

ESTUDI DELS ELEMENTS RESPONSABLES DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL EN EL PROMOTOR DEL GEN DE LA β -FoF1 ATP SINTETASA MITOCONDRIAL.

I. Martín, M. Giralt, R. Iglesias, O. Viñas, T. Mampel i F. Villarroya.
Dept. Bioquímica i Fisiologia. Unitat Bioquímica i Biologia Molecular B. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

L'obtenció d'ATP per via aeròbica en els mamífers es produeix gràcies a un conjunt de complexos proteics presents a la membrana mitocondrial interna i que constitueixen el sistema cadena respiratòria/fosforilació oxidativa (OXFOS). Cadascun d'aquests complexos proteics conté subunitats codificades per gens nuclears i al menys una, codificada pel genoma mitocondrial. La regulació de l'expressió dels gens nuclears que codifiquen per proteïnes del sistema OXFOS es produeix en bona part per mecanismes transcripcionals i en funció de la diferenciació cel·lular, de la seva coordinació amb l'expressió del genoma mitocondrial, dels requeriments energètics de la cèl·lula i sota l'acció hormonal, principalment de les hormones tiroïdals. Els mecanismes precisos de regulació transcripcional de l'expressió d'aquests gens i els factors de transcripció implicats es desconeixen. Per avançar en aquest coneixement hem triat com a model el gen de la subunitat β del complex FoF1 ATP sintetasa mitocondrial humana. Un primer pas fou obtenir la regió promotora del gen (-684/+91) mitjançant la tècnica PCR a partir de la seqüència publicada per S.Ohta i col·laboradors (J. Biol. Chem. 263:11257,1988). El fragment obtingut fou clonat en pUC18 i en pBLCAT. La seqüència de nucleòtids d'aquest fragment té menys d'un 5% de divergència respecte a la publicada prèviament i indica l'absència de caixa TATA, la presència de quatre caixes CCAAT en la regió proximal i una única caixa GC. Hem realitzat assaigs de transfecció transitoria de la construcció -684/+91-pBLCAT en cèl·lules HeLa els quals han indicat que aquesta regió dirigeix efectivament l'expressió del gen "reporter" CAT. Així mateix hem obtingut mitjançant PCR el mutant per delecció -271/+91-pBLCAT, la qual cosa suposa l'eliminació de la caixa GC, i hem observat que no dona lloc a una disminució significativa en l'expressió de CAT, la qual cosa sembla indicar que el lloc putatiu d'unió al factor Sp1 no seria essencial per a l'expressió basal del gen. Paral·lelament hem realitzat un estudi sistemàtic de la interacció física entre proteïnes nuclears i la regió proximal esmentada, mitjançant anàlisis de protecció a la DNasa I ("footprint") i de retard en gel. Aquests estudis han indicat la presència de diferents factors que interactuen amb regions del promotor, entre elles les corresponents a les caixes CCAAT. Així mateix s'ha detectat la presència d'un factor en els extractes nuclears que s'uneix amb alta afinitat a una regió del promotor amb seqüència homòloga al lloc d'unió de factors de transcripció codificats per la família c-ets de protooncogens. També hem detectat la unió específica del receptor nuclear d'hormones tiroïdals a seqüències del promotor. Estudis en curs utilitzant mutans del promotor lligats a CAT i dissenyats en funció de respectar o eliminar les regions esmentades ens donaran la informació sobre la importància funcional dels diferents elements del promotor per a dirigir l'expressió del gen β -FoF1 ATP sintetasa.