

DIFERENCIACIÓ MUSCULAR I REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE LA
ESTUDI ESTRUCTURAL I FUNCIONAL DEL GEN PER LA HIDROXIMETIL-
GLUTARIL CoA SINTASA 2 DE *BLATTELLA GERMANICA*

Núria Casals, Carlos Buesa, José Martínez i Fausto G. Hegardt.
Unitat de Bioquímica. Dept. Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició.
Fac. de Farmàcia. Univ. de Barcelona.

L'enzim hidroximetil-glutaril CoA (HMG-CoA) sintasa catalitza la síntesi d'HMG-CoA a partir d'acetil-CoA i acetoacetat. L'HMG-CoA és després reduït a mevalonat, precursor d'una sèrie de isoprenoids essencials pel creixement i diferenciació dels insectes, tals com Hormona Juvenil, dolicol, proteïnes farnesilades, etc. Aquests organismes són incapaços de fabricar colesterol a partir de mevalonat, i l'obtenen a partir de la dieta. Es per això que aquest sistema esdevé un bon model per estudiar la regulació de la via del mevalonat independent de colesterol.

Al nostre laboratori s'han clonat i seqüenciat dos cDNAs diferents per l'HMG-CoA sintasa de l'escarabat de cuina *blattella germanica*, el que indica l'existència de dos gens diferents (sintasaBg1 i sintasaBg2) per a una mateixa activitat enzimàtica. Posteriorment hem construït una genoteca en Charon 35 i hem aïllat diferents clons genòmics per a les dues sintases. L'estudi estructural del gen de la sintasa2 indica que té un tamany de 1,6 Kilobases, igual que el corresponent cDNA, degut a que no presenta cap intró a la seva seqüència. Tampoc es troba cap seqüència TATA ni cap motiu CG a la zona 5' del gen o promotora. Sí es troba, però, la seqüència consensus ATCATTC d'inici de transcripció a *Drosophila* (1) situada a -100 de la metionina inicial. La zona 3' del gen acaba amb dos adenines, però no considerem que sigui una cua de poly A pròpia dels pseudogens.

Estudis de Northern blot demostren que aquest gen s'expressa amb uns nivells molt baixos a ovari, cervell i cos gras.

S'han realitzat estudis funcionals mitjançant la transfecció en cèl·lules de *Drosophila melanogaster* (Schneider SL2) de 800 bp de la zona 5' del gen sintasaBg2 unida al gen reporter CAT (plasmid pS2CAT). Els resultats obtinguts indiquen que l'expressió d'aquest gen en aquest sistema és molt baixa, molt similar a la del plasmid control (gen reporter CAT sense cap promotor al davant). L'addició de mevalonat 10 mM al medi provoca una disminució de l'expressió en un 50%, l'addició de mevilonina o lovastatina 3uM (inhibidors de la HMG-CoA reductasa) no provoca cap alteració de la transcripció de pS2CAT. Estan en realització experiments que utilitzen efectors propis dels insectes: Hormona Juvenil, ecdisona, alostatines, etc.

(1) Hultmark et al. (1986) Cell, 44, 429-438.

DIFERENCIACIO MUSCULAR I REGULACIO TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE LA β -ATP SINTETASA MITOCONDRIAL.

J.A.Villena, I.Martin, R.Iglesias, T.Mampel, O.Viñas, M.Giralt, F.Villarroya.

Departament de Bioquímica i Fisiologia. Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular B. Universitat de Barcelona.

RESUM

S'ha estudiat l'expressió transitòria de CAT dirigida pel fragment -793/+89 del gen de la subunitat β de la FOF1-ATP sintetasa mitocondrial humana mitjançant transfecció a cèl.lules C2C12 diferenciades (miotubs) o abans de la diferenciació (mioblasts). Els resultats indiquen que el fragment estudiat conté elements en cis implicats en l'elevada expressió associada a la diferenciació muscular. L'anàlisi de l'expressió de mutants per selecció en 5' indica que aquests elements es troben entre -385/-249 i són actius només en cèl.lules musculars diferenciades. Altres elements situats més 5' i que a partir de la seqüència de DNA podrien estar relacionats amb l'expressió preferent a múscul (CARG box -646/-636, MEF-2 -569/-558, OXBOX -466/-453) no es mostren implicats. Dins la regió responsable de l'elevada expressió en miotubs existeixen tres seqüències adjacents capaces d'unir-se a proteïnes de la família ETS. Anàlisis de retard en gel utilitzant extractes nuclears de mioblasts o miotubs indiquen que aquesta regió s'uneix a proteïnes presents específicament a miotubs i absents a mioblasts.

INTRODUCCIO

La subunitat β de la FOF1-ATP sintetasa mitocondrial (β -ATPasa) és una proteïna clau per a la síntesi d'ATP en la fosforilació oxidativa. En mamífers és codificada pel genoma nuclear i, a diferència d'altres proteïnes de membrana mitocondrial, per un gen de còpia única. Aquest gen té una estructura del promotor peculiar (manca d'element TATA, quatre CCAAT box, dos inicis de transcripció), intermèdia entre la pròpia de gens regulats i gens "housekeeping" (1). L'expressió de la β -ATPasa és ubiqua però molt elevada en teixit muscular i cardíac. Així mateix, hi ha una elevada expressió en cèl.lules en activa proliferació respecte a cèl.lules quiescents. En general, dins el procés de diferenciació muscular estudiat en cèl.lules en cultiu, l'activa proliferació cel.lular (mioblasts) i la diferenciació (formació de miotubs) són fenòmens mútuament excloents. El patró d'expressió gènica propi de la cèl.lula muscular diferenciada (miotub) és doncs incompatible amb el de la cèl.lula predeterminada en activa proliferació (mioblast) (2). La coexistència en un mateix gen d'elements que determinen una elevada expressió en ambdues situacions és un fenomen peculiar per al que l'estudi del gen β -ATPasa és un bon model. L'objectiu del present treball ha estat estudiar quins són els elements en cis responsables de la regulació transcripcional del gen β -ATPasa en cèl.lules musculars en diferent estadi de diferenciació.

METODOLOGIA.

Plasmidis: Hem partit del plasmidi β 900-CAT (3), que conté el fragment -793/+89 del gen de la β -ATPasa humana dirigint l'expressió del gen "reporter" CAT. Els mutants per selecció -385/+89CAT, -249/+89CAT i -222/+89CAT s'han obtingut generant per PCR, amb els oligonucleòtids adients, els fragments corresponents del gen β -ATPasa i posterior clonació en pBLCAT3. El mutant -14/+89 s'ha obtingut aprofitant el lloc PstI romanent del "polilinker" en β 900-CAT i el lloc natural PstI a -14 en el gen β -ATPasa. El plasmidi pRSV- β gal, en què el promotor RSV dirigeix l'expressió de la β -galactosidasa, s'ha emprat com a control intern de transfecció.

Cultius cel·lulars i transfecció: Les cèl·lules C2C12 s'han obtingut d'ATCC (USA). S'han mantingut els cultius de mioblasts amb medi DMEM amb 10% de sèrum de vedella fetal (FCS). Per a les transfeccions transitòries s'ha utilitzat el mètode del fosfat càlcic emprant 15 µg de cada construcció CAT juntament amb 10 µg del control intern pRSV-βgal per placa de cultiu de 113 cm² i s'han analitzat les activitats CAT i β-galactosidasa (4) 60 hores després. S'han transfectat cèl·lules confluents de no més de dos dies, i el medi posterior a la transfecció ha estat suplementat amb 2% de sèrum de cavall (HS) o 10% FCS per tal d'accelerar o retardar, respectivament, la diferenciació a miotubs. Els mioblasts han estat també sotmesos a medi amb 10%FCS o 2%HS després d'èsser transfectats a densitat tal que en el temps post-transfecció no s'arribés a confluència.

Assaigs d'interacció DNA-proteïna mitjançant retard en gel: Per als assaigs de retard en gel s'utilitzà DNA marcat amb P³² aprofitant extrems extrusius en 5' i emprant αCTP-P³² i el fragment Klenow de la DNA polimerasa. S'obtingueren extractes nuclears (5) de cèl·lules C2C12 abans de la confluència (mioblasts) o després de la confluència i canvi a 2%HS durant 3-5 dies. Les condicions d'incubació i electroforesi han estat prèviament descrites (6).

RESULTATS

Expressió de CAT dirigida pel fragment -793/+89β-ATPasa en cèl·lules C2C12 (mioblasts o miotubs) sotmeses a diferents condicions de presència de sèrum en el medi de cultiu després de la transfecció.

Com es pot veure a la figura 1, en miotubs existeix un increment de l'expressió de -793/+89CAT en presència de 2%HS respecte a 10% FCS, observant-se una clara correlació entre el grau de diferenciació dels miotubs i l'expressió del promotor. Pel contrari, quan es transfecten mioblasts s'observa un efecte oposat: 10% FCS incrementa l'expressió respecte a 2%HS. L'efecte d'una concentració alta de sèrum estimulant l'expressió de -793/+89 CAT és anàloga al que hem observat en transfectar cèl·lules no musculars com HeLa o NIH3T3 (dades no mostrades).

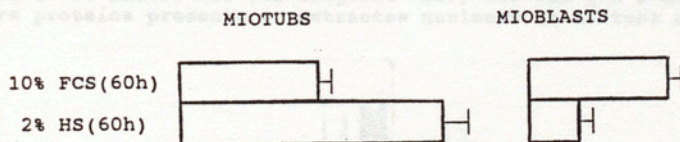


Figura 1. Expressió transitòria de -793/+89 β-ATPasa CAT. Les dades són mitjanes ± SEM per a quantitats equivalents d'activitat β galactosidasa en mioblasts o en miotubs. El valor corresponent a 10% FCS ha estat ajustat a 100%

Anàlisi de l'activitat CAT dirigida per deleccions en 5' de -793/+89 β-ATPasa en mioblasts i miotubs.

Tal i com es pot veure a la Figura 2, la repercussió de les deleccions sobre l'expressió de CAT és diferent en funció de l'estat de diferenciació de les cèl·lules en què s'expressa. En mioblasts, la manca de la regió entre -793 i -385 dona lloc a una disminució d'activitat, mentre que posteriorment aquesta no es redueix més fins a deleccionar el fragment entre -385 i -249 que conté la caixa CCAAT més en 5' del promotor. Pel contrari en miotubs, la delecció entre -793 i -385 no inhibeix sinó que incrementa lleugerament l'expressió. És sobretot l'eliminació del fragment -385/-249 el què redueix dràsticament l'activitat, que es va reduint després progressivament en eliminar -249/-222 i -222/-17.

		C2C12 Mioblasts	C2C12 Miotubs
-793	+89	100±20	100±2
-385	+89	63±11	160±28
-249	+89	48±17	42±8
-222	+89	64±18	36±11
-14	+89	14±3	20±7

Figura 2. Expressió transitòria de diferents deleccions en 5' de -793/+89 β -ATPasa CAT. Les dades són mitjanes \pm SEM per a quantitats equivalents d'activitat β galactosidasa en mioblasts o en miotubs. Els valors corresponents a l'expressió de -793/+89 β -ATPasa CAT en mioblasts o miotubs s'han ajustat al 100%

Anàlisi de la interacció del fragment -309/-268 del gen β -ATPasa amb factors proteics presents en extractes nuclears de miotubs o mioblasts.

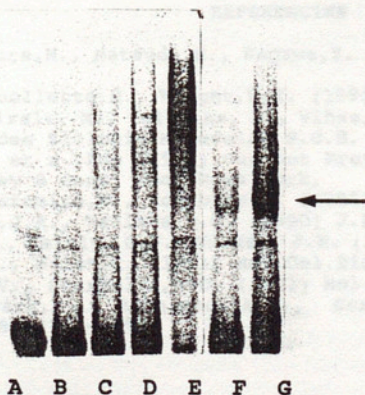


Figura 3: Anàlisi de retard en gel del fragment -309/-268 incubat en absència de proteïna (A), amb 0.4 μ g (B), 2 μ g (C) 4 μ g (D) o 8 μ g (E) de proteïna d'extracte nuclear de mioblast i amb 1 μ g (F) o 7 μ g (G) de proteïna d'extracte nuclear de miotubs. La principal banda de retard, present només a miotubs, s'indica amb una fletxa.

S'ha determinat la possible interacció de proteïnes nuclears presents en miotubs o mioblasts amb la regió -385/+89 del gen β -ATPasa. Com es pot observar en la figura 3, assaigs de retard en gel utilitzant el fragment -309/-268 han permès detectar la presència de factor/s proteic/s presents en miotubs i absents en mioblasts capaços d'interaccionar amb aquesta regió.

DISCUSSIO

Els resultats anteriors indiquen que el fragment -793/+89 dirigeix l'expressió de CAT de la mateixa forma que el que es coneix per al gen endogen: elevada expressió en funció de la proliferació en cèl.lules no diferenciades i en funció del grau de diferenciació muscular en cèl.lules quiescents. Les regions en cis responsables de l'expressió de -793/+89 són diferents segons l'estat de diferenciació de les cèl.lules C2C12. El fet de que la delecció del fragment -793/-385 no repercuteixi en l'expressió en miotubs però sí en mioblasts indica que seqüències com OXBOX (-466/-453) (6) i MEF-2 (-569/-558) (7) no estan implicades en l'expressió de β -ATPasa en la cèl.lula muscular diferenciada. La presència d'una seqüència de tipus "CARC box" (-646/-636), que en principi podria estar implicada tant en l'expressió específica a múscul com en la resposta a sèrum (8), és en aquest cas compatible amb la importància d'aquesta regió per a l'elevada expressió en mioblasts en activa proliferació però no amb una expressió elevada en cèl.lula muscular diferenciada. La regió principalment implicada en l'expressió a miotubs és la compresa entre -385/-249. Dins aquesta regió havíem identificat prèviament elements que uneixen el receptor d'hormones tiroïdals i especialment la presència de tres seqüències que unien proteïnes de la família ETS presents a fetge (3). Hem establert que hi ha factors proteics específics en la cèl.lula muscular diferenciada i absents en mioblasts, capaços d'unir-se a la regió que conté els tres elements tipus ETS. La identitat d'aquests factors com a pertanyents o no a la família ETS és per determinar. No obstant cal assenyalar que membres d'aquesta família de factors de transcripció s'han descrit recentment com implicats en la regulació transcripcional de dos altres gens nuclears per a proteïnes mitocondrials (subunitats de la citocrom oxidasa COXIV i COXVb) (9,10). Les perspectives de del present treball es centren doncs en establir la identitat precisa dels elements en cis implicats en l'expressió elevada del gen de la β -ATPasa en la cèl.lula muscular i dels factors proteics específics que hi interactuen.

REFERENCIES

- 1.-Ohta, S., Tomura, H., Matsuda, K., Kagawa, Y. (1988) J.Biol.Chem. 263, 11257-11262.
- 2.-Funk, W.D., Ouellette, M., Wright, W.E. (1991) Mol.Biol.Med. 8, 185-195.
- 3.-Martin, I., Giralt, M., Iglesias, R., Viñas, O., Mampel, T., Villarroya, F. (1992) IX Jornades Biologia Molecular S.C.B.
- 4.-Ausubel, F.M. et al., Eds (1987) Current Protocols in Molecular Biology Vol 1 i 2. John Wiley & Sons, Inc. Nova York.
- 5.-Gorski, K., Carneiro, M., Schibler, U. (1986) Cell 47, 767-776.
- 6.-Li, K., Hodge, J.A., Wallace, D.C. (1990) J.Biol.Chem. 265, 20585-20588.
- 7.-Gossett, L.A., Kelvin, D.J., Walker, J.E. (1989) Mol.Cel.Biol. 9, 5022-5033.
- 8.-Santoro, I.M., Walsh, K. (1991) Mol.Cel.Biol. 11, 6296-6305.
- 9.-Virbasius, J.V., Scarpulla, R.C. (1991) Mol.Cel.Biol. 11, 5631-5638.
- 10.-Basu, A., Park, K., Atchinson, M.L., Carter, R.S., Avadhani, N. (1993) J.Biol.Chem. 268, 4188-4196.