



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“AISLAMIENTO DEL cDNA DEL TRANSPORTADOR
ABCB6/*Abcb6* DE HÁMSTER”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

LIZETTE MARES GOMEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra.

Vocal: Dr. José Pedraza Chaverri.

Secretario: Dr. Luis Ramos Tavera.

Primer suplente: M. en C. José Ignacio Páramo Ramírez.

Segundo suplente: Dr. Ignacio González Sánchez.

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en el Departamento de Biología de la Reproducción, Laboratorio Bioquímica Hormonal.

Asesor:

Dr. Luis Ramos Tavera

Sustentante:

Lizette Mares Gómez

ÍNDICE

1 RESUMEN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Esteroides.....	2
2.2 Enzimas esteroideogénicas.	5
2.3 Familia de transportadores ABC.	7
2.4 ABCB6.....	11
2.5 Glándula de Harder.....	12
3 OBJETIVO	15
4 MATERIAL Y MÉTODOS	16
4.1 Obtención de tejidos.	16
4.2 Extracción de RNA.....	16
4.3 Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA del transportador Abcb6 mediante RACE (Rapid Amplication of cDNA Ends).	17
4.4 Purificación de los productos de PCR.	19
4.5 Síntesis de oligonucleótidos.....	19
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
4.7 Clonación del cDNA del transportador Abcb6 de Hámster.	21
4.8 Aislamiento de DNA plasmídico (Miniprep).	23
4.9 Aislamiento de DNA plasmídico (Maxiprep).	24
4.10 Secuenciación.	25
5. RESULTADOS	26
6 DISCUSIÓN	34
7 CONCLUSIONES	37
8 BIBLIOGRAFÍA	38

1 RESUMEN

La superfamilia de transportadores ABC son proteínas transmembrales dependientes de ATP. El transportador mitocondrial ABCB6 es una proteína involucrada en la resistencia a múltiples fármacos y en el transporte de porfirinas. Debido a que la glándula Harderiana de hámster exhibe un marcado dimorfismo sexual en la biosíntesis de porfirinas, en el presente trabajo se aisló, clonó y se determinó la secuencia nucleotídica del cDNA y la secuencia deducida de aa del transportador Abcb6. Mediante la extracción de RNA y ensayos de RACE se obtuvo el cDNA total del transportador Abcb6. El fragmento fue insertado en el vector de clonación pcDNA 3.1-NT-GFP TOPO y secuenciado. Los resultados obtenidos revelan que el cDNA clonado consiste de 2,836 pb con un marco de lectura abierto de 2529 pb que codifican para una proteína de 842 aa con un peso molecular de 93.5 kDa. La secuencia nucleotídica y deducida de aa reveló un porcentaje alto (85-93%) de identidad utilizando los transportadores Abcb6 de diversas especies de vertebrados. Se identificaron los dominios de unión a ATP y se pudo obtener la predicción de 8 dominios transmembranales para el transportador Abcb6 de hámster. Mediante el aislamiento y clonación del cDNA total se comprobó que la secuencia obtenida codifica para el transportador Abcb6 de hámster y que corresponde a la superfamilia de genes ABC involucrados en el transporte de iones y xenobióticos. Asimismo, la secuencia reveló un alto grado de homología lo cual indica una proteína altamente conservada. Los resultados obtenidos muestran que la integridad estructural es importante para mantener y conservar los dominios funcionales del transportador Abcb6 de hámster.

2 ANTECEDENTES

2.1 Esteroides.

Los esteroides son moléculas estructuralmente muy similares debido a su hidrocarburo policíclico denominado ciclopentanoperhidrofenantreno. No obstante su alta similitud, se encargan de regular diferentes procesos fisiológicos en vertebrados. Las hormonas esteroideas como andrógenos, estrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides son biosintetizados a partir del colesterol. Estas hormonas son importantes para el mantenimiento de las funciones reproductivas, metabólicas y homeostasis hidrolítica. En mamíferos primordialmente existen tres órganos encargados de la biosíntesis de esteroides: corteza suprarrenal, ovario y testículo (Miller y Auchus, 2011). Debido a que el colesterol es el precursor de las hormonas esteroideas, la esteroidogénesis inicia con la movilización de colesterol hacia el interior de la mitocondria, en donde su cadena lateral sufre oxidaciones y es biotransformado en pregnenolona (Whitfeld, 1999; Morzycki, 2014). La síntesis de testosterona (T) ocurre a través de dos vías: delta 4 (Δ^4) y delta 5 (Δ^5). En el roedor a diferencia del humano, la vía predominante para la síntesis de T es la vía Δ^4 . Esta ruta se caracteriza por la biotransformación de la pregnenolona en progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona y finalmente en androstendiona (Fig. 1). La androstendiona es un precursor en la biosíntesis de andrógenos y estrógenos (estradiol) (Miller, 2002; Fukami *et al.*, 2013).

La T y dihidrotestosterona (DHT) son los andrógenos más potentes, la T se encarga del desarrollo de los conductos de Wolff (epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales) y desarrollo de caracteres sexuales secundarios masculinos; mientras que la DHT es indispensable para la virilización de los genitales externos (escroto, pene y uretra peneana) durante la etapa embrionaria (Brinkmann *et al.*, 2001; Hughes, 2001; Miller, 2002; Sanderson, 2006). Durante la adolescencia el estradiol (E₂) induce el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios femeninos (Hanukoglu, 1992).

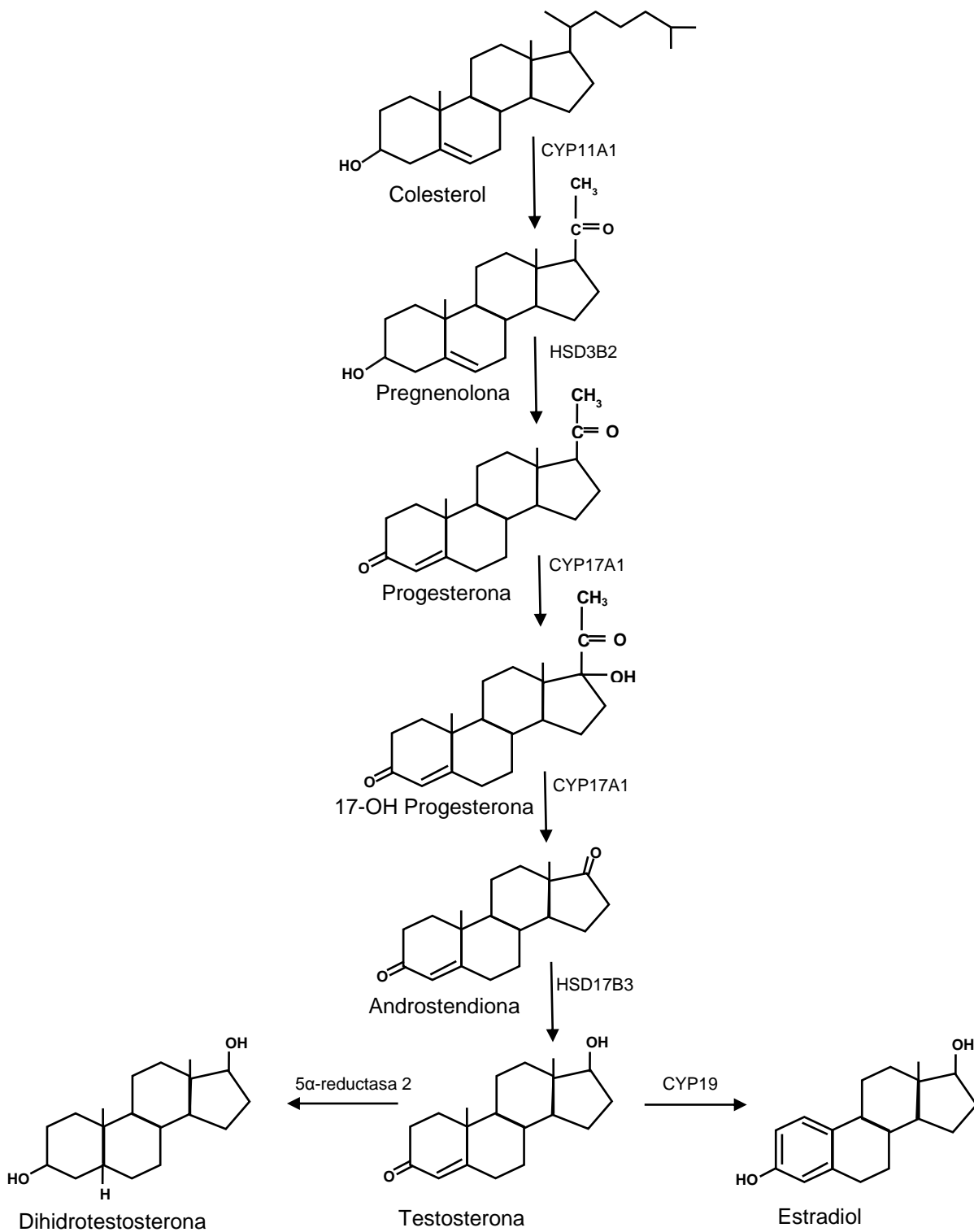


Fig. 1. Esquema representativo de la biosíntesis de T a partir del colesterol a través de la vía Δ^4 .

2.2 Enzimas esteroideogénicas.

La esteroideogénesis gonadal involucra la presencia de citocromos P450 (CYP), hidroxisteroide deshidrogenasas (HSD) y reductasas (Fig. 1). La proteína CYP11A1 (P450_{scc}) cataliza el paso limitante en la biosíntesis de hormonas esteroideas al biotransformar el colesterol en pregnenolona (esteroide con 21 átomos de carbono), mediante tres reacciones sucesivas. La primera reacción es la hidroxilación del carbono 20 (C20), después la hidroxilación en el C22 y finalmente la eliminación del enlace C20-C22 (Hanukoglu, 1992; Payne y Hales, 2006; Sanderson, 2006; Morzycki, 2014).

La 3 β -HSD (isomerasa) tipo 2 es una enzima anclada a la membrana mitocondrial externa y se encarga de catalizar la conversión de los Δ^5 -3 β -hidroxisteroides (pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona) a Δ^4 -3-cetoesteroides (progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona y androstendiona). La conversión inicia mediante la deshidrogenación del C3 y posteriormente la isomerización del Δ^5 -3 cetoesteroide a Δ^4 -3 cetoesteroide (Hanukoglu, 1992; Miller, 2002; Payne y Hales, 2006).

La proteína CYP17A1 (P450_{c17}) cataliza dos funciones mixtas: la 17 α -hidroxilación de la pregnenolona o progesterona y la eliminación del enlace C17-C20, produciendo esteroideas con 19 carbonos, dehidroepiandrosterona (DHEA) o androstendiona, respectivamente. En el humano, la enzima utiliza como sustrato la 17 α -hidroxipregnenolona para producir DHEA; en el roedor, la enzima utiliza la 17 α -

hidroxiprogesterona para formar androstendiona (Hanukoglu, 1992; Miller, 2002; Payne y Hales, 2006).

La enzima 17β -HSD tipo 3 cataliza el paso final de la esteroidogénesis gonadal, actúa como reductasa y oxidasa, convirtiendo los 17-cetoesteroides y 17β -hidroxi en andrógenos, estas reacciones se llevan a cabo a partir de DHEA y androstendiona en donde se obtiene androstendiol y T, respectivamente. La 5α -reductasa tipo 2 se encarga de la conversión de T en DHT, mientras que la proteína CYP19 (P450arom) realiza la aromatización del anillo A de la T para formar E_2 (Hanukoglu, 1992; Miller, 2002; Payne y Hales, 2006).

2.3 Familia de transportadores ABC.

La superfamilia de genes *ABC* (ATP-Binding Cassette) codifican para proteínas que transportan activamente una gran variedad de sustratos a través de las membranas extra o intracelulares. (Dean y Annilo, 2005). Estas proteínas tienen un papel importante en el transporte de lípidos, azúcares, iones y protección celular de xenobióticos (George y Jones, 2012). Existen 48 genes *ABC* en el genoma humano divididos en siete subgrupos (A-G). La asignación del subgrupo se basa en la similitud de la estructura proteica y en la homología de secuencia de los dominios de unión al nucleótido (NBD) y dominios transmembranales (TMD) (Dean y Allikmets, 1995; Dean *et al.*, 2001). Se ha descrito que mutaciones en los genes *ABC* causan diversas patologías como fibrosis quística, enfermedades neurológicas, así como defectos en el transporte de colesterol y lípidos (Dean y Annilo, 2005; Tarling *et al.*, 2013).

Los transportadores ABC son proteínas que se unen e hidrolizan ATP y utilizan esta energía para transportar diversas moléculas hacia el interior o exterior de la célula, así como a los diferentes compartimentos intracelulares (Higgins, 1992; Dean y Allikmets, 1995). En eucariontes, una proteína ABC funcional es clasificada como transportador completo si contienen dos dominios TMD y dos dominios NBD citoplasmáticos; o como hemi-transportador, si presenta un TMD y un NBD. Estos dominios pueden tener la forma de homodímeros o heterodímeros (Dean *et al.*, 2001; Hollestein *et al.*, 2007).

Los dominios TMD están compuestos de 6 a 11 α -hélices transversales a la membrana. Estos dominios forman la vía específica para transportar sustratos y presentan una baja similitud en su secuencia de aminoácidos (aa) (George y Jones, 2012), mientras que los dominios NBD están constituidos por motivos altamente conservados denominados Walker A (G-X-X-G-X-G-K-S/T, donde X es cualquier aa), Walker B (ϕ - ϕ - ϕ - ϕ -D, donde ϕ es un aa hidrofóbico) y Walker C (LSGGQ). Estos dominios están encargados de unir e hidrolizar ATP. Los NBDs comprenden una longitud aproximada de 200 aa (Hyde, *et al.*, 1990; Zutz *et al.*, 2009) (Fig. 2).

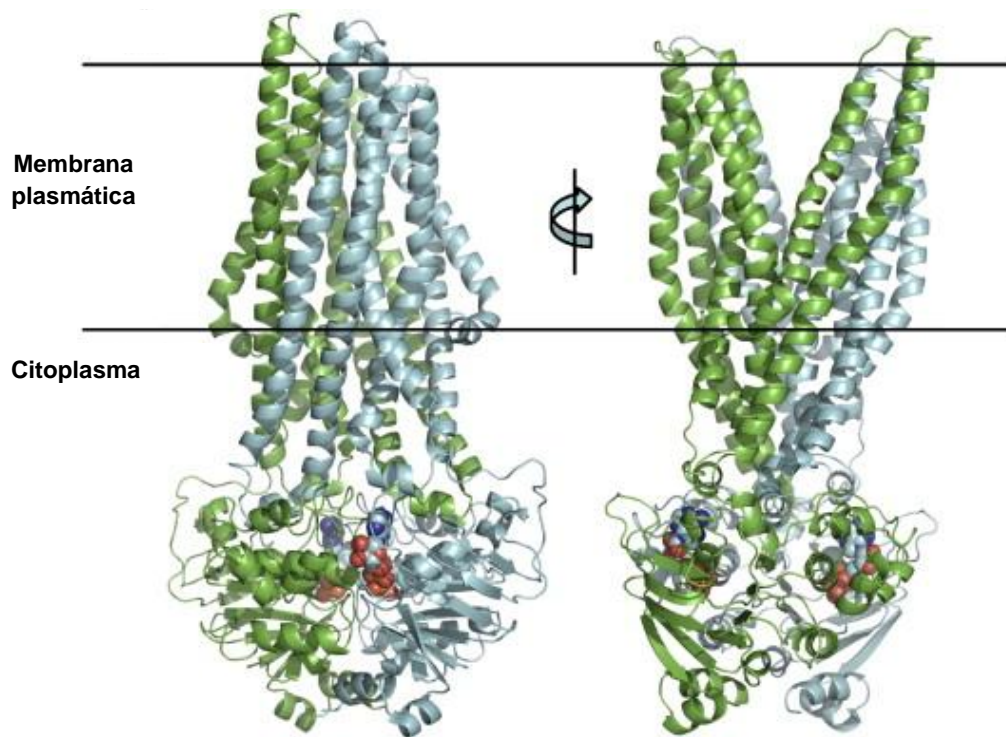


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura de un transportador ABC. Los TMD y NBD se representa en azul y verde, respectivamente. Existen dos dominios TMD con seis α -hélices cada uno y dos dominios NBD citoplasmáticos (Tomado de Zutz *et al.*, 2009).

El transporte que realizan las proteínas ABC es frecuentemente unidireccional y se divide en función a la dirección del mismo, exportadores e importadores (Zutz *et al.*, 2009). En eucariontes, los exportadores ABC movilizan sustratos del citoplasma hacia fuera de la célula o dentro de compartimentos celulares como retículo endoplasmático, mitocondria y peroxisomas (Hollestein *et al.*, 2007). Su función más conocida involucra el transporte de compuestos hidrofóbicos como colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares (Tarling *et al.*, 2013). Los importadores ABC están presentes sólo en procariontes y están involucrados en el importe de moléculas que no pueden ser obtenidas por difusión. Los importadores requieren de una proteína periplasmática de unión a sustratos, encargada de entregar dichas moléculas a los dominios TMD del transportador (Oldham *et al.*, 2008; Zutz *et al.*, 2009). La estructura de los importadores y exportadores fluctúa entre dos conformaciones, orientados hacia el interior y exterior del citoplasma (Oldham *et al.*, 2008; George y Jones, 2012).

En exportadores, la fluctuación de conformaciones se realiza a través de un mecanismo en donde el dímero de NBDs se mantiene abierto por los dominios TMD (recepción de sustratos). En presencia de ATP los dominios NBDs se cierran provocando su hidrólisis. El cierre del dímero ocasiona un cambio conformacional en los TMDs (liberación de sustratos) orientándolos hacia el lado opuesto del citoplasma. La liberación de los productos de hidrólisis genera nuevamente la apertura del dímero NBD y reorientación de los TMDs (Hollestein *et al.*, 2007; Oldham *et al.*, 2008) (Fig. 3).

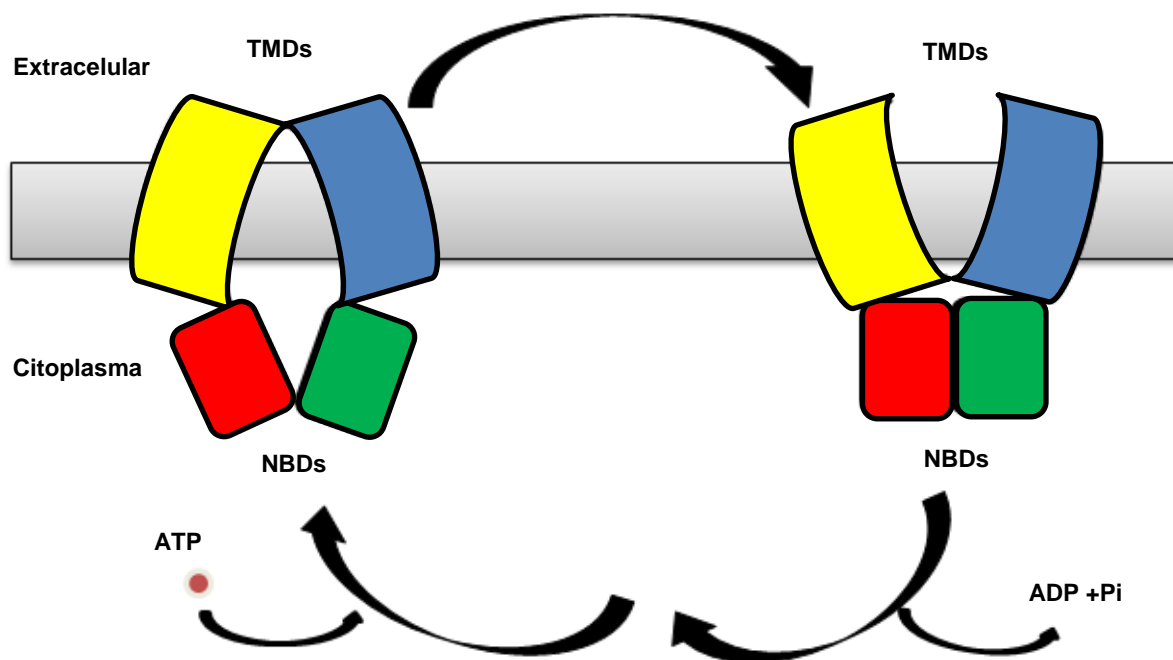


Fig. 3. Mecanismo de translocación de moléculas en los exportadores ABC. Las subunidades transmembranales se representan en color amarillo y azul. Los subdominios de unión a ATP se presentan en color rojo y verde.

En eucariontes, el subgrupo *ABCB* cuenta con 11 genes caracterizados molecularmente y es el único subgrupo formado por transportadores completos (*ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB5*, *ABCB11*) y hemi-transportadores (*ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB6*, *ABCB7*, *ABCB8*, *ABCB9*, *ABCB10*). Los miembros de esta subfamilia se ha asociado con el transporte de fármacos y la regulación en la homeostasis de hierro (Dean y Annilo, 2005; Masereeuw y Russel, 2012; Tarling *et al.*, 2013).

2.4 ABCB6.

El gen *ABCB6* (subfamilia B, miembro 6), también conocido como *MTABC3*, (Mammalian Mitochondrial ABC Protein 3), codifica para una proteína que se expresa en la membrana plasmática, retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi y primordialmente en la membrana mitocondrial externa (Zutz *et al.*, 2009; Tsuchida *et al.*, 2008). En humanos, el gen *ABCB6* abarca 11 kb y está localizado en el cromosoma 2q35. Contiene 19 exones que codifican para una proteína de 842 aa con un peso molecular aproximado de 80 kDa (Mitsuhashi *et al.*, 2000; Ulrich *et al.*, 2012) y no se ha descrito la presencia de pseudogenes en el gen *ABCB6* (Dean *et al.*, 2001).

El gen *ABCB6* de humanos presenta dos mutaciones Leu811Val y Ala57Thr asociados al fenotipo coloboma ocular y microftalmía, respectivamente (Wang *et al.*, 2012). Las mutaciones Leu356Pro y Gly579Glu se han relacionado al fenotipo de discromatosis hereditaria universal (DUH), un trastorno en la pigmentación de la piel (Zhang *et al.*, 2013).

La proteína *ABCB6* humana está involucrada en la homeostasis de hierro, en el mantenimiento del DNA mitocondrial y se ha demostrado que se requiere para la absorción de porfirinas en la mitocondria, tal es el caso de la translocación de la coproporfirina III (Emadi-Konjin *et al.*, 2001; Visapää *et al.*, 2002; Chavan *et al.*, 2013). Al respecto, se ha establecido un nuevo grupo sanguíneo denominado Langereis (Lan), en el que las células rojas de la sangre tienen como antígeno a la proteína *ABCB6* (Lan+) (Kiss *et al.*, 2012).

El transportador ABCB6 está relacionado con la subfamilia MDR/TAP, implicada en la resistencia a múltiples fármacos. En líneas celulares NCI-60 y K562 se han descrito niveles elevados de expresión del mRNA y de la proteína ABCB6 que confieren resistencia a arsénico, cisplatino y camptotecina, así como protección contra estrés celular (Park *et al.*, 2006). Asimismo, la sobreexpresión de ABCB6 ha sido asociada a leucemia mieloide y carcinoma hepatocelular (Emadi-Konjin *et al.*, 2001; Kiss *et al.*, 2012).

2.5 Glándula de Harder.

La glándula de Harder (GH) es una estructura túbulo-alveolar localizada en la parte posterior de la órbita ocular de vertebrados terrestre como anfibios, reptiles, aves y mamíferos, específicamente en aquellos que poseen membrana nictitante; a pesar de su amplia distribución, la GH está ausente en murciélagos, vacas, caballos y primates (Fig. 4) (Olcese y Wesche, 1989; Sbarbati *et al.*, 2002). Las funciones de la GH son diversas e incluyen lubricación de la córnea y nasofaringe, sitio de respuesta inmune, es un órgano fotoprotector y de termorregulación, es considerada un sitio de osmorregulación y en la mayoría de mamíferos funciona como una fuente potencial de feromonas (Payne *et al.*, 1982; Payne, 1994). Las secreciones de la GH varían en composición entre los diferentes grupos de vertebrados. Las células secretoras poseen vacuolas cuyo contenido puede ser mucoso, seroso o lipídico. En mamíferos se presentan secreciones con gran cantidad de lípidos (Payne, 1994; Esposito *et al.*, 2000).

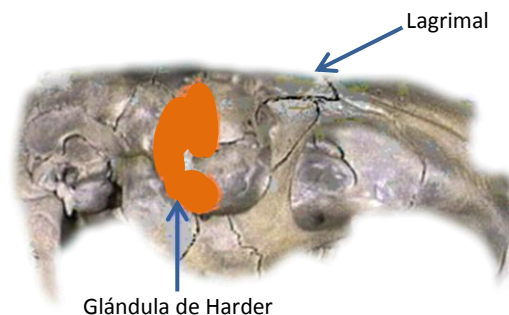


Fig. 4. Localización de la glándula de Harder en la órbita ocular de hámster.

En el hámster dorado existe un notable dimorfismo sexual a nivel morfológico y bioquímico caracterizado por la presencia de dos tipos de células epiteliales denominados tipo 1 y tipo 2 (las células tipo 1 presentan vacuolas pequeñas que secretan lípidos, mientras las células tipo 2 presentan vacuolas grandes que secretan lípidos). En el macho se presentan los dos tipos celulares, mientras que la hembra solo presenta el tipo 1. La GH de la hembra presenta altas concentraciones de porfirinas y bajas concentraciones en el macho, la actividad enzimática para sintetizar melatonina es mayor en la GH de la hembra que en la GH del macho. Existe gran abundancia de mastocitos en hembras en comparación de los machos (Payne *et al.*, 1982; Johnston *et al.*, 1985; Sbarbati *et al.*, 2002; Vilchis *et al.*, 2006).

Se ha observado que el dimorfismo sexual en la GH de hámster está influenciado por los niveles de esteroides gonadales (Vilchis *et al.*, 1987; Vilchis y Pérez-Palacios 1989; Vilchis *et al.*, 1992). Al respecto, se ha determinado que la castración de machos adultos altera la morfología de la GH induciendo su feminización; mientras que la administración de andrógenos (T y DHT) masculiniza la GH en hembras adultas. La

ovariectomía genera cambios menos drásticos en el dimorfismo sexual (Esposito *et al.*, 2000; Vilchis *et al.*, 2006).

En algunos roedores y específicamente en el hámster, la GH ha sido utilizada como modelo biológico para estudiar los efectos de las hormonas gonadales sobre la expresión y actividad de diversos factores (Ramos *et al.*, 2010). Asimismo, los reportes han mostrado que la GH del hámster biosintetiza grandes cantidades de porfirinas (Hoffman, 1971). Asociado a esto, se ha observado que la translocación de porfirinas requiere la presencia de transportadores anclados a membranas intracelulares. Debido a las características observadas en este tejido intraocular, como etapa inicial aislaremos el cDNA del transportador Abcb6 a partir de GH de hámster y se obtendrá la secuencia deducida de aa con la finalidad de determinar los dominios estructurales Walker A, B, C y transmembranales.

3 OBJETIVO

Determinar y caracterizar la secuencia nucleotídica y deducida de aa del transportador
Abcb6 de hámster.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Obtención de tejidos.

Para obtener los tejidos se utilizaron hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) adultos, los cuales se mantuvieron en condiciones de luz: 12 h, oscuridad: 12 h, con agua y alimento *ad libitum*. Los hámsters se sacrificaron por decapitación y se extrajeron las GH. Las muestras se limpiaron utilizando solución salina isotónica y se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -70°C hasta su uso.

4.2 Extracción de RNA.

Los tejidos se homogenizaron con Trizol (50-100 mg/ml) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), posteriormente se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol. Se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C. Al término de la centrifugación la fase acuosa se transfirió y se le agregaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de solución inicial. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a TA y se centrifugaron a 12,000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol (EtOH) al 75% por cada ml de Trizol. Se centrifugó a 12,000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se dejó secar a TA durante 5 minutos. El botón de RNA se disolvió en H₂O dd (H₂O bidestilada-desionizada) tratada con dietilpircarbonato (DEPC) al 1%. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente (DU 650 Beakman) y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de

etidio (BrEt). Los RNAs se observaron en un transiluminador (Molecular ChemiDoc TMXRS + Imaging System).

4.3 Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA del transportador Abcb6 mediante RACE (Rapid Amplication of cDNA Ends).

Para preparar y amplificar los extremos 5' y 3' de cDNA se utilizó el estuche SMARTer™ RACE cDNA Amplification de Clontech.

1) Síntesis de cDNA a partir de RNA total.

La síntesis de cDNA se preparó de la siguiente manera: a) Para la obtención del extremo 5' del cDNA se utilizó 1 µg de RNA total obtenido, 12 µM del oligonucleótido 5'-CDS A (5'-(T)25V N-3'). La reacción se llevó a un volumen final de 3.75 µl con H₂O dd (5' RACE-ReadycDNA). b) Para la obtención del extremo 3' del cDNA se utilizó 1 µg de RNA total obtenido, 12 µM del oligonucleótido 3'-CDS A (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30 V N-3'). La reacción se llevó a un volumen final de 4.75 µl con H₂O dd (3' RACE-ReadycDNA).

Ambos tubos se centrifugaron brevemente (Eppendorf 5415 C) y se incubaron a 72°C durante 3 minutos. Las muestras se colocaron a 42°C durante 2 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm (Microcentrifuga Eppendorf 5415 C) durante 10 segundos. A la reacción de síntesis del extremo 5' se le agregó 1 µl del oligonucleótido SMARTerIIA 12 µM (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX-3'). Se preparó una reacción

utilizando 4.0 μ l de solución 5X First-Strand, 0.25 μ l de RNase Inhibitor y 1.0 μ l de SMARTScribe Reverse Transcriptase. A partir de esta reacción se tomaron 5.25 μ l y se agregaron a las reacciones 5' RACE-ReadyDNA y 3' RACE-ReadyDNA.

Se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó a 42°C durante 90 min en un termociclador (Perkin Elmer 480). Las reacciones se calentaron a 70°C por 10 minutos y se diluyeron con 20 μ l de solución TE (Tris-EDTA).

2) Amplificación 5' y 3'-RACE- PCR.

Se preparó una reacción denominada 1 de la siguiente manera: 34.5 μ l de H₂O dd, 5.0 μ l de solución 10X Advantage 2 PCR, 1.0 μ l de dNTP Mix, 1.0 μ l de 50X Advantage 2 Polymerase Mix. La reacción se mezcló y se centrifugó brevemente. Para las reacciones de PCR se utilizaron: a) 5'-RACE-PCR: 2.5 μ l de 5'-RACE-ReadyDNA, 5 μ l del oligonucleótido universal (UPM) 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3', 1 μ l del oligonucleótido específico del gen 1 (GSP1) y 41.5 μ l de reacción 1. b) 3'-RACE-PCR: 2.5 μ l de 3'-RACE-ReadyDNA, 5 μ l de UPM 10X, 1 μ l de GSP2 y 41.5 μ l de reacción 1. Las condiciones de amplificación fueron: 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 68°C y 3 minutos a 72°C.

Se realizó una reacción de PCR "anidada" utilizando un oligonucleótido anidado universal (NUP) 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' y un oligonucleótido específico del gen anidado (NGSP). Se diluyeron 5 μ l de los producto de PCR en 245 μ l de solución TE. Las reacciones se realizaron con 5 μ l del producto diluido de PCR, 1 μ l

de NUP, 1 μ l de NGSP y 41.5 μ l de reacción 1. Se utilizaron 20 ciclos del programa de amplificación ya establecido. Al terminar la reacción de PCR “anidada” el DNA se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

4.4 Purificación de los productos de PCR.

Los extremos del cDNA obtenidos se amplificaron nuevamente preparando reacciones de PCR de 25 μ l y se depositaron en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt. La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts y las muestras se analizaron en un transiluminador. Los segmentos de PCR con la talla esperada se aislaron y se colocaron en membranas de diálisis (Spectra/Por) con TBE 0.5X para electroeluir las muestras durante 15 minutos a 100 volts. El eluido obtenido fue colocado en columnas Amicon Ultra® con 1 ml de H₂Odd. Las columnas se centrifugaron a 1,000 xg durante 10 minutos. El DNA se cuantificó espectrofotométricamente y se analizó en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt.

4.5 Síntesis de oligonucleótidos

Se diseñó un conjunto de oligonucleótidos para amplificar diferentes regiones del gen *Abcb6* y un par de oligonucleótidos ABCB65 y ABCB633 para la amplificación del cDNA total utilizando el programa PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/primerquest/>).

Oligonucleótidos utilizados para obtener el cDNA del transportador Abcb6

5'-TCA ATG CCT GGT TTG GCC TCA TTG T-3'

5'-ATC AGC TCT GGC TGC ATC CGA ATA-3'

5'-CCA CCT ATG TCT TCC TCA AGT T-3'

5'-AGA CCC AGA ACT TGG TGA TTG-3'

ABCB65: 5'-GAG TTC GGC CAG CAA CTA CAC AT-3'

ABCB633: 5'-AAA AGA TGT GTT CCC TCT CTG GCC-3

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción se realizó al mezclar 2.5 µL solución de PCR 10X TaqAdv, dNTPs 25 µM, 20 µM de oligonucleótido 5' ABCB65, 20 µM de oligonucleótido 3' ABCB63, dimetilsulfóxido al 4% v/v, 0.5 µl de TaqAdv (Promega), 3.0 µl de cDNA y se llevaron a un volumen final de 25 µl con H₂O dd. La reacción de PCR se colocó en un termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 3 minutos a 65°C, 1 minuto a 72°C y 1 ciclo de 3 minutos a 72°C.

Se tomaron 5 µl de los productos de PCR, se les adicionaron 3 µl de solución de carga (azul de bromofenol 0.25%, cianol xileno 0.25% y ficol 400 15.0%) y se depositaron en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt. Las muestras se corrieron a 100 volts. Los geles se analizaron en un transiluminador.

4.7 Clonación del cDNA del transportador Abcb6 de Hámster.

Para clonar el transportador Abcb6 de hámster dorado se utilizó el estuche pcDNA 3.1-NT-GFP TOPO® Cloning de Invitrogen (Fig. 5).

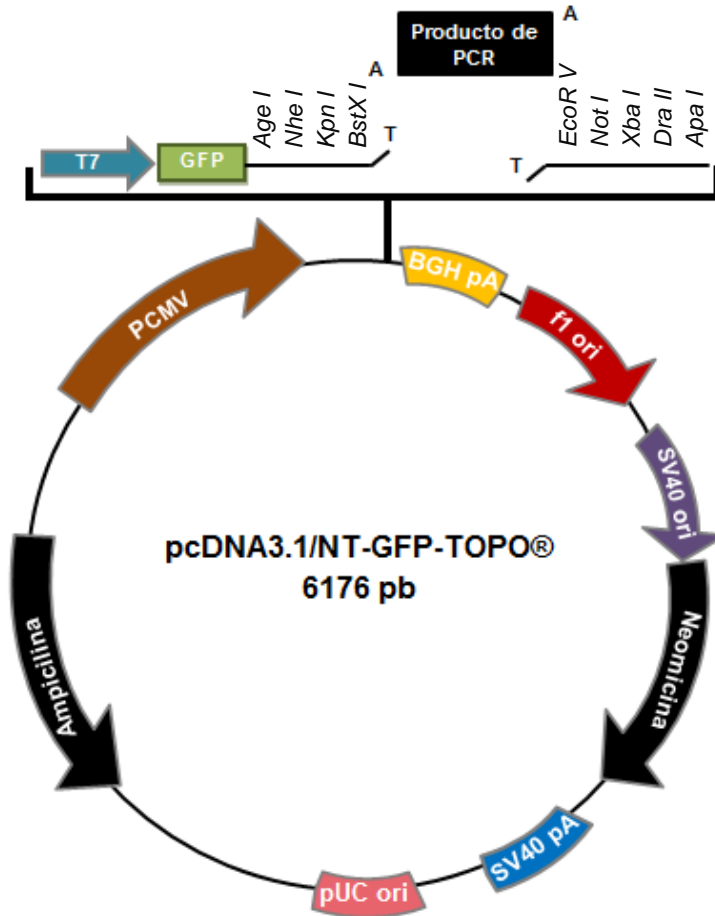


Fig. 5. Representación esquemática del vector de clonación en donde se observan las regiones de importancia para el adecuado funcionamiento y análisis.

1) Reacción TOPO®Cloning.

La reacción se realizó con 3 μ l de producto de PCR previamente obtenido, 1 μ l de solución salina (NaCl 1.2 M, MgCl₂ 0.06 M), 1 μ l de H₂O y 1 μ l del vector TOPO. Se mezcló suavemente y se incubó a TA durante 10 minutos.

2) Transformación química OneShot TOP10.

Se adicionaron 2 μ l de la reacción TOPO® Cloning en un vial de células OneShot TOP10 Chemically Component *E.coli* y se mezcló suavemente. El vial se incubó en hielo durante 10 minutos. Terminada la incubación, la reacción se sometió a choque térmico durante 30 segundos a 42°C (Precision Dubnoff Metabolic Shaker Incubator) e inmediatamente se transfirió la reacción a hielo. Se agregaron 250 μ l de medio SOC (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación horizontal a 225 rpm (Heidolph UNIMAX 1010 + Inkubator 1000). Las células *E. coli* transformadas se sembraron en placas LB-agar (32 g de medio agar LB, 5 g de NaCl) con 100 μ g/ml ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias transformadas se inocularon en 7 ml de medio LB (20 g de medio caldo LB, 5 g de NaCl) con 100 μ g/ml ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación horizontal. El DNA plasmídico se aisló utilizando el estuche GenElute™ Five-Minute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich).

4.8 Aislamiento de DNA plasmídico (Miniprep).

En un tubo colector de 2 ml se agregaron 400 μ L de cultivo bacteriano y 40 μ L de solución de Reconstituted Lysis. Se mezcló por inversión y se incubó a TA durante 2 minutos. Se agregaron 400 μ l de Binding Solution al lisado y se mezcló por inversión 15 veces. La mezcla se colocó en una columna de unión y se sometió a centrifugación (Microcentrifuga Eppendorf 5415 C) durante 20 segundos a máxima velocidad. El eluido se descartó y se adicionaron 700 μ l de Washed Solution a la columna. Se centrifugó durante 30 segundos y se decantó el eluido. La columna se transfirió a un tubo colector limpio y se agregaron 30 μ l de solución de elución directamente en el filtro. Se centrifugó durante 30 segundos. El DNA eluido se recolectó y se analizó mediante restricción.

a) Restricción enzimática.

Se realizó una digestión enzimática utilizando 2 μ l de solución amortiguadora 10X H (Tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM, Ditioneitol 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5), 2 μ l solución amortiguadora 10X L (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, Ditioneitol 10 mM, pH 7.5), 0.5 μ l de enzima *KpnI*, 0.5 μ l de enzima *EcoRV*, 5 μ l de cDNA y la reacción se llevó a un volumen final de 20 μ l con H₂O dd. La reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Al término de la incubación los productos digeridos se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

4.9 Aislamiento de DNA plasmídico (Maxiprep).

Se eligieron algunas clonas a partir de la restricción enzimática, se inocularon 400 µl de las clonas seleccionadas en 100 ml de medio LB (75 µg/ml ampicilina) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 225 rpm.

Se utilizó el estuche PureYield™ Plasmid Maxiprep System de Promega. A partir de 100 ml de medio LB se obtuvo el botón celular por centrifugación a 2,500 xg durante 10 minutos a TA. El sobrenadante se descartó, se agregaron 12 ml de Cell Resuspension Solution y se agitó vigorosamente hasta resuspender el botón celular. Se adicionaron 12 ml de Cell Lysis Solution, se mezcló suavemente y se incubó por 3 minutos a TA. Se adicionaron 12 ml de Neutralization Solution al lisado celular y se mezcló suavemente. La mezcla se centrifugó a 12,000 xg durante 20 minutos a TA. Se ensambló la columna Blue PureYield™ Clearing dentro de la columna White PureYield™ Maxi Binding, ambas columnas se colocaron en un puerto colector de vacío. El lisado se colocó dentro de la columna azul y se aplicó vacío hasta que el líquido pasó por ambas columnas. La columna azul se descartó y se conservó la columna blanca. Se adicionaron 5 ml de Endotoxin Removal Wash a la columna, se accionó el vacío, posteriormente se agregaron 20 ml de Column Wash, se accionó el vacío durante 5 minutos. Se colocó la columna PureYield™ Maxi Binding dentro de un tubo falcón de 50 ml y se agregó 1 ml de H₂O Nuclease-Free directamente a la membrana de la columna de unión. Se sometió a centrifugación en un rotor oscilante a 1,000 xg por 5 minutos. Se recolectó el eluido que contenía el DNA plasmídico y se almacenó a -20°C.

4.10 Secuenciación.

Los productos amplificados por PCR y el DNA plasmídico se analizaron en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados obtenidos se examinaron en el programa ChromasLite 2.1.1 (www.technelysium.com.au). Las secuencias se analizaron al menos dos veces en ambos sentidos.

5. RESULTADOS

Para conocer la secuencia que comprende el transportador Abcb6 de hámster dorado, se extrajo RNA total de la GH y se comprobó su integridad al visualizar las bandas características del RNA ribosomal (rRNA) 28S y 18S (Fig. 6). El RNA total se sintetizó a cDNA mediante RACE y se obtuvieron fragmentos de 700 pares de bases (pb) correspondientes al extremo 3' y bandas de 600 pb para el extremo 5' (Fig. 7).

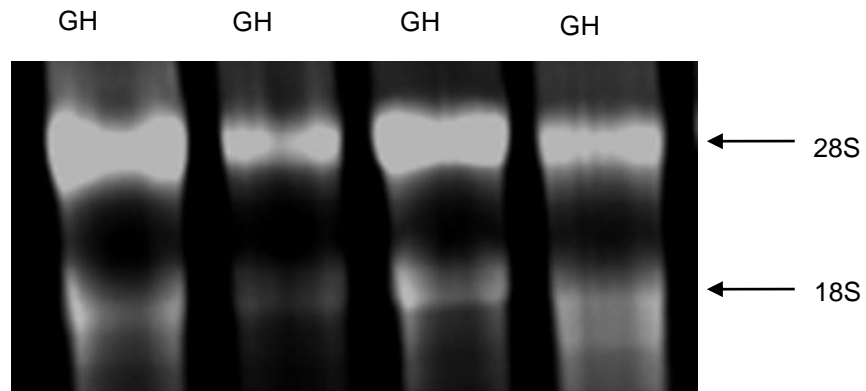


Fig. 6. La integridad de RNA total de GH se determinó mediante la observación del rRNA 18S y 28S en geles de agarosa al 2% teñidos con BrEt.

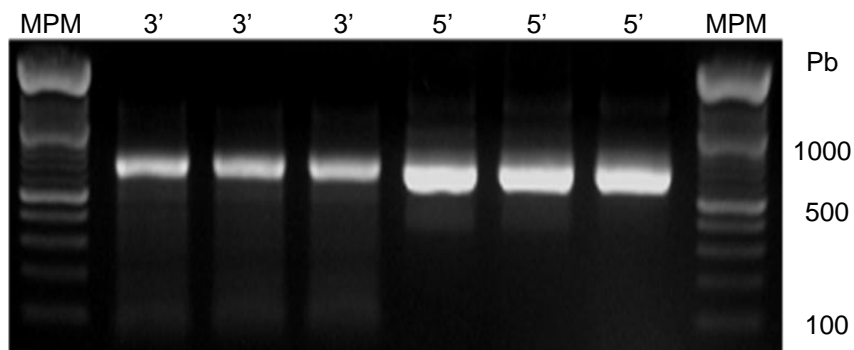


Fig. 7. Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA mediante RACE utilizando GH de hámster. El análisis se realizó en geles de agarosa al 1% teñido con BrEt. MPM: marcador de peso molecular de 100 pb.

El cDNA obtenido se purificó y se ligó a un vector de clonación. Las clonas 1 a 7 contenían el fragmento correspondiente al extremo 3' y las clonas 8 a 15 el fragmento del extremo 5'. El DNA plasmídico se aisló, se amplificó y se sometió a ensayos de restricción enzimática. El análisis de los plásmidos digeridos y del plásmido sin digerir demostró que las clonas 4, 5, 7-15 presentaban el fragmento esperado de 700 y 600 pb de los extremos 3' y 5', respectivamente (Fig. 8).

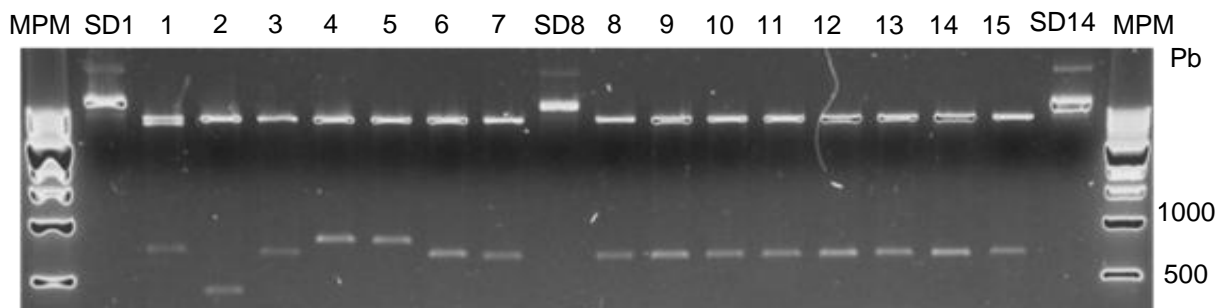


Fig. 8. Restricción enzimática del DNA plasmídico con *KpnI* y *EcoRV*. 1-15: clonas digeridas, SD: sin digerir, MPM de 1000 pb. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

A partir de los resultados obtenidos con miniprep se seleccionaron las clonas 5, 9 y 10. Se realizó un maxiprep y una restricción enzimática de dichas clonas. Se observó que la clona 5 tenía una banda de 700 pb mientras que las clonas 9 y 10 tenían bandas de 600 pb (Fig. 9).

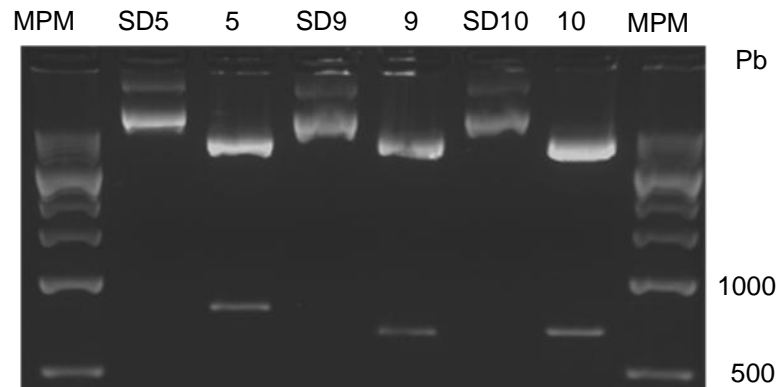


Fig. 9. DNA plasmídico digerido con las enzimas de restricci3n *KpnI* y *EcoRV*. 5, 9 y 10: vector digerido, SD: clonas sin digerir, MPM de 1 kb. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

El cDNA se purific3 y posteriormente los productos se sometieron a secuenciaci3n directa (Fig. 10). A partir del an3lisis de la secuencia se diseñaron un par de oligonucle3tidos (ABCB65 y ABCB633) específcos para los extremos 3' y 5'.

Extremo 5'

CCACCTATGTCTTCCTCAAGTT CCTCCAGGGGGTGGCACTGGCAGTACAGGTTTCGTGAGCAACCTGCGG
 ACCTTCCTGTGGATCCGGGTACCGCAGTTCACATCCCGAGGTGTGGAGCTGCGCCTTCTCTCCCATCTGCA
 CGAGCTCTCACTGCGCTGGCACCTGGGCCGGCGCACAGGGGAGGTGCCTCGGGTTGTGGACCGGGGAACT
 CCAGCGTCACAGGACTGCTCAGCTACCTGGTGTTC AACATCATCCCCACCCTGGCTGACATCATTATTGGC
 ATCATCTACTTCAGCATGTTCT TCAATGCCTGGTTTGGCCTCATTGT GTTCCTGTGCATGAGTCCTTACCT
 CTTCTGACTATTGTGGTCACTGAGTGGAGAGCCAAGTTTCGCCGTGCTATGAACACACAGGAAAACATCA
 CCAGGGCACGAGCAGTGGACTCGCTGCTAACTTTGAGACGGTGAAATACTACAATGCTGAGGGTTATGAA
 GTAGAACGCTACCGAGAGGCCATCATCAAGTATCAGGGTTTGGAGTGGAAATCAAGTGCTTCACTGGTTGT
 ATTGAATCAGACCCAGA ACTTGGTGATTGGGCTTGGGCTCCTGCCCCGCTCCT

Extremo 3'

AGACCCAGA ACTTGGTGATTGGCTTGGGCTCCTGCCCCGCTCCTTACTTTGTGCATACTTTGTGAGTGAG
 CAGAAGTTGCAGGTTGGGGACTTTGTGCTTTTTGGCACTTATATCACTCAACTGTACATGCCTCTCAATCG
 GTTTGGCACCTACTACAGGATGATTCAGACTAACTTCATTGACATGGAGAACATGTTTGACTTGCTGAAAG
 AGGAAACAGAAGTGAAGGATGTTCTTGGAGCAGGGCCCTTCGTTTTATAAGGGCCAGATTGAATTTGAA
 AATGTACTACTTCAGCTATGCTGATGGGCGGAGACTTGACTTTACAGGATGTGTCTTCACTGTGATGCCT
 GGACAGACGGTGGCTCTGGTGGGGCCATCTGGGGCTGGAAAGAGCACAATTTTACGCCTGCTGTTTCGCTT
 CTATGAC ATCAGCTCTGGCTGCATCGCAATA GATGGACAGGACATTTACAGGTGACCCAGATCTCTCTCC
 GGTCTCACATTGGAGTTGTGCCCCAGGACTGTCTCTTCAATGACACCATTGCCAACAAATATCCGCTAC
 GGTTCGCATCGCAGCTGGGGACAGTGAGGTAGAGGCCGAGCTCAAGCTGCAGGCATTCACGATGCCATCCT
 GTCTTTCCCTGAAGGGTATGATACGCAGGTGGGCGAGCGGGGACTGAAGCTAAGCGGCGGTGAGAAGCAGC
 GAGTGGCCATCGCCCCGACCATTCTTAAGGCTCCAGACAT

Fig. 10. Secuencia nucleotídica de los extremos 5' y 3' del gen Abcb6 del hámster. Los oligonucleótidos 5' y 3' se indican con color verde y gris, respectivamente.

Con la finalidad de amplificar el cDNA total del transportador Abcb6, se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos ABCB65 y ABCB633. Los productos amplificados se sometieron a secuenciación directa. La secuencia nucleotídica obtenida a partir del cDNA total de GH fue de 2,836 pb con un marco de lectura abierto (ORF) de 2,529 pb. El análisis de la secuencia nucleotídica reveló un codón de inicio ATG y un codón de término TAG. La región 5' no traducida (UTR) abarca 119 pb, mientras que la 3' UTR es de 188 pb. La región 3' UTR presenta una señal de poliadenilación canónica AATAAA (Fig. 11). A partir de esta secuencia se obtuvo un polipéptido deducido de 842 aa con una masa molecular teórica de 93.5 kDa.

Al comparar la secuencia deducida de aa del Abcb6 de hámster con la secuencia del transportador de ratón (*Mus musculus* NP_076221) se encontró un porcentaje de identidad del 93%, un 92% con la rata (*Rattus norvegicus* NP_542149), un 88% con el humano (*Homo sapiens* NP_005680.1) y un 86% con la vaca (*Bos taurus* NP_001091625). El Abcb6 de las 5 especies presenta regiones muy conservadas en los dominios de unión a ATP: motivos Walker A, Walker B y Walker C. El motivo C denominado LSGGQ, correspondiente a los residuos 729-733, presenta un cambio en el quinto aa al reemplazar una glutamina (Q) por un ácido glutámico (E) LSGGE (Fig. 12). El análisis *In silico* sobre predicción de dominios transmembranales (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) indicó que el Abcb6 de hámster presentaba 8 TMDs, en el ratón 9 TMDs, en la rata 8 TMDs, en el humano 9 TMDs y en la vaca 11 TMDs (Fig. 13).

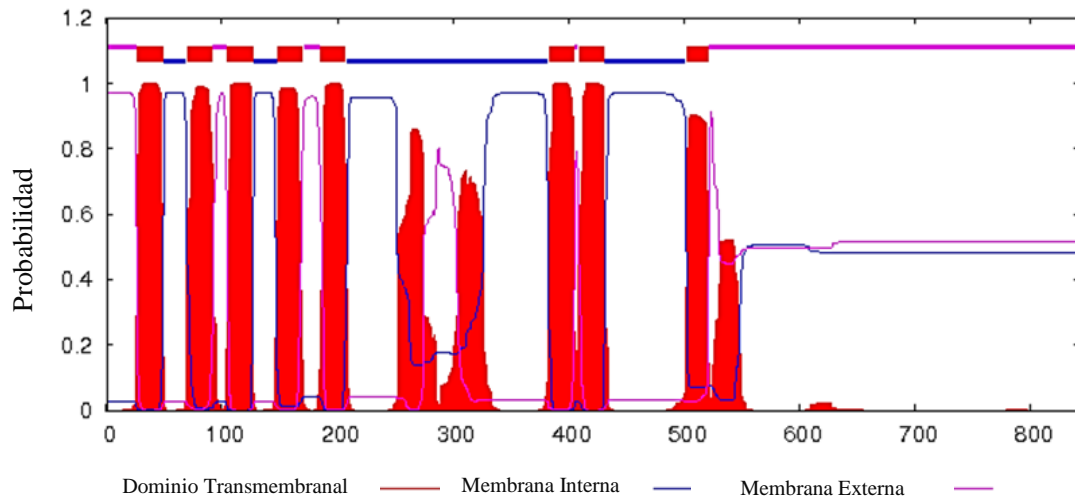


Fig. 13. Secuencia de aa del transportador Abcb6 de y predicción de dominios transmembranales del Abcb6 de hámster (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

6 DISCUSIÓN

La proteína ABCB6 es un transportador transmembranal dependiente de ATP vinculado al desarrollo ocular de vertebrados (Wang *et al.*, 2012). Interesantemente, se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína está asociada a la resistencia de fármacos anticancerígenos (Kiss *et al.*, 2012). La proteína ABCB6 ha sido relacionada al transporte de compuestos no fisiológicos como xenobióticos; asimismo está involucrado en el transporte de esteroides y porfirinas. Al respecto, se ha observado que la cantidad de porfirinas en la GH de roedores varía según la especie. Se ha demostrado que la presencia de estas moléculas tetrapirrólicas está en altas concentraciones en el hámster y que la concentración de porfirinas es más elevada en hembras que en machos. Se ha demostrado que la síntesis de porfirinas en esta especie está influenciada por las hormonas sexuales (Vilchis y Pérez-Palacios 1989; Vilchis *et al.*, 1992). Debido a que la GH del hámster exhibe un marcado dimorfismo sexual en la biosíntesis de porfirinas (Thompson *et al.*, 1984; Vilchis F., *et al.* 2006), en este trabajo hemos utilizado como modelo experimental la GH del hámster para aislar, clonar y caracterizar la secuencia nucleotídica del cDNA total y obtener la secuencia deducida de aa del transportador Abcb6.

El cDNA clonado consistió de 2529 pb que codifican para una proteína de 842 aa. La selección del sitio de inicio de la traducción ATG de transportador Abcb6 se obtuvo en función al ORF que proporcionaba la proteína completa y siguiendo las reglas de las secuencias Kozak. En vertebrados, las secuencias Kozak han sido determinadas como (A/G)CCAUGG, siendo los nucleótidos de las posiciones -3 y +4 los

más importantes (la posición 1 es la A del codón de inicio AUG). En diversos estudios se ha demostrado que mutaciones en estas posiciones reducen significativamente la eficiencia de traducción (Kozak 1997; Tatematsu *et al.*, 2014). Interesantemente, a partir de la selección correcta del ATG de inicio pudimos obtener completa la secuencia deducida de aa del Abcb6 de hámster.

El control de la vida media del mRNA ha sido asociado al desarrollo y progresión de enfermedades, por lo que la desregulación de este ocasiona condiciones patológicas como cáncer de mama (Griseri y Pagès, 2014). Asimismo, la estabilidad del mRNA es regulada a través de la región 3' UTR por diferentes mecanismos que incluyen la poliadenilación, la cual protege a los mRNAs de la degradación. En diferentes estudios se ha demostrado que el procesamiento de los pre-mRNAs de mamíferos consta de dos reacciones sucesivas, la hidrólisis de un enlace fosfodiéster en los pre-mRNAs y la adición de una secuencia de poli(A) en el extremo 3' (Laishram 2014; Hajjawi, 2015). Las señales de poliadenilación más conservadas o canónicas son las secuencias hexaméricas AAUAAA y un dominio rico en GU (Davis y Shi, 2014; Laishram 2014). Los resultados obtenidos revelan que la región 3' UTR del Abcb6 de hámster presentó una señal de poliadenilación AAUAAA común a la gran mayoría de las secuencias nucleotídicas aisladas para diferentes especies de vertebrados. Es importante mencionar que esta señal precede a una secuencia de poliadeninas que es una región importante para la maduración y protección del mRNA.

La estructura canónica de los transportadores ABC comprende 2 dominios NBD y 2 dominios TMD. Los NBDs están encargados de unir e hidrolizar ATP y contienen 3

motivos altamente conservados denominados Walker A, Walker B y el motivo C. Mediante el uso del programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp>) se realizó el alineamiento de la secuencia deducida de aa del Abcb6 de hámster con la misma proteína de otras especies, en donde obtuvimos que los motivos Walker A, Walker B y Walker C son regiones muy conservadas, esto indica que los residuos de aa son clave para una función biológica normal, tal es el caso de la lisina que forma un compuesto de coordinación con el grupo fosfato- γ del ATP, un ácido aspártico que interacciona con el Mg^{2+} y el Walker C que caracteriza a los transportadores ABC de otras proteínas de unión a ATP, respectivamente (Chavan *et al.*, 2013).

Los TMDs son regiones que proporcionan la especificidad y ruta de transporte de los sustratos, generalmente están formadas por 6-11 α -hélices transmembranales y son regiones poco conservadas (Zutz *et al.*, 2009; George y Jones, 2012). Interesantemente, estas regiones se caracterizan por presentar un alto porcentaje de aa hidrofóbicos y extremos amino y carboxilo terminal localizados en el citoplasma. En la predicción de los TMDs del Abcb6 de hámster se obtuvieron 8 α -hélices con propiedades hidrofóbicas típicas de una región transmembranal que incluye un promedio de 23 ± 2 aa. A pesar que los ensayos de análisis comparativo revelaron que los TMDs son dominios con baja homología en su secuencia se pudo observar que las regiones para otras especies presentan las características clásicas de un dominio transmembranal.

7 CONCLUSIONES

En conclusión en este trabajo se aisló, se clonó y se caracterizó la secuencia nucleotídica del cDNA total del transportador Abcb6 de hámster y se obtuvo la secuencia deducida de aa. La secuencia nucleotídica y deducida de aa del Abcb6 de hámster reveló altos porcentajes de identidad con las secuencias del Abcb6 de otras especies de vertebrados con lo que se puede concluir que es una secuencia altamente conservada dentro del grupo de vertebrados. Además los resultados revelaron la presencia de dominios de unión a ATP muy conservados y dominios transmembranales, los cuales son clave importante para que el transportador sea funcionalmente activo.

8 BIBLIOGRAFÍA

Brinkmann A.O. 2001. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 179:105-109.

Chavan, H., Taimur-Khan, M.M., Tegos, G., Krishnamurthy P., 2013. Efficient purification and reconstitution of ATP binding cassette transporter B6 (ABCB6) for functional and structural studies. *J Biol Chem* 288: 22658-22669.

Davis, R., Shi, Y., 2014. The polyadenylation code: a unified model for the regulation of mRNA alternative polyadenylation. *J Zhejiang Univ Sci B* 5(5): 429-437.

Dean, M., Allikmets, R., 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5(6):779-785.

Dean, M., Annilo, T., 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 123-142.

Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R., 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11: 1156-1166.

Emadi-Konjin, H.P., Zhang, H., Anandan, V., Sun, D., Schuetz, J., Furuya, K.N., 2001. Isolation of a genomic clone containing the promoter region of the human ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB6. *BBA* 1574: 117-130.

Esposito, T., Astore, E., Dominguez, P., Chieffi, G., Varriale, B., 2000. Sequence analysis regulation of MHG07 (male Harderian gland) mRNA in male hamster Harderian gland. *Gen Comp Endocrinol* 119: 132-139.

Fukami, M., Homma, K., Hasegawa, T., Ogata, T., 2013. Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn* 242: 320-329.

George, A.M., Jones, P.M., 2012. Perspectives on the structure-function of ABC transporters: The switch and constant contact models. *Prog Biophys Mol Biol* 109: 95-107.

Griseri, P., Pagès, G., 2014. Regulation of the mRNA half-life in breast cancer. *World J Clin Oncol* 5(3): 323-334.

Hajjawi, O.S., 2015. Ribonucleic acid (RNA) biosynthesis in human cancer. *Cancer Cell* 15:22.

Hanukoglu, I., 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43(8): 779-804.

Higgins, C.F., 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67-113.

Hoffman, R.A., (1971) Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamsters. *Am J Anat* 132: 463-478.

Hollestein, K., Dawson, R.J.P., Locher, K.P., 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* 17: 412-418.

Hughes I.A. 2001. Minireview: Sex Differentiation. *Endocrinology* 142: 3281-3287.

Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F., 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-365.

Johnston, H.S., Mcgadey, J., Thompson, G.G., Moore, M.R., Breedw, G., Payne, A.P., 1985. The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the Plains mouse (*Pseudomys australis*). *J Anat* 140 (2): 337-350.

Kiss, K., Brozik, A., Kucsma, N., Toth, A., Gera, M., Berry, L., Vallentin, A., Vial, H., Vidal, M., Szakacs, G., 2012. Shifting the paradigm: the putative mitochondrial

protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. PLoS One 7(5):e37378.

Kozak, M., 1997. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. EMBO J 16 (9): 2482–2492.

Laishram, R.S., 2014. Poly(A) polymerase (PAP) diversity in gene expression –Star-PAP vs canonical PAP. FEBS Lett 588: 2185–2197.

Masereeuw, R., Russel, F.G.M., 2012. Regulatory pathways for ATP-binding cassette transport proteins in kidney proximal tubules. AAPS J 14(4).

Miller, W.L., 2002. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. Mol Cell Endocrinol 198: 7-14.

Miller, W.L., Auchus R.J., 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocr Rev 32: 81-151.

Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, H., Shibata, T., Seino, S., 2000. MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis. J Biol Chem 275: 17536-17540.

Morzycki, J.W., 2014. Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids* 83: 62-79.

Oldham, M.L., Davison, A.L., Chen, J., 2008. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 18: 726-733.

Olcese, J., Wesche, A., 1989. The Harderian gland. *Comp Biochem Physiol A* 93(4): 655-665.

Park, S., Shimizu, C., Shimoyama, T., Takeda, M., Ando, M., Kohno, T., Katsumata, N., Kang, Y.K., Nishio, K., Fujiwara, Y., 2006. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 99(1): 9-17.

Payne, A.H., Hales, D.B., 2006. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25(6): 947-970.

Payne, A.P., 1994. The harderian gland: a tercentennial review. *J Anat* 185 (1): 1-49.

Payne, A.P., McGadey, J., Johnston, H.S., Moore, M.R., Thompson, G.G., 1982. Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. *J Anat* 135 (3): 451-461.

Ramos, L., Chávez, B., Vilchis, F., 2010 Cloning and differential expression of steroid 5 α -reductase type 1 (Srd5a1) and type 2 (Srd5a2) from Harderian glands hamster. *Gen Comp Endocrinol* 166: 388-395.

Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* 94(1): 3-21.

Sbarbati, A., Calderan, L., Nicolato, E., Marzola, P., Lunati, E., Donatella, B., Bernardi, P., Osculati, F., 2002. Magnetic resonance imaging of the rat Harderian gland. *J Anat* 201: 231–238.

Tarling, E.J., de Aguilar Vallim, T.Q., Edwards, P.A., 2013. Roles of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol Metab* 24(7).

Tatematsu K., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., 2014. Effect of ATG initiation codon context motifs on the efficiency of translation of mRNA derived from exogenous genes in the transgenic silkworm, *Bombix mori*. *Springerplus* 3: 136.

Thompson, G.G., Hordovatzki X, Moore, M.R., McGadey, J., Payne, A.P., 1984. Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. *Int J Biochem* 16: 849-852.

Tsuchida M., Emi, Y., Kida, Y., Sakaguchi, M., 2008. Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 369-375.

Ulrich, D.L., Lynch, J., Wang, Y., Fukuda, Y., Nachagari, D., Du, G., Sun, D., Fan, Y., Tsurkan, L., Potter, P.M., Rehg, J.E., Schuetz, J.D., 2012. ATP-dependent mitochondrial porphyrin importer ABCB6 protects against phenylhydrazine toxicity. *J Biol Chem* 287(16):12679-90.

Vilchis, F., Chávez, B., Cerbón, M.A., Pérez-Palacios, G., 1992. The Harderian gland as a target for steroid hormone action: Role and characteristics of intracellular receptors. In *Harderian Glands: Porphyrin metabolism, behavioural and endocrine effects* (Webb S.M., Hoffman R.A., Reiter R.J., Editors Springer Verlag, Berlin pp 297-313).

Vilchis, F., Hernández, A., Pérez, A.E., Pérez-Palacios, G., 1987. Hormone regulation of the rodent Harderian gland: Binding properties of the androgen receptor in the male Golden hamster. *J Endocrinol* 112:3-8.

Vilchis, F., Pérez-Palacios, G., 1989. Steroid hormone receptor and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamster. *J Endocrinol* 121:149-156.

- Vilchis, F., Ramos, L., Timossi, C., Chávez, B., 2006. The influence of sex steroid hormones on ferrochelatase gene expression in Harderian gland of hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Endocrinol* 189: 103–112.
- Visapää, I., Fellman, V., Lanyi, L., Peltonen, L., 2002. ABCB6 excluded as the causative gene for the growth retardation syndrome with aminoaciduria, cholestiasis, iron overload, and lactacidosis. *Am J Med Genet* 109: 202-205.
- Wang, L., He, F., Bu, J., Zhen, Y., Liu, X., Du, W., Dong, J., Cooney, J. D., Dubey, S. K., Shi, Y., Gong, B., Li, J., McBride, P.F., Jia, Y., Lu, F., Soltis, K.A., Lin, Y., Namburi, P., Liang, C., Sundaresan, P., Paw, B.H., Li, D.Y., Phillips, J.D., Yang, Z., 2012. ABCB6 mutations cause ocular coloboma. *Am J Hum Genet* 90: 40-48.
- Whitfiel, G.K., Jurutka, P.W., Haussler, C.A., Haussler, M.R., 1999. Steroid hormone receptors: evolution, ligands and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem Suppl* 32/33: 110-122.
- Zhang, C., Li, D., Zhang, J., Chen, X., Huang, M., Archacki, S., Tian, Y., Ren, W., Mei, A., Zhang, Q., Fang, M., Su, Z., Yin, Y., Liu, D., Chen, Y., Cui, X., Li, C., Yang, H., Wang, Q., Wang, J., Liu, M., Deng, Y., 2013. Mutations in ABCB6 cause dyschromatosis universalis hereditaria. *J Invest Dermatol* 133: 2221-2228.
- Zutz, A., Gompf, S., Schägger, H., Tampé, R., 2009. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1787: 681-690.