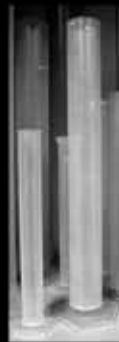


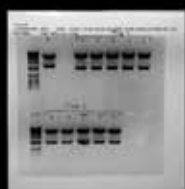
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona

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



resultats

I. ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA

I.1 Localització i estructura gènica

El gen humà de DOR es localitza al cromosoma 20q11.22, proper a loci que s'associen a obesitat (Cheveraud et al., 1996; Norman et al., 1998) i a diabetis mellitus de tipus 2 (Ji et al., 1997; Bowden et al., 1997; Zouali et al., 1997) i el seu 'accession number' de l'NCBI és: NM_021202.1. El gen ha estat anotat com a 'TP53INP2' per la seva homologia amb TP53INP1 (Bennetts et al, 2006) (analitzat al punt I.2).

La comparació entre el cDNA i el corresponent DNA genòmic permet determinar que el gen DOR humà té quatre introns i cinc exons (**Figura 1**). La regió que codifica la proteïna comença a l'exó 3 i acaba a l'exó 5, generant una pauta oberta de lectura de 663 nucleòtids, i per tant donant lloc a una proteïna de 220 aminoàcids. Els gens de rata i ratolí tenen una distribució anàloga a l'humà.

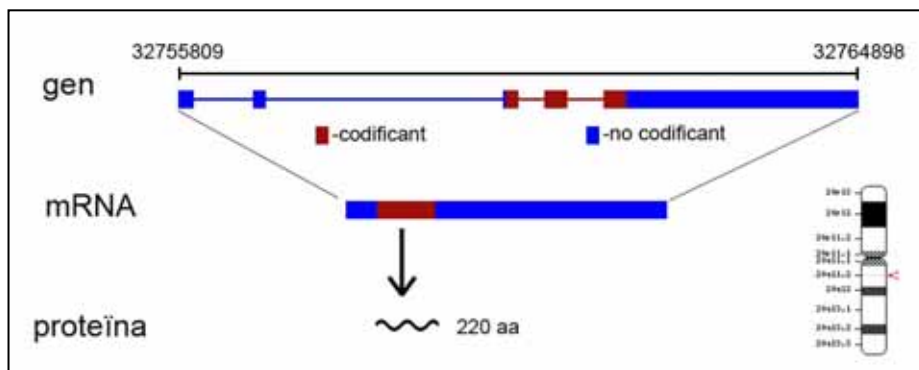


Figura 1. Estructura del gen humà de DOR.

I.2 Anàlisi de la seqüència de la proteïna DOR.

El gen humà de DOR codifica per una proteïna de 220 aminoàcids, i els de rata i ratolí de 221 aminoàcids. Les proteïnes humana, de rata i de ratolí estan força conservades; la humana i la de ratolí tenen un 85% d'identitat, la humana i la de rata tenen un 86% d'identitat, i la de rata i la de ratolí tenen un 98% d'identitat (**figura 2a**).

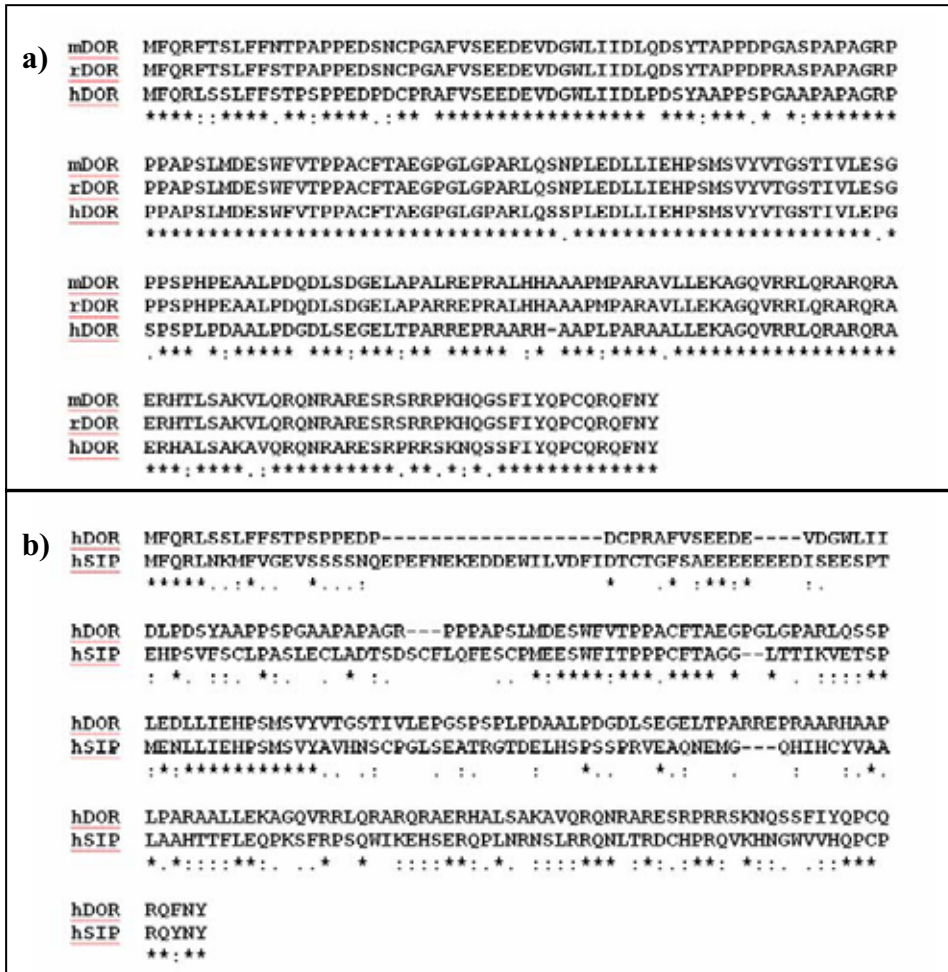


Figura 2. a) Alineament entre les proteïnes humana, de rata i de ratolí de DOR.
 b) alineament de les proteïnes humanes de DOR i TP53INP1 (SIP).

Quan s’identifica un nou gen la millor forma d’entendre quina podria ser la seva funció és comparar la seva seqüència amb bases de dades de gens coneguts i buscar gens que s’hi assemblin, per inferir-ne la funció. En el cas de DOR, aquesta estratègia no va aportar gaire informació, ja que l’única proteïna homòloga es TP53INP1/p53DINP1/TEAP/SIP, que regula l’apoptosi depenent de p53 (Okamura et al., 2001). A més, la identitat entre DOR i TP53INP1 humans és moderada (32%) (figura 2b). Les identitats entre DOR i TP53INP1 de rata i ratolí són també moderades (31% i 34%, respectivament).

Quadre informatiu 1: TP53INP1

TP53INP1 és una proteïna que regula el supressor de tumors TP53. Es localitza al nucli, concretament als cossos nuclears anomenats PMLs. En resposta a trencaments de DNA de doble cadena TP53INP1 promou la fosforilació de TP53 a la serina 46. D'aquesta manera TP53INP1 regula l'activitat transcripcional de TP53 i s'incrementa l'apoptosi mitjançada per TP53 (Okamura et al., 2001; Tomasini et al., 2003). TP53INP1 també regula l'activitat transcripcional i augmenta l'apoptosi mitjançada per p73, un homòleg de TP53 (Tomasini et al., 2005).

Amb la seqüència de la proteïna humana de DOR vam fer també una cerca a les bases de dades per trobar proteïnes d'altres espècies amb homologia al DOR humà i que per tant en poguessin ser ortòlegs. Això ens va permetre trobar possibles ortòlegs de DOR a les espècies *Monodelphis domestica* (amb una identitat amb la forma humana del 100%), *Pan troglodytes* (98%), *Macaca mulata* (96%), *Canis familiaris* (90%), *Bos taurus* (80%), *Gallus gallus* (53%), *Xenopus laevis* (45%), *Oncorhynchus mykiss* (29%), *Salmo salar* (28%) i *Ciona intestinallis* (20%) (**figura 3**).

Donat que la comparació amb altres gens no va aportar gaire informació sobre quina podria ser la funció de DOR el següent pas va ser analitzar la seqüència de la proteïna per determinar quines podien ser les seves característiques, i buscar patrons coneguts que poguessin aportar pistes sobre la seva funció.

Si bé la biologia computacional o bioinformàtica és una eina útil en l'estudi de qualsevol gen, en aquest cas va prendre una rellevància major degut a la manca d'altres informacions. Vam analitzar la seqüència de DOR, sobretot a nivell de proteïna, amb tota una sèrie d'eines d'accés lliure a la xarxa que ofereixen diferents organismes per intentar buscar patrons o característiques de la proteïna que aportessin llum sobre quina podria ser la seva funció. Totes les prediccions estan fetes en la forma humana, de rata i de ratolí de la proteïna. La majoria de les prediccions que vam trobar eren presents a les tres espècies; les poques prediccions que tan sols vam trobar en una de les tres espècies (com per exemple determinats llocs putatius de fosforilació) es van descartar.

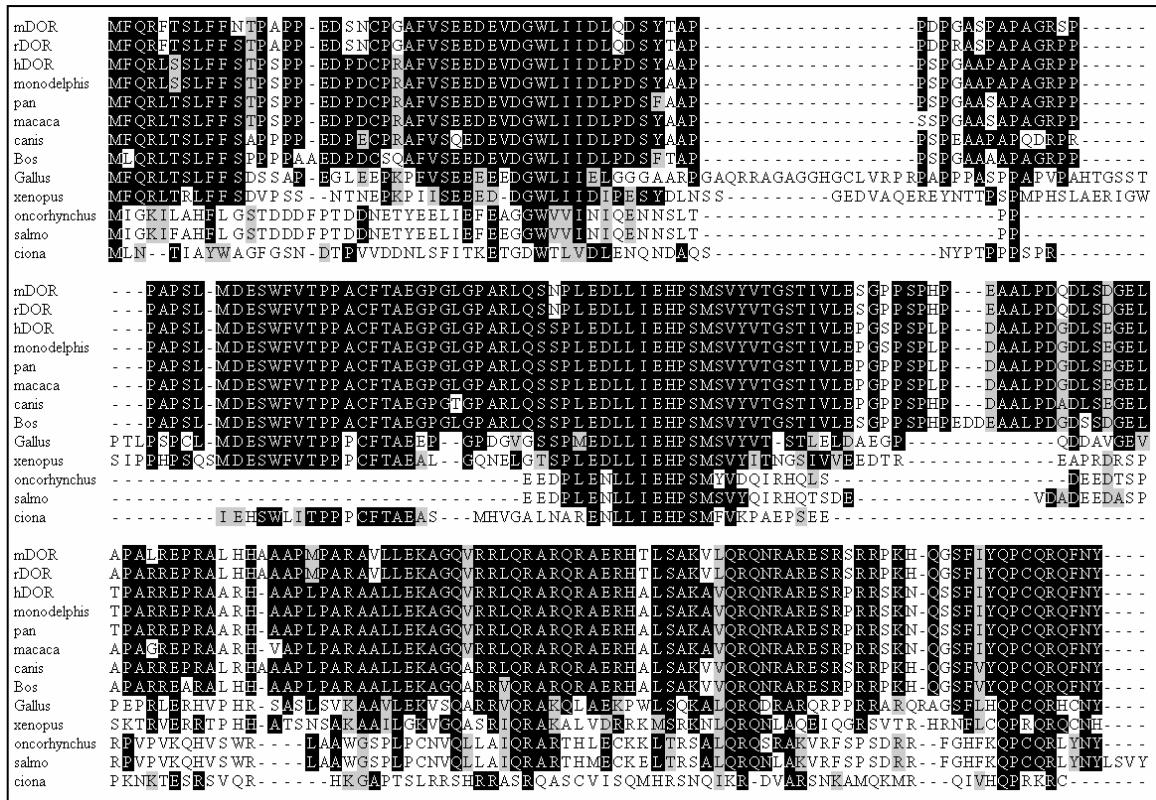


Figura 3. Alineament de les formes humana, de rata i de ratolí de DOR amb possibles ortòlegs de les espècies *Monodelphis domestica*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulata*, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* i *Ciona intestinalis*.

1.2.1 Principals característiques de la proteïna DOR.

-Predicció de la localització subcel·lular: saber quina pot ser la localització subcel·lular d'una proteïna és un element molt important a l'hora d'esbrinar la seva funció. Diversos programes disponibles a la xarxa analitzen la seqüència d'aminoàcids de la proteïna per predir quina pot ser la seva localització subcel·lular. Una bona forma d'usar totes aquestes eines és la que es descriu a l'article d'Emanuelsson et al., 2007.

Els passos a seguir amb proteïnes eucariotes són els següents:

1. **TargetP:** aquest és el primer programa que s'usa; busca a la seqüència de la proteïna pèptids senyal que facin que sigui una proteïna de secreció o senyals de localització a mitocondria. En el cas de DOR no hi trobem ni una cosa ni l'altra i per tant prediu que la localització és "qualsevol altra".

2. **TMHMM**: el següent pas és usar aquest programa per predir la presència d'hèlixs α transmembrana i veure així si es tracta d'una proteïna integral de membrana. La predicció diu que a DOR no hi ha hèlixs α transmembrana.
3. Encara que la proteïna no tingui seqüències transmembrana pot estar ancorada a una membrana per un grup lipídic unit covalentment. Per analitzar aquesta possibilitat es fan servir els programes **big-Pi** i **NMT** que analitzen la presència de la modificació GPI propera a l'extrem C-terminal o de miristoïlació N-terminal, respectivament. En el cas de DOR no hi trobem ni l'una ni l'altra.
4. En aquest punt la proteïna tan sols pot ser citoplasmàtica, nuclear o peroxisomal. El programa **PeroxiP** cerca senyals de localització a peroxisomes. En el cas de DOR aquest programa no troba cap senyal que indiqui possible localització peroxisomal.
5. Els programes **PredictNLS** i **NucPred** serveixen per identificar senyals de localització nuclear a seqüències proteïques. En el cas de DOR no hi trobem cap NLS putativa, però el programa NucPred prediu una probabilitat del 70% de que DOR sigui nuclear.
6. Quan, com és el cas, no hi ha una senyal que indiqui la possible localització de la proteïna és útil mirar quina és la localització de les proteïnes més homòlogues. En el cas de DOR l'única proteïna homòloga és, com ja hem dit, TP53INP1, que es localitza al nucli.
7. Per últim es poden usar tota una sèrie de programes que classifiquen les proteïnes en diverses possibles localitzacions, però no a través de la presència de determinats motius o senyals, si no per característiques de la seqüència de la proteïna com mida, càrrega, composició d'aminoàcids, presència de possibles dominis funcionals, homologia amb altres proteïnes de localització coneguda... Vam utilitzar diversos d'aquests programes per predir quina podia ser la localització de les formes humana, de rata i de ratolí de DOR, i en la majoria de casos la localització més probable era la nuclear, en alguns casos amb un índex de confiança superior al 90% (**taula 1**). En dos casos, però, la localització predita va ser citosòlica.

Resultats

Programa	Localització predita	Fiabilitat (%)		
		hDOR	mDOR	rDOR
LocTree	Nucli	84	84	84
pSLIP	Nucli			
ESLpred	Nucli	75	94	75
pSORT II	Nucli			
pTARGET	Nucli	93,9	93,9	93,9
BaCelLo	Citoplasma			
CELLO	Nucli	85	84	85
MultiLoc	Citoplasma	97	98	98
WoLF PSORT	Nucli	70	61	52
PA-SUB	Nucli	99,9	99,9	99,9

Taula 1. Prediccions de localització per a les formes humana, de rata i de ratolí de DOR, amb l'índex de confiança de la predicció.

Cal destacar que el programa pSORT II va trobar una possible senyal de localització nuclear, a diferència dels programes especialitzats en localització de NLS PredictNLS i NucPred. Aquest punt serà analitzat a l'apartat III.

-Senyal de sortida del nucli: donat que la predicció deia que DOR podria ser nuclear vam analitzar la seqüència de la proteïna amb el programa NetNES, que localitza senyals de sortida del nucli (NES, de Nuclear Export Signal). El programa va detectar dues possibles NES a DOR, entorn als residus 40 i 101, respectivament. Aquest punt serà analitzat a l'**apartat III**.

-Distribució de la càrrega: malgrat tenir un punt isoelèctric relativament neutre (6,62 en hDOR) trobem a la proteïna una marcada separació de les càrregues. Així, la major part de la càrrega positiva de la proteïna es localitza a la part C-terminal de la proteïna, mentre que la resta de la proteïna té distribuïda la càrrega negativa (**figura 4a**). Concretament entre els residus 165 i 204 trobem un clúster de càrrega positiva, ja que dels 40 residus 15 tenen càrrega positiva i tan sols 2 càrrega negativa.

-Predicció de globularitat i desordre: el desordre en les proteïnes es pot descriure com la falta d'estructura secundària i un alt grau de flexibilitat de la cadena polipeptídica. Les regions ordenades s'anomenen sovint globulars, i contenen estructures secundàries. La determinació de quines regions de la proteïna poden ser desordenades i quines poden tenir estructura pot ser útil a l'hora d'identificar possibles dominis de la proteïna. Vam

usar el programa **GlobPlot2** per predir quina pot ser la tendència de la proteïna DOR pel que fa a la presència d'estructura o desordre.

Els resultats indiquen que hi hauria una regió N-terminal de la proteïna que seria desordenada, sense estructura, mentre que la regió C-terminal és un domini potencialment globular. El programa també va detectar una possible regió amb estructura coiled-coil entre els residus 170 i 193 (**figura 4b**).

Cal destacar que aquesta regió que es defineix com a potencialment globular coincideix amb la regió de la proteïna que conté la càrrega positiva. Això, com veurem, podria ser significatiu pel que fa a la funció d'aquesta. Una altra coincidència és que la regió predita com a coiled coil coincideix amb el clúster de càrrega positiva N-terminal.

Com veurem a l'**apartat II.3**, a més d'aquesta diferència en càrrega i estructura les regions N-terminal i C-terminal de la proteïna tenen un paper diferent pel que fa a la funció d'aquesta.

Resultats

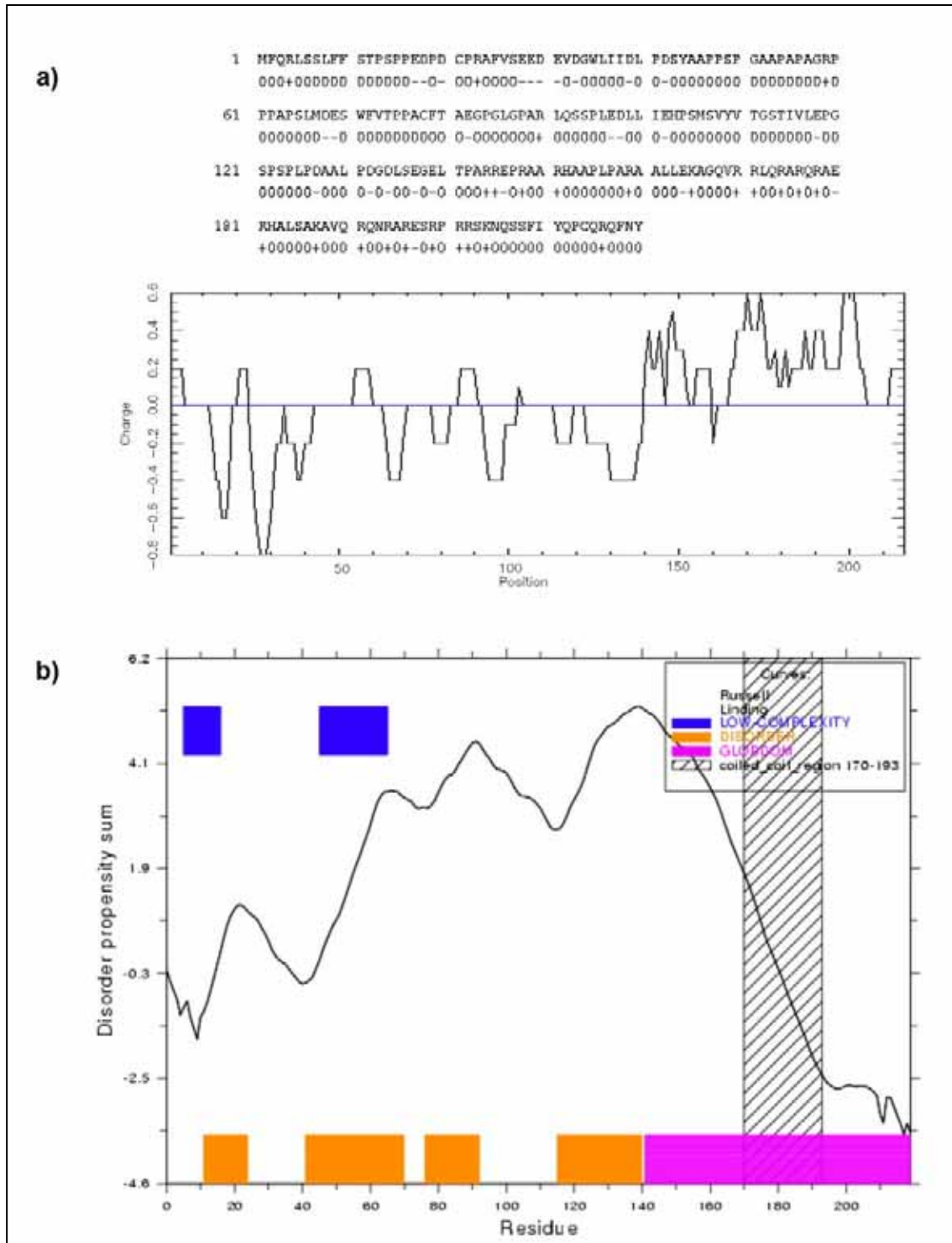


Figura 4. a) Distribució de la càrrega al DOR humà.
b) Resultats del programa GlobPlot2 pel DOR humà.

-Presència de seqüències PEST: Els motius PEST són regions de la proteïna amb una concentració elevada de residus de prolina (P), àcid glutàmic (E), serina (S) i treonina (T), que redueixen la vida de la proteïna ja que n'augmenten la degradació per proteòlisi (Rechsteiner, 1990). Usant el programa **PESTfind** vam poder veure que a DOR hi ha una potencial seqüència PEST a la regió N-terminal (residus 3 a 21) i a més gran part de la proteïna podria tenir paper com a seqüència PEST (**figura 5**). Les seqüències PEST es localitzen sovint a regions desestructurades de la proteïna (Wright et al., 1999), com és el cas d'aquesta regió de DOR segons les prediccions. Aquesta predicció és coherent amb què, com veurem, la proteïna té una vida mitja força curta.

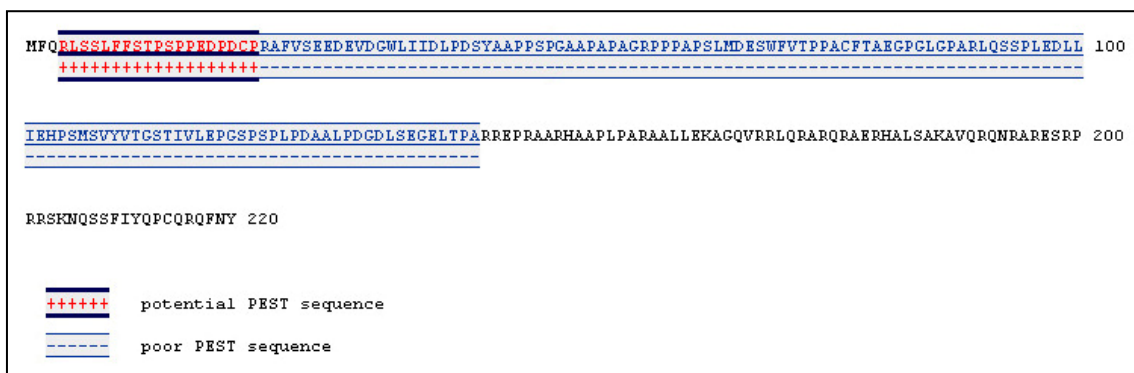


Figura 5. Resultats de PestFind pel DOR humà.

-Principals llocs putatius de fosforilació: amb diversos programes que prediuen llocs putatius de fosforilació (ELM, NetPhosK, PhosphoMotif Finder, Scan Prosite) vam analitzar la proteïna DOR. La **figura 6** mostra els llocs conservats a les formes humana, de rata i de ratolí de DOR que van trobar aquests programes. Cal destacar, a més, que el programa ELM va detectar la serina 93 com a possible lloc d'unió de proteïnes 14.3.3 quan està fosforilada. Aquest punt serà analitzat a l'**apartat IV**.

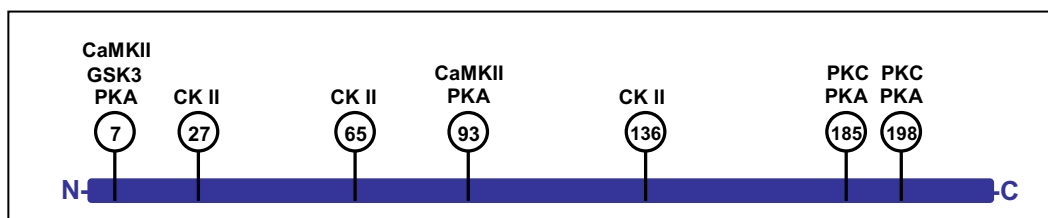


Figura 6. Llocs putatius de fosforilació a DOR. Els números es refereixen a la posició en DOR humà. Per a rata i ratolí les posicions marcades com a 185 i 198 corresponen realment a les posicions 186 i 199.

Resultats

-Caixa LxxLL: la presència de nombroses Leucines a la seqüència de la proteïna ens va portar a analitzar si podria haver-hi a la proteïna una caixa LxxLL, anomenada també caixa NR. Aquesta caixa, composta de 5 aminoàcids on “L” és leucina i “x” pot ser qualsevol aminoàcid, és el motiu a través del qual nombrosos coactivadors interaccionen amb els corresponents receptors nuclears. Vam trobar al DOR humà una caixa LxxLL (residus 96 a 100) que està conservada a les formes de rata i ratolí de DOR, però no a la proteïna homòloga TP53INP1 (**figura 2**).

-Predicció de funció: tot i que amb un valor significatiu relatiu, programes com ProtFun i PFP predeien que DOR podia participar en la regulació de la transcripció.

-Predicció d'unió a RNA: el programa de predicció RNABindR va detectar a DOR una regió que pot tenir capacitat d'unir RNA (**figura 7**). Aquesta regió coincideix amb la que és predita com a coiled-coil i que és un clúster de càrrega positiva (**figura 3**).

```
MFQRLSSLFFSTPSPPEPDCPRAVFSEEEVDGWLIIDLPSYAAPPSP 50
GAAPAPAGRPPPPAPSLMDESWFVTTPACFTAEGPGLGPARLQSSPLEDLL 100
IEHPSMSVYVTGSTIVLEPGSPSPLPDAALPDGDLSEGELTPARREPRAA 150
RHAAPL PARAALLEKAGQVRR LQRARQRAERHALSAKAVQRQNRARESRP 200
RRSKNQSSF IYQPCQRQFNY
-----
-----
-----+--
+-----+--+-----+++++-----
++-----+-----
```

Figura 7. Resultats del programa RNABindR pel DOR humà. Els símbols ‘+’ indiquen residus que podrien participar en la unió d’RNA.

Hi va haver diversos indicadors que ens van fer pensar que DOR podria ser una proteïna implicada en la regulació de la transcripció:

- predicció de localització nuclear.
- predicció de funció relacionada amb la transcripció.
- homologia tan sols amb TEAP/SIP/p53DINP1, que regula l'activitat transcripcional de p53 (Tomasini et al., 2003).
- presència d'una putativa caixa NR, típica de coactivadors de receptors nuclears.

Per aquest motiu vam realitzar una sèrie d'experiments destinats a determinar si DOR era efectivament una proteïna implicada en la regulació de la transcripció.

II. ESTUDIS DE COACTIVACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ.

El primer pas va ser determinar si DOR tenia la capacitat d'actuar com a coactivador de receptors nuclears. Per analitzar la funció dels receptors nuclears i els coreguladors s'utilitzen assajos de transfecció transitòria en cèl·lules amb vectors reporters, tal i com es descriu a l'apartat V de Materials i Mètodes. Breument, els vectors reporters codifiquen per l'expressió d'un gen reporter, fàcilment mesurable quan es fa un extracte cel·lular. L'expressió del gen reporter està controlada per un promotor que respon al receptor nuclear que s'està estudiant.

D'aquesta manera quan es transfecta aquest vector reporter en una línia cel·lular es pot detectar una expressió basal de la proteïna reportera. Si es cotransfecta a més un vector d'expressió pel receptor nuclear al qual respon el vector reporter, i en presència de l'hormona adequada, l'expressió de la proteïna reportera augmenta. Si a més es cotransfecta un coregulador que afecta a la funció del receptor nuclear, es pot mesurar aquesta afectació a través dels canvis que es detecten en la producció de proteïna reportera.

II.1 Estudis amb diferents receptors d'hormones.

Fent ús d'aquests estudis amb vectors reporters vam analitzar de quina manera afectava la presència de DOR a l'acció de diferents receptors nuclears.

Per analitzar si DOR regula el receptor d'hormones tiroïdals α (TR α) vam utilitzar un reporter que conté una regió del promotor del gen Glut4 en la que hi ha una caixa de resposta al receptor d'hormones tiroïdals (Santalucia et al., 2001). Primerament vam poder comprovar que DOR era capaç d'incrementar l'activació que produeix sobre el reporter l'acció de TR α de forma depenent d'hormona (**figura 8a**). La transfecció de diferents quantitats de DOR ens va permetre comprovar que hi havia una relació dosi-resposta en aquesta coactivació (**figura 8b**).

Resultats

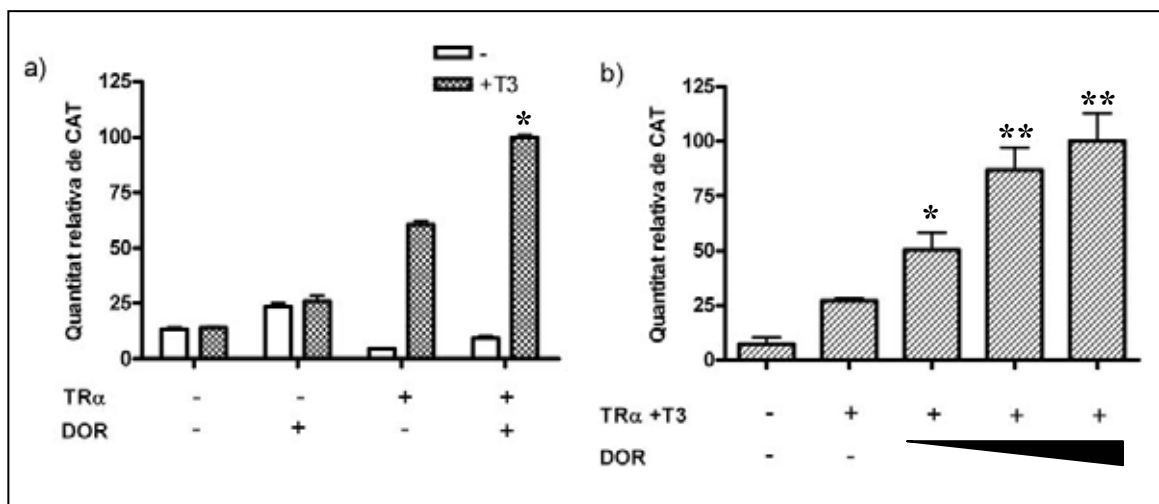


Figura 8. a) acció de DOR sobre TR α en absència o presència d'hormona. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per TR α (75 ng), DOR (100 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de TR α (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència o en absència del lligand (T3 100 nM) i es va analitzar l'expressió del reporter CAT. **b)** dosi-resposta de DOR amb TR α . L'assaig es va realitzar com en l'experiment anterior però amb diferents quantitats de DOR (de 100 a 300 ng). Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. * : diferència significativa comparada amb el grup del receptor nuclear amb P<0,05; ** : P<0,01.

En absència de T3 l'activació que fa DOR sobre l'acció de TR α no és significativa. En presència de T3 (100 nM) DOR augmenta l'acció de TR α i aquest efecte és dependent de la quantitat de DOR transfectada.

Vam procedir de forma anàloga amb el receptor activador de la proliferació de peroxisomes γ (PPAR γ) (**figura 9**). En aquest cas el vector reporter contenia l'element de resposta a PPAR del promotor del gen apo A-II (cedit pel Dr. Diego Haro).

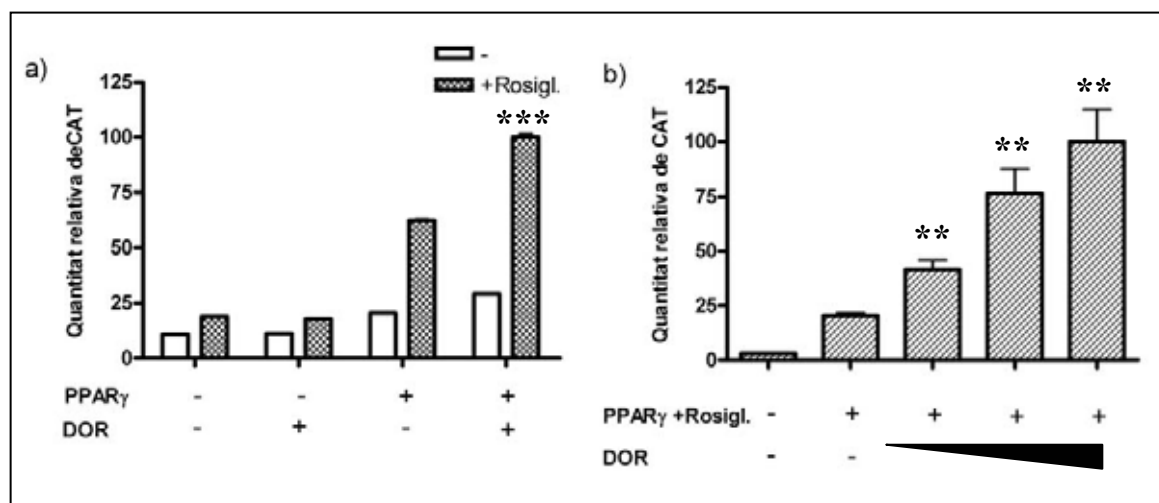


Figura 9. a) acció de DOR sobre PPAR γ en absència o presència d'hormona. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per PPAR γ (75 ng), DOR (100 ng), el vector

buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de PPAR (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència o en absència del lligand (rosiglitazona 100 nM) i es va analitzar l'expressió del reporter CAT. **b) dosi-resposta de DOR amb PPAR γ .** L'assaig es va realitzar com en l'experiment anterior però amb diferents quantitats de DOR (de 100 a 300 ng). Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. **: diferència significativa comparada amb el grup del receptor nuclear amb $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

Vam voler comprovar de quina manera depèn la funció de DOR de la concentració de rosiglitazona utilitzada (**figura 10**).

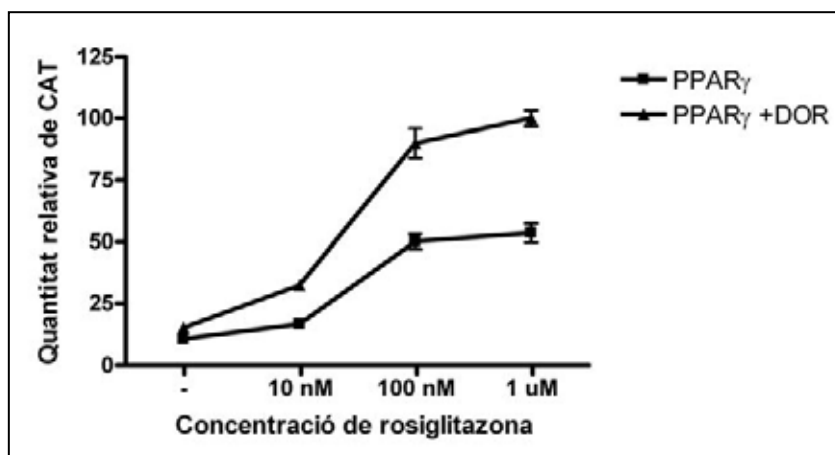


Figura 10. Efecte de DOR a diferents concentracions de rosiglitazona. L'experiment es va realitzar de la forma descrita a la figura 9 en presència o absència de la concentració de rosiglitazona indicada. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

Així vam comprovar que DOR coactiva PPAR γ de manera dependent de la concentració de rosiglitazona utilitzada.

El següent pas va ser comprovar si DOR també podia coactivar el receptor de glucocorticoides α (GR α). Vam realitzar els estudis de forma anàloga als anteriors (**figura 11**) amb un reporter que contenia elements de resposta a GR (cedit per la Dra. Carme Caelles).

Resultats

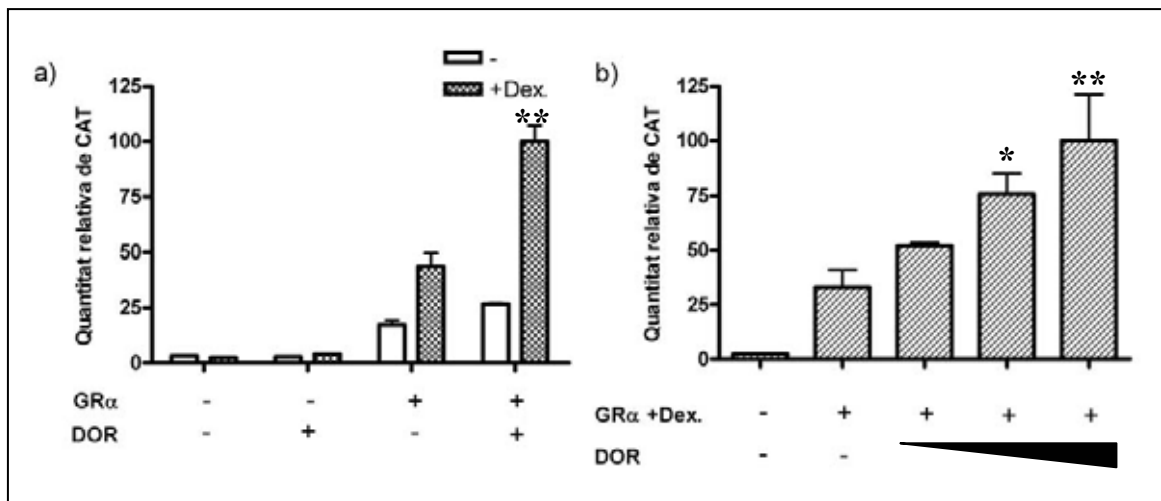


Figura 11. a) acció de DOR sobre GR α en absència o presència d'hormona. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per GR α (75 ng), DOR (200 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de GR α (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència o en absència del lligand (dexametasona 100 nM) i es va analitzar l'expressió del reporter CAT. **b)** dosi-resposta de DOR amb GR α . L'assaig es va realitzar com en l'experiment anterior però amb diferents quantitats de DOR (de 100 a 300 ng). Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. * : diferència significativa comparada amb el grup del receptor nuclear amb P<0,05. ** : P<0,01.

Per poder tenir una referència sobre la capacitat de coactivació de DOR vam realitzar l'experiment en paral·lel amb p300, un coactivador conegut i potent que es sap que coactiva, entre d'altres, GR α (**figura 12**).

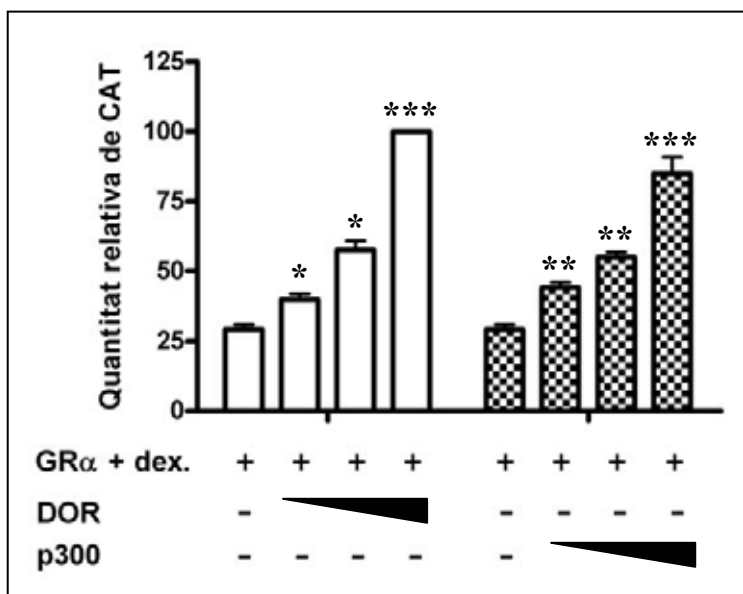


Figura 12. Efecte de DOR i p300 sobre GR α . L'experiment es va realitzar de la forma descrita a la figura 11b amb les mateixes quantitats de DOR o de p300 (100 a 300 ng) i en presència de dexametasona (100 nM). Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. * : diferència significativa comparada amb el grup del receptor nuclear amb P<0,05. ** : P<0,01; *** : P<0.001.

Els resultats demostren que en aquestes condicions experimentals, DOR té una capacitat de coactivar GR similar a la de p300 quan es transfecten les mateixes quantitats de DNA.

Per últim també vam obtenir dades inicials que indiquen que DOR coactiva també el receptor de vitamina D (VDR) (**figura 13**) i el receptor d'estrògens (ER α) (**figura 14**). Per aquests estudis vam usar uns vectors reporter que tenien en cada cas quatre còpies de l'element de resposta a vitamina D o tres còpies de l'element de resposta a estrògens (cedits tots dos per la Dra. Ana Aranda).

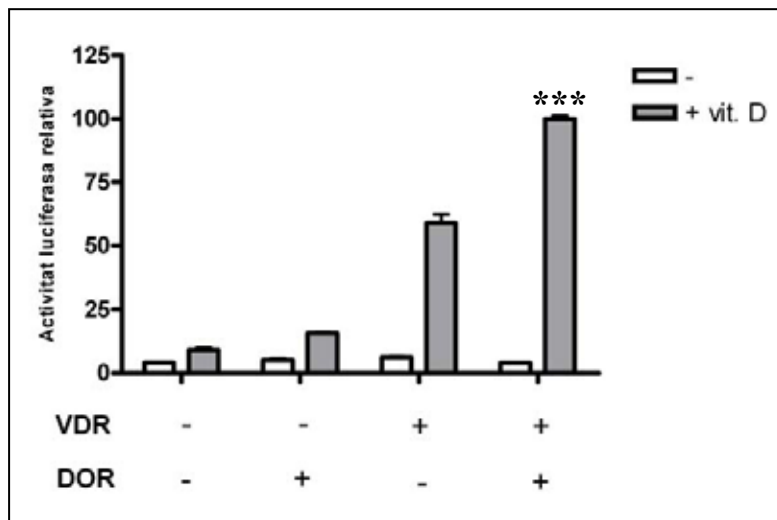


Figura 13. Efecte de DOR sobre VDR en presència i absència d'hormona. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per VDR (75 ng), DOR (100 ng), pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de VDR (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència o en absència del lligand (1,25-dihidroxi-vitamina D3 10 nM) i es va analitzar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

*** : diferència significativa comparada amb el grup del receptor nuclear amb $P < 0,001$.

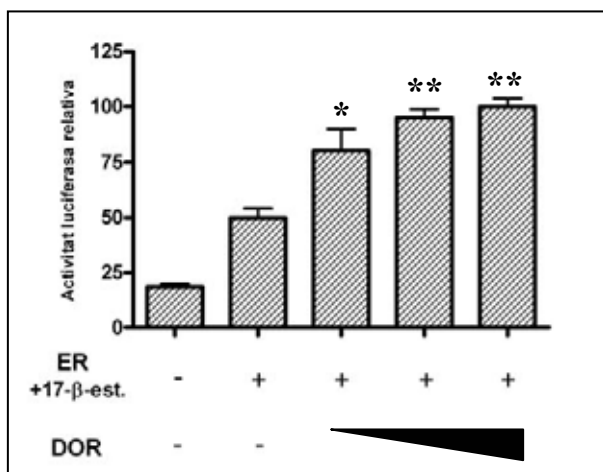


Figura 14. Dosi-resposta de DOR amb ER α . Es van transfectar cèl·lules HeLa amb el vector d'expressió per ER α (75 ng), diferents quantitats de DOR (de 100 a 300 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de ER (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència amb el lligand (17- β -Estradiol 10 nM) i es va analitzar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

* : diferència significativa comparada amb el grup del receptor nuclear amb $P < 0,05$;
 ** : $P < 0,01$.

Resultats

II.2 DOR no és un coactivador general de la transcripció.

Tot i que DOR presenta la capacitat d'activar els receptors nuclears esmentats, vam poder comprovar que l'acció de DOR sobre l'activació de la transcripció no era general, ja que altres factors de transcripció no eren coactivats per DOR. Així, p53 (**figura 15a**) o c-Myc (**figura 15b**) no van ser coactivats per DOR en un assaig amb els reporters corresponents (Ceballos et al., 2000; Miyazato et al., 2005).

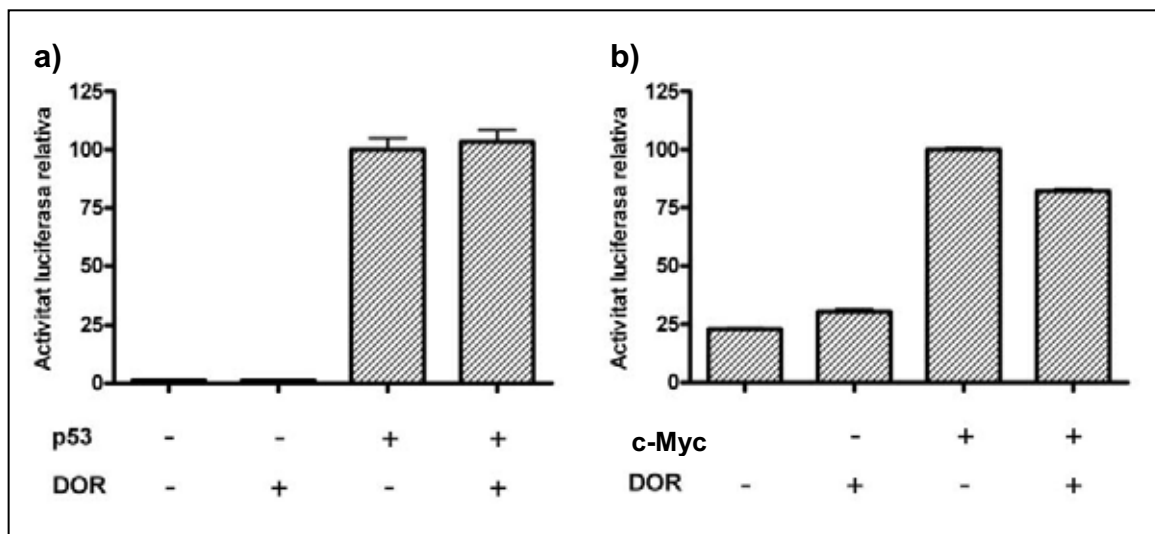


Figura 15. a) *Efecte de DOR sobre p53.* Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per p53 (75 ng), DOR (100 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de p53 (150 ng). Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa; b) *efecte de DOR sobre c-Myc.* Es va procedir de la mateixa manera però amb un vector d'expressió de c-Myc i un vector reporter que respon a aquest. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

Per determinar si l'activació de la transcripció produïda per una determinada proteïna és o no inespecífica sovint es realitza un experiment que consisteix en veure si aquesta proteïna pot incrementar l'activació produïda per un factor de transcripció quimèric, el Gal4-VP16, que està format pel domini d'unió a DNA de Gal4 i el domini d'activació de la transcripció de la proteïna vírica VP16 (Knutti et al., 2000). El reporter utilitzat en aquest cas té diversos llocs d'unió de Gal4. L'expressió de DOR no té cap efecte en l'activitat transcripcional de la quimera Gal4-VP16 (**figura 16**), cosa que indica que DOR no és un activador general de la transcripció.

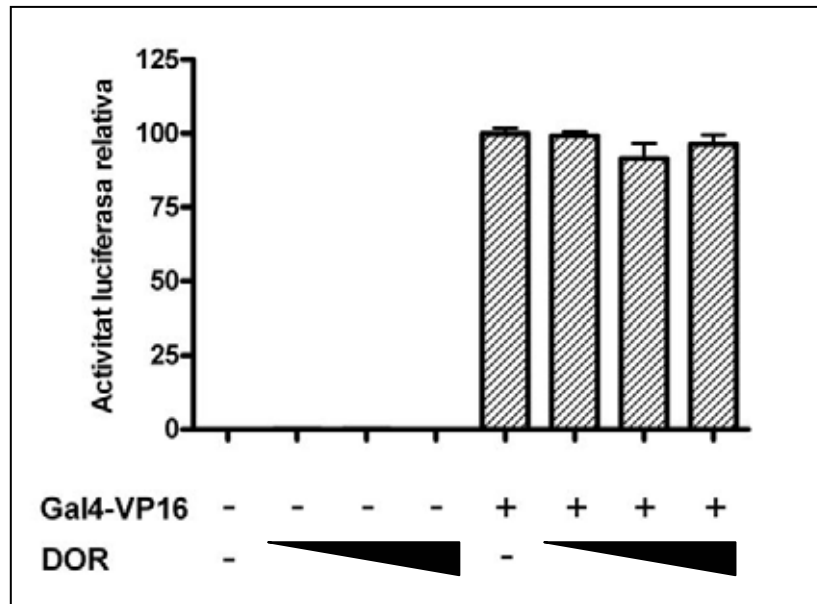


Figura 16. Efecte de DOR sobre el factor quimèric Gal4-VP16. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per Gal4-VP16 (75 ng), diverses quantitats de DOR (100 ng a 300 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de Gal4 (150 ng). Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

II.3 Fusió de DOR amb un domini d'unió a DNA.

Els resultats obtinguts amb el receptors nuclears no deixen clar si DOR té per sí mateix capacitat d'activar la transcripció o si el que fa és desemascarar alguna característica del receptor nuclear. Un dels trets distintius dels coactivadors és que el seu reclutament a un determinat promotor, ja sigui per interaccions amb altres proteïnes o per fusió directa amb un domini d'unió a DNA, activa la transcripció. Això implica que el coactivador ha de tenir un domini d'activació de la transcripció.

Per determinar si DOR té un domini d'activació de la transcripció vam generar un vector per l'expressió d'una proteïna quimèrica en la que DOR està fusionat al domini d'unió a DNA del factor de transcripció de llevat Gal4 (residus 1 a 147). D'aquesta manera podíem analitzar si aquesta proteïna quimèrica era capaç d'activar reporters sota el control de promotors amb elements de resposta a Gal4 quan ho transfectàvem a cèl·lules HeLa.

Resultats

La proteïna quimèrica Gal4-DOR tenia la capacitat d'incrementar l'expressió del reporter. No passava el mateix amb el domini d'unió a DNA sol, ni amb la proteïna DOR sola (**figura 17**). Això demostra que per activar la transcripció DOR necessita estar present a l'entorn del promotor del gen, i per tant un cop més que no està actuant com un activador general de la transcripció, si no com un coactivador.

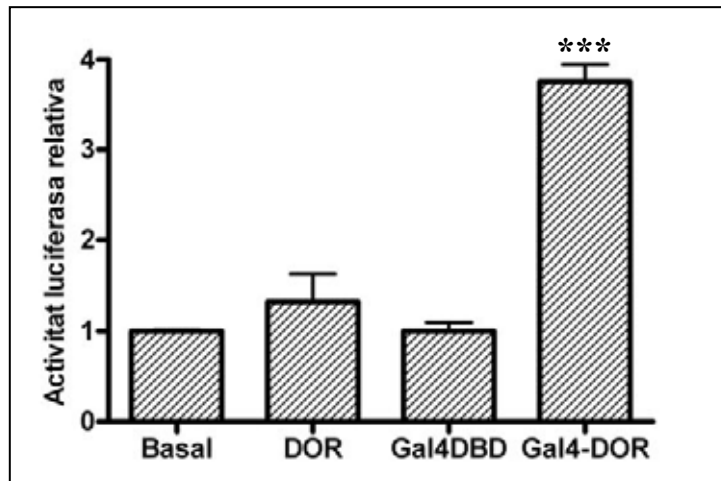


Figura 17. Activitat de la fusió de DOR amb el domini d'unió a DNA de Gal4. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb 200 ng de DOR, el domini d'unió a DNA de Gal4 ('Gal4DBD'), la construcció Gal4-DOR o el vector buit pCDNA3 com a control, i 200 ng del vector reporter de Gal4. Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 6 experiments independents. *** : diferència significativa comparada amb el basal amb $P < 0,001$.

Per mapar on radica el domini d'activació a la proteïna DOR vam generar versions truncades de DOR fusionats al domini d'unió a DNA de Gal4, i vam mesurar la seva capacitat per activar la transcripció.

Una primera aproximació va servir per descartar tota la regió C-terminal (residus 120 a 220) com a responsable de l'activació. De fet a aquesta regió se li pot atribuir fins i tot un paper negatiu, ja que la fusió de la part N-terminal de DOR amb Gal4 (residus 1 a 120) és més potent activant la transcripció que la fusió de la proteïna sencera (**figura 18**).

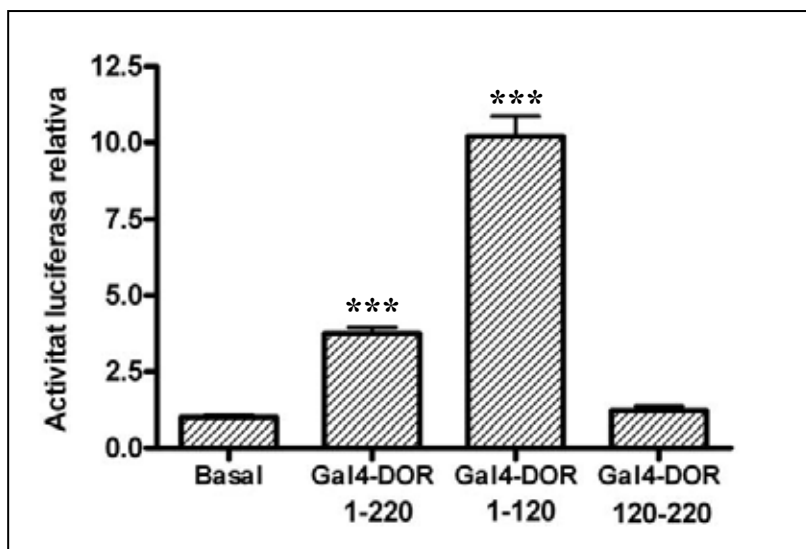


Figura 18. *Activitat dels fragments N-terminal i C-terminal de DOR.* Es van transfectar cèl·lules HeLa amb 200 ng de la construcció Gal4-DOR, el fragment N-terminal de DOR unit a Gal4 (1 a 120), el fragment C-terminal de DOR unit a Gal4 (120 a 220) o el vector buit pCDNA3 com a control, i 200 ng del vector reporter de Gal4. Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 6 experiments independents. *** : diferència significativa comparada amb el basal amb $P < 0,001$.

Un cop descartada com a responsable de l'activació la regió C-terminal ens vam poder concentrar en la regió N-terminal per mapar amb més precisió on residia el domini responsable de l'activació. Per fer-ho vam generar diferents construccions en què fusionàvem diferents fragments d'aquesta regió N-terminal de DOR al DBD de Gal4, i en vam mesurar l'activitat transcripcional a cèl·lules HeLa (**figura 19**).

Resultats

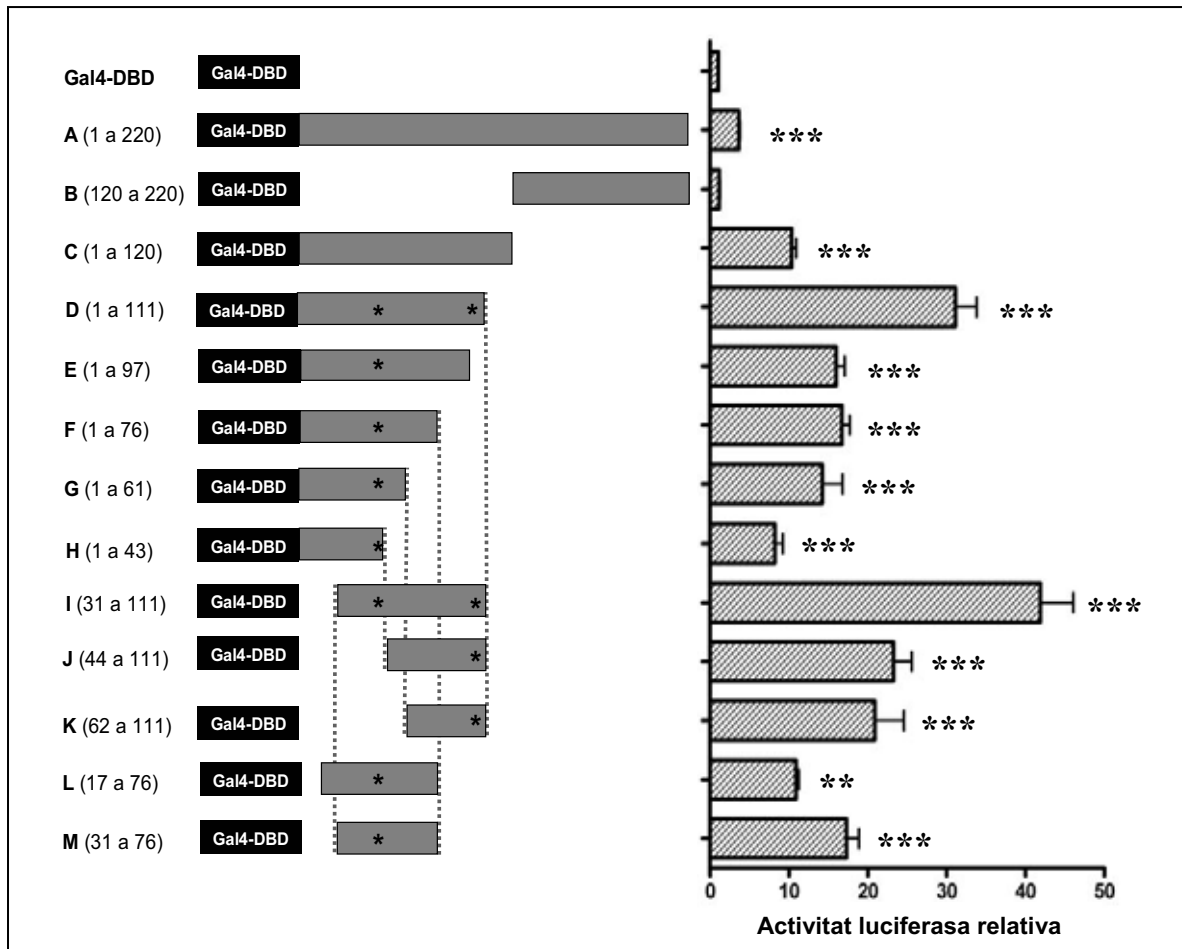


Figura 19. Activació produïda per diferents fragments de DOR units al Gal4-DBD (cèl. HeLa). Es van transfectar cèl·lules HeLa amb 200 ng de Gal4-DBD, la construcció Gal4-DOR, els diferents fragments de DOR units a Gal4 o el vector buit pCDNA3 com a control i 200 ng del vector reporter de Gal4. Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 6 experiments independents. ** : diferència significativa comparada amb el basal amb $P < 0,01$; *** : $P < 0,01$.

Com ja havíem vist amb els tres primers fragments, hi ha tota una regió N-terminal que no exerceix un paper en l'activació i fins i tot actua negativament. El fragment **D** serveix per ampliar aquesta regió N-terminal negativa als residus 112-220, ja que el fragment **D** és més potent que el fragment **C**.

També podem definir una petita regió C-terminal que actua negativament als residus 1-31. Així, el fragment **I** és més potent que el fragment **D**, o el fragment **M** és més potent que el fragment **L**.

Si ens centrem en la regió N-terminal, aquest experiment serveix per definir a DOR dos dominis d'activació de la transcripció (marcats a la **figura 19** amb asteriscs); així, els fragments que contenen els dos dominis (fragments **D** i **I**) són els que més potentment activen la transcripció (30-40 vegades). En canvi, els fragments que tenen tan sols un o l'altre domini d'activació (fragments **E**, **F**, **G**, **H**, **J**, **K**, **L** i **M**) activen la transcripció al voltant de 20 vegades.

Amb la construcció Gal4-DOR i amb el fragment que produïa la màxima activació (residus 31 a 111) vam analitzar l'activitat transfectant diferents quantitats del vector, per comprovar que seguia una cinètica de dosi-resposta (**figura 20**).

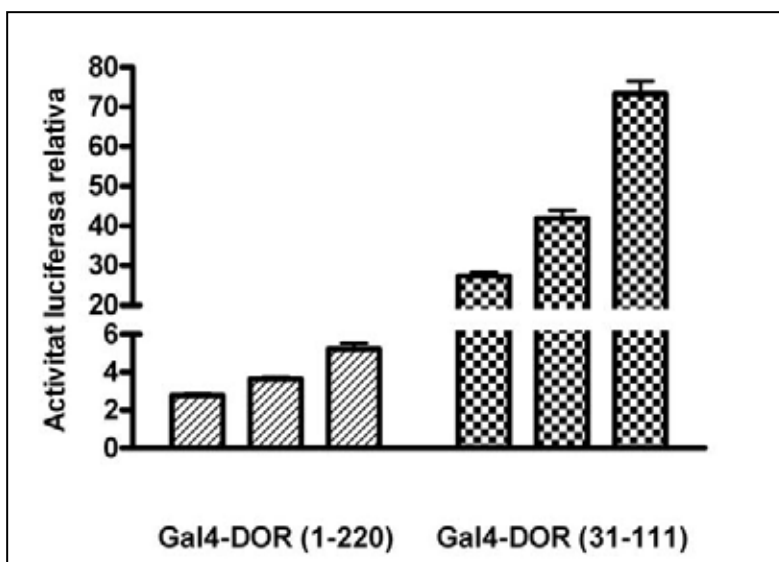


Figura 20. Dosi-resposta amb Gal4-DOR i amb el fragment 31 a 111. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb diferents quantitats de la construcció Gal4-DOR i del fragment 31 a 111 unit a Gal4 (100 ng a 400 ng), i 200 ng del vector reporter de Gal4. Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

Vam poder comprovar que, efectivament, l'activació produïda era directament proporcional a la quantitat de DNA transfectada.

Per últim vam analitzar l'activitat de diverses d'aquestes construccions a cèl·lules HEK 293, obtenint uns resultats molt similars als de les cèl·lules HeLa, amb l'única diferència que les activacions que vam veure eren de major magnitud (**figura 21**).

Resultats

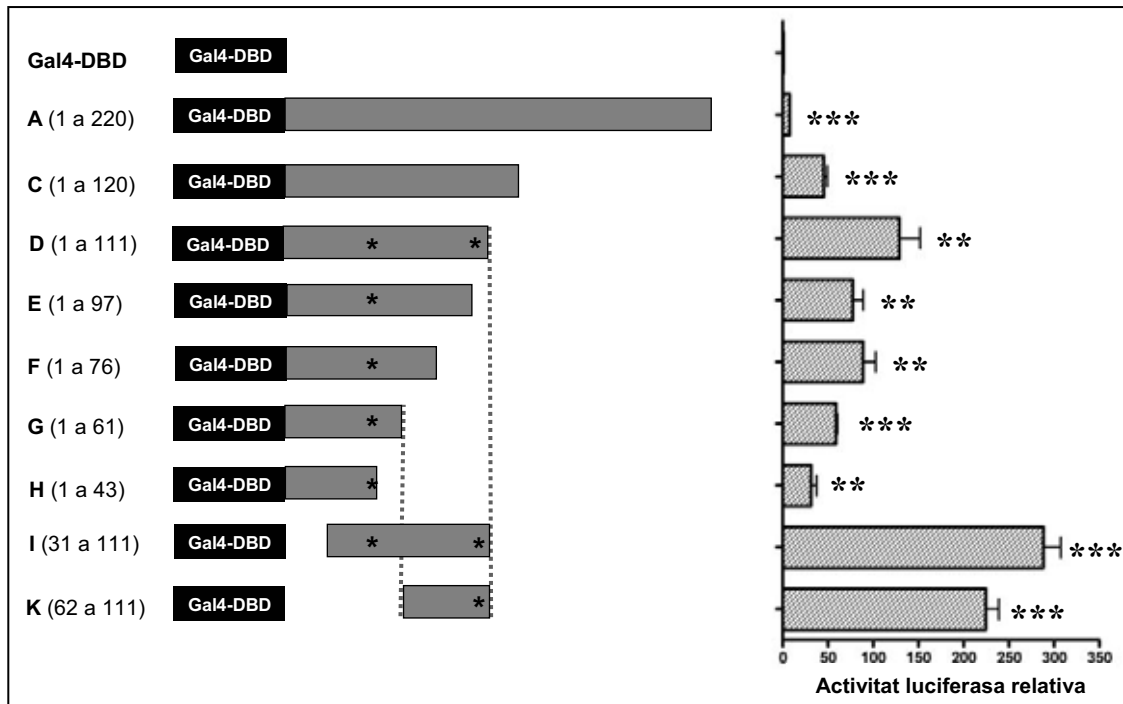


Figura 21. Activació produïda per diferents fragments de DOR units al Gal4-DBD (cèl·lules HEK 293). L'experiment es va realitzar com en el cas de la figura 19 però en cèl·lules HEK 293. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 6 experiments independents. ** : diferència significativa comparada amb el basal amb $P < 0,01$; *** : $P < 0,01$.

II.4 Fusions d'ortòlegs de DOR amb el domini d'unió a DNA de Gal4.

L'alineament de les seqüències de DOR humà, de ratolí i de rata amb la dels possibles ortòlegs que vam detectar a altres espècies (**punt I.1**) deixa veure que les regions que hem detectat com a responsables de l'activació de la transcripció al DOR humà coincideixen amb dominis força conservats als diferents ortòlegs. Vam demanar a diferents genoteques clons de cDNA que continguessin la seqüència sencera de la pauta oberta de lectura d'alguns d'aquests ortòlegs i els vam clonar de manera que vam generar proteïnes de fusió entre aquests possibles ortòlegs i el domini d'unió a DNA de Gal4. La **figura 22** mostra un alineament dels ortòlegs que vam clonar per fer fusions amb el Gal4-DBD.

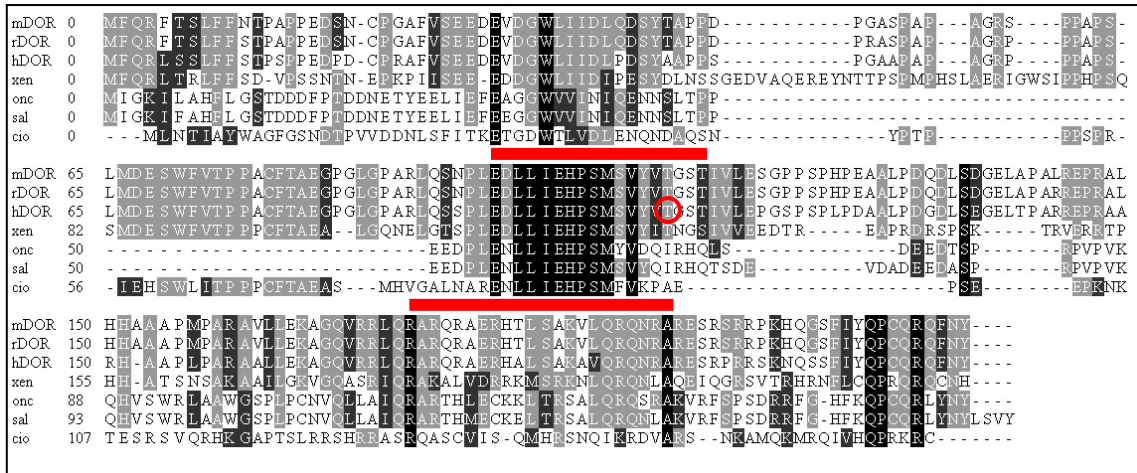


Figura 22. Alineament del DOR humà (**hDOR**), de rata (**rDOR**), de ratolí (**mDOR**), de *Xenopus laevis* (**xen**), d'*Oncorhynchus mykiss* (**onc**), de *Salmo rerio* (**sal**) i de *Ciona intestinalis* (**cio**). Subratllat en vermell, les regions identificades com a importants per a l'activació en els estudis de Gal4-DOR. Encerclat en vermell el residu 111 del DOR humà.

Vam transfectar aquestes construccions per veure si les proteïnes quimèriques generades també eren capaces d'activar l'expressió d'un vector reporter de Gal4 (**figura 23**).

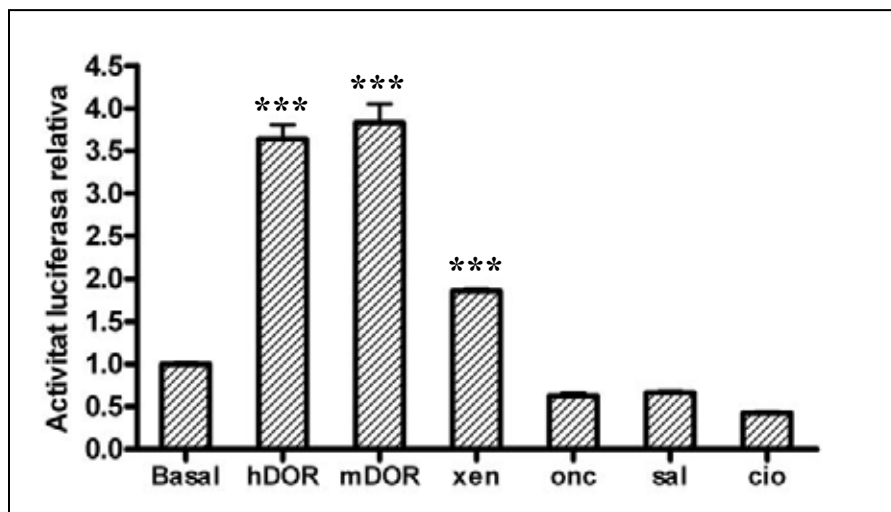


Figura 23. Activitat de les fusions dels diferents ortòlegs amb el Gal4-DBD (**hDOR**: DOR humà; **mDOR**: DOR de ratolí; **rDOR**: DOR de rata; **xen**: *Xenopus laevis*, **onc**: *Oncorhynchus mykiss*; **sal**: *Salmo rerio*; **cio**: *Ciona intestinalis*). Es van transfectar cèl·lules HeLa amb 200 ng de la construcció Gal4-DOR, els diferents ortòlegs de DOR fusionats a Gal4 o el vector buit pCDNA3 com a control i 200 ng del vector reporter de Gal4. Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. *** : diferència significativa comparada amb el basal amb $P < 0,001$.

Resultats

La proteïna DOR de ratolí produïa una activació similar a la del DOR humà. En el cas dels altres ortòlegs tan sols detectàvem una activació molt modesta en el cas de l'ortòleg de *Xenopus laevis*.

Tot i aquest resultat, i basant-nos en que alguns dels fragments de DOR humà que havíem provat eren més potents activant la transcripció que la proteïna sencera, vam voler comprovar si fragments anàlegs dels ortòlegs podien activar la transcripció com en el cas del DOR humà. És per això que vam generar fusions del Gal4-DBD amb fragments N-terminal d'aquests ortòlegs. Aquests fragments N-terminal corresponien, per a cada ortòleg, als residus de l'u al residu que s'alineava amb el residu 111 de hDOR en l'alineament (**figura 22**, encerclat en vermell), ja que el fragment 1-111 del DOR humà és, com hem vist, el fragment N-terminal més actiu.

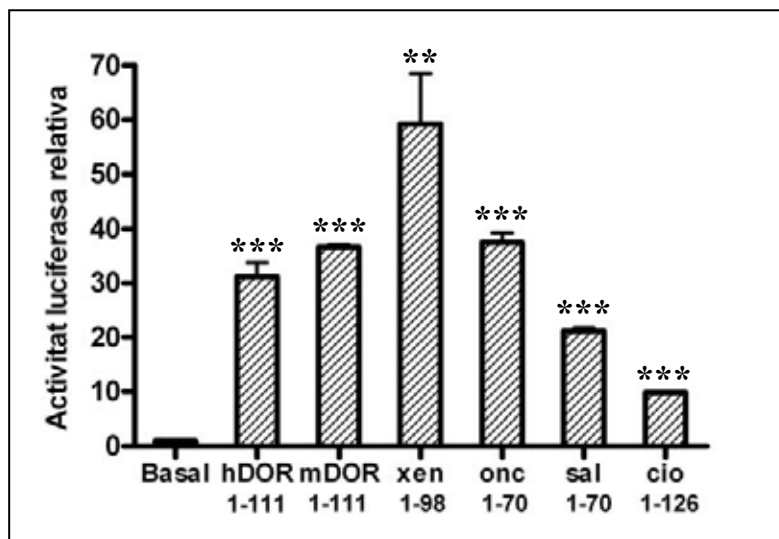


Figura 23. Activitat dels fragments N-terminal dels diferents ortòlegs amb el Gal4-DBD (**hDOR**: DOR humà; **mDOR**: DOR de ratolí; **rDOR**: DOR de rata; **xen**: *Xenopus laevis*, **onc**: *Oncorhynchus mykiss*; **sal**: *Salmo rerio*; **cio**: *Ciona intestinallis*). Es van transfectar cèl·lules HeLa amb 200 ng dels fragments N-terminal dels diferents ortòlegs de DOR fusionats a Gal4 o el vector buit pCDNA3 com a control i 200 ng del vector reporter de Gal4. Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. **: diferència significativa comparada amb el basal amb $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

Els fragments N-terminal dels ortòlegs sí són capaços d'activar la transcripció quan es fusionen amb domini d'unió a DNA de Gal4, a diferència del que passa amb les proteïnes senceres (**figura 23**). Aquest resultat ens fa pensar que aquestes proteïnes

podrien ser, efectivament, ortòlegs del DOR humà, i que tindrien també la capacitat d'activar la transcripció. D'altra banda aquest resultat també ens reforça la idea de que la regió N-terminal d'aquestes proteïnes tindria un paper inhibidor de la funció de DOR.

Per analitzar una mica més aquest possible paper inhibidor del fragment N-terminal de la proteïna vam voler comprovar si la sobreexpressió d'aquest fragment afectava a la capacitat de coactivar els receptors nuclears de la proteïna sencera. Així en un experiment en què DOR coactiva un receptor nuclear (en aquest cas TR α) vam cotransfectar la fusió de Gal4 que conté el fragment de DOR dels residus 120 a 220 (**figura 24**).

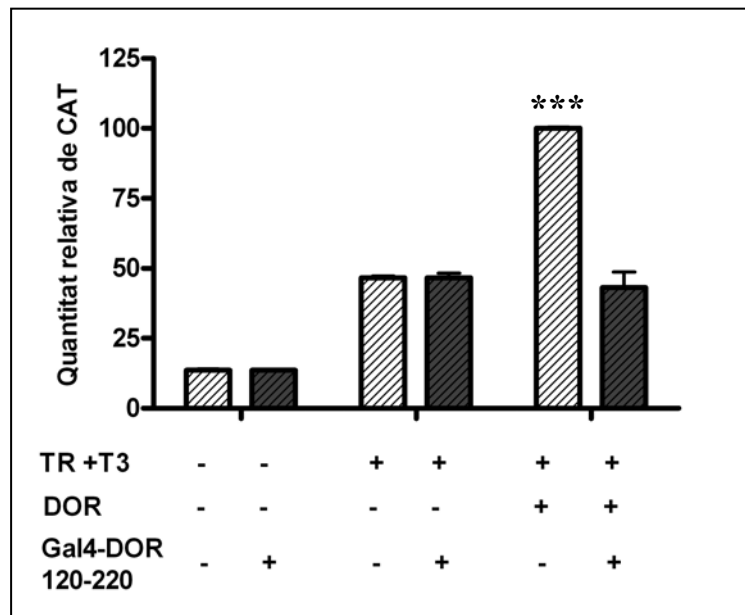


Figura 24. Efecte del fragment 120 a 220 sobre la capacitat de coactivació de DOR. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per TR α (75 ng), DOR (100 ng), la construcció Gal4-DOR 120 a 220 (100 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de TR α (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència del lligand (T3 100 nM) i es va analitzar l'expressió del reporter CAT. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

*** : diferència significativa amb el grup del receptor nuclear amb P<0.001.

Els resultats mostren que quan es cotransfecta la regió C-terminal de DOR en un experiment de coactivació d'un receptor nuclear aquesta és capaç d'abolir la funció coactivadora de la proteïna sencera.

Resultats

II.5 Interacció funcional de DOR amb proteïnes HAT.

Per la seva petita mida i per la seva manca d'homologia amb proteïnes conegudes sembla difícil que DOR pugui tenir una activitat enzimàtica. Així el seu paper en l'activació de la transcripció molt probablement el portarà a terme interaccionant amb altres proteïnes, més que modificant-les d'alguna manera. Per aquest motiu ens vam preguntar si hi podia haver algun tipus d'interacció funcional entre DOR i els coactivadors amb activitat Histona Acetil Transferasa (HAT) CBP, p300 i PCAF, que coactiven un ampli espectre de receptors nuclears (Glass et al., 2000).

Per respondre a aquesta pregunta les fusions del Gal4-DBD amb el DOR sencer i amb el fragment 1 a 120 es van cotransfectar amb els altres coactivadors i es va mesurar l'activació del reporter de Gal4 (**figura 25**).

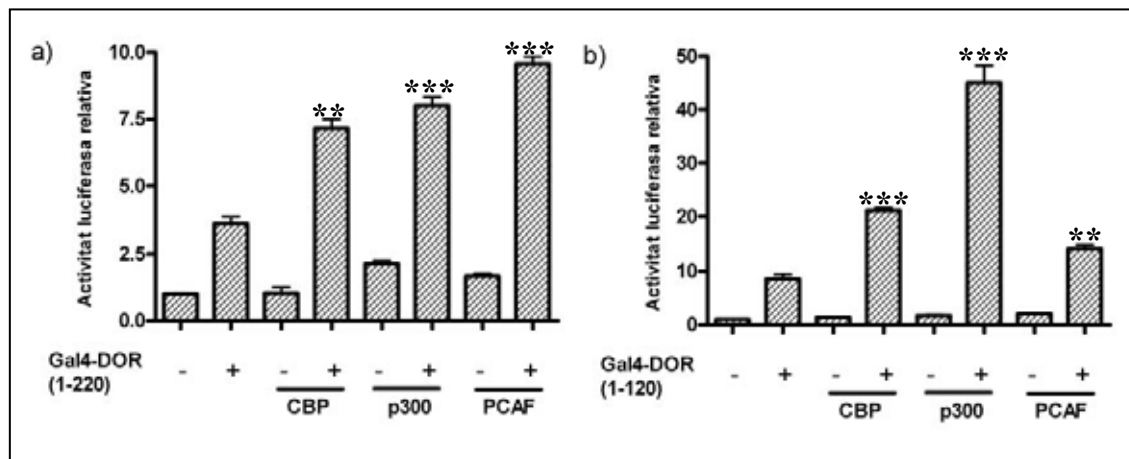


Figura 25. Efecte de diferents HATs sobre l'activació de les fusions de Gal4-DBD amb: **a)** DOR sencer (1 a 220). Es van transfectar cèl·lules HeLa amb la construcció Gal4-DOR (200 ng), els vectors d'expressió per les HATs indicades (100 ng), el vector buit pCDNA3 com a control i el vector reporter de Gal4 (200 ng). Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. **b)** fragment 1 a 120. Es va realitzar el mateix experiment però amb el fragment 1 a 120 unit a Gal4.

Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. ** : diferència significativa comparada amb el grup control sense HAT amb $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

Els resultats mostren que diferents HATs tenen la capacitat d'augmentar la l'activació de la transcripció que fa Gal4-DOR, tant en el cas del DOR sencer com en el fragment N-terminal dels residus 1 al 120.

Cal dir que aquesta interacció funcional amb coactivadors amb activitat HAT no és inespecífica, ja que altres coactivadors amb activitat (GCN5, Tip60 i SRC1) amb què vam realitzar l'experiment no van donar el mateix resultat (**figura 26**). De fet, Tip60 va reduir de manera dràstica l'activitat de Gal4-DOR.

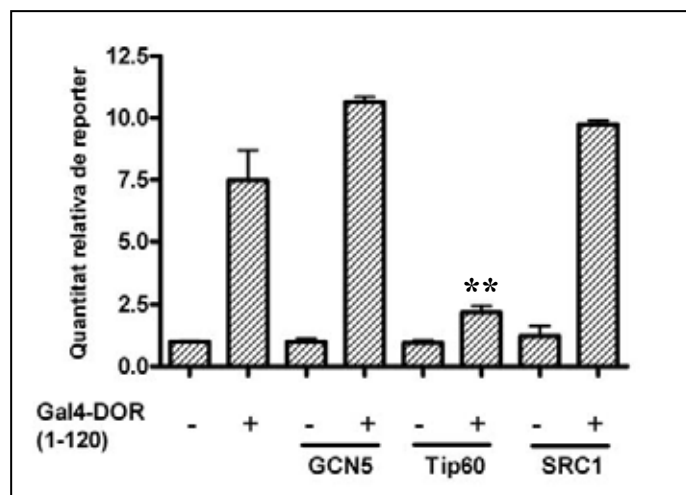


Figura 26. Efecte de les HATs GCN5, Tip60 i SRC1 sobre el fragment 1 a 120 de DOR unit al Gal4-DBD. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb la construcció Gal4-DOR (200 ng), els vectors d'expressió per les HATs indicades (100 ng), el vector buit pCDNA3 com a control i el vector reporter de Gal4 (200 ng). Al cap de 24 h es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats mitjana i error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. **: diferència significativa comparada amb el grup control sense HAT amb $P < 0,01$.

II.6 Estudi de la pèrdua de funció de DOR a cèl·lules musculars.

El següent pas va ser comprovar si en cèl·lules que expressen DOR de forma endògena, la pèrdua d'aquesta expressió té alguna conseqüència en l'activitat dels receptors nuclears que havíem vist que eren coactivats per DOR.

Per fer-ho es van generar vectors lentivirals amb siRNAs que reprimien l'expressió de DOR, i es van utilitzar aquests vectors per infectar cèl·lules musculars C2C12. D'aquesta manera es va generar una línia de cèl·lules C2C12 'knock-down' de DOR, en què l'expressió de DOR estava marcadament reduïda, tant a nivell de mRNA com de proteïna. Com a control es van usar cèl·lules infectades amb un siRNA 'scramble', és a dir, amb la mateixa composició que l'siRNA de DOR però desordenat (**figura 27**).

Resultats



Figura 27. Expressió de mRNA (Real Time PCR) i de proteïna (Western Blot) de DOR a cèl·lules C2C12 infectades amb un siRNA 'scramble' o específic per DOR (Font: Vicent Ribas).

* : diferència significativa amb el grup scramble amb $P < 0.05$.

Es van transfectar cèl·lules control i cèl·lules knock-down per DOR amb reporters de TR i de PPAR, en presència o absència del lligand corresponent (T3 o rosiglitazona) i en presència o absència del receptor nuclear (**figura 28**). Els resultats indiquen que les cèl·lules knock-down de DOR tenen menys capacitat per respondre a $TR\alpha$ i a $PPAR\gamma$.

Això indica que DOR és un coactivador important per a la funció d'aquests dos receptors en aquestes cèl·lules.

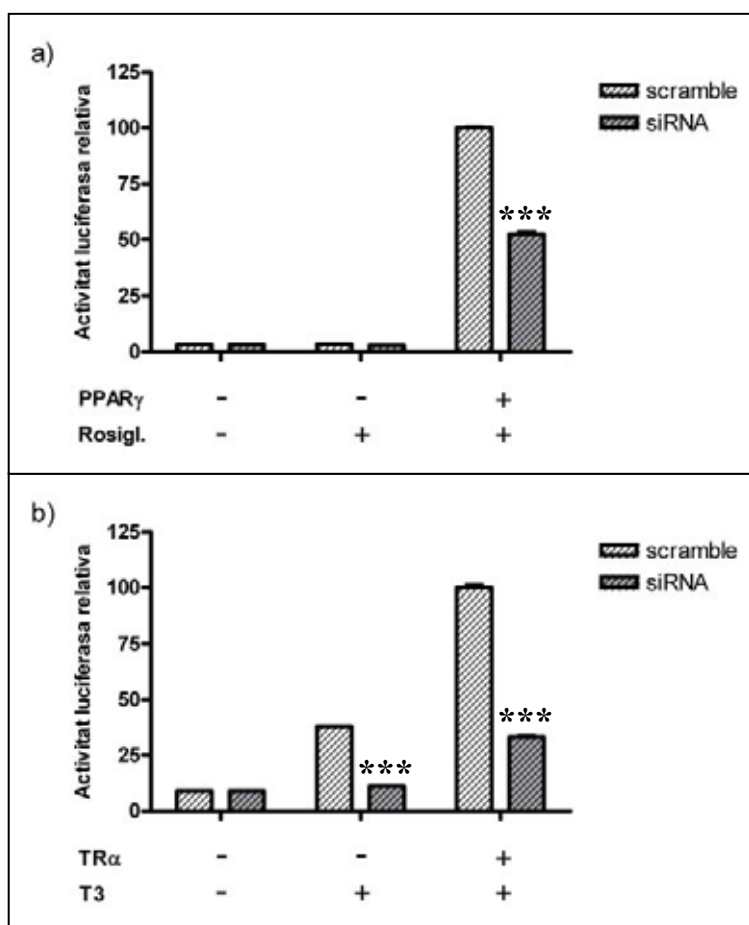


Figura 28. Efecte de la repressió de DOR en cèl·lules C2C12 sobre la capacitat d'incrementar l'expressió del seu vector reporter de:

a) PPAR γ . Cèl·lules C2C12 infectades amb un siRNA 'scramble' o un siRNA específic per DOR es van transfectar amb un vector d'expressió per PPAR γ (75 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de PPAR (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència o en absència del lligand (rosiglitazona 100 nM) i es va analitzar l'activitat luciferasa.

b) TR α . L'experiment es va realitzar de la mateixa forma però amb un vector d'expressió de TR α , un reporter de TR i T3 100 nM com a lligand.

Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. *** : diferència significativa comparada amb el corresponent grup scramble amb $P < 0,001$.

D'altra banda en el nostre laboratori hem pogut comprovar que aquestes cèl·lules knock-down de DOR responen pitjor a l'estímul que provoca la hormona tiroïdal en l'expressió de determinats gens (resultats de Vicent Ribas; veure **Annex I**).

II.7 Paper de la caixa LxxLL

Com ja hem dit, un dels motius que ens va portar a pensar que DOR podia ser un coactivador de receptors nuclears va ser la presència a la seqüència de la proteïna d'una putativa caixa LxxLL (també anomenada caixa NR). Aquesta caixa serveix en molts coactivadors com a domini d'interacció amb els receptors nuclears.

Com hem vist a la introducció, la interacció de les caixes LxxLL dels coactivadors amb els receptors nuclears té lloc pel domini AF-2. Aquest domini consisteix en dos residus carregats, una Lisina i un Glutamat, que formen un 'charge-clamp' que orienta la caixa LxxLL correctament, i una sèrie de residus hidrofòbics que interaccionen amb les Leucines de la caixa LxxLL. La interacció entre la caixa LxxLL i el domini AF-2 dels receptors nuclears és dependent d'hormona (Savkur et al., 2004).

En estudis de co-immunoprecipitació realitzats al nostre laboratori per caracteritzar la interacció entre DOR i TR α vam poder observar que DOR interaccionava amb el receptor d'hormones tiroïdals tant en presència com en absència d'hormona (M. Orpinell, Tesi Doctoral 2006, Universitat de Barcelona).

D'altra banda vam analitzar la capacitat de DOR per coactivar una versió mutada del receptor de glucocorticoides en què el residu de Glutamat que forma el 'charge clamp' que s'uneix a les caixes LxxLL s'ha mutat a Alanina (GR E773A), de manera que aquesta versió mutada de GR no pot interaccionar amb coactivadors que ho facin via caixes LxxLL, com ara Src-1 (Kucera et al., 2002; Wu et al., 2004) (**figura 29**).

Resultats

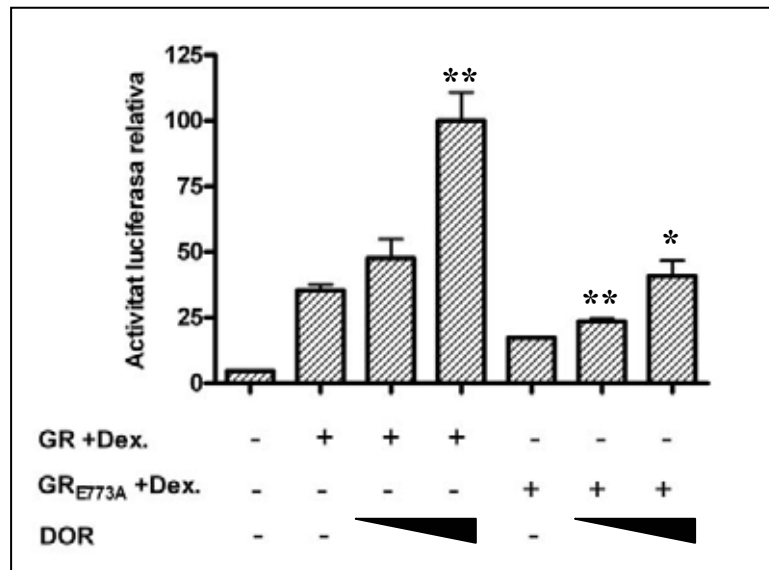


Figura 29. Efecte de DOR sobre GR α i sobre el mutant de GR α E773A. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb de vectors d'expressió per GR α o del mutant E773A (75 ng), DOR (100 o 200 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de GR α (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència o en absència del lligand (dexametasona 100 nM) i es va analitzar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. * : diferència significativa comparada amb el grup del receptor nuclear amb $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$.

Com era d'esperar, el GR_{E773A} activa menys la transcripció que el GR natiu. Malgrat la mutació, DOR també és capaç de coactivar el GR_{E773A}, i amb una intensitat similar. Això es pot apreciar millor si s'analitzen les dades de GR i GR_{E773A} per separat, atorgant a cada forma del receptor el valor d'activació del 100% (**figura 29bis**).

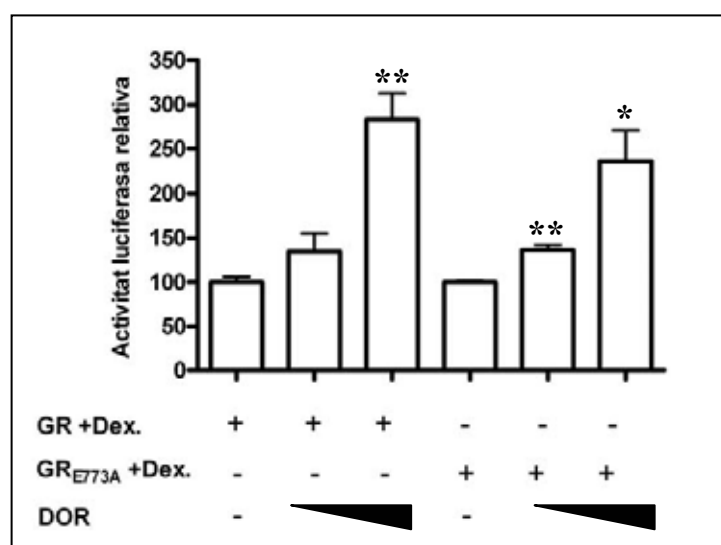


Figura 29bis. Les mateixes dades de la **figura 29** però referides a cada forma del receptor com a 100%.

Aquests darrers resultats ens van portar a pensar que la interacció de DOR amb els receptors nuclears podia ser per un domini diferent de la caixa LxxLL. Per aquest motiu vam generar, per mutagènesi dirigida, un vector per a l'expressió d'una forma mutada de DOR, on les leucines de la caixa LxxLL s'havien convertit a alanina, i que vam anomenar DOR AXXAA. Vam analitzar aleshores si aquesta forma mutada perdia la seva capacitat de coactivar receptors nuclears (**figura 30**).

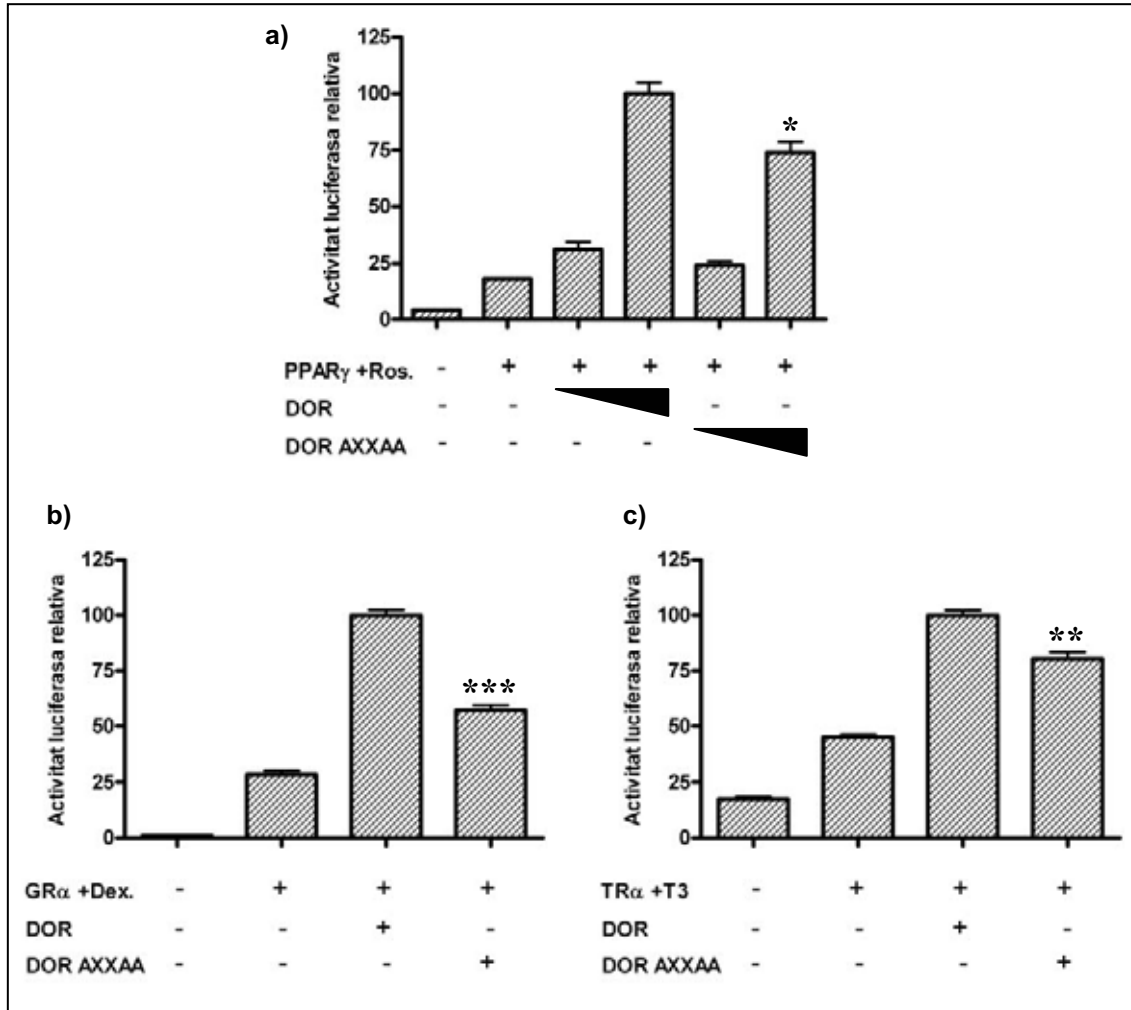


Figura 30. Efecte de DOR i del mutant de la caixa LxxLL (DOR AXXAA) sobre: **a)** PPAR γ ; **b)** TR α ; **c)** GR α . Els experiments es van realitzar com ja s'ha descrit anteriorment amb la forma nativa de DOR o amb el mutant AXXAA. * : diferència significativa entre els grups DOR natiu i DOR AXXAA amb P<0,05; ** : P<0.01; *** : P<0.001.

Els resultats van demostrar que el mutant de la caixa LxxLL manté la capacitat de coactivar els receptors nuclears. Això ens fa pensar que, contràriament al que esperàvem, la caixa LxxLL no és el domini pel qual DOR interacciona amb els

Resultats

receptors nuclears. Tot i això, la potència de la coactivació del mutant DOR AXXAA disminueix lleugerament respecte la proteïna sense mutar.

La caixa LxxLL no tan sols serveix per interaccions receptor nuclear-coactivador sinó que s'han trobat exemples funcionalment actius de motius LxxLL en altres tipus d'interaccions (Parker *et al.*, 1999; Litterst *et al.*, 2002; Torchia *et al.*, 1997). Com hem vist, quan mutem la caixa LxxLL tot i que no es perd la capacitat de coactivar els receptors nuclears, sí es perd una certa potència en la coactivació. Vam voler comprovar si aquesta pèrdua d'activitat de DOR degut a la mutació de la caixa LxxLL es produïa també en el context de Gal4-DOR. Per això vam mutar la primera de les leucines de la caixa en diversos dels constructes de Gal4-DOR i vam analitzar la seva activitat en comparació amb el mateix constructe sense mutar (**figura 31**).

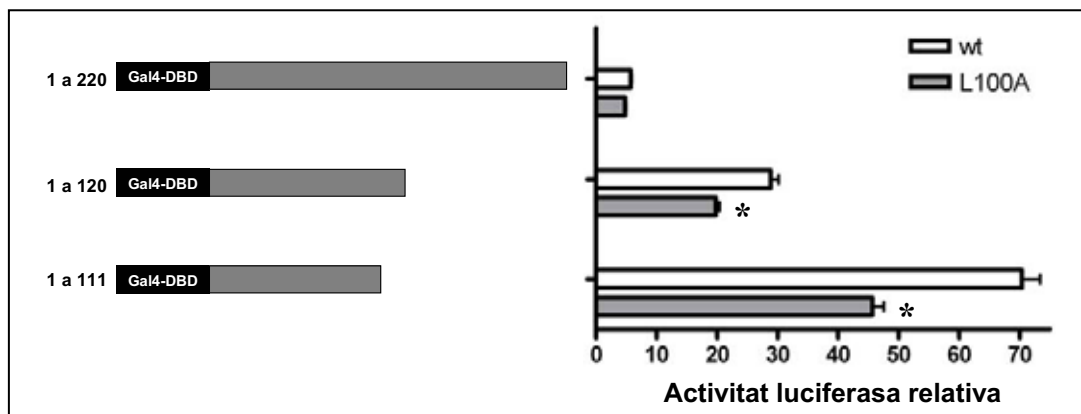


Figura 31. Efecte de la mutació a la caixa LxxLL sobre les construccions Gal4-DOR. Els experiments es van realitzar com ja s'ha descrit anteriorment amb les construccions de Gal4-DOR indicades o amb la seva versió mutada L100A. * : diferència significativa entre cada construcció i el seu mutant amb $P < 0,05$.

Les construccions Gal4-DOR també perden part de la potència coactivadora quan es muta la caixa LxxLL. Per tant aquesta caixa és important per al domini d'activació de DOR (cosa que explicaria el fet de que estigui en una regió conservada als diferents ortòlegs), però no per la interacció amb els receptors nuclears.

A l'altra regió identificada com a important per l'activació en els estudis de Gal4-DOR vam detectar que també hi havia un grup de residus aromàtics similar a una caixa LxxLL (en aquest cas LIIDL, residus 36 a 40). El fet que la mutació de la caixa LxxLL

fa baixar la potència activadora de la transcripció de DOR ens va portar a pensar que potser mutant aquesta altra regió rica en residus aromàtics també podríem afectar a la capacitat activadora de DOR. Per aquest motiu vam generar diverses construccions de Gal4-DOR en els quals les dues leucines d'aquesta regió van ser mutades a alanina.

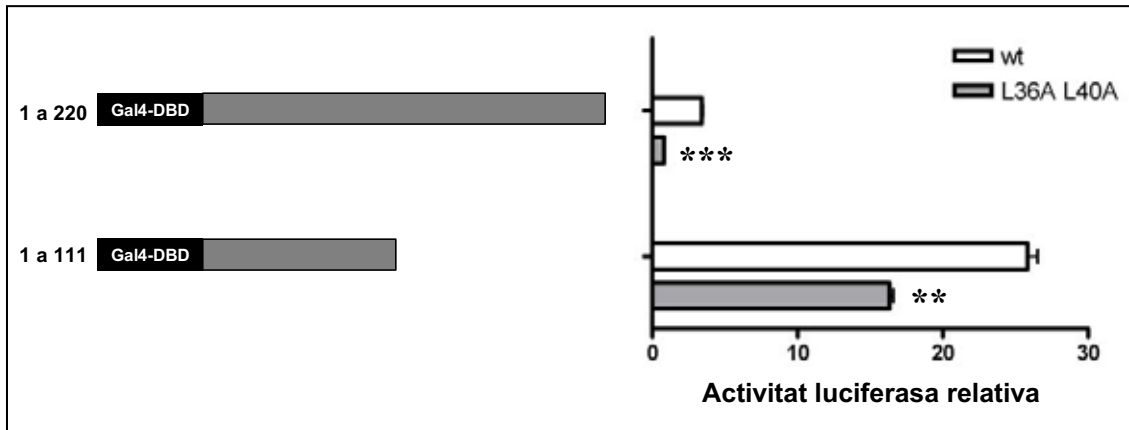


Figura 32. Efecte de les mutacions L36A i L40A sobre els constructes Gal4-DOR. Els experiments es van realitzar com ja s'ha descrit anteriorment amb les construccions de Gal4-DOR indicades o amb la seva versió mutada L36A L40A. ** : diferència significativa entre cada construcció i el seu mutant amb $P < 0,01$; *** : $P < 0,01$.

En el context de la quimera Gal4-DOR la mutació d'aquestes leucines feia disminuir la capacitat de la proteïna d'activar la transcripció (figura 32). També vam voler comprovar com afectaven aquestes mutacions en la capacitat de DOR de coactivar els receptors nuclears. Per això vam generar una versió de DOR amb les mateixes mutacions, L36A i L40A. Com era d'esperar el mutant generat tenia menys capacitat de coactivar els receptors nuclears que la proteïna nativa (figura 33).

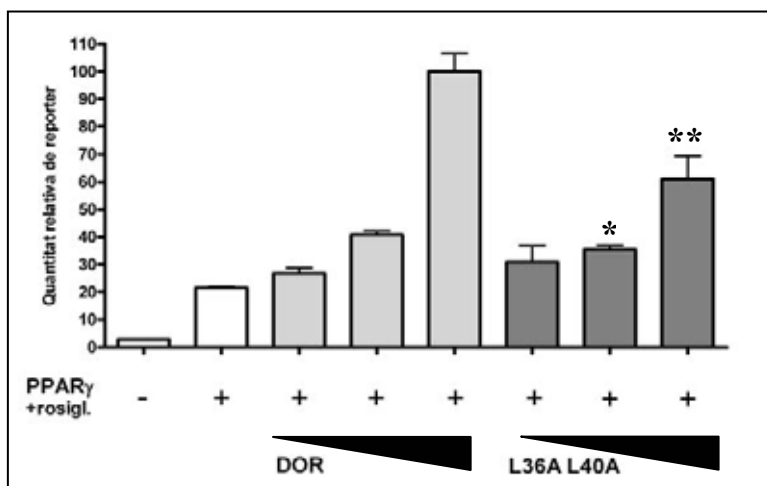


Figura 33. Coactivació de DOR i del mutant L36A L40A sobre PPAR γ . Els experiments es van realitzar com ja s'ha descrit anteriorment amb la forma nativa de DOR o amb el mutant L36A L40A. * : diferència significativa entre els grups DOR natiu i DOR L36A L40A amb $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$.

III. LOCALITZACIÓ INTRACEL·LULAR DE DOR

III.1 Dominis responsables de la localització de DOR.

Per poder actuar com a regulador de la transcripció és imprescindible que DOR es localitzi, com a mínim parcialment, a nivell de nucli. La majoria de les prediccions, com hem vist a l'**apartat I.2.1**, deien que la localització de DOR era nuclear. Vam voler comprovar si efectivament DOR es localitza al nucli.

Quadre informatiu 2. Localització nuclear de les proteïnes.

La compartimentalització de les cèl·lules eucariotes fa que totes les proteïnes que es localitzen al nucli hagin de ser importades des del citoplasma. L'intercanvi de macromolècules entre el nucli i el citoplasma té lloc a través dels porus nuclears. El pas de les proteïnes a través del porus nuclear pot ser:

- per difusió passiva: el pas per difusió està limitat per la mida de la proteïna: el porus nuclear tan sols permet el pas de proteïnes més petites de 40 kDa (Görlich et al., 1999).
- per transport actiu mitjançat per senyals específiques
- per cotransport amb altres proteïnes

Algunes proteïnes, tot i ser suficientment petites per passar de forma passiva pel porus nuclear, la seva localització està regulada per senyals d'entrada (NLS) o de sortida del nucli (NES) de manera que aquesta localització esdevé més eficient, controlada i regulable. Aquest podria ser el cas de la proteïna DOR: tot i que té una mida d'uns 24 kDa. (cosa que probablement li permet passar de forma passiva pel porus nuclear) la seva localització podria estar regulada per senyals i transport actiu.

Per determinar quina era la localització intracel·lular de la proteïna DOR vam generar un vector per a l'expressió d'una proteïna de fusió de DOR amb la proteïna fluorescent GFP (Green Fluorescent Protein), unint aquesta a l'extrem N-terminal de DOR . La proteïna GFP sola es va usar com a control. Els vectors d'expressió per aquestes

Resultats

proteïnes es van transfectar en cèl·lules HeLa i es va analitzar la localització intracel·lular de la fluorescència amb un microscopi confocal (**figura 34**).

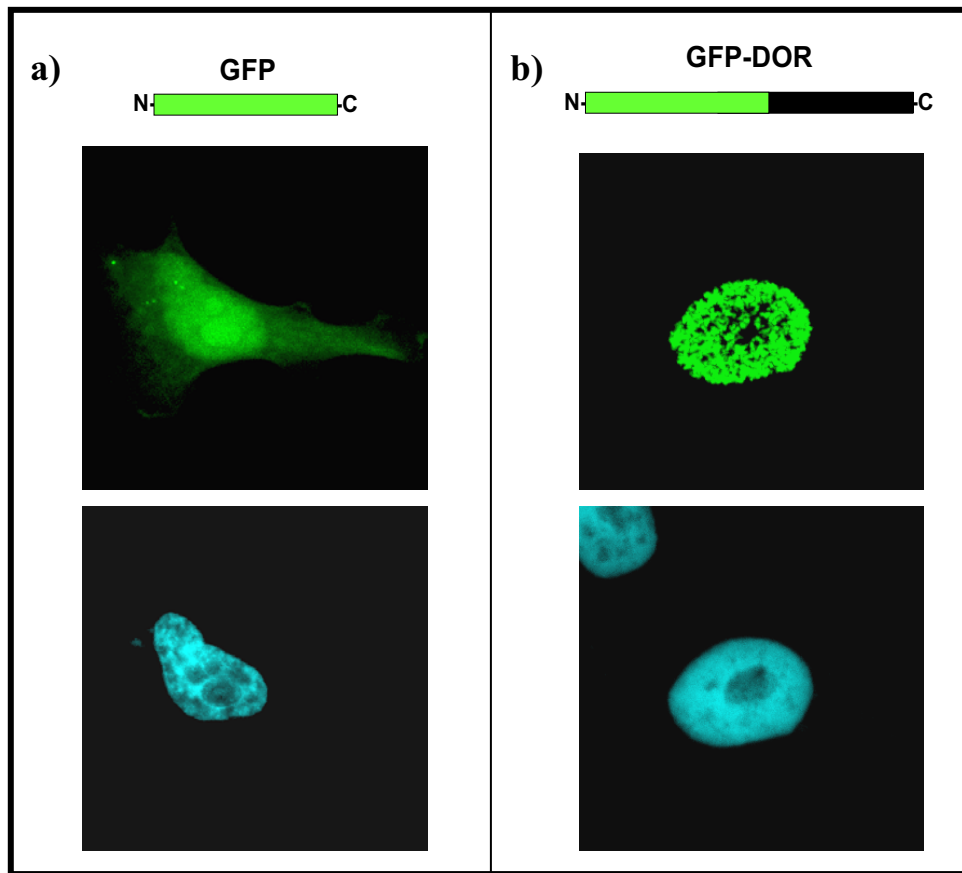


Figura 34. En verd, distribució cel·lular de: **a)** GFP; **b)** GFP-DOR. En blau, marcatge de nuclis amb Hoescht. Es van plaquejar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. Al cap de 24 h es van transfectar amb el vector d'expressió de GFP o de la construcció GFP-DOR. Al cap de 36 h es van fixar les cèl·lules amb PFA 3% i es va realitzar la tinció de Hoescht.

La proteïna GFP sola es localitza distribuïda tant per citosol com al nucli; això és degut a que no té cap senyal de localització, i a més és prou petita per poder passar pels porus nuclears ja que té un pes molecular aproximat d'uns 29 kDa.

La proteïna de fusió de DOR amb GFP, en canvi, es localitza exclusivament al nucli. La localització a més no és difusa per tot el nucli, si no que apareix formant un puntejat. Aquesta proteïna té un pes molecular teòric d'uns 55 kDa, de manera que el pas per difusió facilitada a través del porus nuclear estaria molt limitat si no impossibilitat. La

presència de la proteïna GFP-DOR de forma exclusiva al nucli indica que la proteïna ha de ser transportada al nucli de forma activa.

Vam voler comprovar si la construcció GFP-DOR mantenia l'activitat que havíem atribuït a DOR, és a dir, si seguia sent capaç d'actuar de coactivador dels receptors nuclears que havíem provat. D'aquesta manera podríem estar segurs que la localització observada era la correcta. La fusió de DOR amb GFP mantenia, efectivament, la capacitat de coactivar els receptors nuclears TR α , GR α i PPAR γ (**figura 35**), cosa que dóna més significació a la localització que observem de la fusió.

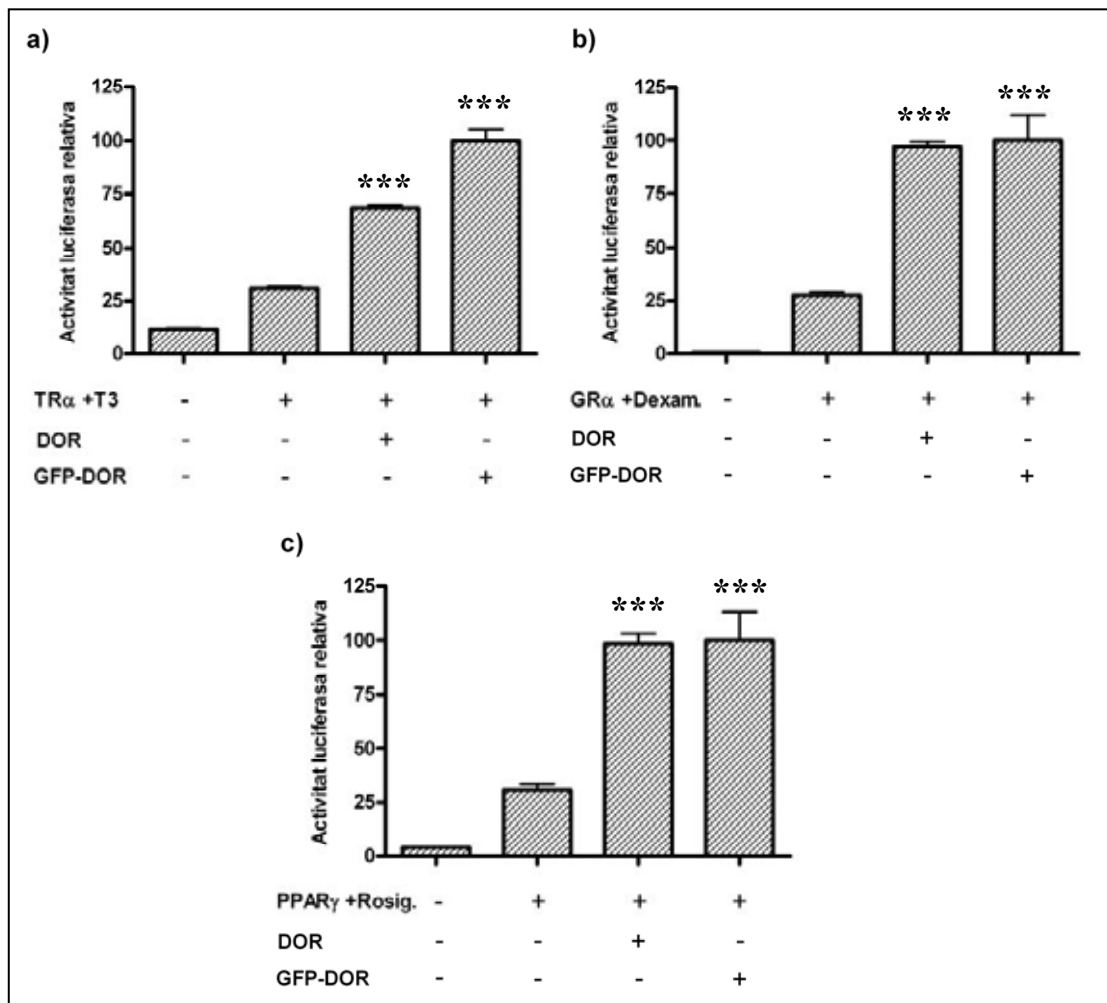


Figura 35. Comparació dels efectes de DOR i GFP-DOR sobre: **a)** TR α ; **b)** GR α ; **c)** PPAR γ . Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió pel receptor nuclear (75 ng), DOR o la construcció GFP-DOR (200 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter adequat (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència o en absència del lligand corresponent i es va analitzar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

*** : diferència significativa amb el grup del receptor nuclear amb P<0,001.

Resultats

Per localitzar quina regió de DOR és la responsable de la seva localització nuclear vam generar dues noves construccions de DOR fusionades amb GFP: una amb la regió N-terminal de DOR (residus 1 a 111) i l'altra amb la regió C-terminal (residus 83 a 220) i en vam analitzar la localització al microscopi confocal.

Totes dues construccions tenen una mida de vora 40 kDa, cosa que els permetria passar pel porus nuclear de forma passiva. La fusió de GFP amb la regió N-terminal de DOR es distribueix per tota la cèl·lula, incloent el nucli, de forma anàloga a com ho fa la GFP sola. El constructe de GFP unit al fragment C-terminal de DOR, en canvi, es localitza exclusivament al nucli, tot i que amb un marcatge diferent al de la fusió amb GFP de la proteïna sencera (**figura 36**).

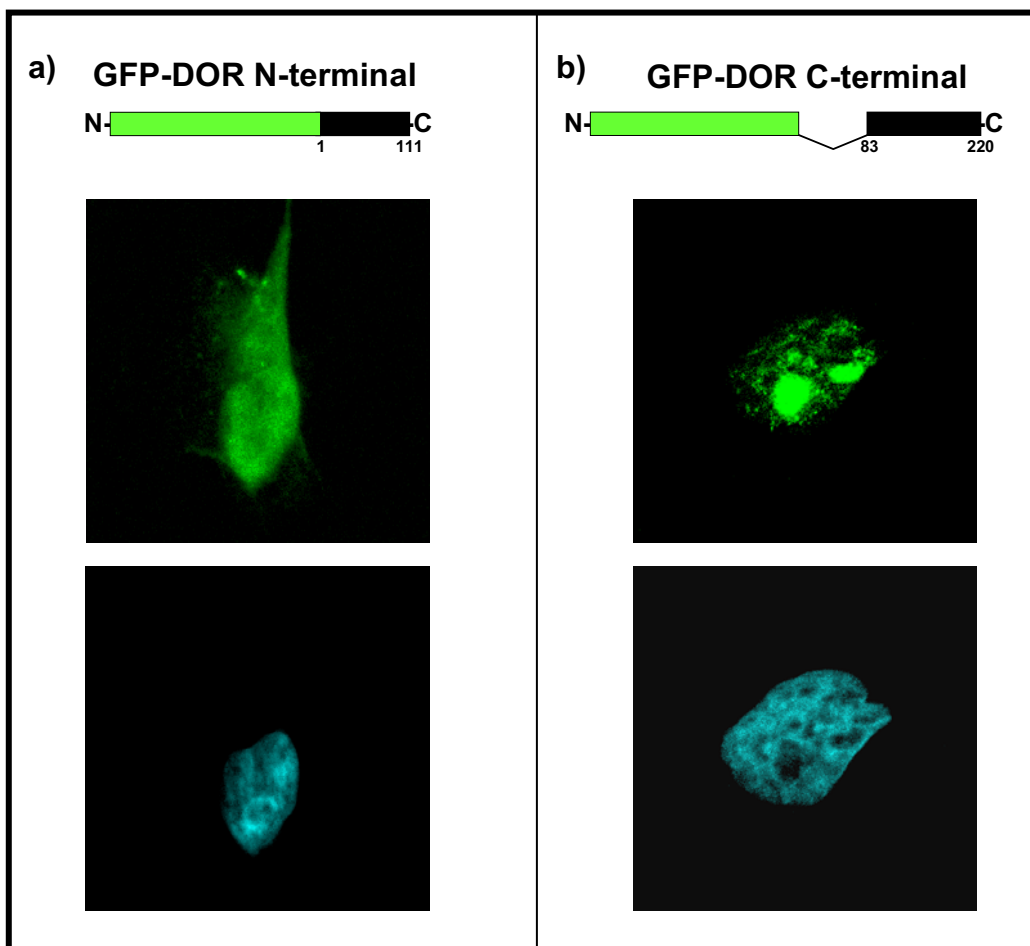


Figura 36. En verd, distribució cel·lular de: **a)** GFP-DOR N-terminal (1 a 111); **b)** GFP-DOR C-terminal (83 a 220). En blau, marcatge de nuclis amb Hoescht. Es van plaquejar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. Al cap de 24 h es van transfectar amb el vector d'expressió de les construccions GFP-DOR N-terminal i GFP-DOR C-terminal. Al cap de 36 h es van fixar les cèl·lules amb PFA 3% i es va realitzar la tinció de Hoescht.

Aquests resultats servien per descartar la regió N-terminal com a responsable de la localització nuclear de la proteïna. Com hem vist, els programes PredictNLS i NucPred, que s'usen per detectar senyals de localització nuclear a proteïnes, no en van trobar cap a DOR (apartat I.2.1). El programa PSORT II, en canvi, va trobar a la seqüència de DOR un putatiu NLS a l'extrem C-terminal de la proteïna, del tipus que anomena 'pat4', que consisteix en un patró de 4 residus format per 4 aminoàcids bàsics (lisina o arginina), o 3 bàsics i histidina o prolina (Hicks et al., 1995) (**figura 37**).

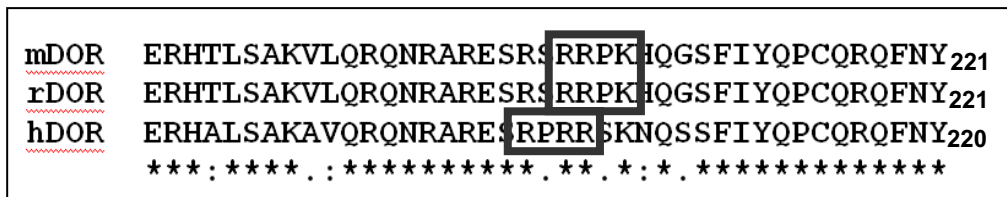


Figura 37. Localització de la senyal NLS predita pel programa PSORT II a DOR humana, de rata i de ratolí.

Per comprovar si aquesta era efectivament la NLS de DOR vam anular aquesta senyal per mutagènesi dirigida: les dues arginines consecutives es van convertir a alanina, de manera que la putativa NLS quedaria anul·lada. Vam transfectar aquesta forma mutada de GFP-DOR a cèl·lules HeLa i en vam analitzar la localització per microscòpia confocal (**figura 38**).

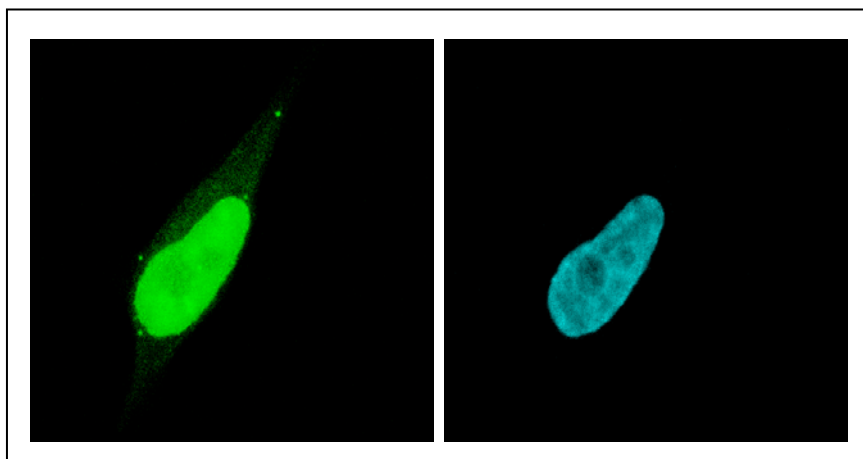


Figura 38. Distribució del mutant de la possible NLS (verd) i marcatge de nuclis amb Hoescht (blau). Es van plaquejar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. Al cap de 24 h es van transfectar amb el vector d'expressió de la construcció GFP-DOR amb la possible NLS mutada. Al cap de 36 h es van fixar les cèl·lules amb PFA 3% i es va realitzar la tinció de Hoescht.

Resultats

Els resultats indiquen que aquesta forma mutada de GFP-DOR es localitza també al nucli. Tot i això apareix una lleugera senyal citosòlica que no es donava en la forma nativa. Això indica que aquesta possible NLS podria estar participant en la localització nuclear de la proteïna, però en qualsevol cas no n'és l'únic ni tan sols el major responsable, sinó que el seu paper és molt residual. Cal destacar també que aquesta forma mutada es distribueix de forma difusa al nucli, a diferència de la forma nativa que ho feia en forma de puntejat.

El posterior desenvolupament al nostre grup d'un anticòs policlonal específic per a DOR va permetre analitzar la localització intracel·lular de la proteïna sola. En cèl·lules HeLa transfectades la distribució de la proteïna és majoritàriament nuclear (**figura 39**). Això és coherent amb el marcatge vist amb les proteïnes de fusió de DOR amb GFP.

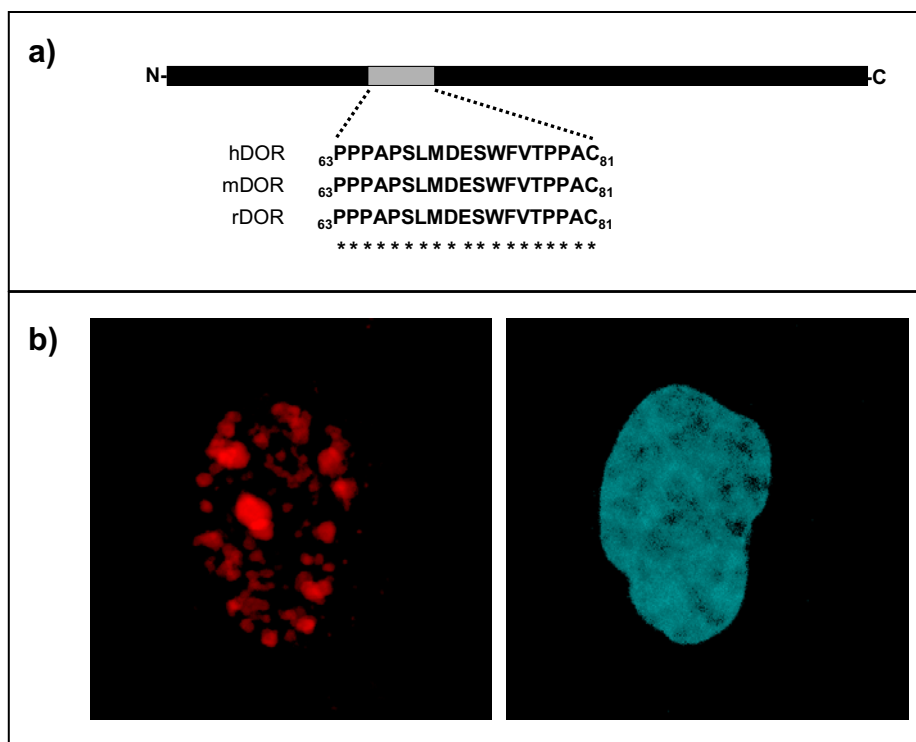


Figura 39. a) *Epítip que reconeix l'anticòs policlonal anti-DOR.* L'epítip està totalment conservat a les formes humana, de rata i de ratolí de DOR. b) *Immunolocalització de DOR (vermell) i marcatge de nuclis amb Hoescht (blau) en cèl·lules HeLa transfectades amb DOR.* Es van plaquejar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. Al cap de 24 h es van transfectar amb el vector d'expressió de DOR. Al cap de 36 h es van fixar les cèl·lules amb PFA 3% i es va realitzar una immunolocalització amb l'anticòs específic. Posteriorment es va realitzar la tinció de Hoescht.

Com hem vist, tant en el marcatge amb l'anticòs específic com en la proteïna de fusió GFP-DOR es podia constatar que la distribució de la proteïna dins el nucli no és difusa, si no que s'acumula formant un marcatge puntejat. El nucli no és un compartiment homogeni si no que conté diferents estructures o cossos que estan compartimentalitzats tot i que no tenen una membrana pròpia. Cada compartiment està enriquit en unes determinades proteïnes i pot ser identificat per mètodes microscòpics. Per determinar en quin compartiment es localitzava la proteïna DOR es van fer co-localitzacions amb marcadors d'aquestes estructures nuclears (M. Orpinell, tesi doctoral 2006, Universitat de Barcelona) i es va determinar que dins el nucli DOR es troba en unes estructures anomenades PMLs (Promyelocitic Leukemia protein). Els PMLs són cossos nuclears que participen en la regulació de la transcripció (Zhong et al., 2000), cosa que és consistent amb l'activitat coreguladora de DOR. A més l'única proteïna homòloga amb DOR, TP53INP1, es localitza també als PMLs (Tomasini et al., 2003).

La disponibilitat de l'anticòs específic per DOR ens va permetre analitzar també la localització de formes truncades de la proteïna que mantinguessin l'epítop. Vam generar dues formes truncades per l'extrem C-terminal de la proteïna: la primera contenia fins al residu 203 de la proteïna i la segona fins al 163 i vam realitzar una immunolocalització d'aquestes formes generades (**figura 40**).

La forma truncada 1 a 203 manté la localització nuclear, tot i que dins el nucli la seva localització és diferent a la de la proteïna sencera, ja que es distribueix de forma perifèrica i no en forma de puntejat per tot el nucli. La forma truncada 1 a 163, en canvi, es distribueix per tota la cèl·lula, i per tant no té la localització exclusivament nuclear de la proteïna sencera.

Resultats

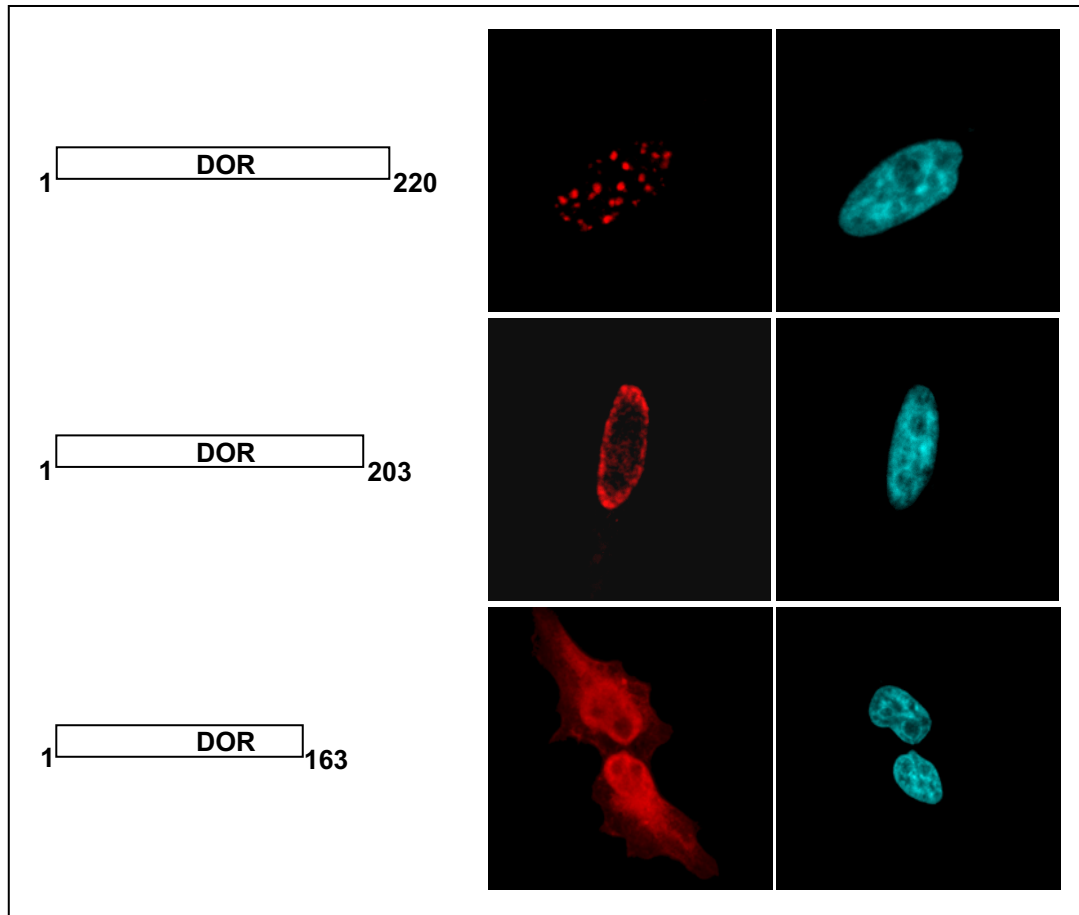


Figura 40. Localització de DOR i de les formes truncades 1 a 203 i 1 a 163. En blau, marcatge dels nuclis amb Hoescht. Es van plaquejar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. Al cap de 24 h es van transfectar amb el vector d'expressió de DOR i de les formes truncades 1 a 203 i 1 a 163. Al cap de 36 h es van fixar les cèl·lules amb PFA 3% i es va realitzar una immunolocalització amb l'anticòs específic. Posteriorment es va realitzar la tinció de Hoescht.

També vam voler analitzar la localització de la proteïna endògena a línies cel·lulars. Es van triar línies musculars perquè: 1) en estudis de Northern Blot amb diferents teixits es va veure que DOR s'expressa de manera més notable a múscul esquelètic i cardíac (**Annex I**); 2) en estudis de Western Blot amb extractes de diferents línies cel·lulars es va veure que les línies que més proteïna endògena expressaven eren línies musculars com les 1C9.

La proteïna endògena DOR també és nuclear en cèl·lules proliferatives, amb una distribució anàloga a l'obtinguda en la sobreexpressió en cèl·lules HeLa, és a dir, la proteïna es localitza als PMLs. En cèl·lules diferenciades, en canvi, la proteïna es

localitza en la seva totalitat al citosol. Això s'ha pogut constatar tant cèl·lules C2C12 (**figura 41**) com en les línies musculars 1C9 i L6E9 (M.Orpinell, Tesi doctoral 2006, Universitat de Barcelona). Aquesta localització diferent de DOR en cèl·lules diferenciades i no diferenciades ens fa pensar que la funció de DOR està regulada pel cicle cel·lular.

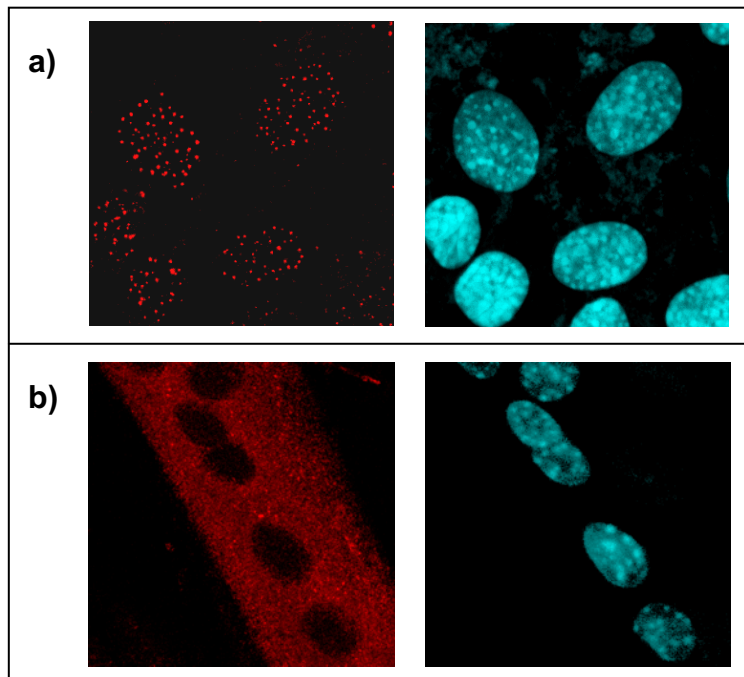


Figura 41. En vermell, distribució de DOR a cèl·lules C2C12: **a)** no diferenciades; **b)** diferenciades a mitob. En blau, marcatge de nuclis amb Hoescht. Cèl·lules C2C12 plaquejades sobre cobreobjectes no diferenciades o diferenciades a mitob de dia 4 es van fixar amb PFA 3% i es va realitzar una immunolocalització amb l'anticòs específic anti-DOR. Posteriorment es va realitzar la tinció de Hoescht..

Com hem vist a l'**apartat 1.2.1**, l'anàlisi de la seqüència de la proteïna revela la presència a DOR de diversos llocs de fosforilació que estan conservats entre la proteïna humana, de ratolí i de rata. La fosforilació pot regular els coreguladors a diferents nivells: localització, estabilitat, interacció amb altres proteïnes, etc.

Per determinar si aquesta diferent localització de la proteïna està regulada per l'estat de fosforilació de la mateixa es poden usar un inhibidor general de proteïna cinases (estaurosporina) i un inhibidor de proteïna fosfatases (àcid ocaidaic) i analitzar-ne la localització. Així tant en cèl·lules HeLa transfectades com en línies musculars no diferenciades, la inhibició de les fosfatases amb àcid ocaidaic no provoca cap canvi en la

Resultats

localització de DOR. La inhibició de les proteïna cinases amb estaurosporina, en canvi, provocava una sortida ràpida de la proteïna del nucli al citoplasma (**figura 42c**).

Vam voler analitzar el possible paper de caixes de sortida del nucli (NES) en aquesta sortida de DOR del nucli. Les NES tenen la seqüència consens Φ -X₂₋₃- Φ -X₂₋₃- Φ -X- Φ , on 'Φ' correspon a un residu aromàtic (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina o metionina) i 'x' pot ser qualsevol residu (Henderson et al., 2000). Amb l'ajuda del programa NetNES vam localitzar a DOR dues regions que podien formar una NES, tot i que cap de les dues complia exactament amb el consens. Les vam anomenar NES-1 (residus 32 a 40) i NES-2 (residus 91 a 101) (**figura 42a**).

Estudis previs ja havien descartat la NES-2 com a responsable de la sortida de DOR del nucli, ja que el mutant DOR AXXAA (veure **secció II.7**), en el qual diversos residus aromàtics de la putativa NES-2 s'havien passat a alanina (**figura 42b**), seguia sortint del nucli en el tractament amb estaurosporina (M. Orpinell, tesi doctoral 2006, Universitat de Barcelona).

Per analitzar si la NES-1 és la responsable de la sortida del nucli de DOR en els tractaments amb estaurosporina vam mutar diversos dels residus aromàtics d'aquesta NES-1 a alanina (**figura 42b**, mutant NES1-A) i vam analitzar la seva localització amb i sense tractament amb estaurosporina. Com ja sabíem el DOR natiu és nuclear, i el trobem totalment fora del nucli quan tractem les cèl·lules amb estaurosporina (**figura 42c**). La forma mutada NES1-A també es localitza al nucli en absència de tractament. En el tractament amb estaurosporina el mutant NES1-A manté en gran part la seva localització nuclear (**figura 42d**). Això ens indica que la caixa NES-1 és la principal responsable de la sortida del nucli en els tractaments amb estaurosporina.

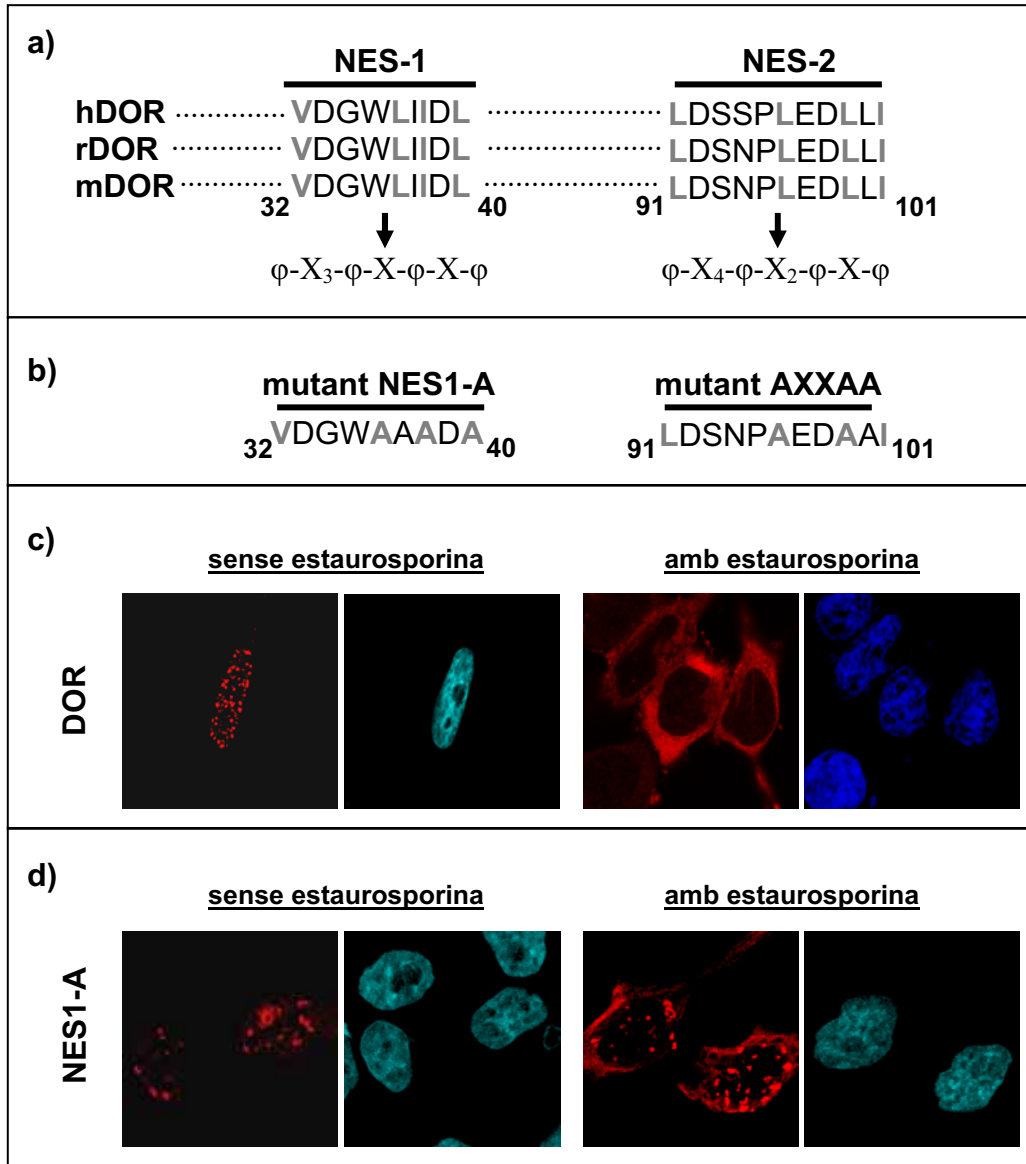


Figura 42. a) possibles caixes NES de DOR; b) mutacions generades a les caixes NES-1 i NES-2; c) immunolocalització de DOR amb o sense tractament amb estaurosporina; d) immunolocalització del mutant NES1-A amb o sense tractament amb estaurosporina. Es van plaquejar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. Al cap de 24 h es van transfectar amb el vector d'expressió de DOR i del mutant NES1-A. Al cap de 36 h es van tractar les cèl·lules amb vehicle (DMSO) com a control o amb estaurosporina (10 µM) durant 1h. Immediatament després del tractament es van fixar les cèl·lules amb PFA 3% i es va realitzar una immunolocalització amb l'anticòs específic anti-DOR. Posteriorment es va realitzar la tinció de Hoescht.

Resultats

III.2 Estudi de la localització de DOR en miotubs.

La presència de DOR al citosol i l'absència a nucli són incompatibles amb la funció que hem pogut atribuir a la proteïna com a regulador transcripcional, que ha de tenir lloc necessàriament al nucli. Aquesta diferent localització a cèl·lules diferenciades obre lloc a diverses possibilitats:

-que DOR estigui al citosol esperant alguna senyal que faci que entri al nucli. Això implicaria que al citosol DOR actua com a reservori de proteïna preparada per entrar al nucli i exercir la seva funció en el moment adequat. En aquest sentit diversos coreguladors, com HDAC5 i Ankrd2, surten al citosol durant la diferenciació miogènica (McKinsey et al., 2000; Kojic et al., 2004). Alguns d'aquests coreguladors es troben al citosol esperant la senyal que els faci tornar al nucli i exercir la seva funció coreguladora.

-que al citosol DOR tingui una funció específica. D'aquesta manera DOR podria tenir dues funcions diferents que exerciria distintament a diferents estats de diferenciació de la cèl·lula. És el cas de proteïnes com l'enzim DCoH α , que a més de la seva funció citosòlica actua de coactivador quan entra al nucli (Hevel et al., 2006).

Val a dir que aquestes dues opcions no són mútuament excloents. Així DOR podria estar exercint una determinada funció al citosol i alhora sota l'acció de diferents estímuls entrar al nucli per regular la transcripció.

Hi ha una dada que fan pensar que la opció de DOR al citosol com a simple reservori de proteïna inactiva no és correcta: en la diferenciació muscular l'expressió de DOR augmenta considerablement, i això es pot veure tant a nivell de mRNA com a nivell de proteïna (**figura 42**). Els resultats d'mRNA coincidien amb les dades obtingudes en experiments de microarray de diferenciació miogènica de cèl·lules C2C12 realitzats per Tomczak et al., el 2004 (dades accessibles a la NCBI GEO database, accession number GDS586; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/gds/gds_browse.cgi?gds=586).

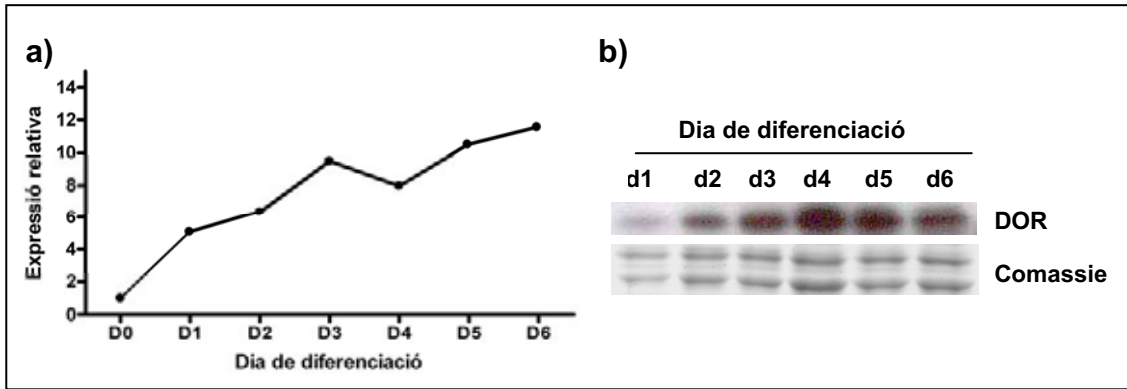


Figura 43. Expressió de DOR durant la diferenciació de cèl·lules C2C12 a miotub. **a)** mesura del mRNA per Real Time PCR; **b)** detecció de la proteïna per Western Blot. Cèl·lules C2C12 es van plaquejar alhora en diverses plaques. Quan van arribar a confluència (dia 0) es va canviar el medi per medi de diferenciació, i després del temps indicat es van recollir cèl·lules i se'n va obtenir RNA i proteïna (la proteïna correspon a lisats totals).

Si la raó de que DOR estigui al citosol fos simplement estar retinguda fora del seu lloc d'acció no seria fàcil entendre perquè n'augmenta l'expressió.

Donat que havíem vist que DOR coactiva diversos receptors nuclears vam pensar en la possibilitat que els lligands per a aquests receptors nuclears fossin un estímul que fes que DOR entrés al nucli. Si bé la principal forma d'acció que caldria esperar d'aquests lligands és la d'activar el corresponent receptors nuclear i regular la transcripció, està descrit que alguns d'aquests lligands tenen també efectes no-genòmics, que es produeixen a més curt termini que les accions genòmiques que van via el corresponent receptor nuclear. Així estan descrites accions no-genòmiques tant per l'hormona tiroïdal (Hiroi et al, 2006) com pels glucocorticoides (Song et al., 2006). D'aquesta manera vam pensar que l'arribada d'aquests lligands podia ser una senyal per la cèl·lula per a la entrada de DOR al nucli, de manera que pogués exercir la seva funció de coactivar el receptor nuclear.

En cèl·lules C2C12 diferenciades de dia 5 vam fer tractaments amb els diferents lligands dels receptors nuclears que havíem descrit que eren coactivats per DOR: hormona tiroïdal, dexametasona i rosiglitazona. A diferents temps de tractament es van fixar les cèl·lules i es va analitzar la localització de DOR marcant amb les cèl·lules amb l'anticòs anti-DOR i analitzant-ho per microscòpia confocal.

Resultats

En cap cas el tractament va provocar una entrada de DOR des del citoplasma cap al nucli. En canvi, en els tractaments amb T3 o dexametasona el que vam observar va ser que el marcatge citosòlic passava de ser difós abans del tractament a acumular-se en uns grànuls de forma transitòria entre els 15' i 30' de tractament. Després d'una hora de tractament el marcatge de DOR tornava a ser difós al citoplasma.

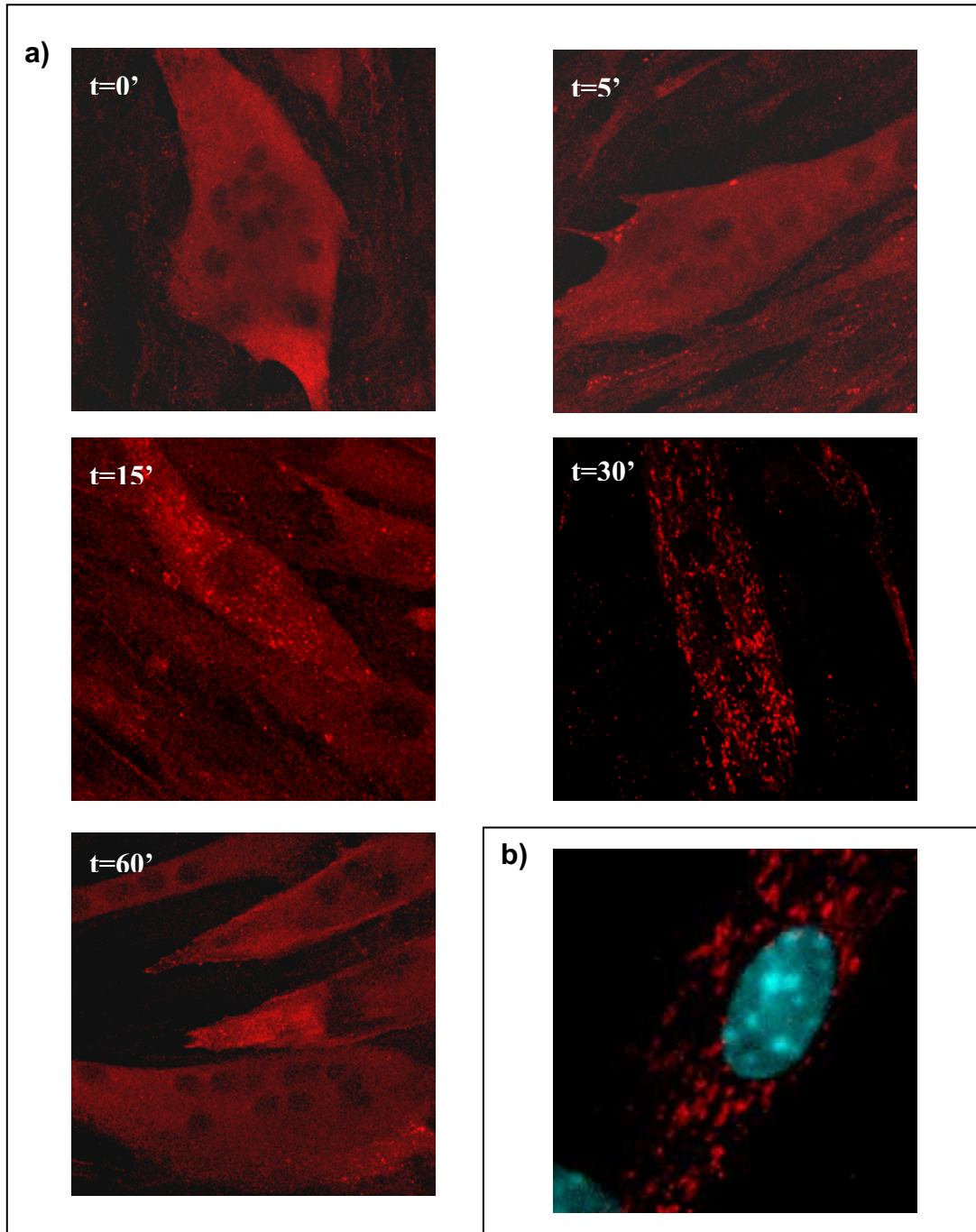


Figura 44. a) localització de DOR a cèl·lules C2C12 miotubs tractades a diferents temps amb T3. b) resultats anàlegs en el tractament amb dexametasona a 30'. Cèl·lules C2C12 es van plaquejar sobre cobreobjectes i es van diferenciar a miotub de dia 4. Es va afegir el lligand indicat al medi (T3 100 nM o dexametasona 100 nM) i als temps indicats es van recollir cobreobjectes, es van fixar amb PFA 3% i es va realitzar la immunolocalització de DOR.

La **figura 44a** mostra els resultats obtinguts amb T3; es van obtenir resultats anàlegs amb el tractament amb dexametasona (**figura 44b**), però no amb rosiglitazona.

Aquests resultats ens indiquen que DOR, tot i estar al citosol en aquestes condicions, segueix responent a algunes de les hormones a les que respon quan està al nucli coactivant receptors nuclears. Això dóna crèdit a la hipòtesi de que DOR al citosol té una funció concreta, diferent de la que té al nucli com a regulador de la transcripció, i que no tan sols està al citosol com a proteïna inactiva a l'espera de la seva entrada al nucli.

Vam poder comprovar a més que el tractament amb T3 feia disminuir la quantitat de proteïna DOR present a les cèl·lules C2C12 a temps també curts (**figura 44**).

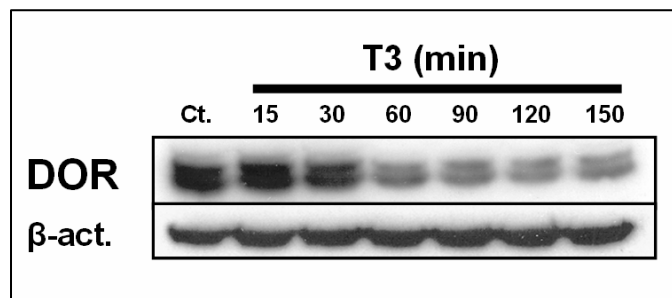


Figura 45. Western Blot de DOR a cèl·lules C2C12 mitotub tractades amb T3 100 nM a diferents temps.

Per poder esbrinar quina és aquesta possible funció que exerceix DOR al citosol vam intentar determinar en quines estructures s'estava acumulant DOR en els tractaments amb T3 i dexametasona. És per això que vam fer co-localitzacions en mitotubs de dia 5 tractats amb hormona tiroïdal durant 30 minuts de la proteïna DOR amb diferents proteïnes que serveixen de marcadors per a diferents orgànuls o estructures cel·lulars que podien tenir una distribució similar a la que veiem per a la proteïna DOR (**figura 46**). Els resultats demostren que la localització de DOR no correspon a la que s'observa quan s'utilitza un marcador de microtúbuls (MAP2B), de mitocòndries (Cox-1), de lisosomes (Lamp-1), de l'aparell de Golgi (GM130), de reticle sarcoplàsmic (SERCA-1) o de P-bodies (GW182) . Així doncs no vam poder determinar quines són aquestes estructures en les que s'acumula DOR en els tractaments amb T3.

Resultats

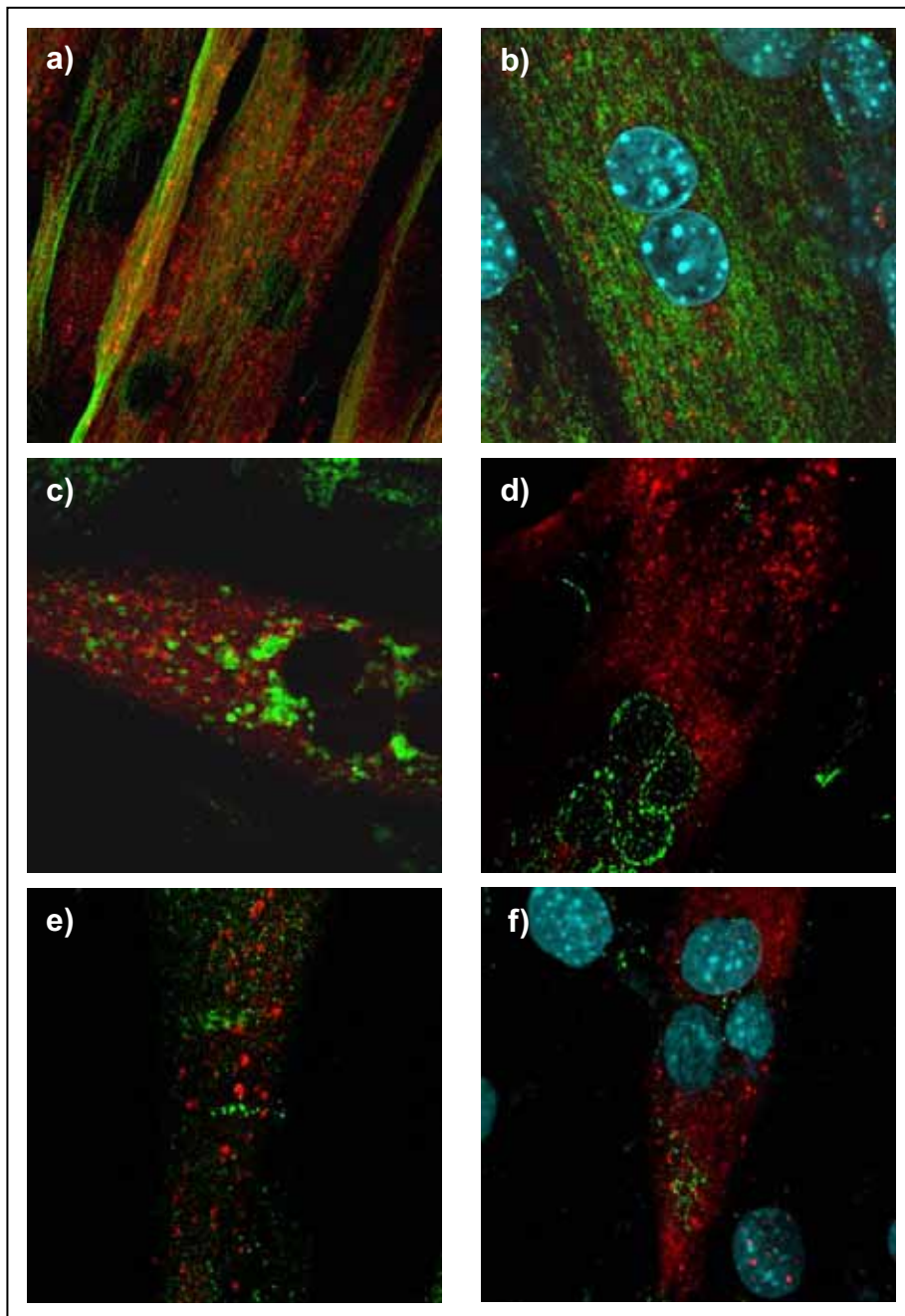


Figura 46. Cèl·lules C2C12 tractades 30' amb T3. En vermell, la localització de DOR; en verd: **a)** MAP2B (marcador de microtúbuls); **b)** Cox-1 (marcador de mitocondries); **c)** Lamp-1 (marcador de lisosomes); **d)** GM130 (marcador l'aparell de Golgi). **e)** SERCA-1 (marcador de reticle sarcoplàsmic). **f)** GW182 (marcador de P-bodies). Es van plaquejar cèl·lules C2C12 sobre cobreobjectes i es van diferenciar a miotub de dia 4. Es va afegir T3 100 nM al medi i al cap de 30' es van fixar els cobreobjectes amb PFA 3%. Es va realitzar la immunolocalització amb l'anticòs específic anti- DOR i amb l'anticòs marcador d'estructures indicat en cada cas.

IV. IMPACTE DE MUTACIONS PUNTUALS.

IV.1 Mutacions en possibles llocs de fosforilació.

El fet que en diferents circumstàncies trobem DOR localitzat al nucli o al citosol ens va portar a preguntar-nos de quina manera es regulava la localització de DOR. Els resultats obtinguts amb els tractaments amb estaurosporina fan pensar que la localització podria estar regulada directament per fosforilació de la pròpia proteïna. En aquest sentit, diversos coreguladors han estat descrits prèviament pels quals la seva localització està regulada per modificacions post-traduccionals, entre elles la fosforilació (Baek et al., 2004). Els resultats suggerien un possible model segons el qual hi hauria una forma fosforilada de DOR, que seria nuclear, mentre que la inhibició de les proteïna cinases amb estaurosporina donaria un DOR desfosforilat que seria citosòlic. Com hem vist a l'apartat I.2.1, l'anàlisi de la seqüència de DOR va permetre la detecció de diversos llocs putatius de fosforilació per diverses proteïna cinases conservats a les formes humana, de rata i de ratolí de DOR. En funció de dades trobades a la literatura vam seleccionar alguns d'aquests possibles llocs de fosforilació com a més probables per a explicar la regulació de la localització per fosforilació:

- 1) El primer lloc seleccionat va ser la serina 93. La serina 93 és un lloc putatiu de fosforilació per PKA i per CaMK II conservat a les formes humana, de ratolí i de rata de DOR. El que fa especialment interessant a aquest lloc de fosforilació és que també en les 3 espècies és un lloc putatiu d'unió de proteïnes 14.3.3.

Quadre informatiu 3. Les proteïnes 14.3.3.

Les proteïnes **14.3.3** van ser els primers exemples d'unió específica a un motiu amb una serina o treonina fosforilada. Aquestes proteïnes intervenen en molts processos cel·lulars com ara la regulació del cicle cel·lular, l'apoptosi o la resposta a estrès. En determinades proteïnes que es localitzen al nucli la fosforilació d'un determinat residu i la posterior unió de proteïnes 14.3.3 provoca la sortida de la proteïna cap al citosol (Eckardt, 2001; Screatton et al., 2004; Pan et al., 2005). En alguns casos, a més, aquest procés té lloc en el moment en que s'inicia la diferenciació muscular (Grozinger C.M. et al., 2000; McKinsey et al., 2001).

Resultats

D'aquesta manera la localització de DOR es podia estar regulant per fosforilació a la serina 93 i posterior unió de proteïnes 14.3.3.

2) D'altra banda les prediccions de llocs de fosforilació de DOR deixaven veure la presència a la seqüència de la proteïna de múltiples llocs putatius de fosforilació per Caseïna cinasa II (CK II). A la literatura vam trobar diversos exemples de proteïnes que la seva localització nucli-citoplasma està regulada per fosforilació de residus per part de la CK II. Així, per exemple, l'antigen T del virus SV40 (Rihs et al., 1991), o el coactivador alphaNAC (Quelo et al., 2005) estan regulats d'aquesta manera. A més molts dels substrats de la CK II són factors de transcripció i proteïnes nuclears implicades en l'expressió gènica, la transcripció i la traducció (Pinna, 2002). Tot això ens va fer pensar que la localització de DOR podia estar regulada per fosforilació per CK II.

Per analitzar aquestes dues possibilitats vam generar dues versions mutants de DOR en què la Serina 93 o les Serines 27, 65 i 136 s'havien convertit a Alanina (mutants S93-A i CK II-A, respectivament) de forma que obteníem una versió no fosforilable de la proteïna. Aquestes versions mutades es van transfectar a cèl·lules HeLa i es va analitzar la seva localització al microscopi confocal (**figura 47**).

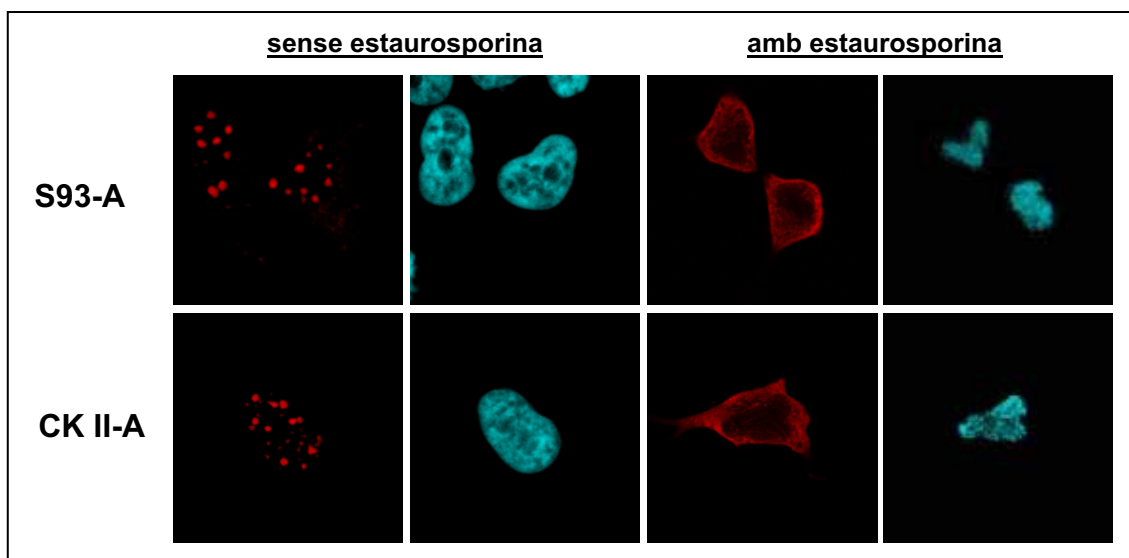


Figura 47. Localització dels mutants S93-A i CK II-A amb i sense tractament amb estaurosporina. Es van plaquejar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. Al cap de 24 h es van transfectar amb el vector d'expressió dels mutants S93-A i CK II-A. Al cap de 36 h es van tractar les cèl·lules amb vehicle (DMSO) com a control o amb staurosporina (10 μ M) durant 1h. Immediatament després del tractament es van fixar les cèl·lules amb PFA 3% i es va realitzar una immunolocalització amb l'anticòs específic anti-DOR. En blau, marcatge dels nuclis.

Vam poder comprovar que les mutacions esmentades no afectaven a la localització de la proteïna: els mutants es localitzaven al nucli. A més, el tractament amb estaurosporina produïa la sortida dels mutants del nucli, com passa amb el DOR natiu (**figura 42c**).

Adicionalment vam mutar els altres llocs putatius de fosforilació conservats que hi ha a DOR: la Serina 7, la Serina 185 i la Serina 198. Aquestes mutacions tampoc van tenir cap efecte en la localització de la proteïna. La **taula 2** és una llista dels mutants de possibles llocs de fosforilació que vam generar i que vam comprovar que no explicaven la diferent localització de DOR en els tractaments amb estaurosporina.

Mutant	Convertit a Alanina...
S7-A	Serina 7
S93-A	Serina 93
CK II-A	Serines 27, 65 i 136
S185-A	Serina 185
S198-A	Serina 198

Taula 2. Mutants de llocs de fosforilació generats per DOR.

Tot i no explicar canvis en la localització de DOR, alguns dels mutants generats podien tenir com a conseqüència canvis en l'activitat de la proteïna.

Pel que fa a la Serina 93, la unió de proteïnes 14.3.3 a més d'alterar la localització de la proteïna pot tenir altres efectes sobre aquesta (Tzivion et al., 2002). Així pot bloquejar la funció d'una proteïna emmascarant-ne un domini important. Un exemple d'això es dona en factors de transcripció de la família FOXO, els quals quan són fosforilats i s'hi uneixen proteïnes 14.3.3 es bloqueja la seva capacitat d'unir-se a DNA (Obsil et al., 2003). Això podria ser un mecanisme important d'inhibició de DOR, ja que el putatiu lloc d'unió de proteïnes 14.3.3 està en un dels dominis identificats als estudis de Gal4-DOR com a importants per l'activació de la transcripció.

La fosforilació per CK II també té com a resultat, en molts casos, canvis en l'activitat de la proteïna fosforilada; és el cas per exemple del coactivador PC4, l'activitat del qual és regulada negativament per fosforilació per la CK II (Ge et al., 1994).

Resultats

Basant-nos en això vam voler comprovar si els mutants S93-A i CK II-A presentaven canvis d'activitat respecte la proteïna nativa. Vam realitzar experiments de coactivació d'un receptor nuclear (en aquest cas PPAR γ) amb diferents quantitats de la forma nativa de DOR o dels mutants de fosforilació, de manera anàloga als experiments de l'apartat II.1 (**figura 48**).

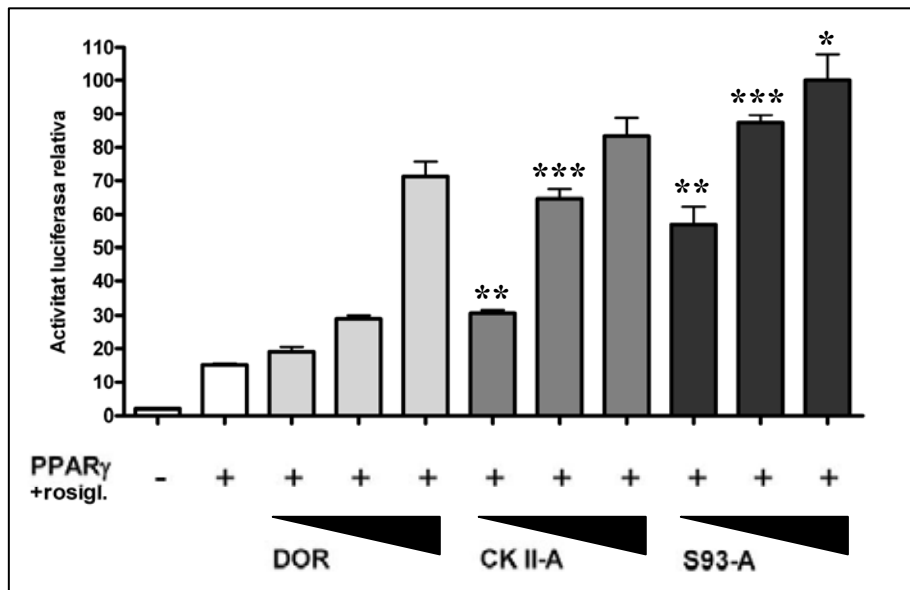


Figura 48. Comparació de l'activitat de la forma nativa de DOR amb la dels mutants CK II-A i S93-A. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per PPAR γ (75 ng), diferents quantitats de DOR o dels mutants CK II-A i S93-A (100 a 300 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de PPAR (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència del lligand (rosiglitazona 100 nM) i es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. * : diferència significativa comparada amb el grup equivalent del DOR natiu amb $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

Els resultats indiquen que les dues formes mutants són més actives que la forma nativa, ja que transfectant les mateixes quantitats de DNA s'aconsegueixen coactivacions majors, sobretot amb el mutant S93-A. Tot i això aquest resultat també podria explicar-se en el cas de que els mutants tinguessin una vida mitja més llarga que la forma nativa. Per analitzar aquesta possibilitat es va mirar quina era la vida mitja de cada forma transfectant-les a cèl·lules HeLa i analitzant-ne la degradació després de bloquejar la traducció amb cicloheximida (**figura 49**).

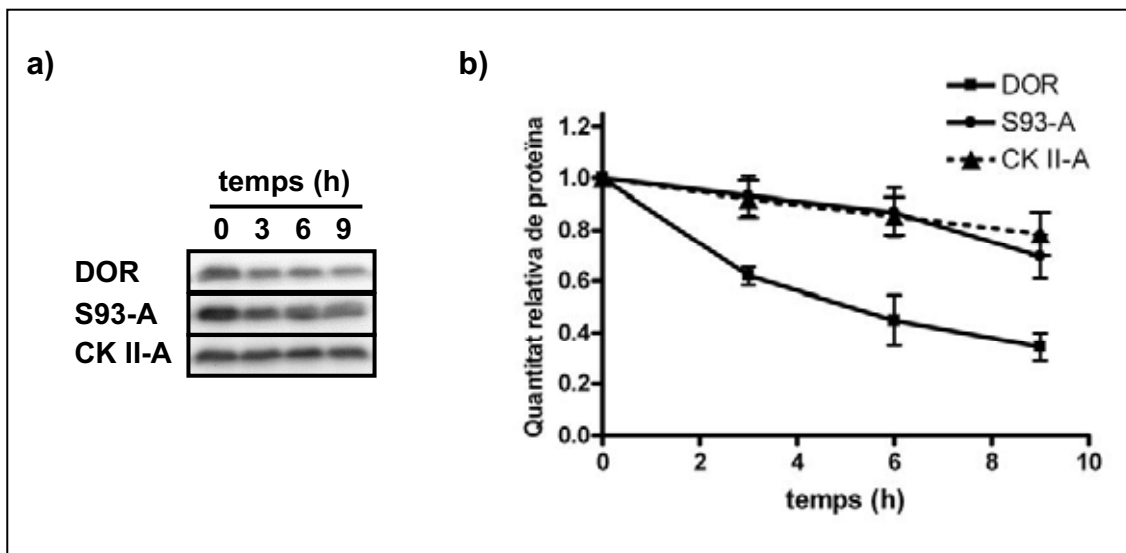


Figura 49. a) *Western Blot* dels tractaments amb cicloheximida; b) quantificació de les bandes. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb DOR o amb els mutants S93-A i CK II-A. Al cap de 12 h es van tripsinitzar i es van distribuir en diferents plaques de cultiu. Al cap de 24 h es va afegir al medi cicloheximida (100 µg/ml). Als temps indicats es van recollir cèl·lules i es va obtenir la proteïna. La quantificació correspon a la mitjana de 3 experiments independents.

Els mutants de fosforilació S93-A i CK II-A tenen una vida mitja més llarga que la forma nativa de DOR. La ràpida degradació que pateix DOR està afavorida, per tant, per fosforilacions en els llocs putatius de CK II i en la Serina 93.

IV.2 Mutacions en residus de Lisina.

Diverses observacions ens van portar a pensar que la modificació de les lisines de DOR podia ser una forma important de regulació de la proteïna:

- 1) La seva curta vida mitja i la presència d'una putativa seqüència PEST (veure **apartat I.2.1**) feien pensar que la proteïna podia estar sent ubiquitinada.
- 2) Dades prèvies indicaven que la localització de la proteïna també podia estar regulada per modificacions a les lisines: el tractament amb Nicotinamida (un inhibidor de la desacetilasa SIRT1) de cèl·lules HeLa transfectades amb DOR fa que la proteïna surti del nucli (M. Orpinell, Tesi Doctoral 2006, Universitat de Barcelona). Això suggereix que l'acetilació de DOR en residus de Lisina faria que DOR sortís del nucli.

Resultats

Per aquests motius, i aprofitant el fet que a DOR tan sols hi ha tres residus de lisina (residus 165, 187 i 204 al DOR humà), vam generar un mutant en què vam eliminar aquestes lisines. Per mantenir la càrrega i una mida semblant als residus de lisina es van mutar a arginina, generant el mutant que vam anomenar 3K-R.

El primer que vam analitzar va ser si, com en el cas dels mutants S93-A i CK II-A, el mutant 3K-R tenia una vida mitja més llarga que la forma nativa de DOR (**figura 50**).

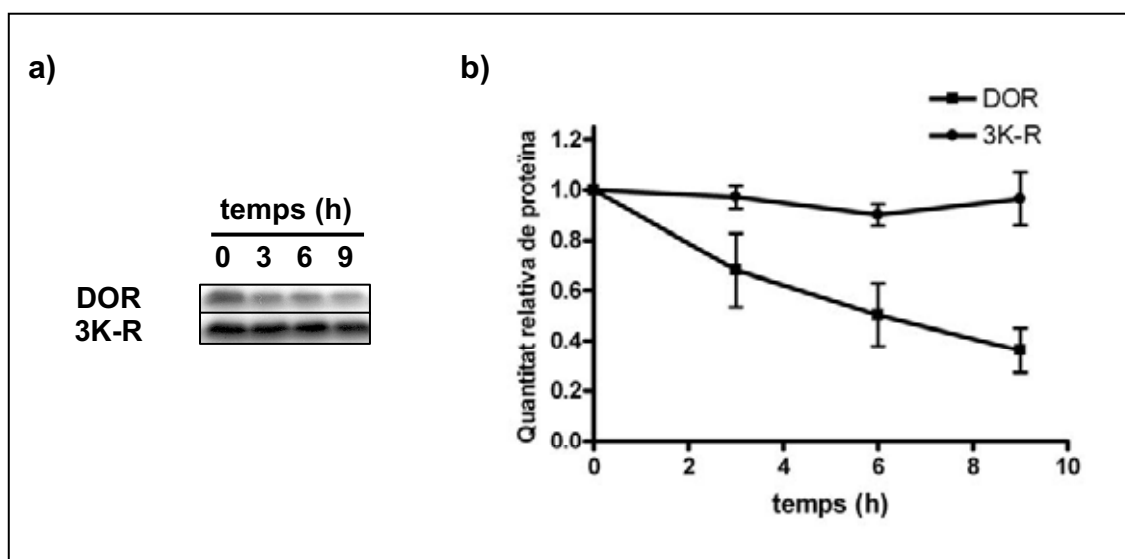


Figura 50. a) Western Blot dels tractaments amb cicloheximida; b) quantificació de les bandes. Els experiments es van realitzar de la forma descrita a la figura 49.

Un cop més el mutant tenia una vida mitja més llarga que la forma nativa. Vam voler analitzar quin efecte tindria la inhibició del proteasoma en cèl·lules que sobreexpressaven DOR o el mutant 3K-R. Per fer-ho vam fer Western Blot d'extractes de cèl·lules HeLa sobreexpressant les dues formes de la proteïna tractades o no amb l'inhibidor del proteasoma MG-132 (**figura 51**).

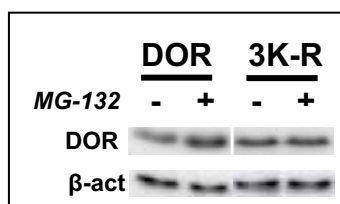


Figura 51. Tractaments amb MG-132 en cèl·lules sobreexpressant la forma nativa de DOR o el mutant 3K-R. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb DOR o amb el mutant 3K-R. Al cap de 12 h es van tripsinitzar i es van distribuir en dues plaques de cultiu. Al cap de 24 h es va afegir al medi vehicle (Etanol) com a control o MG-132 (20 µM). Al cap d'una hora es van recollir les cèl·lules i es va obtenir la proteïna.

L'inhibidor del proteasoma MG-132 feia incrementar la quantitat detectada del DOR natiu, però no del mutant 3K-R. Aquestes dades juntes fan pensar que DOR s'ubiquitina i és degradat pel proteasoma, cosa que no passa amb el mutant 3K-R, que no té lisines ubiquitinables.

Vam voler analitzar quina activitat tenia aquest mutant 3K-R en comparació amb la forma nativa. Per fer-ho vam realitzar un estudi de coactivació de PPAR amb els anteriorment esmentats (**figura 52**).

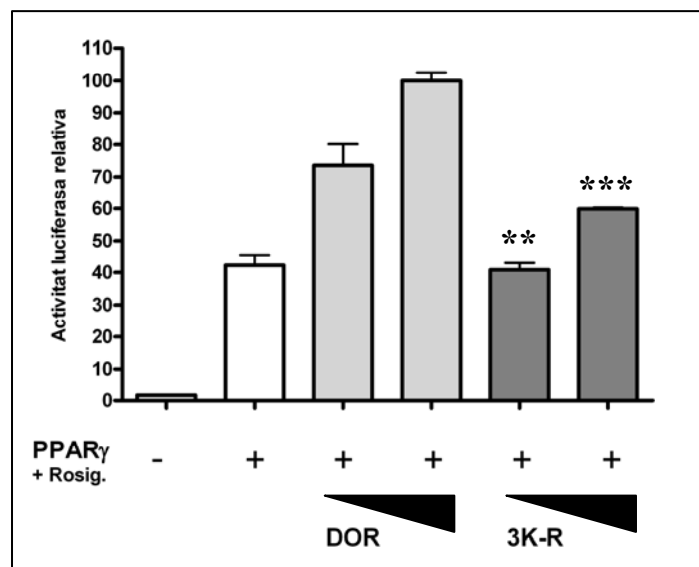


Figura 52. Comparació de l'activitat de la forma nativa de DOR amb la del mutant 3K-R. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per PPAR γ (75 ng), diferents quantitats de DOR o del mutant 3K-R (100 a 200 ng), el vector buit pCDNA3 com a vector control i el vector reporter de PPAR (150 ng). Les cèl·lules es van tractar durant 18 h en presència del lligand (rosiglitazona 100 nM) i es va analitzar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents. * : diferència significativa comparada amb el grup equivalent del DOR natiu amb $P < 0,05$.

Tot i tenir una vida mitja notablement més llarga, la forma mutant 3K-R és menys potent a l'hora de coactivar PPAR. Aquest resultat ens indica que una o més d'aquestes Lisines formen part d'un element important per a la funció de DOR i la seva substitució per Arginina afecta a aquesta funció.

Com hem dit el tractament amb nicotinamida fa que DOR surti del nucli, i això suggereix que la localització de DOR podria estar regulada per acetilació. Vam poder

Resultats

comprovar que en aquestes condicions DOR no és capaç de coactivar els receptors nuclears (**figura 53**).

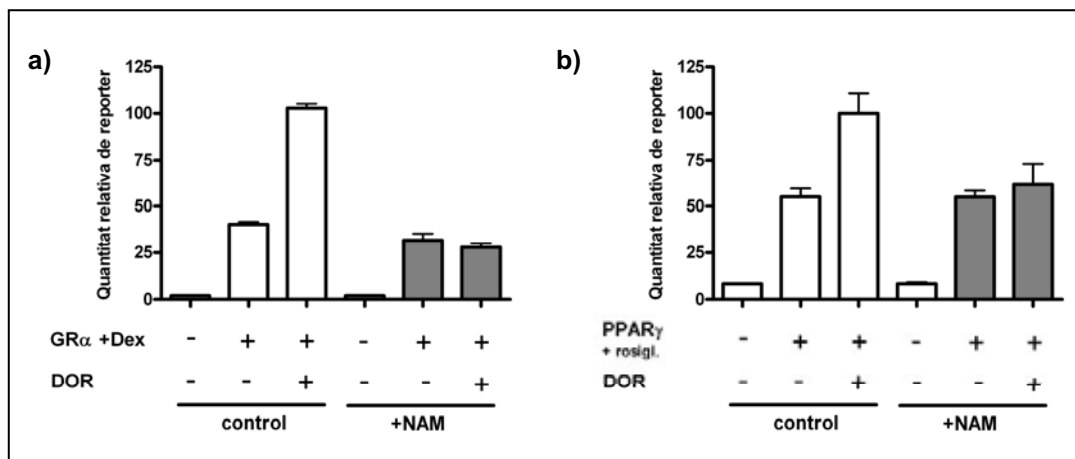


Figura 53. Acció de DOR en presència o no de NAM sobre: **a)** GR α ; **b)** PPAR γ . Es van transfectar cèl·lules HeLa amb vectors d'expressió per GR α o PPAR γ (75 ng), DOR (100 ng), el vector buit pCDNA3 com a control i el reporter de GR o de PPAR en cada cas (150 ng). Les cèl·lules es van tractar 18 h en presència del lligand adequat (dexametasona 100 nM o rosiglitazona 100 nM) i en presència o absència de nicotinamida ('NAM', 10 mM) i es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats són la mitjana i l'error estàndard de triplicats i són representatius de 3 experiments independents.

Per determinar si l'efecte de Nicotinamida sobre DOR és degut a una modificació directa de la proteïna voler analitzar quina era la localització del mutant 3K-R. En condicions normals el mutant 3K-R té una localització anàloga a la forma nativa de la proteïna. El tractament amb nicotinamida, com hem esmentat, fa que DOR surti completament del nucli, acumulant-se en el citosol. No passa el mateix amb el mutant 3K-R: tot i que el tractament produeix una certa sortida d'aquesta forma mutada de la proteïna, trobem que en gran part el marcatge nuclear es manté (**figura 54**).

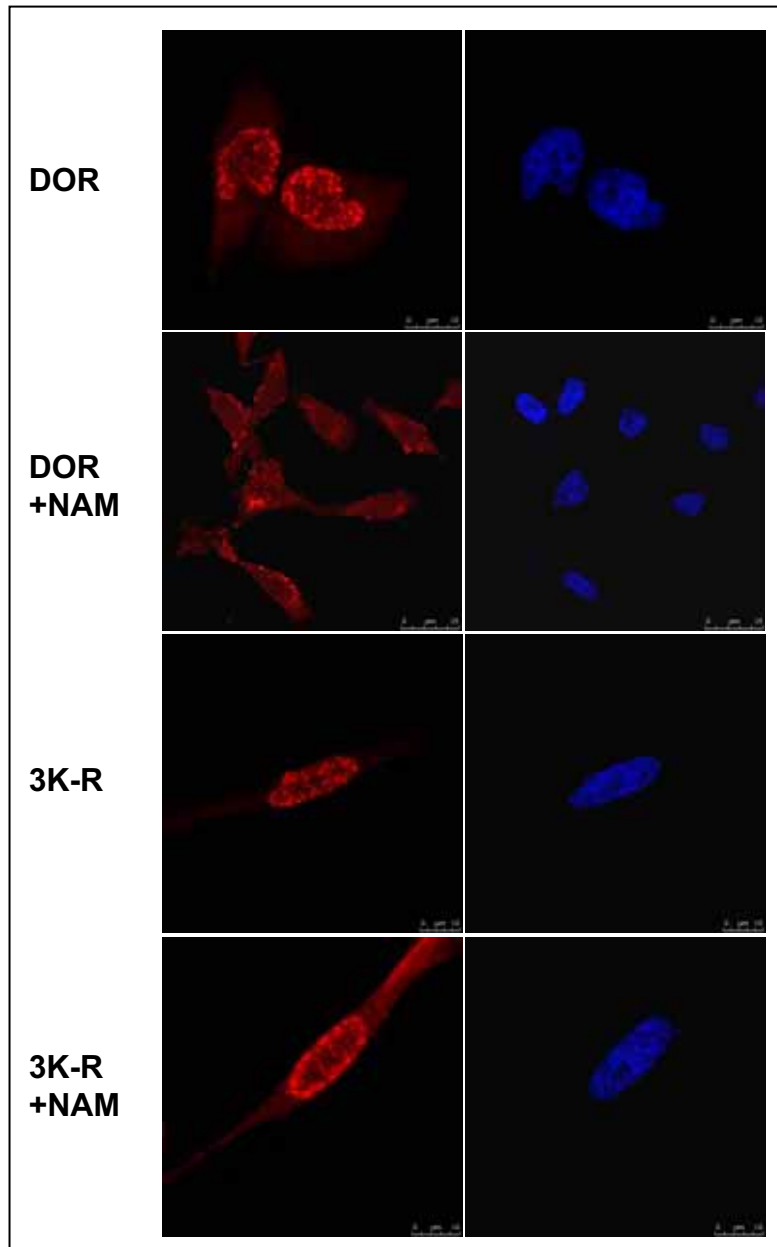


Figura 54. Localització de DOR i del mutant 3K-R amb i sense tractament amb NAM. Es van sembrar cèl·lules HeLa sobre cobreobjectes. A les 12 h es van transfectar amb el vector d'expressió de DOR o del mutant 3K-R. Al cap de 36 h es va tractar les cèl·lules durant 1 h amb nicotinamida ('NAM', 10 mM). Després del tractament les cèl·lules es van fixar amb PFA 3% i es va realitzar una immunolocalització amb l'anticòs específic anti-DOR. En blau, marcatge dels nuclis amb Hoescht.

Aquests resultats ens van portar a pensar que la sortida del nucli que veiem en la diferenciació muscular podia estar mitjançada per l'acetilació de les lisines de DOR, en lloc de per fosforilació de la proteïna com havíem pensat fins aleshores. De fet, en la diferenciació muscular es donen canvis en l'acció de SIRT1, que es veu regulada pel ratio NAD^+/NADH . Així, un ratio NAD^+/NADH alt, típic de cèl·lules proliferatives,

Resultats

activa SIRT1, la qual inhibeix l'expressió de gens musculars. En la diferenciació aquest ratio disminueix, cosa que fa que l'acció de SIRT1 s'inhibeixi i es permeti l'expressió dels gens musculars (Fulco et al., 2003).

Per aquest motiu vam transfectar cèl·lules C2C12 amb la forma nativa de DOR i amb el mutant 3K-R, i vam diferenciar-les a miotub per comprovar la localització de la proteïna (figura 55). A dia 4 de diferenciació, les cèl·lules transfectades amb la forma nativa de la proteïna mantenen la localització que havíem vist en les cèl·lules C2C12 diferenciades no transfectades de dia 4, és a dir, DOR es localitzava totalment al citosol del miotub. A les cèl·lules transfectades amb el mutant 3K-R, en canvi, podem veure miotubs en què trobem DOR al nucli en forma d'un puntejat anàleg al de les cèl·lules proliferatives. És interessant destacar que a les cèl·lules transfectades amb el mutant 3K-R el nombre de miotubs obtinguts era molt menor que en la transfecció del DOR natiu, i aquests eren més curts i de forma irregular.

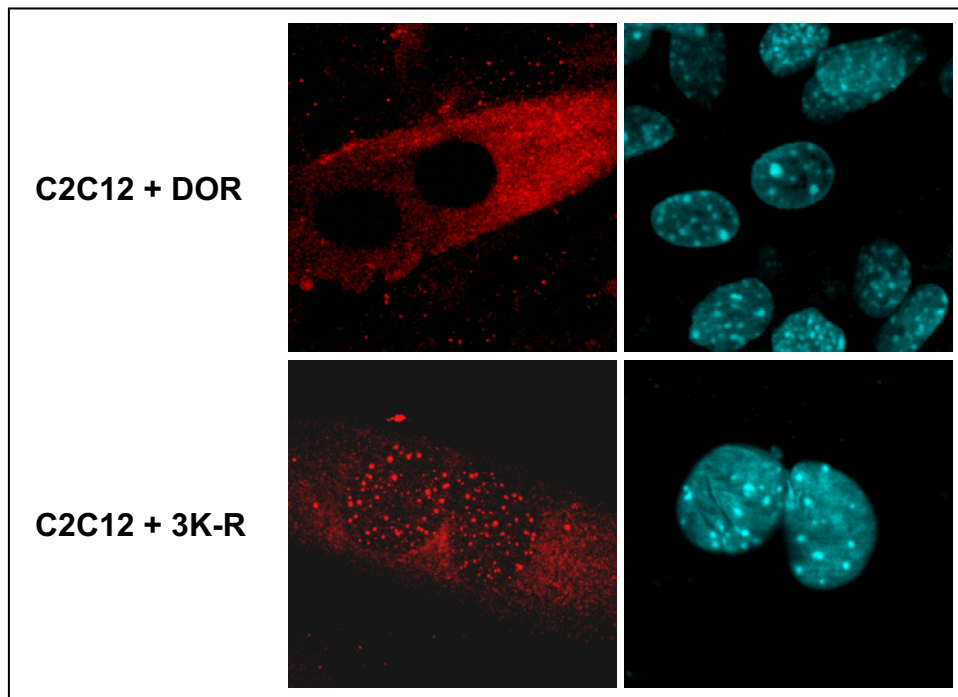


Figura 55. Localització de DOR a cèl·lules C2C12 transfectades amb el DOR natiu o amb el mutant 3K-R i diferenciades a miotub. Es van sembrar cèl·lules C2C12 sobre cobreobjectes. Quan van arribar al 80% de confluència es van transfectar amb el vector d'expressió de DOR o del mutant 3K-R. Al cap de 12 h es va canviar el medi per medi de diferenciació. Als 4 dies de diferenciació les cèl·lules es van fixar amb PFA 3% i es va realitzar una immunolocalització amb l'anticòs específic anti-DOR. En blau, marcatge dels nuclis amb Hoescht.