTTCCTTAT	60	73	s	1371-1430
JGP04	TGCTTGGTGAAGGAAG	16	48	a	458-473
JGP12	TACTGCCGCTACCAGAAGTGC	21	66	s y a	640-661
JGP14	GCAGCAGCGAGGACATCAAGC	21	68	s	380-400
JGP16	TGCCCGGACAACAAGGACTGC	21	68	s y a	586-606
JGP17	AGGAGCGGCAGCGTGGCAAGG	21	72	s	695-715
JGP18	AGCCCAAGACCGAGACCTACG	21	68	s y a	703-823
JGP19	GCATTCTCCCATCAGCACCTG	22	70	s y a	216-237
JGP20	GCTGATGACCGAGAAAGGCGGG	22	72	a	261-283
JGP21	GCCAAGCAGCCGACAAACAGC	21	68	s	881-901
JGP22	GAGGGAGAAGGTCTATGCGTC	21	66	s	1251-1271
JGP23	CTGCGCGCCATCGTCCTCTTTAAC	24	76	s y a	1183-1206
JGP26	AGCTGCTCATCGCCTCCTTCTCCC	24	78	s	995-1018
JGP27	TGTCAAAGATGGCGCCACCCTG	24	78	a	1094-1117
JGP29	AGCTCAAGGAGGTTGGGAGTTGGC	24	78	a	intrón 8
JGP31	CGGGAGGCACCAGGGAACAAG	21	60	a	intrón 2
JGP35	TGGACACCAAACATTTCTGCCG	23	70	s	77-99
JGP36	ACCGAGCGGCAGGAAATGTTTGG	23	72	a	83-103
JGP37	CAGGAAATGTTTGGTGTCCAT	21	60	a	76-96
JGP38	ACCCCATCAAAGCCAGCACTCTT	25	78	a	pMB3
JGP39	TACAGACCCACCAGCAAATGAGCC	25	78	a	pMB3
JGP40	GCTGACAAGACAAAGCAGGCAAAAAG	25	74	a	pMB39
JGP41	GGGAAACTGAGGCATAGAGAAGGTG	25	76	a	pMB39
JGP42	TGAAACCCCGTTGCAAGCAGCTAGC	25	78	a	pMB41
JGP43	AGGCCCTCAGAGCTTCTGGATCAC	25	80	a	pMb42
JGP44	CGGGCATGAGTTAGTCGAGACA	23	72	s	54-76
JGP45	GAATGCCAAACCCACTTTTATTATC	225	68	a	pMB43
JGP46	TCCAGTTTCCCAGTGCAAGATCAG	25	76	a	pMB43

polinucleótido quinasa del fago T4. La purificación de los oligonucleótidos marcados se realizó por cromatografía de exclusión molecular en columnas de Sephadex G-50 (*Nick™ column*, Pharmacia).

PCR

Las reacciones de PCR se realizaron empleando en todos los casos la técnica de *hot start* y 1 unidad de DNA polimerasa por cada kpb a amplificar. Para la amplificación de fragmentos menores de 2 kpb se emplearon como enzimas la *Taq* DNA polimerasa (Promega) o la DNA polimerasa de *Thermus brockianus* (*Dynazyme™* comercializada por Finnzymes). Para la amplificación de fragmentos mayores (de hasta 10kpb) se utilizaron las polimerasas anteriormente mencionadas en combinación con el aditivo *Taq Extender™* (Stratagene). Se emplearon 540 ng de DNA patrón y 60pm de cebadores para las amplificaciones de DNA genómico y 50-100 ng de DNA patrón y 30pm de cebadores para las amplificaciones de cósmidos o plásmidos. Todas las reacciones de amplificación contaron con un ciclo de desnaturalización a 95 °C de 2-5 min, 25-35 ciclos de 3 pasos, desnaturalización a 95°C de 0,5-1min, emparejamiento a 42-72 °C de 0,5-1min y extensión de 68-72 °C de 1-10 min, y un ciclo de extensión a 72 °C de 7-20 min. La temperatura de emparejamiento adecuada para cada reacción se determinó a partir de la temperatura de fusión teórica (T_m) calculada para cada cebador. El tiempo de extensión varió según el tamaño del fragmento de DNA que se quería amplificar, usándose habitualmente 1 min por cada kilobase a amplificar.

Las reacciones de amplificación realizadas con el sistema *PromoterFinder™ DNA Walking Kit* (Promega) se llevaron a cabo en las condiciones recomendadas por el fabricante.

Para el clonado de productos de PCR se utilizó el sistema *pMOSBlue T-vector kit* comercializado por Amersham. Tanto en lo referente a la ligación como a la transformación de las células competentes se siguió el procedimiento indicado por el fabricante.

Secuenciación de DNA

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo empleando el sistema *fmol™ DNA sequencing system* (Promega) en las condiciones descritas por el fabricante de acuerdo con los siguientes programas: 1) para cebadores con menos de 24 bases o con un contenido de G y C inferior al 50%, tras un calentamiento inicial a 95 °C durante 2 min, se realizaron 30 ciclos compuestos por tres pasos, 95 °C durante 30 s, 42 °C durante 30 s y 70 °C durante 1 min; 2) para cebadores con más de 24 bases o cebadores más cortos con un contenido en G y C superior al 50 %, tras un calentamiento inicial a 95°C durante 2 min, se realizaron 30 ciclos de 2 pasos, 95°C durante 30 s y 70°C durante 30 s.

RESULTADOS

Aislamiento de clones genómicos para el gen hRXRA y determinación de los sitios de *splicing*

Por comparación de la secuencia del cDNA del RXR α con la de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen hRXRA (JGP02 y JGP03) de acuerdo con la secuencia de los dominios D y E del receptor. Estos oligonucleótidos, cuyas Tms, secuencias y posiciones con respecto al cDNA se describen en material y métodos, se emplearon como sondas para el *screening* convencional de un banco de DNA genómico humano (Clontech) en pWE15. Tras tres rondas de *screening* con la sonda JGP03 se seleccionaron 12 clones (GP01 a GP12) que hibridaban con la misma. Los clones GP01 a GP12 fueron digeridos con *EcoRI*, transferidos a membrana, hibridados con la sonda JGP03 y rehibridados con la sonda JGP02. Cuatro de estos clones hibridaban dando una señal intensa con la sonda JGP03 y uno de ellos, el GP02, daba también una señal intensa con la sonda JGP02, por lo que se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *HincII*, *PvuII*, *EcoICRI* y *XhoI* y se analizó por *southern blot*, lo que permitió comprobar la autenticidad del clon.

Tras el aislamiento del clon GP02 se procedió a su análisis mediante secuenciación, lo que permitió comprobar que contiene los exones 3 a 10 del gen. La síntesis de los cebadores utilizados en las reacciones de secuenciación se realizó conforme a la secuencia publicada del cDNA del RXRa humano⁸ tomando como referencia la ubicación de los sitios de *splicing* del receptor de glucocorticoides⁹. Las características principales de los distintos cebadores utilizados se describen en material y métodos. Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando el sistema de secuenciación cíclica *fmol*TM sobre el cósmido GP02. Por último, el tamaño de los intrones se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir del cósmido GP02 usando como cebadores de la reacción oligonucleótidos basados en las secuencias de los exones.

Clonado del extremo 5' del gen hRXRA

Con objeto de aislar fragmentos genómicos específicos para el extremo 5' del intrón 2 se llevó a cabo una reacción de PCR, usando como molde DNA genómico y como cebadores los oligonucleótidos JGP19s y JGP31. El cebador JGP31 está localizado en el extremo 5' del cósmido GP02, en el intrón 2, y JGP19s en el exón 2. El producto obtenido fue subclonado y secuenciado permitiendo obtener el extremo 5' del intrón. El extremo 3' del intrón 2 se determinó por secuenciación directa del cósmido GP02 con el cebador JGP04.

A continuación se realizó un paseo cromosómico desde el exón 2 hacia el extremo 5' del gen utilizando el sistema *PromoterFinder*TM. Como cebadores específicos del gen se utilizaron una serie de cebadores antisentido anidados. El primer par de cebadores anidados estaba formado por los cebadores JGP20a y JGP19a, ambos diseñados contra la secuencia del cDNA en el exón 2. Este primer paso permitió subclonar una banda de 2,2 kpb (pMB3) en la cual estaba contenido el extremo 3' del intrón 1. Dos cebadores diseñados de acuerdo con la secuencia del extremo 5' de esta banda, JGP38 y JGP39 permitieron un nuevo avance de unos 600 pb hacia el interior del intrón 1 (pMB39). A continuación,

siguiendo un procedimiento análogo, se diseñaron dos nuevos cebadores, JGP40 y JGP41, que permitieron un nuevo paso de 2,8 kpb (pMB41). Nuevamente se diseñaron dos cebadores de acuerdo con la secuencia del extremo 5' de esta última banda. Estos cebadores, JGP42 y JGP43, permitieron amplificar un fragmento de 1,8 kpb a partir del cual no fue posible realizar nuevas extensiones.

A continuación, se diseñaron nuevos cebadores de PCR contra la secuencia del cDNA en el exón 1, con el objeto de seguir avanzando a partir de éste en dirección 3' hacia el interior del intrón 1. Para ello se diseñaron los cebadores JGP44s y JGP35 anidados contra la secuencia sentido del cDNA. Empleando esta pareja de cebadores se pudo aislar y clonar una banda que contenía 5 pb del extremo 5' del intrón 1. Para extender la secuencia hacia el extremo 5' del gen se diseñaron tres cebadores antisentido (JGP44a, JGP36 y JGP37) contra la secuencia del exón 1. Ninguno de los productos obtenidos con ellos resultó ser específico del gen.

Visión global del gen hRXRA

Los resultados descritos con anterioridad nos han permitido determinar que el gen hRXRA está compuesto por un mínimo de 10 exones y 9 intrones. El tamaño de los exones varía entre 92 y 543 pb, siendo los de mayor tamaño los exones 2 y 10 con 251 y 543 pb respectivamente. El exón 10 contiene además la región 3'-UTR. El tamaño de los intrones determinados oscila entre 600 pb y 8 kpb. El estudio de la posición en la que se insertan los intrones en el marco de lectura muestra 2 intrones de tipo 0, 5 de tipo 1 y 2 de tipo 2.

El análisis de la relación de los distintos exones con respecto a los dominios del receptor mostró que en el exón 1 están contenidas las secuencias de la región 5'-UTR y las que codifican el extremo amino-terminal del dominio A, mientras que el exón 2 codifica los aminoácidos restantes de este dominio, el exón 3 codifica el dominio B y la primera mitad del dedo de zinc CI, el exón 4 codifica la segunda mitad del dedo CI, el dedo CII completo y los primeros tres aminoácidos del dominio D, el exón 5 codifica

el resto del dominio D y los primeros 36 aminoácidos del dominio E, y los exones 6 a 10 codifican el resto del dominio E. El exón 10 contiene además el codón de terminación TAG y la secuencia 3'-UTR. El intrón 2 coincide con la separación neta de los dominios A y B. Los demás intrones están desplazados hacia el extremo 3' con respecto a las uniones entre dominios.

Aislamiento de clones genómicos específicos para el hRXR β

Los resultados obtenidos para el hRXR α con el sistema Sistema Promoter Finder™ (Clontech), junto con la posibilidad de amplificar fragmentos de DNA de gran tamaño, nos ha llevado a intentar también en este trabajo la determinación de la estructura genómica del gen del receptor de retinoides humano hRXR β . El aislamiento de clones genómicos específicos para el hRXR β se ha realizado utilizando una modificación de la técnica de PCR que permite obtener fragmentos de entre 10 y 30 kilobases. Como cebadores de las reacciones se han empleado oligonucleótidos diseñados contra la secuencia del cDNA en regiones que, por comparación con otros genes de la misma familia, suponíamos se encontraban en exones distintos. Los productos de PCR se han clonado en el vector pMOS de Amersham, y se han secuenciado por el método de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos de Sanger. Se ha podido así determinar la estructura exón-intrón del gen, y secuenciar las uniones de *splicing*.

Existen dos isoformas del hRXR β denominadas hRXR β ₁ y hRXR β ₂ respectivamente. Ambas isoformas difieren en su extremo 5', habiéndose propuesto para explicar su formación la posibilidad de que se produzca un *splicing* alternativo o bien la existencia de dos promotores de uso diferencial. Para comprobar este aspecto, hemos clonado la posible región promotora del gen utilizando el sistema Promoter Finder™ de Clontech. Para ello diseñamos una pareja de cebadores antisentido contra la región 5' del cDNA. Con estos cebadores se han obtenido varios productos que incluyen la posible secuencia promotora y reguladora del gen. Las secuencias de estos productos, que comprenden aproximada-

mente 2,8 Kb de DNA incluyen el extremo 5' de la isoforma b1, así como la totalidad del gen hKe4.

DISCUSIÓN

De los datos descritos en los apartados precedentes es posible predecir que el hRXR α está codificado por un único gen que tiene un tamaño mínimo de 28 kbp y contiene al menos 10 exones. La región amino terminal está codificada por los dos primeros exones del gen. Otros dos exones, los exones 3 y 4, codifican para la región de unión al DNA. Como en el caso del mRxb, y a diferencia de lo que ocurre en el resto de los miembros de la superfamilia en los que cada dedo de Zn está codificado por un único exón, el intrón 3, divide en dos exones diferentes al primero de los dedos, sugiriendo así un origen filogenético más antiguo para este receptor que para el resto de los miembros de la superfamilia. Por último, el dominio de unión a la hormona está codificado por 6 exones diferentes, los exones 5 a 10, estando toda la región 3' no traducida codificada por este último.

A su vez, el hRXR β está codificado por un gen que contiene al menos 10 exones y tiene un tamaño aproximado de 10 kbp. La región amino terminal de la isoforma b1 de la proteína está codificada por el primer exón descrito del gen. Las secuencias 5' con respecto a este exón incluyen la posible región promotora y reguladora de la expresión de esta isoforma, físicamente ligada con el gen hKe4 cuya estructura exón-intrón también hemos determinado. Sin embargo no hemos podido identificar un exón específico para la isoforma b2 que no se encontraría presente en al menos 50 kb de DNA. La región de unión al DNA está codificada por otros dos exones, los exones 3 y 4. Como en el hRXR α el tercer intrón divide en dos exones al dedo CI. Por último, el dominio de unión a la hormona está codificado por los exones 5 a 10, estando toda la región 3' no traducida codificada por este último exón.

Comparación con otros miembros de la superfamilia

El gen hRXRA posee una estructura genómica similar a la de los genes que

codifican otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Sin embargo, existen dos características que diferencian claramente a los genes *hRXR* de los genes de otros receptores nucleares. La primera de estas diferencias está dada por la posición del intrón en el dominio de unión al DNA, que mientras en los genes de otros miembros de la superfamilia está localizado entre ambos dedos de zinc, en los *hRXR* está localizado en la G^{144} en mitad del primer dedo. Por contraste, la posición del intrón localizado tras el segundo dedo está altamente conservada en todos los miembros de la superfamilia. La segunda diferencia importante entre las estructuras de los genes de los RXRs y RARs se refiere al número de intrones en el dominio de unión al ligando, 5 en los *hRXR* por 4 en los *hRAR*. Estas diferencias sugieren que los genes *RXRs* y *RARs* están menos relacionados entre sí de lo que lo están estos últimos con los *Trs*.

Hasta el momento presente sólo se han descrito las estructuras de otros dos genes pertenecientes a la subfamilia RXR: el *Rxrb* y el *Rxrg*, ambos de ratón. En general, podemos decir que la estructura del gen *hRXRA* presenta un patrón común con las de éstos, aunque también existen algunas diferencias. Ambos genes murinos presentan el intrón 3 dentro del primer dedo de zinc, posición característica de esta subfamilia, y el *mRxrg* también tiene 5 intrones interrumpiendo el dominio E. En cambio, el *mRxrb* posee sólo 4 en esta región. El análisis de las estructuras de estos tres genes muestra un altísimo grado de conservación entre los mismos. Este alto nivel de conservación se da tanto en el tamaño de los exones como en la localización y tipo de los intrones. El tamaño del exón 4 y de los 4 últimos exones que codifican la región E son idénticos para los tres subtipos de genes. Nótese que los exones 10 para el *hRXRA* y el *mRxrg*, y el exón 9 para el *mRxrb* codifican el extremo 3' del receptor pero contienen además las secuencias 3'-UTRs. Si tenemos en cuenta sólo el número de nucleótidos codificantes, estos tres exones tienen un tamaño uniforme igual a 145 pb. Los exones 2 y 3 también poseen tamaños muy similares. Por último, el tamaño del exón 5 del *mRxrb* es aproxi-

madamente igual a la suma de los tamaños de los exones 5 y 6 de los otros dos genes.

El gen *hRXRB* posee una estructura exón-intrón análoga al *hRXRA* y los genes *mRxrg* y *mRxrb*. Tanto el tamaño de los exones como la posición y tipo de intrones están conservados en estos genes. Al igual que los genes *hRXRA* y *mRxrg*, el *hRXRB* posee un intrón al comienzo del dominio E. Sin embargo este intrón no se encuentra en ratón, lo que posiblemente sea un ejemplo de eliminación de un intrón después de la divergencia entre ambas especies.

Consideraciones evolutivas

Los genes que codifican los receptores nucleares poseen una estructura genómica similar. La mayoría de ellos poseen una organización exón-intrón compleja, formada por unos 8-10 exones y sus respectivos intrones. En general, el dominio C está codificado por 2 exones y el dominio E por 4-6 exones. Las regiones promotoras descritas hasta el presente poseen las características de los promotores de los genes constitutivos y generalmente están embebidas en islas GpC. Hasta el momento la única excepción con respecto a esta estructura genómica común la constituyen los genes *COUP-TF I* y *II*^o.

Comparando los puntos de inserción de los intrones en la región de unión al DNA de los distintos receptores se puede observar que la posición del intrón siguiente al dedo CII es invariante para todos los receptores. Por otro lado, y contrastando con lo anterior, la posición del intrón entre ambos dedos es variable. Tomando como criterio la posición de este intrón se ha propuesto una subdivisión de los receptores nucleares en seis grupos¹¹: grupo I (*COUP-TF I* y *II*) que no posee este intrón; grupo II (*GR*, *MR*, *PR*, *ER* y *AR*), grupos III (*VDR*, *NGFI-B*), IV (*TR*, *RAR*, *EAR 1*) y V (*PPAR*) que poseen un intrón entre ambos dedos; y el grupo VI (*RXR*) que posee un intrón que interrumpe el primer dedo de Zn. Esta clasificación se corresponde casi perfectamente con la basada en la comparación de las secuencias del cDNA en el dominio C¹², con la excepción de la ubicación del *COUP-TF I* y *II* en un nuevo grupo y la separación de los *RXRs*

que forman un grupo independiente de los RARs. La posición invariante del intrón ubicado después del dedo CII en todos los miembros de la superfamilia sugiere la existencia de este intrón antes de la diversificación de estos receptores. Por contraste, la posición variable del intrón entre ambos dedos sería consecuencia de su inserción tras la separación de las seis subfamilias mencionadas.

Comparando la estructura exón-intrón en el dominio E encontramos que la posición del primer intrón en esta región está conservada en las subfamilias *RAR* y *TR* pero no en los *GRs* ni en los *COUP-TFs*. Dado que este intrón es de tipo 0 se ha propuesto que se corresponde con un intrón ya presente en el gen precursor¹³. Sin embargo este intrón no está presente en el *mRxb*.

Al comparar la localización de los intrones con respecto a la estructura tridimensional de las proteínas se puede observar que el intrón 3 interrumpe el primer dedo de zinc y el intrón 4 la hélice 3. Con respecto al tipo de exón entre ambos intrones observamos que éste es el único exón simétrico presente en el gen. La simetría de este exón, el más conservado en toda la superfamilia, podría indicar su origen antiguo y su participación en los procesos de intercambio de exones en las primeras fases de la evolución de estos receptores.

En el dominio de unión al ligando observamos una mayor correlación entre la posición de los intrones y los módulos estructurales de la proteína. Los intrones 5, 6 y 8 están localizados en aminoácidos en regiones de unión. Los intrones 7 y 9 están situados al comienzo de las hélices 7 y 10. Dado que la estructura tridimensional de este receptor, está conservada en su homólogo en *Drosophila* (*dusp*) es muy probable que la posición de los intrones también esté conservada, correspondiendo a la posición en un gen ancestral común.

Concluyendo, en este trabajo se ha determinado la estructura de los genes que codifican los receptores de retinoides humanos *RXRα* y *RXRβ*, cuyas estructuras son similares a la de los RARs pero con dos diferencias importantes: el sitio de inser-

ción atípico del intrón que interrumpe el dominio de unión al DNA en medio del primer dedo de zinc, y la presencia de un intrón más en el dominio de unión al ligando. La posición variable del intrón entre ambos dedos de zinc es consecuencia de su inserción después de la separación de los receptores en distintas subfamilias, lo que permite su clasificación filogenética. De acuerdo con la posición de este intrón los RXRs formarían un grupo independiente de los RARs. A su vez, la posición invariante del intrón localizado tras el segundo dedo de zinc en todos los miembros de la superfamilia sugiere su existencia antes de la diversificación de estos receptores. La estructura genómica de los receptores *hRXRα* y *hRXRβ* está altamente conservada, tanto entre sí como con respecto a la de el *mRrg* y *mRrb*, lo que permite predecir la estructura exón-intrón de los genes homólogos en otras especies, así como la estructura del *hRxy*.

También se ha determinado la estructura del gen *hKe4*. El gen, con un tamaño aproximado de 3 kb, que consta de 7 exones y 6 intrones. Mientras la región 5'-UTR y la metionina iniciadora están codificadas por el exón 1, el exón 7 contiene el codón de terminación y la región 3'-UTR.

BIBLIOGRAFÍA

1. PETKOVICH M. Regulation of gene expression by vitamin A: The role of nuclear retinoic acid receptors. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 443-471.
2. CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*; 1996; 10: 940-954.
3. LEID N, KASTNER P, CHAMBON P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 427-433.
4. ZELENT A, MENDELSON C, KASTNER P, KRUST A, GARNIER JM, RUFFENACH F et al. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J* 1991; 10: 71-81.
5. NAGATA T, KANNO Y, OZATO K, TAKETO M. The mouse RXRB gene encoding RXRb: genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from Cp6 island promoters. *Gene* 1994; 142: 183-189.

CLONADO Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÓMICA DEL RECEPTOR...

6. YU VC, DELSERT C, ANDERSE B, HOLLOWAY JM, DEVARY OV, NAAR AM et al. RXR beta: A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D receptor to their cognate response elements. *Cell* 1991; 67: 1251-1266.
7. MANO H, MORI R, OZAWA T, TAKEYAMA K, YOSHIKAWA Y, KOJIMA R et al. Positive and negative regulation of retinoid X receptor gene expression by thyroid hormone in the rat. Transcriptional and post-transcriptional controls by thyroid hormone. *J Biol Chem* 1994; 269: 1591-1594.
8. MANGELSDORF DJ, ONG ES, DYCK JA, EVANS RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990; 345: 224-229.
9. ENCÍO I, DETERA-WADLEIGH S. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 7182-7188.
10. RITCHIE H, WANG LH, TSAI S, O'MALLEY BW, TSAI MJ. COUP-TF gene: a structure unique for the steroid/thyroid receptor superfamily. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6857-6862.
11. BANIAHMAD A, TSAI M-J, BURRIS TP. The nuclear hormone receptor superfamily. En: Mechanism of steroid hormone regulation of gene transcription. Tsai M-J, O'Malley BW, eds., Austin: RG Landes, 1994.
12. LAUDET V, HANNI C, COLL J, CATZEFELS F, STEHELIN D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 1992; 11: 1003-1013.
13. KASTNER P, CHAMBON P, LEID M. Role of nuclear retinoic acid receptors in the regulation of gene expression. En: Vitamin A in health and disease. Blomhoff R, ed., New York: Marcel Dekker, 1994.