

ESTUDI DE LA REGIO 5' PROXIMAL DEL GEN HUMÀ DE LA TRANSLOCASA ADP/ATP (ANT1).

J. Sánchez, J.C. Jiménez, R. Iglesias, F. Villarroya, M. Giralt, T. Mampel i O. Viñas

Bioquímica i Biologia Molecular B Dept Bioquímica i Fisiologia Univ Barcelona

RESUM

La translocasa ADP/ATP o ADP/ATP carrier (AAC) és una proteïna integral de membrana mitocondrial interna de 30 Kd, codificada en el genoma nuclear. La seva funció és l'intercanvi 1:1 d'ADP citosòlic amb l'ATP mitocondrial generat per l'ATP sintetasa. S'han seqüenciat tres gens humans que codifiquen per AAC. Un d'ells, el gen *ant1*, s'expressa majoritàriament a cor i múscul esquelètic. En un intent d'esbrinar els elements del gen responsables de la seva regulació transcripcional hem iniciat estudis d'interacció física DNA-proteïnes d'un fragment de la regió 5' proximal del gen amb proteïnes nuclears de cor i fetge. Aquests experiments inicials indiquen que la regió proximal 5' del gen *ant1* conté dues possibles regions reguladores. Una podria estar implicada en la seva regulació muscular específica probablement mitjançant proteïnes MEF2. L'altra podria estar implicada en la regulació de la seva expressió de forma coordinada amb altres proteïnes mitocondrials, probablement mitjançant el factor NRF2. En l'actualitat s'estan realitzant els estudis sobre la funcionalitat d'aquestes regions.

INTRODUCCIÓ

La síntesi d'ATP en cèl·lules eucariotes es realitza majoritàriament pel procés de la fosforilació oxidativa en els mitocondris. Un dels punts claus d'aquest procés és la sortida del mitocondri de l'ATP sintetitzat pel seu ús per la resta de la cèl·lula, i l'entrada d'ADP a dins per a ésser convertit de nou en ATP. A la membrana mitocondrial interna existeix una proteïna de 30 Kd coneguda com a translocasa ADP/ATP o ADP/ATP carrier (AAC) codificada en el genoma nuclear que, de forma dimèrica, és la responsable de l'intercanvi ADP/ATP amb una estequiometria de 1:1. Recentment s'han clonat, en humans, tres gens que codifiquen per proteïnes altament homòlogues anomenades ANT1, ANT2 i ANT3 (Walker et al. 1989; Ku et al. 1990) amb una distribució teixit específica dels mRNA corresponents. El mRNA de l'ANT1 és especialment abundant a cor i múscul esquelètic (Li et al. 1989) i la seva seqüència derivada d'aminoàcids és exactament igual a la seqüència d'aminoàcids de l'AAC purificada de cor. Estudis funcionals de la regió 5' proximal d'aquest gen en experiments de transfecció estable d'una línia de cèl·lules musculars han mostrat que en els 600 pb primers d'aquesta regió hi ha informació suficient per a la seva expressió lligada a la diferenciació muscular (Li et al. 1990). L'objectiu d'aquest treball és estudiar els elements del gen humà *ant1* que puguin ser responsables de la seva expressió cor i múscul específica.

METODES

Extractes nuclears. Els extractes nuclears de fetge i cor de rata es prepararen segons el mètode de Gorsky et al. (1986) amb les modificacions de Landschulz et al. (1988).

Anàlisi de protecció a la DNasa I (Footprint). Les anàlisis de protecció a la DNasa I es feren usant com a base un fragment de 1015 pb del gen humà *ant1* que comprèn la regió de -397 a +628 pb respecte l'inici de transcripció, clonat en pUC19. Es marcà amb [α - 32 P]dCTP (6000 Ci/mmol) i enzim Klenow l'extrem 5' un cop linialitzat amb HindIII corresponent a una diana del polilinker del vector

i seguidament es feu una restricció amb NcoI per alliberar el fragment resultant de 513 pb. Pel marcatge de l'extrem 3' s'emprà EagI per linialitzar i s'alliberà un fragment de 320 pb per restricció amb BamHI. Els fragments es separaren en un gel de poliacrilamida al 6% no desnaturalitzant. Un cop obtinguts els fragments s'incubaren alíquotes (10000cpm per reacció) amb diferents quantitats (0-25 ug) d'extractes nuclears de fetge i cor durant 30 min a 4°C. Les reaccions es feren en un volum de 50 ul contenint 20 mM Hepes pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 1 mM DDT, 10% glicerol, 50 mM NaCl, 2% PVA i 1 ug de poli(dI).(dC). La reacció de la DNasa I es feia en presència de 10 mM MgCl₂-30 mM CaCl₂ durant 45 s a temperatura ambient. Els fragments resultants s'analitzaren en un gel de poliacrilamida al 6% desnaturalitzant. Com a marcadors s'utilitzà el mateix fragment sotmés a les reaccions de seqüenciació de Maxam i Gilbert. Un cop assecat el gel s'exposà amb un film a -80°C durant 12-48 hores.

Anàlisi de retardament en gel (gel-shift). Pels anàlisis de retardament en gel s'empraren dos fragments obtinguts a partir del clon original. Un fragment de 200 pb (-397/-197) linialitzant amb BamHI, marcant com s'ha explicat abans i alliberant-lo per restricció amb MseI. Un segon fragment de 133 pb (-197/-64) linialitzant amb EagI i marcant com abans, tallant amb BamHI, i un cop obtingut aquest fragment de 352 pb digerint-lo amb DraI. Els subfragments s'incubaren (7000cpm per reacció) amb extractes nuclears de fetge (1-2 ug) i de cor (5 ug) durant 15-20 min a 22°C. Les reaccions es feren en un volum final de 20 ul contenint 20 mM Hepes (pH 7.6), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerol, 50 mM NaCl i 1 ug de poli(dI).(dC). La barreja de reacció s'aplicà a un gel de poliacrilamida al 5% en 0.5xTBE i es feu l'electroforesi a 250 V durant 60 min a 4°C. En els estudis de competència s'utilitzaren els oligonucleòtids descrits en un excés de concentració de 5 a 100 vegades segons el cas.

Oligonucleòtids. Els oligonucleòtids de doble cadena foren sintetitzats per Oligos,Inc (USA). Oligonucleòtid MEF2, correspon a la seqüència 5'-CGCTCTAAAAATAACCCT del gen de la creatina kinasa muscular de ratolí (Cserjesi i Olson, 1991). Oligonucleòtid ETS correspon a la seqüència 5'-TCGAGCAGGAAGCATTTCCTGGT del gen de la estromelina de rata (Wasylyk et al. 1991). Oligonucleòtid NRF2 correspon a la seqüència 5'-TTTCGCGACCGAAGAGCGGGT del gen de la subunitat IV de la citocrom c oxidasa (Virbasius i Scarpulla, 1991).

RESULTATS I DISCUSSIO

En la figura 1 es mostra una anàlisi de protecció a la DNasa I realitzada amb els 400 pb 5' proximals del gen humà que codifica per la proteïna ANT1 amb extractes nuclears de fetge i cor. Aquesta anàlisi mostra diverses regions protegides tant per proteïnes de cor com de fetge. D'aquestes n'hi ha dues que l'anàlisi de la seqüència mostrà que tenien gran homologia amb seqüències reguladores descrites en altres gens tal com s'indica en la figura 2. La primera situada entre -270/-252 molt rica amb A/T presenta homologia amb una seqüència descrita en diversos gens l'expressió dels quals és múscul específica i amb la que interaccionen físicament membres de la família de proteïnes nuclears MADS/MEF2 (Gossett et al., 1989; Cserjesi i Olson, 1991). L'altra, amb un nucli GGAA situada entre -140/-125 presenta homologia amb una seqüència reguladora descrita en els gens de les subunitats IV i VI de la citocrom c oxidasa les quals s'ha descrit que interactuen amb proteïnes de la família ETS, específicament el factor NRF2 (Virbasius i Scarpulla, 1991; Scarpulla 1993). A aquesta última se l'ha implicat en la regulació de l'expressió coordinada de proteïnes mitocondrials codificades pel genoma nuclear. Amb l'intent d'aprofundir en la interacció física de proteïnes nuclears amb aquestes dues regions del gen *ant1* realitzarem anàlisis de retardament en gel amb extractes nuclears de fetge i cor utilitzant subfragments de la regió de 400 pb que continguessin aquestes regions. La figura 3 mostra un exemple d'una anàlisi de retardament en gel amb un fragment de 220 pb que inclou la possible regió MEF2. Els resultats mostren la presència de diversos complexos DNA-proteïna tant amb

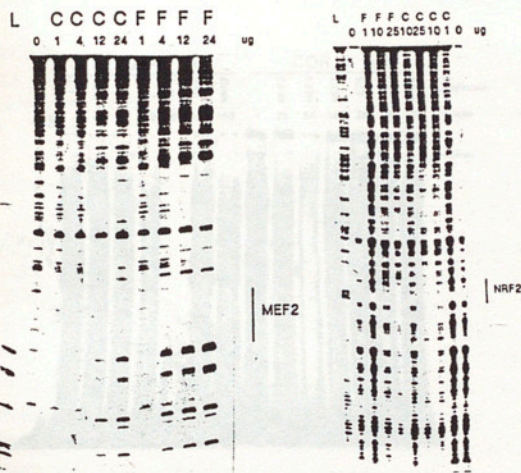


FIG 1. Anàlisi de protecció a la DNasa I. L, marcador. C, extracte nuclear de cor. F, extracte nuclear de fetge. A) Fragment de 513 pb marcat en l'extrem 5'. B) Fragment de 320 pb marcat en l'extrem 3'

A)
 5'-CGCTCTAAAAATAACCCT MEF2-CK
 5'-TGTGCTATAAATACGGCG MEF2-ANT1

B)
 5'-GCAGGAAGCAT ETS SML
 5'-ACCGGAAGAGC NRF-2 COIV
 5'-CCCCGAAGCGC NRF-2 ANT1

FIG 2. A) Comparació de la seqüència MEF2 del gen de la creatina quinasa muscular (CK) amb la del gen ANT1. B) Comparació de les seqüències ETS del gen de la estromelina de rata (SML), NRF2 del gen de la subunitat IV de la citocrom c oxidasa i del gen ANT1.

extractes de fetge com de cor. A prop del pou apareix de forma feble però constant un complex només amb extracte de cor. Aquest desapareix en presència d'un excés de l'oligonucleòtid MEF2 però no en presència d'altres oligonucleòtids com NRF2. Això ens indica que la mateixa proteïna que forma aquest complex reconeix la seqüència a la que es lliga específicament MEF2 i que per tant existiria en el gen *ant1* una possible regió reguladora amb característiques de MEF2. La figura 4 mostra un exemple d'anàlisi de retardament en gel amb un fragment de 140 pb que conté la possible regió NRF2. Es pot observar una banda minoritària tant amb extractes de fetge com de cor que desapareix quan hi ha un excés d'oligonucleòtid NRF2 però no en presència dels oligonucleòtids ETS i MEF2. Aquests resultats ens indiquen que existeix una regió que seria reconeguda específicament per NRF2. La conclusió d'aquests experiments inicials seria que la regió proximal 5' del gen *ant1* conté dues possibles regions reguladores. Una podria estar implicada en la seva regulació múscul específica probablement mitjançant proteïnes MEF2. L'altra podria estar implicada en la regulació de la seva expressió de forma coordinada amb altres proteïnes mitocondrials, probablement mitjançant el factor NRF2. En

PURIFICACIÓ DE CF-2 A PARTIR DE NÚCLIS DE HEPATOCITIS DE RATA

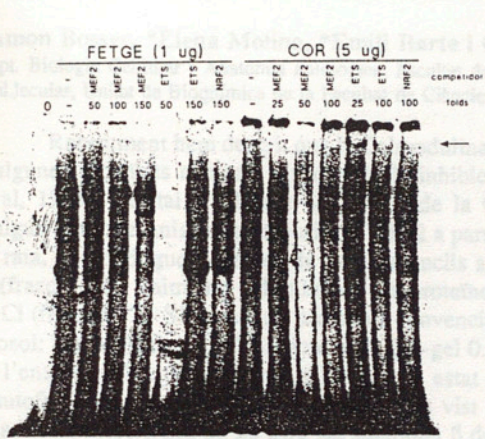


FIG 3. Anàlisi de retardament en gel. Fragment de 200 pb. La banda corresponent a MEF2 s'indica amb una fletxa.

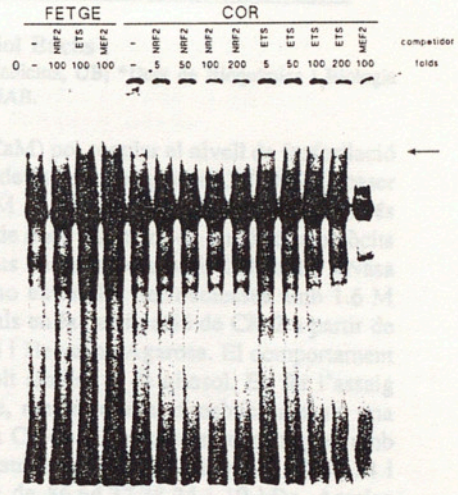


FIG 4. Anàlisi de retardament en gel. Fragment de 133 pb. La banda corresponent a NRF2 s'indica amb una fletxa.

l'actualitat s'estan realitzant els estudis sobre la funcionalitat d'aquestes regions. Experiments preliminars de transfecció transitòria en cèl.lules de la línia muscular de ratolí C2C12 d'una construcció (-397)ANT1-CAT (que conté 400 pb de la regió 5' del gen humà ANT1 clonades en pBLCAT3) mostren que aquesta construcció és transcripcionalment activa.

BIBLIOGRAFIA

- Cserjesi,P,Olson,EN. 1991 Mol Cell Biol 11:4854-4862.
- Cozens,AL,Runswick,MJ,Walker,JE. 1989 J Mol Biol 206:261-280.
- Gorsky,K,Carneiro,M,Schibler,U. 1986 Cell 47:767-776.
- Gossett,LA,Kelvin,DJ,Sternberg,EA,Olson,EN. 1989 Mol Cell Biol 9:5022-5033.
- Ku,HD,Kagan,J,Chen,ST,Chang,CD,Baserga,R,Wurzel,J. 1990 J.Biol Chem 265: 16060-16063.
- Landschulz,WH,Johnson,PF,Adashi,EY,Graves,BJ,McKnight,SL. 1988 Genes Dev 2:786-800.
- Li,K,Hodge,JA,Wallace,DC. 1990 J Biol Chem 265:20585-20588.
- Li,K,Warner,CK,Hodge,JA,Minoshima,S,Kudoh,J,Kukuyama,R,Maekawa,M, Shimizu,Y,Shimizu,N,Wallace,DC. 1989 J Biol Chem 264:13998-14004.
- Virbasius,JV,Scarpulla,RC. 1991 Mol Cell Biol 11:5631-5638.
- Wasylyk,C,Gutman,A,Nicholson,R,Wasylyk,B. 1991 EMBO J 10:1127-1134.