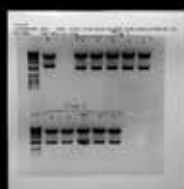
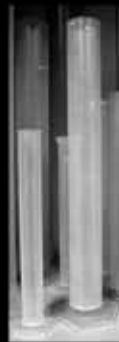


Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona

ESTUDI FUNCIONAL DEL GEN DOR

Jordi Duran i Castells
Tesi Doctoral - Barcelona, 2007



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

A dense, monochromatic pile of clear plastic pipette tips, likely 0.2 ml or 0.5 ml tips, filling the bottom third of the page. The tips are scattered and overlapping, creating a textured, repetitive pattern.

discussió

1. Context de la investigació.

L'elevada prevalença actual de la diabetis mellitus de tipus 2 és deguda, en gran part, a un canvi en el nostre estil de vida cap a un model més sedentari, que ens predisposa a l'obesitat i a la resistència a la insulina. Associats a aquesta malaltia sovint trobem altres desordres com la hipertensió i la dislipèmia (alteració en els nivells circulants de greixos en la sang). La combinació d'aquests desordres mèdics es coneix com a 'Síndrome Metabòlica'. Algunes persones estan genèticament predisposades a la resistència a la insulina. Factors adquirits, com l'excés de greix corporal i la inactivitat física poden desencadenar la resistència a la insulina i la síndrome metabòlica en aquestes persones. Per poder lluitar contra la síndrome metabòlica cal identificar-ne els gens de susceptibilitat, aconseguint així noves dianes terapèutiques per a futurs fàrmacs. En un intent per identificar gens involucrats en la fisiopatologia de la diabetis mellitus vam realitzar al nostre laboratori una cerca de gens amb expressió alterada en situació de resistència a la insulina. Això va portar a la identificació de DOR (Diabetes and Obesity Related), que està menys expressat en múscul esquelètic d'individus diabètics. El principal objectiu d'aquesta tesi ha estat identificar i caracteritzar la funció de DOR.

L'única informació amb què comptàvem al principi era la seqüència del gen i de la proteïna: identificar-ne la funció era tot un repte. Fent cerques a bases de dades de diferents genomes vam poder detectar la presència d'ortòlegs a de DOR a diferents espècies; contràriament al que es pot trobar a la literatura (Bennetts et al, 2007) aquestes no es limitaven solament a mamífers, sinó també a espècies com *Gallus gallus* i *Ciona intestinallis*. Evolutivament la proteïna DOR està ben conservada: la identitat entre la forma humana de DOR i la d'espècies properes és alta.

Quan s'identifica una nova proteïna, la principal font d'informació sobre quina pot ser la seva funció prové de la seva semblança amb altres proteïnes de funció coneguda. Aquesta semblança pot ser de la proteïna sencera o de determinats dominis o regions que tinguin unes característiques o una funció determinades. En el cas de DOR no vam trobar homologia clara amb cap proteïna o domini coneguts; tan sols vam trobar una homologia moderada amb la proteïna TP53INP1. El fet que la homologia sigui molt moderada i que a la literatura no trobem gaire informació sobre TP53INP1 fa que

Discussió

aquesta eina no aportés gaire llum sobre la possible funció de DOR. Tot i això esta descrit que TP53INP1 regula l'activitat transcripcional de TP53 i de p73.

L'anàlisi de la seqüència de la proteïna de DOR amb diverses eines bioinformàtiques va servir per detectar diferents característiques que van ser útils en la determinació i caracterització de la seva funció. Les prediccions deien que DOR podia ser una proteïna nuclear implicada en la regulació de la transcripció. També vam detectar a DOR la presència d'una caixa NR o LxxLL, que és el motiu principal pel qual els coactivadors de receptors nuclears interaccionen amb aquests de forma dependent d'hormona.

Aquestes dades ens van fer pensar que DOR podia ser un coactivador de receptors nuclears. Per aquest motiu vam dissenyar diferents experiments amb diversos receptors nuclears amb l'objectiu d'analitzar si DOR exercia aquesta funció.

2. DOR com a coactivador de receptors nuclears.

Del nombrós grup de receptors nuclears descrits a la literatura vam seleccionar per als nostres experiments receptors que tinguessin un paper important en els principals teixits d'expressió de DOR, múscul esquelètic i teixit adipós. Així el receptor de glucocorticoides (GR) i el receptor d'hormones tiroïdals (TR) regulen diversos aspectes del metabolisme del múscul esquelètic; el PPAR γ també juga un paper a múscul esquelètic, però és encara més rellevant el seu paper en adipòcits.

Per analitzar la funció d'una proteïna com a coregulador d'un determinat receptor nuclear es fan servir transfeccions transitòries amb vectors reporters que responen a aquest receptor. Es tracta d'experiments complexes, en què moltes vegades cal transfectar un nombre elevat de plasmidis diferents. Per aquest motiu cal treballar amb línies cel·lulars que siguin fàcilment transfectables. La línia d'elecció per a la majoria d'experiments d'aquesta tesi ha estat les cèl·lules HeLa. Es tracta de cèl·lules transformades que no són representatives d'un determinat teixit, però són resistents i de fàcil manteniment, i es poden transfectar eficientment per diferents sistemes. A més, l'expressió de DOR a les cèl·lules HeLa és molt baixa, cosa que permet veure amb claredat les diferències degudes a la seva sobreexpressió. Les transfeccions per a aquests assajos s'han realitzat principalment pel mètode de la *Lipofectamin 2000*. El

motiu és que, si bé per altres mètodes com el fosfat de calci s'obtenen eficiències de transfecció majors, aquests altres mètodes tenen una major variabilitat pel que fa a l'eficiència. En aquests tipus d'experiments cal que en les diferents condicions experimentals l'eficiència de la transfecció sigui semblant, ja que en cas contrari els valors obtinguts no són comparables, encara que es corregeixin per l'eficiència de la transfecció.

Els estudis realitzats amb TR α , GR α i PPAR γ demostren que DOR és capaç de coactivar aquests receptors nuclears i ho fa de forma depenent de dosi. La coactivació a més és depenent d'hormona, ja que en els punts en què no hi ha la hormona corresponent l'increment de l'expressió del reporter degut a la presència de DOR no és significatiu. D'altra banda es podria dir que l'absència d'hormona en aquests experiments no és total, ja que el sèrum que conté el medi de creixement de les cèl·lules podria contenir una certa concentració d'hormones que tindrien un cert efecte en els resultats d'aquests experiments. Com es pot veure en un experiment de coactivació de GR α realitzat en paral·lel, la coactivació detectada per DOR és d'una magnitud similar a la d'un altre coactivador conegut i potent, p300.

Dades inicials també indiquen que DOR podria estar coactivant altres receptors nuclears, concretament el receptor de vitamina D (VDR) i el receptor d'estrògens α (ER α). No passa el mateix amb dos factors de transcripció analitzats, c-Myc i p53: la cotransfecció de DOR en experiments en reporters amb aquests factors no provoca un increment en l'expressió del reporter. Tampoc observem coactivació quan es realitza l'experiment amb un factor de transcripció quimèric, format pel domini d'unió a DNA de Gal-4 i el domini d'activació de la transcripció de VP16. Aquests darrers resultats indiquen que DOR no és un activador general de la transcripció, sinó que el seu efecte es dona tan sols en determinats factors.

A diferència dels coactivadors de la família p160, DOR no s'expressa de forma ubíqua, sinó limitat a certs teixits. Els coreguladors que s'expressen tan sols en determinats teixits poden conferir accions específiques de teixit a receptors nuclears que s'expressen de forma ubíqua. En aquest sentit DOR podria ser responsable d'algunes accions específiques de múscul esquelètic, cor o teixit adipós dels receptors nuclears que coactiva.

3. Presència d'un domini d'activació de la transcripció.

En aquest punt vam voler determinar l'efecte sobre la funció dels diferents receptors nuclears testats es deu a la presència en DOR d'un domini d'activació de la transcripció. Alternativament, l'efecte de DOR podia ser indirecte, desemascarant o afavorint alguna propietat dels receptors nuclears que els fes més actius, per exemple afavorint-ne una conformació més favorable a la interacció amb altres coactivadors. Per respondre aquesta pregunta vam fusionar la proteïna DOR amb el domini d'unió a DNA del factor de transcripció de llevat Gal-4 (Gal4-DBD) i vam analitzar la capacitat d'aquesta fusió d'incrementar l'expressió d'un reporter de Gal-4. D'aquesta manera aconseguíem situar DOR al seu lloc d'acció (en l'entorn del promotor d'un gen), però sense la participació d'un receptor nuclear, de manera que els possibles efectes indirectes esmentats ja no podien tenir lloc. Si en aquestes condicions vèiem augment de l'expressió del reporter podíem dir que DOR té un domini d'activació de la transcripció. Els resultats indiquen que la fusió de DOR amb el Gal4-DBD és capaç d'incrementar l'expressió del reporter, i per tant que DOR té un domini d'activació de la transcripció.

Un avantatge d'aquest experiment és que permet analitzar l'activitat no solament de la proteïna sencera, sinó també de diferents fragments d'aquesta; així podem localitzar les regions de la proteïna responsables de l'activació. En estudis amb receptors nuclears no hauríem pogut fer aquest mapatge del domini d'activació, ja que podíem estar eliminant un fragment de la proteïna que no fos responsable de l'activació però sí, per exemple, de la localització nuclear o de la interacció amb el receptor, i perdríem l'activitat igualment. En les fusions amb el Gal-4 DBD la interacció amb el receptor no té lloc, i la localització nuclear ve donada pel propi Gal4-DBD (Chan et al., 1998; Silver et al., 1984), de manera que l'activitat del fragment ve determinada gairebé exclusivament per la presència o no d'un domini d'activació de la transcripció.

L'anàlisi de l'activitat de diferents fragments de la proteïna ens va permetre determinar que si bé l'activitat de la proteïna sencera és moderada, l'activitat de determinats fragments és molt més potent, reforçant així la idea de que DOR té un domini d'activació de la transcripció. Els resultats localitzen el domini d'activació de la transcripció a la regió N-terminal, mentre que hi ha tota una regió C-terminal de la proteïna que té un paper inhibidor. L'emascarament o atenuació de dominis de

transactivació per altres dominis de la mateixa molècula ja ha estat descrit per altres proteïnes, com ara els factors de transcripció ATF-2, C-Myb, Lmx1.1 o Nkx2.2 (Li et al., 1996; Dash et al., 1996; Sollerbrant et al., 1996; Johnson et al., 1997; Watada et al., 2000).

4. Definició a DOR de dominis funcionals.

El paper negatiu de la regió C-terminal podria ser degut a diferents motius:

- que aquesta regió de DOR contingui un domini de repressió de la transcripció; el fet que el fragment C-terminal unit al Gal4-DBD no provoca una repressió de la transcripció basal del reporter de Gal4 fa descartar aquesta opció.
- que aquesta regió reguli el domini d'activació de DOR, per exemple unint-s'hi i impeding la seva funció.
- que l'efecte sigui un artefacte experimental, i aquesta regió tingui un altre paper (per exemple la unió als receptors nuclears) però influeixi negativament en aquestes condicions experimentals.

Per analitzar aquestes possibilitats vam analitzar com afectava la cotransfecció del fragment C-terminal a la capacitat de DOR per coactivar TR α . Vam poder comprovar que la regió C-terminal de DOR bloqueja la capacitat de DOR de coactivar TR α , cosa que reforça la idea de que aquesta regió de DOR regula negativament la seva funció, probablement per interacció directa amb el domini d'activació de la transcripció. En aquest sentit en l'anàlisi de la seqüència de la proteïna ja havíem detectat una distribució de la càrrega molt polaritzada entre les regions N-terminal i C-terminal: mentre que la major part de la càrrega positiva es localitza a la regió C-terminal, la càrrega negativa es troba majoritàriament a la regió N-terminal. Així el paper inhibidor de la regió C-terminal, amb càrrega positiva, podria explicar-se per interacció amb la regió carregada negativament N-terminal (**figura 1**). Una interacció intramolecular reguladora d'aquest tipus ja s'ha vist, per exemple, en el cas de la proteïna p53 on d'aquesta manera s'inhibeix el domini d'interacció amb el DNA (Gu et al., 1997). Estudis d'interacció física seran necessaris en el futur per acabar d'aclarir aquest punt.

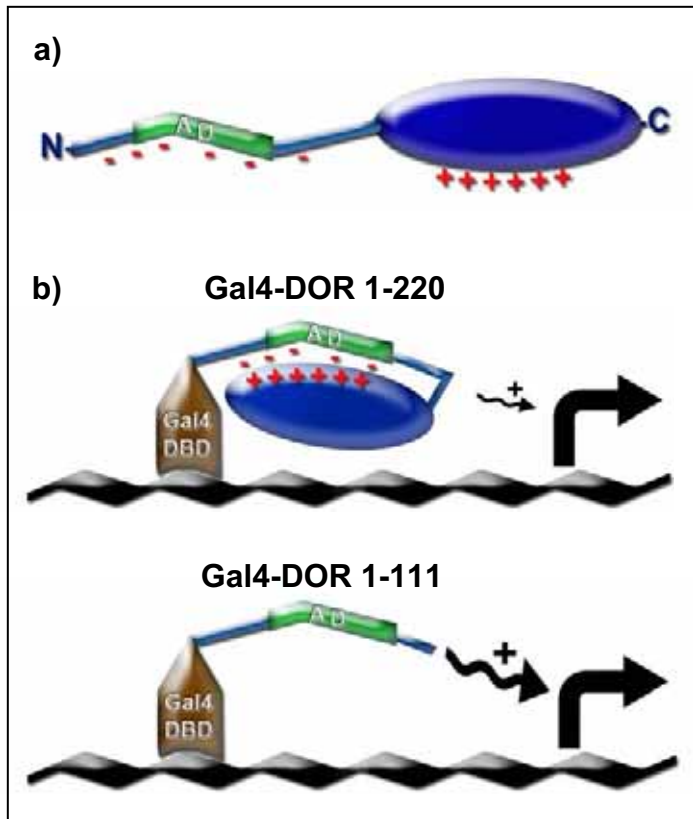


Figura 1. a) Esquema de l'estructura i distribució de càrregues de DOR. En verd i marcat 'AD' la regió identificada com a domini d'activació de la transcripció. b) Gal4 DBD unit al DOR sencer (1 a 220) o al fragment 1 a 111. La unió de la regió C-terminal podria ser la responsable de la baixa activitat del Gal4-DOR sencer.

Les regions N-terminal i C-terminal també difereixen en un altre aspecte: la regió C-terminal és, segons la predicció, l'única que té estructura; la regió N-terminal, identificada en aquests experiments com a responsable de l'activació de la transcripció, es prediu com a desordenada. Tot i que es tendeix a associar estructura tridimensional amb funció, molts segments proteics funcionalment importants resideixen fora de dominis globulars, a regions que estan intrínsecament desordenades. Així, molts dominis d'activació de la transcripció són no-globulars i intrínsecament desordenats. Un exemple d'això és el coactivador CBP: més de la meitat dels seus 2441 residus corresponen a regions que es prediuen de baixa complexitat i alta flexibilitat. En aquestes regions s'hi troba el domini d'interacció amb el receptor nuclear i el domini de transactivació, que interacciona amb SRC-1 (Dyson et al., 2005). En molts casos els dominis d'activació adopten estructura tan sols quan s'uneixen a la seva proteïna diana. És el cas per exemple del domini d'activació de la proteïna del virus de l'Herpes VP16, que es plega en una hèlix amfipàtica quan s'uneix a la seva proteïna diana (Uesugui et al., 1997).

La manca d'estructura pot conferir diverses característiques a una proteïna: 1) l'habilitat per unir-se a diferents dianes; 2) la proteïna pot ser fàcilment regulada per fosforilació o per interacció amb altres proteïnes; 3) la vida mitja d'aquestes proteïnes serà més curta que la de proteïnes que estan ben plegades sempre. Això també constitueix un component de regulació d'aquestes proteïnes (Wright et al., 1999; Dyson et al., 2005).

Curiosament si realitzem la predicció de la globularitat o desordre dels diferents ortòlegs que hem trobat per a DOR veiem que hi ha una relació inversa entre la homologia amb la forma humana de DOR i la mida de la regió de la proteïna que es prediu com a desordenada. Així, la predicció d'estructura per l'ortòleg de *Salmo salar* indica que gairebé la totalitat de la proteïna seria globular. Així en espècies més evolucionades DOR podria interaccionar amb un nombre major de proteïnes diferents, donant així una funció més complexa.

L'estudi dels diferents fragments generats de DOR fusionats al Gal4-DBD permet determinar no tan sols que el domini d'activació de la transcripció està a la regió N-terminal, sinó també que hi hauria dues regions de la proteïna responsables d'aquesta activació, que podríem situar en els residus 30 a 50 i els residus 90 a 110, respectivament. És interessant destacar que aquests residus corresponen a regions que estan força ben conservades en els diferents ortòlegs de la proteïna, sobretot pel que fa a la regió 90 a 110. Cal dir que molt probablement el fet que aquesta regió N-terminal no tingui una estructura definida és el que ens ha permès definir amb una certa precisió on són els dominis d'activació de la proteïna, ja que la manca d'estructura permet generar diferents fragments de la proteïna i que aquests segueixin sent funcionals. Si fos una regió amb estructura ens podríem trobar amb què un determinat fragment, tot i contenir el domini d'activació de la transcripció, no fos funcional per qüestions estructurals. En aquestes dues regions vam identificar dos grups amb residus aromàtics que són importants per la capacitat de DOR de transactivar la transcripció. Així a les posicions 96 a 100 trobem la caixa LxxLL, la mutació de la qual compromet la capacitat de DOR d'activar la transcripció tant en el context de la proteïna sola com en les fusions amb el Gal4-DBD. A les posicions 36 a 40 trobem un grup semblant de residus aromàtics (LIIDL) la mutació dels quals també afecta la funció de DOR (**figura 2**).

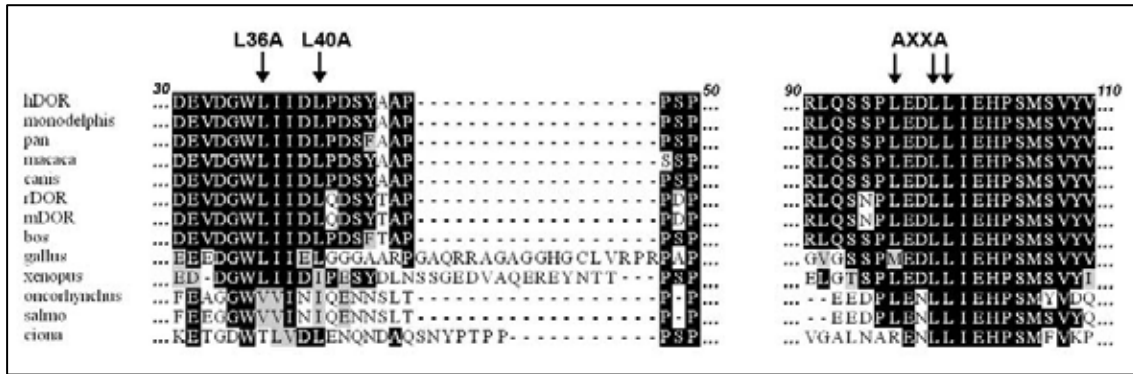


Figura 2. Alineament dels diferents ortòlegs de DOR en les regions identificades com a importants per la seva capacitat transactivadora. Indicats amb fletxes els residus mutats que provoquen pèrdua de funció.

5. Ortòlegs de DOR.

Vam voler comprovar si les proteïnes amb homologia amb DOR que havíem trobat a diferents espècies són, efectivament, ortòlegs de DOR, analitzant si també eren capaces d'activar la transcripció. Per fer-ho vam fusionar algunes d'aquestes proteïnes al Gal4-DBD i vam analitzar si, com en el cas del DOR humà, aquestes fusions activaven l'expressió d'un reporter de Gal4. Vam triar espècies amb diferent grau d'identitat amb la forma humana: des de l'elevada identitat del DOR de ratolí (85%), passant per la més moderada de *Xenopus laevis* (45%), *Oncorhynchus mykiss* (29%), i *Salmo salar* (28%) i fins a la més baixa de totes, la de *Ciona intestinallis* (20%). De totes aquestes fusions, l'única que aconseguia una activació similar a la de la forma humana era la que té més identitat, la forma de ratolí. La forma de *Xenopus laevis* aconseguia una lleugera activació, mentre que les altres formes no eren capaces d'activar la transcripció.

Donat que la fusió de la proteïna sencera de DOR humà activa menys la transcripció que diversos dels fragments estudiats, vam voler analitzar si fragments dels possibles ortòlegs anàlegs al fragment N-terminal més actiu del DOR humà eren capaços d'activar la transcripció. En aquest cas les diferents formes de DOR sí eren capaces d'activar la transcripció del reporter de Gal4. L'activació era menys potent que la de la forma humana en espècies amb menys identitat com *Salmo salar* i *Ciona intestinallis*. Curiosament, la forma de *Xenopus laevis* aconseguia una activació encara major que la de la forma humana.

Aquests resultats van reforçar la possibilitat que les proteïnes homòlogues trobades a les diferents espècies siguin ortòlegs del DOR humà. A més aquests resultats també reafirmen una distribució de la proteïna en què hi ha un domini d'activació de la transcripció N-terminal i un domini C-terminal que regula aquesta activitat. En aquest sentit el domini d'activació de la transcripció estaria conservat fins i tot en procordats (*Ciona intestinalis*).

6. Possibles mecanismes d'actuació de DOR.

Quin és el mecanisme pel qual DOR transactiva els receptors? Aquesta és una pregunta que encara no podem respondre. La mida de la proteïna i la manca d'homologia amb altres proteïnes fan pensar que molt probablement DOR no té una activitat enzimàtica que pugui ser responsable del seu paper transactivador. En aquest sentit, el paper de DOR ha de ser, molt probablement, el d'interaccionar amb altres molècules. Com hem dit, gran part de la proteïna no tindria una estructura definida segons les prediccions, i això li donaria la capacitat d'interaccionar amb diferents estructures. Així DOR podria estar fent de connector entre el receptor i la maquinària de transcripció basal, fent un paper anàleg als coactivadors del complex 'Mediator' (Conaway et al., 2005). Alternativament DOR podria ser un coactivador secundari, és a dir, podria estar unint-se al receptor i reclutant altres proteïnes, les quals sí tinguessin una activitat enzimàtica, que fossin les efectores de la transactivació. Una observació interessant és que segons les prediccions DOR podria tenir un domini d'unió a RNA. Altres coactivadors com PGC-1 (Monsalve et al., 2000) o CoAA (Auboeuf et al., 2004) tenen motius de reconeixement de RNA i això els permet participar, a més d'en la iniciació de la transcripció, en passos posteriors com el processament o l'estabilitat dels mRNAs (Minvielle-Sebastia et al., 1999; Calvo et al., 2005). Per tant la presència d'aquest domini d'unió a RNA obre la possibilitat que DOR tingui també un paper en etapes posteriors a la iniciació de la transcripció.

En estudis amb les fusions de DOR amb el Gal4-DBD vam detectar una interacció funcional entre DOR i diversos coactivadors amb activitat Histona Acetil Transferasa (HAT). Com hem dit el paper de DOR com a coactivador podria ser el d'unir altres coactivadors que fossin els efectors de la transactivació. Aquests experiments suggereixen que els coactivadors amb activitat HAT podrien ser aquests efectors, ja que

Discussió

la seva sobreexpressió augmenta l'activitat de DOR en el context de les fusions amb Gal4. Tot i això no es poden descartar altres mecanismes per a aquesta interacció funcional. Un cop més, estudis d'interacció física seran necessaris en el futur per aclarir aquest punt. En qualsevol cas és interessant destacar que la interacció funcional es dona tan sols amb alguns dels coactivadors testats. Curiosament amb el coactivador Tip60 l'efecte obtingut és exactament el contrari: l'acció de DOR pateix una repressió molt significativa. Tot i que en la majoria de casos Tip60 activa la transcripció gènica, en determinats casos també indueix repressió reclutant altres complexes, per exemple desacetilases (Gavaravarapu et al., 2000; Xiao et al., 2003; Nordentoft et al., 2003). Això podria explicar l'efecte de Tip60 sobre la funció de DOR.

7. Efecte de la repressió de DOR a cèl·lules musculars.

Tots els resultats esmentats fins ara es basen en la sobreexpressió de DOR en cèl·lules que no tenen expressió endògena de la proteïna. Vam voler comprovar quin efecte tenia la disminució de l'expressió de la proteïna en cèl·lules amb expressió endògena sobre la capacitat de TR α i PPAR γ d'activar l'expressió dels seus reporters. Així, vam transfectar cèl·lules C2C12 control i knock-down de DOR (infectades amb un vector lentiviral amb un siRNA per DOR) amb vectors reporter per a TR α i PPAR γ i vam analitzar l'expressió dels reporters en presència i absència del receptor i de l'hormona corresponents. En les cèl·lules en què l'expressió de DOR està disminuïda l'acció dels receptors nuclears es veu minvada ja que l'increment de l'expressió dels reporters disminueix clarament. Aquests resultats demostren que DOR és un efector important de la capacitat d'aquests receptors nuclears per transactivar els seus gens diana, ja que en absència de DOR aquesta capacitat es veu minvada. Confirmant aquests resultats, quan aquestes cèl·lules knock-down de DOR es tracten amb hormona tiroïdal, l'expressió de diversos gens com miogenina, IGF-2 o α -actina augmenta menys que en les cèl·lules control (**Annex I, figura 5**). A més en la diferenciació muscular l'expressió de diversos gens que s'indueixen de forma marcada a les cèl·lules control està alterada a les cèl·lules knock-down de DOR (**Annex I, figura 6**). Aquestes dades indiquen que DOR tindria un paper regulador a les primeres etapes de la diferenciació muscular.

8. Interacció amb els receptors nuclears.

La majoria de coactivadors i utilitzen seqüències LxxLL per unir-se de forma dependent de lligand al domini AF-2 del LBD dels receptors nuclears. De fet, la presència d'una caixa LxxLL va ser un dels principals motius pels quals vam pensar en un principi que DOR podia ser un coactivador. Tot i això els resultats indiquen que en el cas de DOR la unió no seguirà aquests paràmetres. Resultats previs obtinguts al nostre grup ja indicaven que la unió de DOR a TR és independent d'hormona (M. Orpinell, Tesi Doctoral 2006, Universitat de Barcelona), cosa que no encaixa amb una unió canònica LxxLL–AF-2. Però el més significatiu són els resultats obtinguts quan es muten els dos actors de la interacció, el domini AF-2 i la caixa LxxLL. La mutació E773A a GR α , que elimina un dels dos residus del 'charge-clamp' que es forma a l'AF-2 impeding la interacció amb altres coactivadors, no elimina la capacitat de DOR per coactivar GR α . Encara més enllà, la mutació de l'única caixa LxxLL que presenta DOR tampoc aboleix la coactivació dels diferents receptors nuclears testats. Aquestes dades indiquen clarament que la interacció de DOR amb els receptors nuclears no és la interacció canònica LxxLL–AF-2. A la literatura podem trobar altres exemples de coactivadors que s'uneixen a receptors nuclears de forma independent de lligand, i que tenen caixes LxxLL la mutació de les quals no aboleix la interacció, com ara CCPG, DRIP150 o PNRC2 (Li et al., 2007; Lee et al., 2005; Zhou et al., 2001). Aquesta diferent interacció obre la possibilitat que la proteïna no sigui un coactivador alternatiu a altres coactivadors controlats per lligand, sinó que es podria unir paral·lelament a aquests per generar un complex macromolecular coactivador més gran (**figura 3**). La interacció funcional observada entre DOR i coactivadors amb activitat HAT podria anar en aquest sentit.

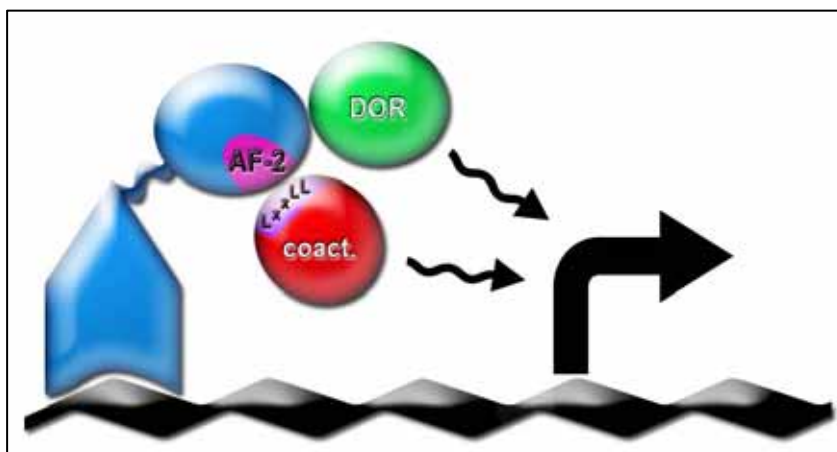


Figura 3. La unió no canònica de DOR podria permetre l'acció concertada amb altres coactivadors que s'uneixin de forma canònica.

Discussió

Quin és, doncs, el domini de DOR que li serveix per la interacció amb els receptors nuclears? Podem trobar exemples de coactivadors que utilitzen diversos motius per interaccionar amb els receptors nuclears, com ara motius d'unió a dominis SH3 en el cas del coactivador PNRC2 (Zhou et al., 2001) o motius d'unió a dominis WW en el coactivador WBP2 (Dhananjayan et al., 2006). És interessant destacar que en l'anàlisi de la seqüència de la proteïna DOR trobem aquests dos motius, així com altres motius putatius d'interacció amb proteïnes (**figura 4**). El mapatge de les regions de DOR i dels receptors nuclears que serveixen per la interacció entre ells és una pregunta no resposta encara pel nostre grup i a la que caldrà donar prioritat en els propers temps.

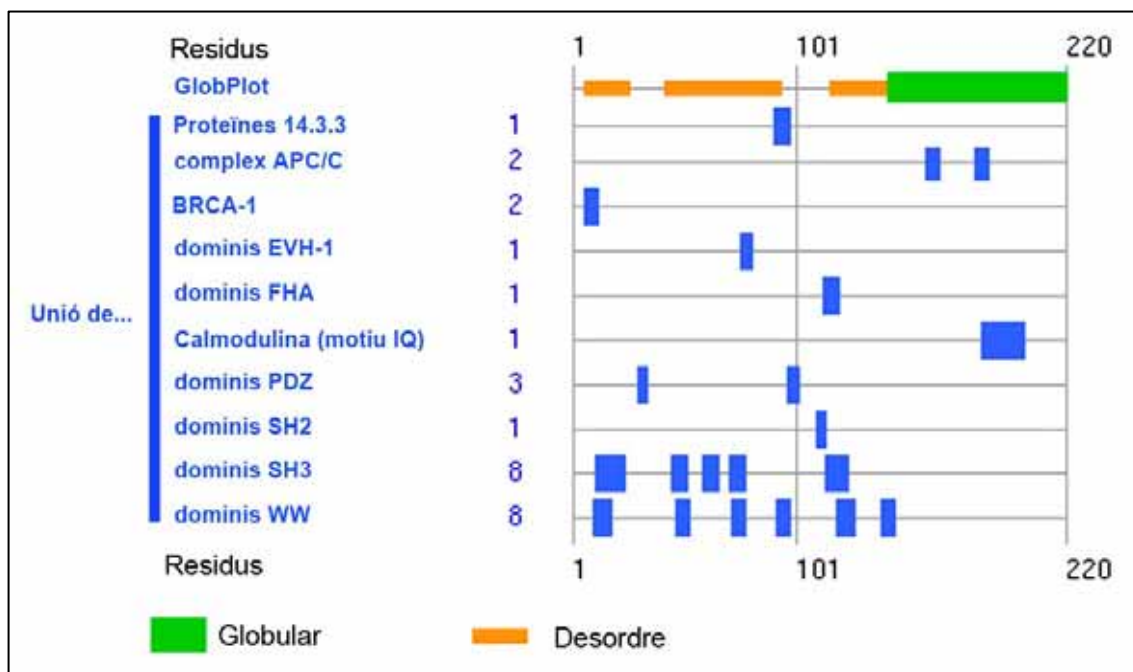


Figura 4. Localització a DOR de llocs putatius d'unió de diferents proteïnes o dominis predits pel programa ELM.

La caixa LxxLL tot i ser el domini més comú en la interacció entre coactivadors i receptors nuclears, es pot trobar en altres tipus d'interaccions, com per exemple entre coactivadors (Torchia et al., 1997). En el cas de DOR, la caixa LxxLL es troba en la regió més conservada de la proteïna, cosa que n'indica la importància. Com hem esmentat en el punt 4 aquesta regió és, a més, una de les dues regions identificades com a importants per l'activació de la transcripció en els estudis amb les fusions de Gal4-DOR i la mutació de la caixa fa que la proteïna perdi part de la seva capacitat transactivadora. Per tant podria ser que aquesta caixa LxxLL de DOR no li servís per

interaccionar amb els receptors nuclears sinó amb altres proteïnes, i aquesta interacció seria responsable de part de la capacitat transactivadora de DOR.

Quin és el paper de DOR en absència d'hormona? Com a mínim en el cas de TR α , en estudis de sobreexpressió en absència d'hormona DOR ja està unit al receptor (**Annex I, figura 7**). En aquestes condicions DOR podria:

- estar unit però inactiu, actuant tan sols en presència de l'hormona.
- estar afavorint la transcripció fins i tot en absència d'hormona
- fins i tot DOR podria tenir un paper dual i actuar com a corepressor en absència d'hormona i com a coactivador en presència d'hormona.

En els experiments amb reporters per als diferents receptors nuclears l'efecte de DOR en absència d'hormona no és significatiu. A més, la dificultat per obtenir medis absolutament lliures d'hormona fa que aquests resultats no siguin completament indicatius i que calguin altres aproximacions per aclarir aquest punt.

9. Localització de DOR.

Per que una proteïna pugui exercir de coactivador és imprescindible que es localitzi al nucli. La predicció de si una determinada proteïna és o no nuclear és difícil: no sempre és fàcil detectar les senyals de localització nuclear (NLS); a més, algunes proteïnes poden no tenir NLS i entrar al nucli cotransportades amb altres proteïnes que sí en tenen, pel sistema anomenat de 'piggy-back'.

Alguns programes analitzen la possible localització d'una proteïna en funció de la seva composició d'aminoàcids i la comparació amb altres proteïnes. Les prediccions amb diversos d'aquests programes de quina seria la localització de DOR van identificar en la seva majoria DOR com a proteïna nuclear. La primera confirmació que vam tenir d'aquesta localització va ser en els estudis amb la proteïna de fusió que vam generar de DOR amb la Green Fluorescent Protein (GFP). Aquesta proteïna de fusió es localitza exclusivament al nucli, a diferència del que passa amb la GFP sola, que es distribueix de forma difosa per tota la cèl·lula. La fusió de DOR amb GFP manté la capacitat de coactivar els diferents receptors nuclears. Dins el nucli la seva distribució no és difosa

Discussió

sinó que la proteïna es troba formant un puntejat característic. El desenvolupament d'un anticòs policlonal específic per DOR ens va permetre confirmar aquesta localització nuclear, i identificar aquest puntejat com als cossos nuclears PMLs.

Tant en el context de la fusió amb GFP com en el de la proteïna sola vam poder constatar que la regió de DOR responsable de la seva localització nuclear és la part C-terminal. Així, els residus 1 a 111 fusionats amb GFP es distribueixen per tota la cèl·lula (de manera anàloga a com ho fa la GFP sola) mentre que quan el que es fusiona a GFP són els residus 83 a 220 la localització és exclusivament nuclear. En el context de la proteïna sola, una versió truncada que conté els residus 1 a 203 és nuclear, mentre que una altra versió truncada amb els residus 1 a 163 es distribueix per tota la cèl·lula. Això localitza la regió responsable de la localització nuclear entre els residus 163 i 203.

La cerca de possibles senyals de localització nuclear (NLS) a DOR amb diferents programes de predicció va donar tan sols un possible candidat, format per 3 residus bàsics i una prolina. La mutació de dos d'aquests residus bàsics en el context de GFP-DOR té un efecte molt lleu en la localització de la proteïna, que gairebé en la seva totalitat es localitza també al nucli. En les transfeccions d'aquest mutant apareix un lleuger marcatge citosòlic, que no es dona amb la forma nativa; això ens podria indicar que aquesta possible NLS té un cert paper en la localització nuclear de la proteïna, però en qualsevol cas no n'és l'única responsable. En aquest sentit diverses proteïnes tenen un NLS que s'ha demostrat no imprescindible per la seva entrada al nucli, ja que aquesta també es dona per cotransport amb altres proteïnes (Kambach C. Et al., 1994; Dostie, J. et al., 2000; Llorian, M. et al., 2005).

És interessant destacar que en aquesta regió identificada com a responsable de la localització nuclear trobem una putativa seqüència d'unió a Calmodulina (residus 183 a 201) (**figura 4**). En aquest sentit proteïnes com els factor de transcripció SOX9 i p21 veuen afavorit el seu transport al nucli per unió de Calmodulina (Argentaro et al., 2003; Rodríguez-Vilarrupla et al., 2005).

El paper de la regió C-terminal de DOR pel que fa a la seva localització podria ser:

1. determinar la localització nuclear de la proteïna: en aquesta regió hi podria haver una NLS desconeguda o podria ser la regió per la qual DOR interacciona amb altres proteïnes responsables de sistemes 'piggy-back' que la portin al nucli.
2. que sigui una regió responsable de la retenció al nucli: en absència de retenció al nucli les proteïnes nuclears tendeixen a estar contínuament entrant i sortint del nucli (Schmidt-Zachman et al., 1993; Laskey et al., 1993). El paper de la regió C-terminal de DOR podria ser el d'interaccionar amb altres proteïnes o dominis que retinguessin la proteïna al nucli. Això faria que la proteïna no estigués entrant i sortint del nucli sinó que s'hi acumulés.

Vam analitzar també el paper de possibles senyals de sortida del nucli (NES) en la localització de DOR. L'anàlisi de la seqüència ens va permetre detectar dues possibles senyals NES, si bé cap de dels dues no compleix exactament amb la seqüència consens. Vam analitzar com afectava la mutació dels residus aromàtics d'aquestes possibles NES a la localització de la proteïna, tant en condicions basals com en tractaments amb estaurosporina, en el quals havíem vist que la proteïna és exportada ràpidament del nucli. La mutació de la caixa LxxLL (mutant AXXAA), generada en aquesta tesi, afectava a una de les dues possibles NES; en estudis previs ja s'havia demostrat que aquesta mutació no impedia la sortida de DOR del nucli en els tractaments amb estaurosporina. Vam analitzar quin era el paper de l'altra possible NES mutant-ne diversos residus (mutant NES1-A); aquest mutant té menys tendència a abandonar el nucli en el tractament amb estaurosporina que la forma nativa de la proteïna. Tot i això el tractament provoca una certa sortida de la proteïna al citosol. Aquests resultats suggereixen que l'anomenada caixa NES1 té un paper important en la sortida del nucli de DOR, però altres mecanismes influeixen en la sortida promoguda per estaurosporina.

Com ja hem dit, un dels principals teixits d'expressió de DOR és el múscul esquelètic. L'anàlisi de la localització de la proteïna endògena en diverses línies musculars ens va portar la sorpresa de que, si bé en cèl·lules no diferenciades la localització és anàloga a la de cèl·lules transfectades, en cèl·lules diferenciades a miotubs la localització és totalment citoplasmàtica. Per tant ens vam trobar amb la paradoxa de tenir una proteïna

Discussió

amb una funció nuclear, però que en determinades circumstàncies no es troba al nucli. Diverses explicacions per a aquesta paradoxa són possibles:

-la proteïna podria estar al citosol com a mecanisme de regulació negativa, esperant una senyal que li permetés l'entrada al nucli per exercir la seva funció. En aquest sentit trobem diversos exemples de coreguladors que són regulats modificant la seva localització per diversos mecanismes com ara el corepressor NCoR o el coactivador pCIP (Hermanson et al., 2002; Wu et al., 2002). Alguns d'aquests casos tenen lloc també en la diferenciació muscular com és el cas de la HDAC5 (McKinsey et al., 2000).

-la proteïna podria tenir al citosol un paper funcional diferent del que desenvolupa al nucli com a coactivador. Actuaria així com una proteïna amb una funció dual, exercint una o l'altra en funció de si es troba al nucli o al citoplasma. Exemples d'aquest comportament també han estat descrits amb anterioritat, com per exemple per la proteïna EDF-1, que actua al nucli com a coactivador o al citosol regulant la disponibilitat de calmodulina (Ballabio et al., 2004), o per TAB2, que forma part d'un complex corepressor quan està al nucli i al citosol participa en la cascada de transducció de senyal de la IL-1 (Baek et al., 2002; Takaesu et al., 2000).

Val a dir que aquestes dues opcions no són mútuament excloents: així, DOR podria estar al citosol realitzant una determinada funció però sota un estímul concret entrar al nucli per actuar de coactivador. En aquest sentit trobem exemples de coreguladors que tenen també un paper fora del nucli en una determinada estructura i que fins i tot actuen com a sensors de canvis en aquestes estructures, traduint la informació fins al nucli. És el cas del coactivador Ankrd2, que podria estar implicat en detectar senyals d'estrès al sarcòmer i traduir-los en canvis en l'expressió de gens al múscul (Kojic et al., 2004). També és el cas de diverses proteïnes que transmeten informació des d'adhesions focals fins al nucli (Hervy et al., 2006).

L'expressió de DOR durant la diferenciació muscular augmenta considerablement, tant a nivell de missatger com a nivell de proteïna. Això sembla contradir la possibilitat de que la proteïna estigui fora del nucli simplement com a reservori de proteïna inactiva esperant una senyal que la faci entrar al nucli.

Per analitzar la possibilitat de que determinades senyals facin entrar DOR al nucli es va analitzar la localització de la proteïna a miotubs sota diversos tractaments. Cap d'ells va tenir com a resultat una re-localització de la proteïna del citosol cap al nucli. Alguns tractaments, en canvi, van generar una re-localització dins el propi citosol: en els tractaments amb hormona tiroïdal o dexametasona a temps curts, el marcatge de la proteïna va passar de ser difós a formar uns agregats en forma de puntejat citosòlic. En aquest punt és interessant mencionar que tant les hormones tiroïdals com els glucocorticoides generen dos tipus de resposta: d'una banda accions genòmiques, que passen per la unió amb el receptor nuclear i la modificació directa de l'expressió de gens diana; de l'altra banda accions no genòmiques, que tenen lloc a temps molt més curts, i que impliquen canvis com ara activació de determinades cascades de proteïna cinases.

Els resultats ens mostren que la proteïna DOR, tot i trobar-se al citosol (on no pot exercir de coactivador), segueix responent d'alguna manera a la presència de les hormones de determinats receptors nuclears als quals coactiva. En aquest sentit DOR podria ser un efector també d'alguna de les accions no genòmiques d'aquestes hormones quan es troba al citosol. Aquests resultats donen crèdit a la idea de que DOR al citosol també hi té un determinat paper, i resten força a la possibilitat que DOR estigui al citosol simplement com a reservori inactiu de proteïna.

Per donar una mica de llum sobre aquest punt vam intentar aclarir quines són aquestes estructures en forma de puntejat en les que DOR s'acumula en presència de les hormones esmentades. Això ens podria donar, a més, informació de quin és el paper de DOR quan es troba al citosol. Per fer-ho vam tractar cèl·lules C2C12 amb T3 durant 30 minuts, i vam analitzar la localització de DOR i de proteïnes representatives de determinades estructures o orgànuls, per veure si co-localitzaven. Malauradament cap de les proteïnes analitzades té la mateixa localització que DOR, i per tant no vam poder determinar en quines estructures s'acumula DOR en els tractaments amb hormona. Tot i això la forma i distribució del puntejat que forma DOR en aquests tractaments ens va suggerir que el marcatge podria correspondre a vacuoles autofàgiques. L'autofàgia és el procés pel qual la cèl·lula degrada part del seu contingut citosòlic per redistribuir nutrients des de processos innecessaris cap a processos més essencials. En l'autofàgia es forma una membrana que engloba part del contingut citosòlic, generant així una vacuola

Discussió

autofàgica. Aquesta es fusionarà amb els lisosomes per degradar-ne el contingut i obtenir així components necessaris per altres processos. En estudis preliminars hem pogut observar al nostre laboratori que en cèl·lules HeLa transfectades i en condicions en què s'afavoreix l'autofàgia DOR colocalitza amb LC3, una proteïna que es fa servir com a marcador de vacuoles autofàgiques. La manca d'eines adequades ens ha impedit, de moment, analitzar aquesta colocalització a cèl·lules C2C12 miotub tractades amb hormona, però aquest punt serà analitzat properament al nostre laboratori. En cas de confirmar-se, DOR no seria el primer cas de co-activador que en determinades condicions es pot trobar als autofagosomes: PELP1, identificat com a coactivador del receptor d'estrògens, es localitza a autofagosomes en tractaments amb Resveratrol (un agonista d'ER) en determinades línies cel·lulars (Ohshiro et al., 2007).

En els tractaments de les cèl·lules C2C12 miotub amb hormones vam poder comprovar que a més de relocalitzar-se, la quantitat de proteïna DOR disminueix. En aquest sentit, i en cas de confirmar-se que aquesta re-localització correspon a vacuoles autofàgiques, caldrà analitzar si la incorporació de DOR a les vacuoles respon a que hi té una determinada funció o si tan sols s'hi localitza per degradar-s'hi.

10. Estudi de possibles modificacions post-traduccionals a DOR.

En cèl·lules transfectades amb DOR havíem vist que el tractament amb estaurosporina, un inhibidor de cinases d'ampli espectre, la proteïna surt del nucli i es localitza totalment al citosol. Això ens indicava que podia haver-hi una fosforilació de la proteïna que fos la responsable de la seva localització nuclear. Vam interessar-nos en aquest punt per la seva possible relació amb la sortida de nucli que veiem en la diferenciació muscular: a la literatura trobem diferents exemples de proteïnes nuclears que durant la diferenciació muscular pateixen canvis en el seu estat de fosforilació i això fa que es localitzin al citosol. És el cas per exemple de la HDAC5 (McKinsey et al., 2000), del corepressor MITR (Zhang et al., 2001) o del coactivador pCIP (Qutob et al., 2002). En aquest sentit la sortida de DOR del nucli que veiem en cèl·lules HeLa tractades amb estaurosporina i en la diferenciació de cèl·lules musculars podrien respondre al mateix mecanisme. Per això ens vam proposar analitzar com afecta la mutació dels principals llocs putatius de fosforilació a la localització de la proteïna en cèl·lules HeLa. És interessant destacar que la majoria de llocs putatius de fosforilació de DOR es troben a

la regió identificada com a desordenada a les prediccions. Les regions desordenades de les proteïnes tenen la característica de ser més fàcilment regulables per fosforilació (Iakoucheva et al., 2004).

Tots els mutants de llocs de fosforilació generats (S7A, S93A, CK2A, S185A, S198A) es localitzen al nucli igual que ho fa el DOR natiu. Això dona lloc a diverses possibilitats:

- 1) que hi hagi un altre lloc de fosforilació que sigui el responsable d'aquest comportament de la proteïna en els tractaments amb estaurosporina i que no ha estat detectat a les prediccions.
- 2) Els efectes de l'estaurosporina sobre la localització de DOR podrien ser indirectes, i explicar-se per canvis en l'estat de fosforilació d'una tercera proteïna. Així, la localització d'alguns coactivadors com SRC-1 es veu modificada per canvis en l'estat de fosforilació d'una altra proteïna, SIP (SRC-Interacting Protein) (Zhang et al., 2007). Com hem dit la localització de DOR al nucli es deu molt probablement al cotransport amb una altra proteïna; en aquest sentit els efectes provocats per l'estaurosporina podrien ser deguts a canvis en l'estat de fosforilació d'aquesta altra proteïna, i no directament sobre DOR.
- 3) La localització de DOR podria no estar regulada per fosforilació, tot i els resultats amb estaurosporina. En aquest sentit el tractament amb estaurosporina és molt agressiu per les cèl·lules, i això es pot veure fins i tot a nivell de canvis en la morfologia de les cèl·lules tractades. Així la sortida de DOR del nucli podria ser un efecte indirecte de l'estrès provocat pel tractament, i no d'una desfosforilació. Cal dir en aquest punt que altres tractaments que poden suposar un estrès per la cèl·lula també fan sortir DOR del nucli en cèl·lules HeLa transfectades; aquests tractaments inclouen la disrupció dels filaments d'actina amb Citocalasina D i dels microtúbuls amb Nocodazol, així com la inhibició de la transcripció amb Actinomicina D (Merixell Orpinell, tesi doctoral 2006, Universitat de Barcelona).

Tot i que la localització dels mutants és la mateixa que la de la proteïna nativa vam voler analitzar alguns d'aquests mutants a nivell de la seva activitat i vida mitja, ja que diversos exemples a la literatura suggerien que aquestes fosforilacions podien estar

Discussió

regulant la proteïna en aquest sentit. Les formes mutants CKII-A i S93-A són més potents activant la transcripció que la forma nativa de la proteïna, sobretot pel que fa a la forma S93-A. Les dues formes tenen, a més, una vida mitja considerablement més llarga. Cal destacar que tot i que els dos mutants tenen una vida mitja semblant, el mutant S93-A té una activitat molt superior al mutant CK II-A. L'activitat del mutant CK II-A és tan sols lleugerament superior a la de la forma nativa, i probablement es pot explicar simplement per l'augment de la vida mitja. El mutant S93-A, en canvi, és molt més actiu, cosa que fa pensar que hi ha altres mecanismes implicats (a més de l'augment de la vida mitja) en aquesta major activitat. La serina 93 es troba en una de les dues regions identificades com a importants per a l'activació de la transcripció produïda per DOR. A més, aquesta serina fosforilada podria ser un lloc d'unió de proteïnes 14.3.3; els resultats suggereixen que la unió de proteïnes 14.3.3 a la serina 93 fosforilada podria ser un mecanisme de regulació negativa de la funció de DOR, mecanisme que no pot tenir lloc en el mutant S93-A. Tot i això caldrà realitzar diversos experiments complementaris en el futur per confirmar si la major activitat d'aquest mutant es deu a aquest mecanisme.

Els residus de Lisina poden patir diferents modificacions post-traduccionals, com ara acetilació, metilació, ubiquitinació o sumoïlació. Tot i que la proteïna DOR és relativament rica en residus carregats positivament, tan sols 3 d'aquests residus corresponen a Lisines (posicions 165, 187 i 204 al DOR humà). Això ens va permetre obtenir fàcilment una versió mutada de la proteïna en què les 3 Lisines es van convertir a Arginina (mutant 3K-R), conservant així la càrrega global de la proteïna. D'aquesta manera vam poder analitzar el comportament d'aquesta forma de la proteïna, que no pot patir modificacions post-traduccionals en Lisines.

La forma nativa de DOR té una vida mitja força curta, al voltant de les 5 hores; a més segons les prediccions una gran part de la proteïna és desordenada i té una seqüència PEST. Això fa pensar que la proteïna es podria estar ubiquitinant, cosa que n'afavoriria la degradació (Rechsteiner, 1990; Hershko et al., 1998). Per analitzar aquest punt vam comparar la vida mitja de la proteïna nativa amb el mutant 3KR, que no pot ser ubiquitinat. El mutant té una vida mitja considerablement més llarga que la forma nativa de la proteïna; a més, el tractament amb l'inhibidor del proteasoma MG-132, que incrementa la quantitat de la forma nativa de DOR, no fa el mateix amb el mutant 3K-R.

Aquestes dades indiquen que la proteïna DOR s'estaria ubiquitinant, i aquesta seria una de les causes de la seva curta vida mitja.

L'anàlisi de l'activitat del mutant 3K-R ens va mostrar que, tot i tenir una vida mitja més llarga que la forma nativa, la proteïna és força menys activa, generant una activació de la transcripció gairebé nul·la. Aquests resultats, tot i semblar contradictoris, podrien tenir diferents explicacions:

- alguna de les Lisines mutades (o totes) podrien formar part d'un domini important per a la funció de DOR, de manera que la seva mutació n'afectaria a la funció. Fins i tot la mutació podria afectar a l'estructura de la proteïna, ja que les tres Lisines es troben a la regió de la proteïna predita com a globular.

- paradoxalment el fet que el mutant 3K-R no es pugui ubiquitinar podria ser la causa de la seva menor activitat. En algunes proteïnes la ubiquitinació és, a més d'una senyal de degradació, una senyal d'activació de la funció. D'aquesta manera es lliga l'activació de la proteïna a la seva degradació, generant un estricte mecanisme de regulació de l'activitat (Salghetti et al., 2001; Conaway et al., 2002). Així una versió de la proteïna no ubiquitinable és més longeva però menys activa.

- fins i tot en el cas de que la ubiquitinació no fos una senyal d'activació de la proteïna, una proteïna no ubiquitinable podria tenir problemes per exercir la seva funció. La transcripció és un procés ordenat, en el qual han de participar diferents proteïnes seqüencialment en un determinat ordre. Un cop una determinada proteïna ha fet la seva funció cal que surti de l'entorn del promotor per deixar entrar a la següent. Molts cops aquesta sortida es fa per degradació; si la proteïna no pot sortir perquè no es degrada això pot tenir efectes negatius en la transcripció (Dennis et al., 2005).

- com hem dit les Lisines poden patir diferents modificacions, no tan sols la ubiquitinació. D'aquesta manera es podria donar el cas que una determinada modificació en Lisines (per exemple sumoïlació) fos necessària per la funció de la molècula mentre que la ubiquitinació en promogué la degradació. La mutació de les Lisines afectaria a tots dos processos.

- d'altra banda en el mutant que hem analitzat s'ha eliminat les tres Lisines de la proteïna; es podria donar el cas que tan sols una d'aquestes Lisines s'ubiquitinés

Discussió

promovent la degradació, mentre que una altra fos important per a la funció d'alguna de les formes esmentades. En aquest sentit serà necessari repetir els experiments amb els mutants individuals de cada Lisina per aclarir aquest punt.

El tractament de cèl·lules HeLa transfectades amb Nicotinamida, un inhibidor de la desacetilasa SIRT-1, provoca la sortida de DOR cap al citosol. La explicació més directa d'aquest efecte seria que la proteïna DOR es pugui trobar acetilada, i que aquesta acetilació reguli la seva localització, de manera que quan estigui acetilada es trobi al citosol i quan no al nucli. Per comprovar aquest punt vam analitzar la localització del mutant 3K-R en cèl·lules HeLa transfectades. En condicions normals, la localització és la mateixa que la de la forma nativa; en el tractament amb Nicotinamida, a diferència del que passa amb la forma nativa, la proteïna manté la major part de la seva localització nuclear. Aquests resultats semblen confirmar que en aquestes cèl·lules la localització de DOR es regula per acetilació directa de la proteïna. El mutant 3K-R, que no pot ser acetilat, no pateix aquesta regulació. A la literatura trobem diversos exemples de proteïnes la localització de les quals està regulada d'aquesta manera. Així, TP53 és acetilada per la HAT p300, i això fa que surti del nucli (Kawaguchi et al., 2006). L'acetilació requereix la unió de p300 a TP53, i aquesta es dona per uns dominis de TP53 rics en prolina (dominis 'PxxP' o 'PxPxP', on 'P' correspon a Prolina i 'x' a qualsevol aminoàcid), així com per una caixa LxxLL (Dornan et al., 2003). És interessant destacar que a DOR trobem diversos d'aquests dominis rics en prolina (**figura 5**), que juntament amb la caixa LxxLL podrien servir per interactuar amb p300 i ser acetilada. TP53, a més, és substrat de la desacetilasa SIRT-1 (Brooks et al., 2003), com podria ser el cas de DOR. Un altre exemple d'aquest mecanisme de regulació de la localització és la proteïna nuclear c-Abl. Aquesta és acetilada per diverses HATs (CBP, p300 i pCAF) i això fa que surti al citosol. El més interessant d'aquest exemple és que l'acetilació de la proteïna i la consegüent sortida al nucli té lloc als primers passos de la diferenciació miogènica, com en el cas de DOR (di Bari et al., 2006).

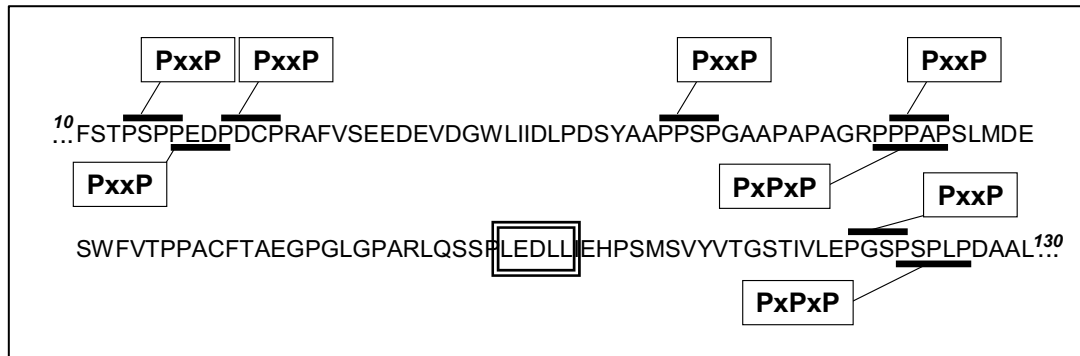


Figura 5. Possibles dominis d'interacció amb p300 a DOR.

Aquests resultats ens suggerir que la sortida de DOR del nucli que es dona en la diferenciació muscular podia estar regulada per acetilació de la proteïna. Si aquest fos el cas, el mutant 3K-R hauria de ser nuclear fins i tot en cèl·lules musculars diferenciades a miotub. Per comprovar-ho vam transfectar cèl·lules C2C12 amb la forma nativa de DOR i amb el mutant 3K-R. Després de la transfecció vam diferenciar les cèl·lules a miotub i a dia 4 de diferenciació vam analitzar la localització de la proteïna. Les cèl·lules que havíem transfectat amb la forma nativa de la proteïna tenien una morfologia i una distribució de DOR semblants a la de cèl·lules no transfectades. Les cèl·lules que s'havien transfectat amb el mutant 3K-R, en canvi, tenien molts problemes per diferenciar: el nombre de miotubs formats era molt reduït i aquests eren curts i amb una morfologia diferent de la de les cèl·lules no transfectades. En aquests miotubs, a més, podíem veure la presència de DOR al nucli en forma del puntejat característic de cèl·lules proliferatives. Presumiblement aquest puntejat nuclear correspon a la forma mutada de la proteïna que ha estat transfectada.

Amb aquests resultats, i a manca de nous experiments que acabin de confirmar aquest punt, proposem que la localització de la proteïna està regulada per acetilació en alguna de les tres lisines, i que aquesta regulació és la responsable de la diferent localització de proteïna en cèl·lules musculars no diferenciades i diferenciades a miotub. Basant-nos en totes les dades obtingudes podem dibuixar la següent hipòtesi: la proteïna DOR es pot trobar en dues formes, acetilada o desacetilada. La forma desacetilada és nuclear; l'acetilació en canvi afavoreix la sortida al citosol. En cèl·lules proliferatives SIRT1 es troba activa, i això manté la proteïna DOR desacetilada i per tant al nucli. En els primers passos de la diferenciació muscular SIRT1 s'inhibeix i això permet l'expressió de gens

Discussió

musculars (Fulco et al., 2003). Un dels efectes d'aquesta inhibició de SIRT1 és que es va acumulant la forma de DOR acetilada i aquesta es localitza al citosol. El mutant 3K-R no té lisines i per tant no pot ser acetilat. Per aquest motiu manté la localització nuclear en el tractament amb un inhibidor de SIRT1, la nicotinamida. De forma anàloga, la inhibició de SIRT1 que té lloc a la diferenciació muscular tampoc afecta a la localització del mutant 3K-R. Per confirmar aquesta hipòtesi caldrà demostrar la presència d'acetilació a DOR; això es podria portar a terme amb l'ús d'un anticòs específic per Lisines acetilades. Aquest experiment es podrà realitzar en un futur immediat al nostre grup, ja que en aquesta tesi s'han generat les eines necessàries per realitzar-lo: els vectors d'expressió de DOR natiu i 3K-R unit a una cua d'histidines. També s'han generat mutants individuals de cada una de les Lisines units a una cua d'histidines per discriminar en quines Lisines concretes té lloc l'acetilació.

Com encaixa en aquest esquema la sortida del nucli que té lloc en el tractament amb estaurosporina? No es pot descartar un mecanisme alternatiu de sortida del nucli regulat per l'estat de fosforilació de la proteïna que expliqui aquests resultats. D'altra banda l'estat de fosforilació de DOR podria estar regulant a la seva vegada l'acetilació de la proteïna. És el cas del coactivador PC4: la fosforilació d'aquest per CK II inhibeix la seva acetilació per p300 (Kumar et al., 2001). Alternativament l'efecte de l'estaurosporina es podria deure no a canvis en la fosforilació de DOR sinó en el seu estat d'acetilació: és conegut que SIRT1 és activada per diverses senyals d'estrès (Wang et al., 2006). El tractament amb estaurosporina suposa un estrès per a la cèl·lula i fins i tot pot representar un estímul pro-apoptòtic.

11. L'acetilació com a senyal dual.

En aquesta discussió hem esmentat anteriorment la possibilitat que la part C-terminal de DOR inhibeixi l'acció del domini d'activació de la transcripció N-terminal per interacció directa per càrrega, de forma anàloga al que passa amb la proteïna p53 (**punt 4**). A p53, l'acetilació de determinades Lisines trenca aquesta interacció, ja que resta càrrega positiva a aquest domini regulador. En el cas de DOR hem proposat l'acetilació de les Lisines com una senyal que fa que la proteïna surti del nucli; tot i això, podria ser que l'acetilació, com en el cas de p53, també abolís la interacció auto-inhibidora de DOR. Això explicaria el fet que el mutant 3K-R és gairebé inactiu. D'aquesta manera

l'acetilació podria ser, pel cas de DOR, una senyal dual: per una banda podria activar la proteïna i per l'altra podria promoure'n la sortida del nucli com a mecanisme de control de l'activitat. D'acord amb aquesta possibilitat hem pogut comprovar al nostre laboratori que després de tractar cèl·lules HeLa transfectades amb DOR amb els agonistes dels receptors nuclears que DOR coactiva (T3, rosiglitazona i dexametasona) part de la proteïna es re-localitza al citosol (Meritxell Orpinell, Tesi Doctoral 2006, UB).

Així, en condicions basals DOR es trobaria al nucli desacetilat i inactiu. Quan arriba l'hormona DOR patiria una acetilació que faria que la regió C-terminal es separés del domini d'activació de la transcripció N-terminal, donant així una proteïna activa. Aquesta forma de DOR faria la seva funció durant un cert temps, però l'acetilació de les Lisines també faria la proteïna més propensa a sortir del nucli, cosa que mantindria l'acció de DOR limitada en el temps (**figura 6**).

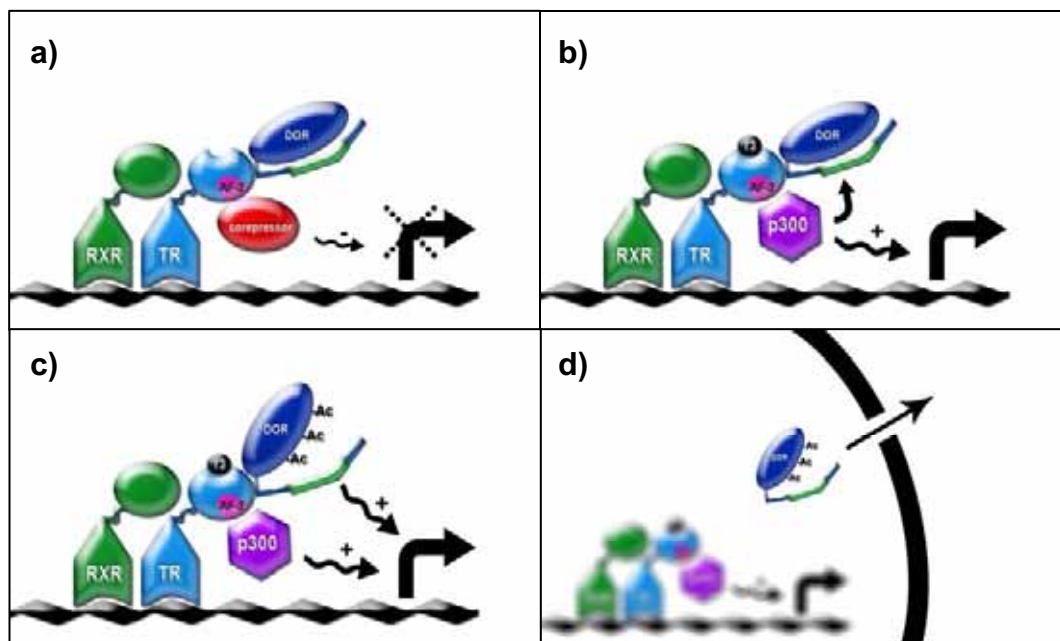


Figura 6. Possible regulació per acetilació de DOR. **a)** en absència d'hormona DOR ja es troba unit a TR però inactiu. **b)** la unió de l'hormona fa que TR canviï corepressors per coactivadors. **c)** DOR és acetilat, de manera que s'activa. **d)** l'acetilació finalment promou la sortida de DOR del nucli.

Discussió

Una conclusió que es pot treure de totes les dades que coneixem de DOR és que es tracta d'una proteïna altament regulada. Diverses senyals regulen la seva vida mitja, la seva activitat i la seva localització. Això fa pensar que la seva funció serà molt específica i que ha de tenir lloc tan sols en determinades circumstàncies.

Aquest treball ha respost algunes preguntes sobre la funció i la regulació de DOR, però també n'ha obert moltes altres. En el nostre laboratori s'està treballant per respondre aquestes preguntes.

L'interès en el gen DOR va sorgir a l'inici de la seva possible implicació en la fisiopatologia de la diabetis mellitus de tipus II. Tot i això, els coneixement generat en aquesta tesi és lluny de ser aplicable directament a la prevenció o el tractament d'aquesta malaltia. Quin sentit té investigar qüestions la utilitat pràctica de les quals no es pot albirar? Una bona raó és l'interès, inherent a l'ésser humà, en saber com funciona el món. L'OCDE definia fa poc la investigació bàsica com a la investigació generada per la curiositat ('curiosity-driven research') (OCDE, Workshop 2001 on Basic Research, Oslo). Però potser encara més important és el fet que qualsevol coneixement, fins i tot el que sembla més inútil, acaba tenint d'una manera o altra una aplicació pràctica.