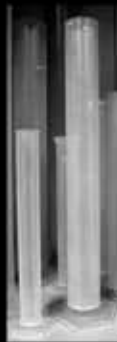


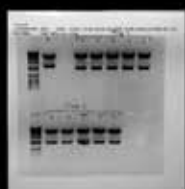
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona

# ESTUDI FUNCIONAL DEL GEN DOR

Jordi Duran i Castells  
Tesi Doctoral - Barcelona, 2007



Jordi





# **Estudi funcional del gen DOR**

Jordi Duran i Castells  
TESI DOCTORAL  
Barcelona, 2007



**Programa de Doctorat de Biomedicina, Bienni 2002-2004**  
**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**  
**Facultat de Biologia**  
**Universitat de Barcelona**

**Memòria per a optar al grau de**  
**Doctor per la Universitat de Barcelona**

**Presentada per:**

**JORDI DURAN I CASTELLS**

Vist i plau del director:

L'interessat,

Dr. Antonio Zorzano Olarte  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona

Jordi Duran i Castells





***index***





<b>ÍNDEX DE CONTINGUTS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>11</b>
1. La cèl·lula i la seva interacció amb l'entorn.....	13
2. El DNA com a material genètic.....	15
3. L'expressió gènica.....	17
4. Regulació de l'expressió gènica.....	19
5. Els receptors nuclears.....	20
6. Els elements de resposta a hormona.....	23
7. Efectes no genòmics.....	25
8. Interacció entre receptors i coreguladors. La caixa LxxLL.....	26
9. Coactivadors i corepressors.....	28
10. Receptors nuclears i coreguladors com a diana de vies de transducció de senyal.....	32
11. Malalties associades a coreguladors.....	34
12. La diabetes mellitus.....	35
13. El múscul esquelètic i els receptors nuclears.....	36
14. El gen DOR.....	37
<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>39</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>43</b>
<b>I. ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA</b> .....	<b>45</b>
<b>I.1 Localització i estructura gènica</b> .....	<b>45</b>
<b>I.2 Anàlisi de la seqüència de la proteïna DOR</b> .....	<b>45</b>
I.2.1 Principals característiques de DOR.....	48
Predicció de localització subcel·lular.....	48
Senyal de sortida del nucli.....	50
Distribució de la càrrega.....	50
Globularitat i desordre.....	50
Presència de seqüències PEST.....	53

Llocs putatius de fosforilació .....	53
Caixa LxxLL .....	54
Predicció de funció .....	54
Predicció d'unió a RNA .....	54
<b>II. ESTUDIS DE COACTIVACIÓ .....</b>	<b>57</b>
<b>II.1 Estudis amb diferents receptors d'hormones.....</b>	<b>57</b>
Receptor d'hormona tiroïdal $\alpha$ (TR $\alpha$ ).....	58
PPAR $\gamma$ .....	58
Receptor de glucocorticoides $\alpha$ (GR $\alpha$ ).....	60
Receptor de Vitamina D (VDR) .....	61
Receptor d'estrògens $\alpha$ (ER $\alpha$ ).....	61
<b>II.2 DOR no és un activador general de la transcripció .....</b>	<b>62</b>
p53 i C-myc .....	62
Gal4-VP16.....	63
<b>II.3 Fusió de DOR amb un domini d'unió a DNA .....</b>	<b>63</b>
Gal4-DOR activa la transcripció .....	64
Mapatge de la regió activadora.....	65
Estudi dosi-resposta.....	67
Efecte de les fusions en cèl·lules HEK 293 .....	68
<b>II.4 Fusions dels ortòlegs de DOR amb el Gal4-DBD .....</b>	<b>68</b>
Fusions de les proteïnes senceres .....	69
Fusions dels fragments N-terminals .....	70
La regió C-terminal inhibeix l'acció de DOR sobre TR .....	71
<b>II.5 Interacció funcional de DOR amb proteïnes HAT .....</b>	<b>72</b>
HATs que tenen un efecte positiu sobre l'acció de DOR.....	72
HATs que no tenen efecte .....	73
<b>II.6 Estudi de la pèrdua de funció de DOR a cèl·lules musculars ....</b>	<b>73</b>
Repressió de l'expressió de DOR a cèl·lules C2C12 .....	74
Estudis amb PPAR $\gamma$ i TR $\alpha$ .....	74
<b>II.7 Paper de la caixa LxxLL.....</b>	<b>75</b>
Coactivació de GR <sub>E773A</sub> .....	76
Efecte del mutant AXXAA .....	77

Mutació L100A a Gal4-DOR .....	78
Mutació L36A L40A a Gal4-DOR.....	79
Mutació L36A L40A en la coactivació de PPAR $\gamma$ .....	79
<b>III. LOCALITZACIÓ DE DOR .....</b>	<b>81</b>
<b>III.1 Dominis responsables de la localització de DOR .....</b>	<b>81</b>
Distribució cel·lular de GFP i de GFP-DOR.....	82
Activitat transactivadora de la construcció GFP-DOR .....	83
Distribució cel·lular de GFP-DOR N-terminal i GFP-DOR C-terminal.....	84
Anàlisi del paper d'una possible NLS a DOR.....	85
Localització de DOR per immunolocalització .....	86
Localització de les formes truncades 1 a 203 i 1 a 163 .....	88
Localització de DOR a cèl·lules C2C12 no diferenciades i diferenciades a miotub.....	89
Anàlisi de possibles NES a DOR .....	91
<b>III.2 Estudi de la localització de DOR en miotubs .....</b>	<b>92</b>
Expressió de DOR a cèl·lules C2C12 durant la diferenciació a miotub.....	93
Localització de DOR a miotubs C2C12 tractats amb agonistes de receptors nuclears .....	94
Expressió de DOR en tractaments amb T3.....	95
Co-localització de DOR amb marcadors de diferents estructures cel·lulars a miotubs C2C12 tractats amb T3.....	96
<b>IV. IMPACTE DE MUTACIONS PUNTUALS.....</b>	<b>97</b>
<b>IV.1 Mutacions en possibles llocs de fosforilació.....</b>	<b>97</b>
La Serina 93 i els llocs putatius de fosforilació per CK II .....	97
Localització dels mutants S93-A i CK II-A .....	98
Mutants de fosforilació generats.....	99
Activitat transcripcional dels mutants S93-A i CK II-A .....	100
Vida mitja dels mutants S93-A i CK II-A .....	101

<b>IV.2 Mutacions en residus de Lisina.....</b>	<b>101</b>
Vida mitja del mutant 3K-R .....	102
Tractament amb MG-132 de DOR i del mutant 3K-R .....	102
Activitat transcripcional del mutant 3K-R.....	103
Efecte de la NAM sobre la funció de DOR.....	104
Efecte de la NAM sobre la distribució cel·lular de DOR i del mutant 3K-R .....	105
Localització de DOR i del mutant 3K-R a cèl·lules C2C12 transfectades i diferenciades a miotub.....	106
 <b>ANNEXOS.....</b>	 <b>109</b>
 <b>ANNEX I. ARTICLE .....</b>	 <b>113</b>
Sumari.....	113
Introducció.....	114
Resultats .....	114
Discussió.....	118
Materials i mètodes.....	120
Referències .....	123
Peus de figura .....	127
Figures .....	130
 <b>ANNEX 2. GENERACIÓ D'UN RATOLÍ TRANSGÈNIC.....</b>	 <b>139</b>
Procediment per a la generació del ratolí .....	139
Genotipació per PCR amb primers específics .....	140
Expressió de DOR a múscul esquelètic en animals transgènics i no transgènics .....	141
 <b>ANNEX 3. EFECTE DE VDUP1 SOBRE LA FUNCIO DE DOR.....</b>	 <b>143</b>
La Tioredoxina i la VDUP1 .....	143
Efecte de VDUP1 sobre la capacitat transactivadora de DOR i de les construccions Gal4-DOR.....	144

Efecte de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la capacitat transactivadora de DOR i de les construccions Gal4-DOR.....	145
<b>ANNEX 4. ACCIÓ DE LA DISPONIBILITAT DE GLUCOSA SOBRE LA FUNCIO DE DOR .....</b>	<b>147</b>
Predicció de llocs de O-β-gluconoacetilació a DOR.....	147
Efecte de la concentració de glucosa sobre la capacitat transactivadora de les construccions Gal4-DOR .....	148
Efecte de l'inhibidor BADG sobre la capacitat transactivadora de les construccions Gal4-DOR.....	149
Efecte del lactat sobre la capacitat transactivadora de DOR i de les construccions Gal4-DOR.....	150
Assaig de detecció de O-β-gluconoacetilació a DOR .....	151
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>153</b>
1. Context de la investigació.....	155
2. DOR com a coactivador de receptors nuclears.....	156
3. Presència d'un domini d'activació de la transcripció a DOR.....	158
4. Definició a DOR de dominis funcionals.....	159
5. Ortòlegs de DOR .....	162
6. Possibles mecanismes d'actuació de DOR.....	163
7. Efecte de la repressió de DOR a cèl·lules musculars .....	164
8. Interacció amb els receptors nuclears.....	165
9. Localització de DOR .....	167
10. Estudi de possibles modificacions post-traduccionals a DOR .....	172
11. L'acetilació com a senyal dual .....	178
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>181</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>185</b>
<b>I. EINES INFORMÀTIQUES.....</b>	<b>187</b>

I.1 Bases de dades.....	187
I.2 Anàlisi de seqüències .....	188
I.3 Disseny d'encebadors.....	192
I.4 Gestió de vectors .....	192
<b>II. TÈCNiques GENERALS DE MANIPULACIÓ DEL DNA .....</b>	<b>194</b>
II.1 Consideracions generals .....	194
II.2 Bactèries competents .....	194
II.3 Recuperació del DNA .....	196
II.4 Digestió del DNA amb enzims de restricció.....	197
II.5 Electroforesi en gels d'agarosa .....	198
II.6 Recuperació de fragments de DNA .....	200
II.7 Lligació .....	200
II.8 Desfosforilació.....	201
II.9 PCR.....	202
II.10 PCR a temps real.....	204
II.11 Obtenció de RNA total .....	208
II.12 Obtenció de cDNA.....	208
<b>III CULTIU CEL·LULAR.....</b>	<b>209</b>
III.1 Consideracions generals .....	209
III.2 Medis i reactius generals .....	209
III.3 Manteniment dels cultius cel·lulars .....	210
III.4 Congelació i descongelació de cèl·lules .....	212
III.5 Detecció de micoplasma.....	214
III.6 Línies cel·lulars utilitzades .....	214
<b>IV TRANSFECCIÓ CEL·LULAR TRANSITÒRIA .....</b>	<b>216</b>
IV. 1 Transfecció pel mètode del fosfat de calci .....	216
IV.2 Transfecció amb <i>Lipofectamine</i> .....	218
IV.3 Mesura de l'eficiència de transfecció.....	220

<b>V. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL</b> .....	<b>222</b>
V.1 Disseny de l'experiment .....	222
V.2 Assaig de l'expressió de CAT .....	223
V.3 Assaig de l'expressió de Luciferasa .....	224
<b>VI. TÈCNiques GRALS. DE MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES</b> .....	<b>227</b>
VI.1 Obtenció d'extractes proteics totals .....	227
VI.2 Quantificació de les proteïnes .....	228
VI.3 Detecció de proteïnes .....	229
<b>VII. TÈCNiques DE MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA</b> .....	<b>240</b>
VII.1 Fixació de les cèl·lules .....	241
VII.2 Immunofluorescència.....	242
VII.3 Microscopia confocal.....	244
<b>ANNEX 1. Vectors usats per clonar i expressar</b> .....	<b>245</b>
<b>ANNEX 2. Vectors reporter usats</b> .....	<b>245</b>
<b>ANNEX 3. Construccions usades (cedides)</b> .....	<b>246</b>
<b>ANNEX 4. Construccions usades (generades en aquesta tesi)</b> .....	<b>247</b>
<b>ANNEX 5. Construccions usades (generades en aquesta tesi, però que no apareixen en aquesta memòria)</b> .....	<b>249</b>
<b>ANNEX 6. Encebadors</b> .....	<b>250</b>
<b>ANNEX 7. Anticossos</b> .....	<b>251</b>
<b>ANNEX 8. Productes químics usats en tractaments cel·lulars</b> .....	<b>252</b>
<b>REFERÈNCIES</b> .....	<b>253</b>
<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>277</b>