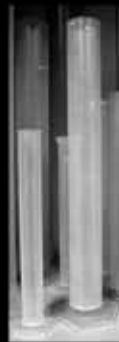


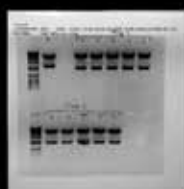
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona

# 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

A dense pile of clear, conical microcentrifuge tubes, likely Eppendorf tubes, filling the bottom third of the page. The tubes are scattered and overlapping, creating a textured, repetitive pattern.

# ***introducció***



## 1. La cèl·lula i la seva interacció amb l'entorn.

Les cèl·lules són les unitats estructurals i funcionals de tots els organismes vius. En general s'accepta que cap organisme és un organisme viu si no consta com a mínim d'una cèl·lula. Tota cèl·lula ha estat originada a partir d'una altra cèl·lula, per divisió d'aquesta. Per poder comprendre com funciona un cos humà, com es desenvolupa i envella i què falla en cas de malaltia és imprescindible conèixer les cèl·lules que el constitueixen.

Per sobreviure i exercir les seves funcions una cèl·lula ha de respondre a determinats estímuls o senyals; aquests estímuls poden ser molt diversos (**taula 1**) i representen una informació vital per a la cèl·lula sobre l'entorn en què viu. Per poder-hi respondre les cèl·lules tenen receptors. Un receptor és una proteïna que s'uneix a una molècula específica (el lligand) i inicia una resposta cel·lular a aquest, que sempre implica un procés químic. Aquesta conversió de la informació en un canvi químic s'anomena transducció de senyal i és una propietat universal de totes les cèl·lules. Per tant els canvis en el comportament del receptor induïts pel lligand tenen com a conseqüència canvis fisiològics que constitueixen les accions biològiques dels lligands. En funció de la naturalesa del lligand i de la seva capacitat per travessar membranes els receptors es poden trobar a la membrana de la cèl·lula o a l'interior d'aquesta.

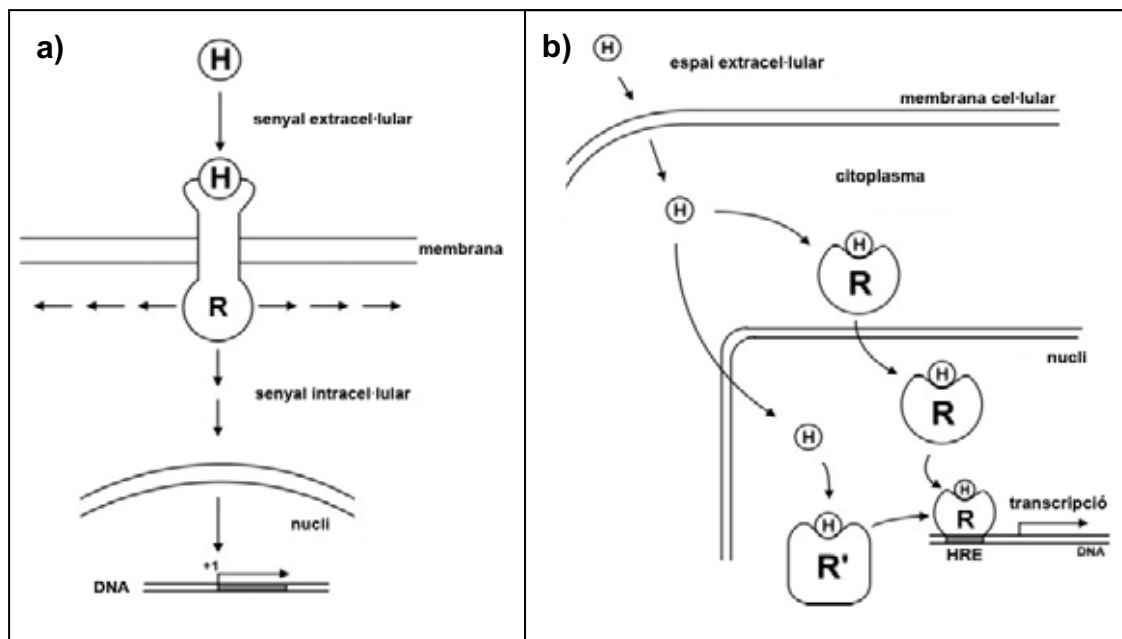
**Taula 1. Algunes de les senyals a les quals respon una cèl·lula**

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| • Antígens  | • Llum                  |
| • Components de la matriu extracel·lular                    | • Neurotransmissors     |
| • Factors de creixement                                     | • Nutrients             |
| • Feromones   | • Partícules olfactivas |
| • Glicoproteïnes o oligosacàrids de la superfície cel·lular | • Partícules gustatives |
| • Hormones  | • Pressió mecànica      |

Una hormona és un senyal químic que és secretat a la sang per una glàndula endocrina o un òrgan amb propietats endocrines. La sang porta la hormona fins a totes les cèl·lules del cos, però tan sols les cèl·lules diana per a aquella hormona poden respondre-hi. Les

## Introducció

hormones que són massa grans o massa polars per travessar membranes plasmàtiques regulen les seves cèl·lules diana sense entrar-hi: s'uneixen a receptors localitzats a la superfície exterior de la membrana plasmàtica. Per aquest motiu és necessari que dins de la cèl·lula es produeixi un segon missatger per produir els efectes de l'hormona. La interacció entre l'hormona i el seu receptor activa mecanismes a la membrana plasmàtica que incrementen la concentració de missatgers secundaris al citoplasma de la cèl·lula diana (**figura 1a**). Aquest missatger secundari serà el que finalment produirà els efectes derivats de l'hormona a la cèl·lula diana. Així els receptors de membrana poden ser ionotròpics o metabotròpics. Els receptors ionotròpics són canals que s'obren quan el lligand s'uneix al receptor; el missatger secundari serà, en aquest cas, l'ió que deixa passar el canal que s'ha obert. Els receptors metabotròpics estan associats a enzims, l'activitat dels quals serà la que generarà el missatger secundari a l'interior de la cèl·lula.



**Figura 1.** a) receptor transmembrana que converteix la senyal extracel·lular en intracel·lular fins que arriba al nucli; b) l'hormona entra al nucli i s'uneix al receptor nuclear al nucli o al citosol. (adaptat de Krauss, 2003)

Les hormones lipòfiles (on s'inclouen les hormones esteroïdals i la hormona tiroïdal), així com altres molècules reguladores lipòfiles (com els retinoides o la vitamina A) poden entrar fàcilment a la cèl·lula ja que la membrana cel·lular no representa una

barrera per a l'entrada de reguladors lipòfils. En aquest cas els receptors seran intracel·lulars i la unió del lligand produirà un canvi en l'activitat de proteïnes cel·lulars. Els receptors intracel·lulars sovint poden entrar al nucli i regular l'expressió gènica en resposta a l'activació del lligand (**figura 1b**).

## 2. El DNA com a material genètic.

El gen és la unitat bàsica d'herència dels éssers vius. Un gen per tant és la partícula de material genètic que determina l'herència d'una determinada característica o conjunt de característiques. Els gens estan fets de DNA. Aquesta molècula conté tota la informació necessària per fer una cèl·lula, i és capaç de transmetre aquesta informació quan la cèl·lula es divideix.

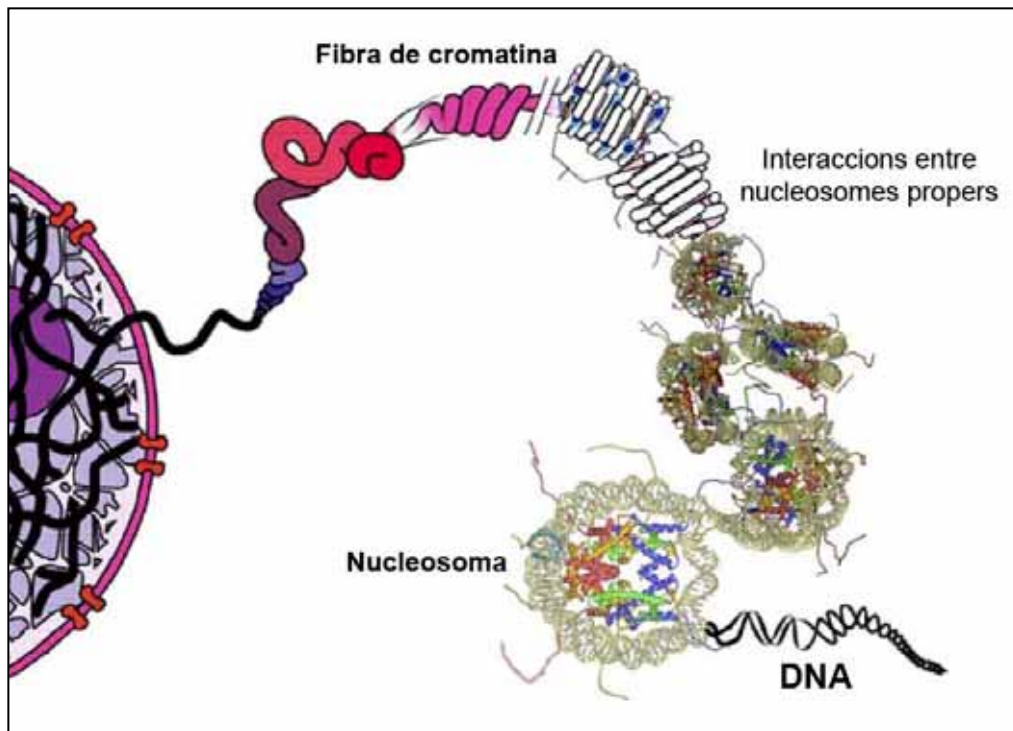
El DNA dirigeix la síntesi de proteïnes a través d'una molècula intermediària, l'RNA. La informació del DNA es passa a RNA en el procés anomenat transcripció, i l'RNA és aleshores traduït a una seqüència d'aminoàcids en la síntesi proteica. Aquest és el dogma central de la biologia molecular: la informació genètica passa del DNA a l'RNA, i d'aquest a les proteïnes. Els retrovirus són una excepció a aquesta regla: són capaços de fer una molècula de DNA a partir d'un RNA, en un procés anomenat transcripció reversa.

Per contenir tota la informació necessària per fer una cèl·lula calen molècules de DNA molts grans; això fa que s'hagin empaquetar per poder-les encabir dins el nucli de la cèl·lula. Això es soluciona unint el DNA a proteïnes per formar la cromatina. El DNA s'uneix a proteïnes conegudes com histones; les histones estan carregades positivament perquè contenen una gran quantitat d'aminoàcids carregats positivament, arginina i lisina; això els permet unir-se als fosfats carregats negativament del DNA. Una seqüència de 146 parells de bases s'uneix al voltant d'un complex proteic format per 4 histones diferents (H2A, H2B, H3, i H4) per formar un nucleosoma. Una cinquena histona, la histona H1, s'uneix al DNA que hi ha entre dos nucleosomes i els ajunta per empaquetar encara més el DNA formant fibres de cromatina. Aquestes fibres encara pateixen posteriors passos d'empaquetament fins a formar l'estructura altament empaquetada que és la cromatina (**figura 2**). L'accessibilitat del DNA que està en forma de cromatina és molt diferent de la d'un DNA lineal lliure de proteïnes. Això té



## Introducció

conseqüències molt importants en tots aquells processos que utilitzen el DNA com a substrat, com ara la reparació del DNA, la replicació o la transcripció. Com veurem més endavant per poder tenir regions de DNA transcripcionalment actives cal modificar aquesta estructura per fer-la més accessible a les proteïnes que efectuaran la transcripció.



**Figura 2.** Compactació del DNA per formar la cromatina (adaptat de Luger, 2003)

La seqüenciació dels genomes de diferents organismes ha aportat la sorpresa de que organismes suposadament complexes tenen un nombre de gens inferior al que s'esperava. Així la seqüenciació del genoma humà ha permès determinar que el nombre de gens en humans es situa al voltant dels 23.000 (font: Ensembl), menys del doble que la mosca del vinagre (*drosophila melannogaster*) i força menys dels 100.000 que s'esperaven (**taula 2**). Hi ha dos factors que permeten a genomes com l'humà generar un organisme més complex. Primer l'expressió dels diferents gens està molt més controlada, amb molta més seqüència de DNA i moltes més proteïnes dedicades a aquest control: aproximadament el 5-10% de les proteïnes codificades per organismes complexes són proteïnes que regulen la transcripció (Levine et al., 2003). Segon la

relació entre el nombre de gens i el de productes d'aquests (bàsicament proteïnes) no és de 1 a 1. Com veurem el procés anomenat 'splicing' alternatiu permet que es produeixin diferents proteïnes del mateix gen. S'estima que al voltant del 50% dels gens humans pateixen 'splicing' alternatiu (Sharp, 2005).

Taula 2. Nombre de gens a diversos organismes	
Organisme	Nombre de gens
• Bacteri - <i>Haemophilus influenzae</i>	1709
• Llevat - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6.697
• Mosca - <i>Drosophila melanogaster</i>	14.039
• Cuc - <i>Caenorhabditis elegans</i>	20.069
• Planta - <i>Arabidopsis thaliana</i>	25.498
• Humà - <i>Homo sapiens</i>	22.680

### 3. L'expressió gènica.

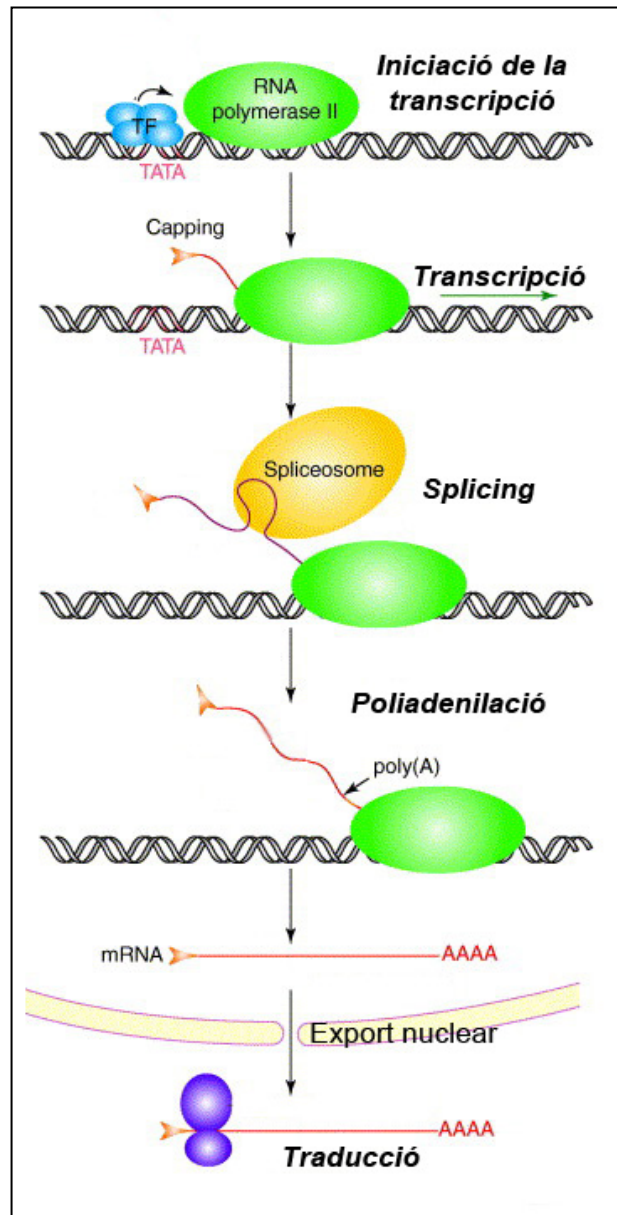
Els productes finals de l'expressió dels gens són bàsicament proteïnes (tot i que en alguns casos pot ser RNA). Les proteïnes són polímers lineals d'aminoàcids; la seqüència de bases del DNA determina la seqüència d'aminoàcids de les proteïnes. Hi ha 20 aminoàcids diferents però tan sols 4 bases diferents de DNA. Cada aminoàcid és especificat per un codó, un grup de tres bases. La traducció de la seqüència de DNA de codons a aminoàcids es fa a través d'una molècula intermediària, l'RNA missatger (mRNA). L'mRNA és el que actua de motllo per guiar la unió dels aminoàcids formant les proteïnes.

A les cèl·lules eucariotes les regions que codifiquen per proteïnes estan organitzades com una sèrie de fragments anomenats exons, separats per unes regions no codificants anomenades introns. En el procés anomenat transcripció, el DNA és copiat generant una cadena de RNA que conté tant introns com exons. Els introns són aleshores eliminats en el procés anomenat 'splicing', generant el mRNA. Això implica que un gen és més gran que l'mRNA que finalment codifica per la proteïna. En l'splicing algunes vegades es poden eliminar exons o fragments d'exons, de manera que el mateix gen pot donar lloc

## Introducció

a diferents mRNAs i per tant a diferents proteïnes. Aquest procés s'anomena splicing alternatiu.

Els mRNAs pateixen altres modificacions abans de sortir del nucli: d'una banda s'afegeix una 7-metilguanosa a l'extrem 5' del RNA, modificació anomenada 'capping'. De l'altra a l'extrem 3' s'afegeix una sèrie de residus d'adenosina, la cua de poli-A (figura 3). Aquestes modificacions juguen un paper important en l'estabilitat del RNA, la sortida del nucli i la traducció a proteïnes.



**Figura 3.** Transcripció, processament de l'RNA i traducció (adaptat de Sharp, 2005).

#### 4. Regulació de l'expressió gènica.

Tots els organismes necessiten per evolucionar correctament i sobreviure que l'expressió dels seus gens estigui controlada de forma precisa, expressant-se tan sols al lloc i en el moment adequats.

En el DNA, les seqüències promotores de la majoria dels gens eucariotes contenen uns elements anomenats caixes TATA situats a uns 25 parells de bases de l'inici de transcripció. Aquests elements permeten la unió de la proteïna TBP (de l'anglès TATA Binding Protein), que és una subunitat del factor de transcripció TFIID. Posteriorment s'uneixen altres factors de transcripció (TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF i TFIIH) al TFIID i a la regió promotora. La RNA polimerasa II, que és l'encarregada de transcriure el DNA en RNA, s'uneix aleshores al factor TFIID i això la situa al començament del gen que ha de transcriure. El complex format pel factor TFIID, la RNA polimerasa II i els altres factors es coneix com el complex de preiniciació de la transcripció.

Alguns gens no tenen caixa TATA al seu promotor. En la majoria de casos aquests gens codifiquen per proteïnes que són necessàries de forma constant (no només en determinats moments o llocs) i es coneixen per aquest motiu com a gens *house-keeping*. Els promotors d'alguns d'aquests gens contenen un altre tipus de seqüència, la caixa GC. Una proteïna anomenada Sp1 s'uneix a la caixa GC i recluta la proteïna TBP al promotor. El complex de pre-iniciació es forma aleshores de la mateixa forma que amb la caixa TATA.

Tot i que en alguns casos la formació del complex de pre-iniciació és suficient per produir algunes molècules de RNA, la unió d'altres proteïnes a seqüències properes al gen incrementen de forma notable la transcripció del DNA, produint moltes més còpies de RNA. Aquestes proteïnes s'anomenen factors de transcripció, i les seqüències de DNA a les que s'uneixen s'anomenen 'enhancers' (activadors). Aquestes seqüències sovint estan a la regió 5' del promotor, però també es poden trobar a la regió 3' o fins i tot als introns del gen. Les seqüències enhancer i les proteïnes que s'hi uneixen juguen un paper molt important en determinar si un determinat gen es transcriu o no en un determinat teixit i en un determinat moment.

## **Introducció**

### **5. Els Receptors Nuclears.**

Els receptors nuclears són una família de factors de transcripció que regulen l'expressió gènica en resposta a determinats lligands. A diferència dels lligands que s'uneixen als receptors de superfície de la cèl·lula, els lligands dels receptors nuclears són molècules petites i lipòfiles que poden travessar la membrana plasmàtica i entrar a l'interior de la cèl·lula, on els receptors nuclears en transduiran la senyal.

Els receptors nuclears s'uneixen als seus elements de resposta en la regió promotora dels seus gens diana, i en regulen l'expressió. La funció primària dels receptors nuclears es pot veure essencialment com la de regular l'accés de la maquinària de transcripció basal al promotor per iniciar la transcripció. Aquesta funció és exercida a través de la unió d'unes altres proteïnes, els coreguladors; aquests poden actuar incrementant la transcripció (coactivadors) o reprimint-la (corepressors). De forma senzilla es podria dir que els receptors nuclears seleccionen quins gens s'han de regular i en quin sentit, mentre que els coreguladors són els que fan efectiva aquesta regulació. La funció dels coreguladors no és exclusiva dels receptors nuclears sinó que són usats de forma similar per altres factors de transcripció.

En els mamífers la superfamília dels receptors nuclears d'hormones comprèn prop de 50 factors de transcripció (**taula 3**), on s'inclouen receptors per hormones esteroïdals, com el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor d'andrògens (AR), el receptor de progesterona (PR) o el receptor de mineralocorticoides (MR); receptors per lligands no esteroïdals, com el receptor d'hormona tiroïdal (TR) i el receptor d'àcid retinoic (RAR); així com receptors per diversos productes del metabolisme de lípids com ara àcids grassos i prostaglandines, com el receptor activador de la proliferació de peroxisomes (PPAR) o l'LXR ('Liver X Receptor'). També s'inclouen en aquesta superfamília els anomenats receptors orfes, pels quals els lligands són encara desconeguts o podrien fins i tot no existir, però que tenen una estructura similar als receptors nuclears. Un cop es descobreix quin és el lligand del receptor orfe es diu que es tracta d'un receptor orfe adoptat, com és el cas de l'LXR.

Determinats receptors nuclears es troben presents al nucli fins i tot en absència del lligand corresponent. Aquests receptors són capaços d'actuar com a silenciadors de la

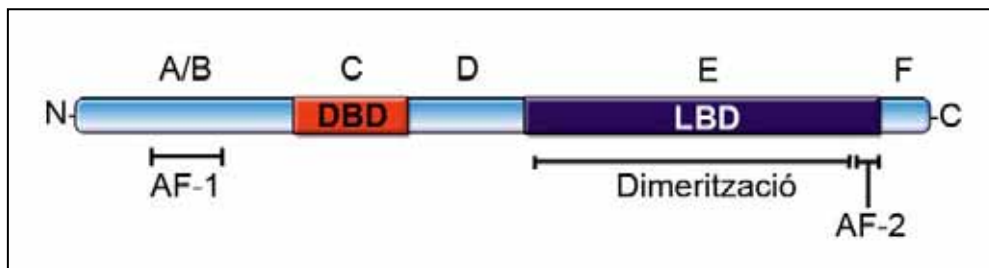
transcripció en absència de lligand, degut a la seva capacitat d'unir complexos de proteïnes corepressores als promotors dels seus gens diana. La unió del lligand provoca un canvi conformacional en el receptor que fa que els complexos corepressors es canviïn per complexos de coactivadors, de manera que es promou la transcripció. És el cas per exemple de TR, PPAR, VDR o RAR.

Taula 3. Receptors nuclears humans, la seva nomenclatura oficial segons el <i>Nuclear Receptor Nomenclature Committee</i> i el seu lligand o si es tracta d'un receptor orfe.		
Nom	Nomenclatura	Lligand
• TR $\alpha$	NR1A1	Hormones tiroïdals
• TR $\beta$	NR1A2	Hormones tiroïdals
• RAR $\alpha$	NR1B1	Àcid retinoic
• RAR $\beta$	NR1B2	Àcid retinoic
• RAR $\gamma$	NR1B3	Àcid retinoic
• PPAR $\alpha$	NR1C1	Àcids grassos, leucotriè B <sub>4</sub> , fibrats
• PPAR $\beta$	NR1C2	Àcids grassos
• PPAR $\gamma$	NR1C3	Àcids grassos, prostaglandina J <sub>2</sub> , tiazolidinacions
• Rev-erba	NR1D1	Orfe
• Rev-erb $\beta$	NR1D2	Orfe
• ROR $\alpha$	NR1F1	Colesterol, colesteril sulfat
• ROR $\beta$	NR1F2	Àcid retinoic
• ROR $\gamma$	NR1F3	Orfe
• LXR $\alpha$	NR1H3	Oxisterols, T0901317, GW3965
• LXR $\beta$	NR1H2	Oxisterols, T0901317, GW3965
• FXR $\alpha$	NR1H4	Àcids biliars, fexaramine
• FXR $\beta$	NR1H5	Lanosterol
• VDR	NR1I1	Vitamina D, 1,25-dihidroxyvitamin D <sub>3</sub>
• PXR	NR1I2	Xenobiòtics, 16-cianopregnenolona
• CAR	NR1I3	Xenobiòtics, fenobarbital
• HNF4 $\alpha$	NR2A1	Orfe
• HNF4 $\gamma$	NR2A2	Orfe
• RXR $\alpha$	NR2B1	Àcid retinoic
• RXR $\beta$	NR2B2	Àcid retinoic
• RXR $\gamma$	NR2B3	Àcid retinoic
• TR2	NR2C1	Orfe
• TR4	NR2C2	Orfe
• TLL	NR2E2	Orfe
• PNR	NR2E3	Orfe
• COUP-TFI	NR2F1	Orfe
• COUP-TFII	NR2F2	Orfe
• EAR2	NR2F6	Orfe
• ER $\alpha$	NR3A1	17- $\beta$ -Estradiol, tamoxifè, raloxifè
• ER $\beta$	NR3A2	17- $\beta$ -Estradiol, diversos compostos sintètics
• ERR $\alpha$	NR3B1	Orfe
• ERR $\beta$	NR3B2	DES, 4-OH tamoxifè
• ERR $\gamma$	NR3B3	DES, 4-OH tamoxifè
• GR	NR3C1	Cortisol, dexametasona, RU486
• MR	NR3C2	Aldosterona, espirolactona
• PR	NR3C3	Progesterona, acetat de medroxyprogesterona, RU486
• AR	NR3C4	Testosterona, flutamida
• NGFI-B	NR4A1	Orfe
• NURR1	NR4A2	Orfe
• NOR1	NR4A3	Orfe
• SF1	NR5A1	Orfe
• LRH-1	NR5A2	Orfe
• GCNF	NR6A1	Orfe
• DAX-1	NR0B1	Orfe
• SHP	NR0B2	Orfe

## Introducció

En altres casos, en absència de lligand el receptor nuclear es troba al citosol, retingut per chaperones del tipus 'heat-shock proteins'. Les chaperones mantenen el receptor en un estat plegat capaç d'unir l'hormona però no d'accedir al DNA. La unió del lligand fa que aquestes proteïnes 'heat-shock' es separin, permetent al receptor nuclear entrar al nucli i activar la transcripció. Aquest és el cas de receptors d'hormones esteroïdals, com GR o ER.

Els receptors nuclears tenen una estructura modular característica que consisteix en cinc o sis dominis d'homologia (designats de la A a la F, sent A el més N-terminal i F el més C-terminal) en base a regions de seqüència i funció conservades (Germain et al., 2006; Krauss, 2003) (**figura 4**).



**Figura 4.** Dominis dels receptors nuclears.

El domini d'unió a DNA (DBD, regió C) i el domini d'unió a lligand (LBD, regió E) són els dominis més conservats. La regió N-terminal A/B i la regió D estan menys conservats. La regió C-terminal F no és present a tots els receptors nuclears, i la seva funció és força desconeguda.

La regió A/B N-terminal conté un domini d'activació de la transcripció anomenat AF-1 ('Activation Function 1'). A diferència de l'altre domini d'activació AF-2, localitzat al LBD, l'AF-1 pot actuar de manera independent de lligand quan es separa del receptor. Tot i això, en el context del receptor, l'activitat de l'AF-1 també està controlada per la unió del lligand al LBD. La seqüència i la mida de la regió A/B és molt variable als diferents receptors nuclears. Aquest domini s'ha demostrat que pot ser diana de diverses modificacions post-traduccionals, i pot interaccionar amb coreguladors o amb altres factors de transcripció.

La regió C és el DBD, que és el domini més conservat. Com veurem més endavant, a través d'aquest domini el receptor nuclear s'uneix a unes seqüències específiques de DNA, anomenades elements de resposta a hormona (HREs). El DBD també és diana de modificacions post-traduccionals, i participa en la localització nuclear i en la interacció amb factors de transcripció i coactivadors.

La regió D és un domini molt poc conservat, i es considera que és un connector entre el DBD i el LBD, actuant com una frontissa i permetent així adoptar al DBD i a l'LBD diferents conformacions evitant impediments estèrics.

A la regió E, l'LBD, podem trobar diferents elements importants per a la funció del receptor. Primerament un domini de dimerització, que possibilita la interacció amb un altre LBD d'un altre receptor. També hi trobem el lloc d'unió a lligand, que és per on els receptors que s'uneixen a lligand interaccionen amb aquest. Per últim també hi trobem el segon domini d'activació de la transcripció, l'AF-2, on s'uneixen els coreguladors per modular la transcripció (descriu amb més detall més endavant). Els receptors nuclears que interaccionen amb proteïnes 'heat-shock' (GR, MR, PR, AR i ER) ho fan també via el LBD.

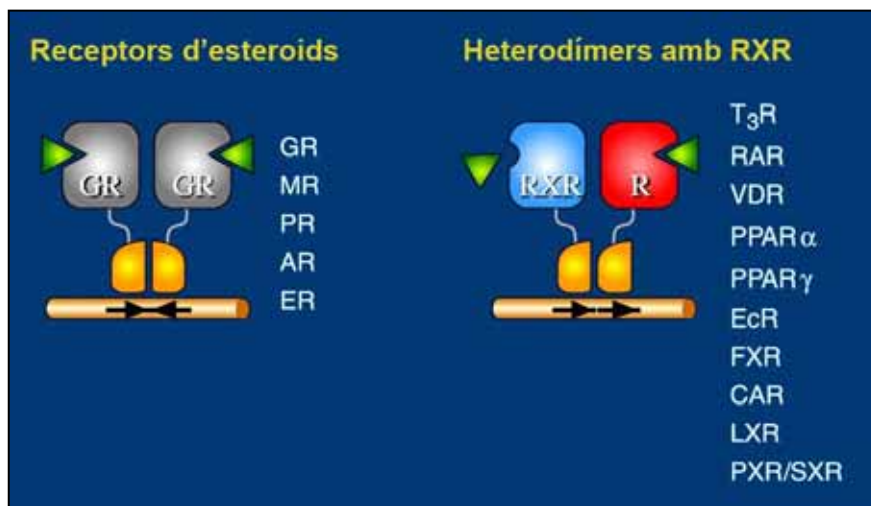
### **6. Els elements de resposta a hormona.**

Com ja hem esmentat els receptors nuclears interaccionen amb seqüències específiques de DNA dels promotors dels seus gens diana, anomenats elements de resposta a hormona (HRE, de l'anglès Hormone Response Element). Els HREs, per tant, posicionen els receptors i els complexos transcripcionals a prop dels gens diana. En alguns casos la unió dels receptors és en forma de monòmer, però en la majoria de casos la unió és en forma de dímers. Així, els HREs es componen normalment de dues seqüències consens de sis parells de bases separades per un espaiador. La diversitat entre els diferents HREs es genera per la posició relativa de les dues seqüències consens. D'aquesta manera les dues meitats del HRE poden estar configurades com a palíndroms, palíndroms invertits o repeticions directes. La longitud de l'espaiador, de 1 a 5 bases, també dóna selectivitat al HRE.



## Introducció

La superfamília dels receptors nuclears es divideix en dos grups en funció del seu patró de dimerització (**figura 5**). El primer grup és el dels receptors d'esteroides, que formen homodímers. En aquest cas l'HRE consisteix en dues repeticions invertides separades per un espaiador de 3 parells de bases. Excepte en el cas d'ER, els receptors d'hormones esteroïdals (GR, MR, AR i PR) reconeixen la seqüència consens 5'-AGAACA-3'; en el cas d'ER la seqüència és 5'-AGGTCA-3'. L'altre grup són els receptors que formen heterodímers amb RXR (Retinoid X Recceptor). En aquest cas l'HRE consisteix en dues repeticions directes de la seqüència consens 5'-AGGTCA-3' amb espaiadors de 1 a 5 parells de bases (Germain et al., 2006).

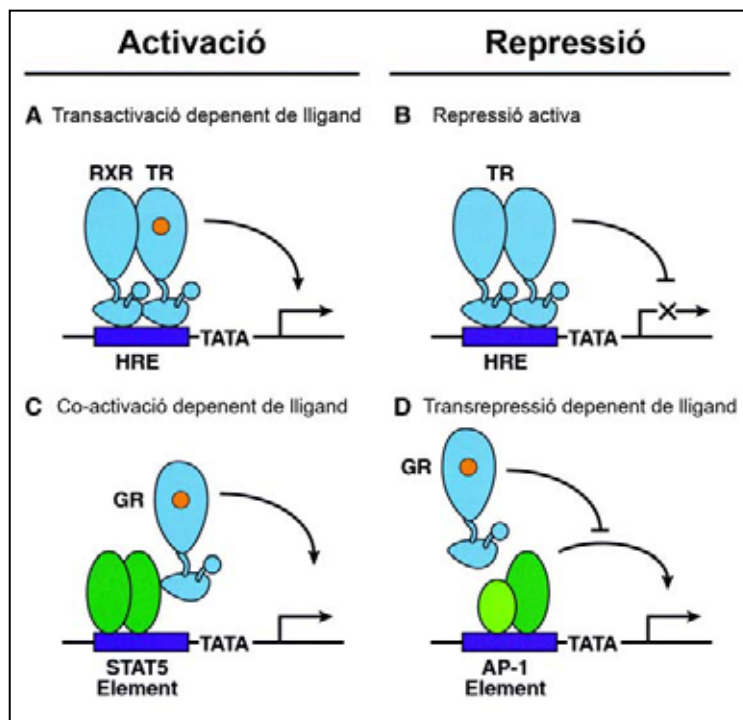


**Figura 5.** Receptors nuclears segons el seu patró de dimerització (adaptat d'Olefsky, 2001)

La seqüència específica de DNA a la que s'uneix el receptor pot actuar com a regulador al·lostèric del reclutament de coreguladors; la informació de la seqüència del HRE es tradueix en canvis conformationals del receptor que tenen conseqüències en el reclutament de coreguladors. D'aquesta manera en diferents HREs un mateix receptor nuclear pot estar reclutant diferents coreguladors, cosa que afectarà a la resposta final que es produirà al promotor (Loven et al., 2001; Klinge et al., 2004).

En alguns casos els receptors nuclears també poden regular la transcripció sense unir-se directament al DNA. En aquests casos actuen modificant l'activació transcripcional produïda per altres factors de transcripció. D'aquesta manera els receptors nuclears poden augmentar l'activació d'un altre factor de transcripció, actuant de manera anàloga

a com ho faria un coactivador, o poden inhibir-ne l'acció, el que s'anomena trans-repressió. Un exemple de tots dos comportaments és GR: aquest receptor interactua amb els factors de transcripció NF- $\kappa$ B i AP-1 i reprimeix així els seus gens diana (**figura 6D**). De fet es pensa que aquest és el principal mecanisme pel qual els glucocorticoides protegeixen de la inflamació, ja que tant NF- $\kappa$ B com AP-1 promouen la transcripció de gens com citoquines, receptors de citoquines o molècules d'adhesió (De Bosscher et al., 2003; Hermoso et al., 2003). D'altra banda la família de factors de transcripció STAT també són regulats per GR. En aquest cas la interacció física de GR amb aquests factors augmenta l'expressió dels seus gens diana, com per exemple la  $\beta$ -caseïna (**figura 6C**) (Stocklin et al., 1996).



**Figura 6.** Mecanismes d'actuació dels receptors nuclears.  
**A)** activació dependent de lligand.  
**B)** repressió en absència de lligand.  
**C)** coactivació d'altres factors de transcripció.  
**D)** Trans-repressió (adaptat de Glass et al., 2000).

## 7. Efectes no genòmics.

Alguns lligands de receptors nuclears tenen també efectes no genòmics, és a dir, que no impliquen directament una modificació de la transcripció. Aquests efectes són a més curt termini que els efectes sobre la transcripció: es poden donar en segons o minuts en front a les hores que calen per les respostes genòmiques a les hormones. En alguns casos aquests efectes estan mitjançats per proteïnes diferents dels receptors clàssics, és a

## **Introducció**

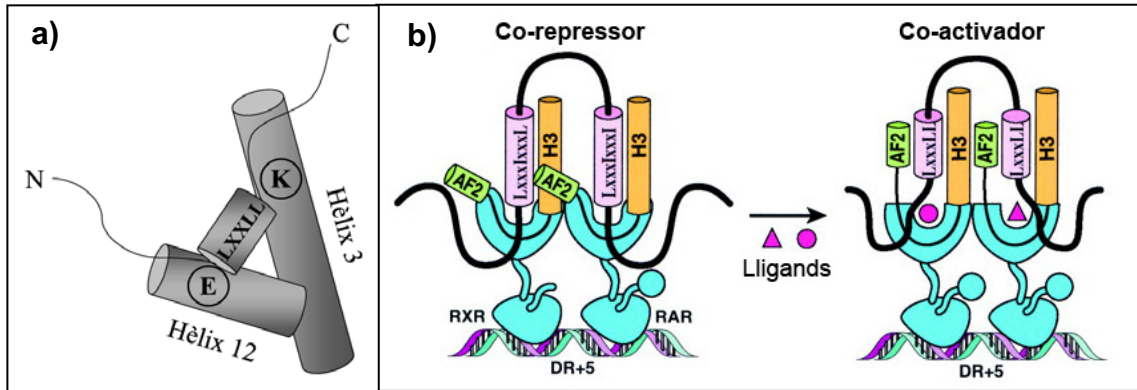
dir, els que vehiculen les accions genòmiques; en altres casos, però, el mateix receptor nuclear és responsable d'alguns d'aquests efectes no genòmics dels seus lligands. En el cas dels glucocorticoides, per exemple, gran part dels efectes no genòmics és vehiculada pel propi receptor de glucocorticoides present al citosol o associat a la membrana. Així s'ha vist que receptors d'esteroides clàssics modulen vies de senyalització com ara cascades de cinases (Losel et al., 2003). En el cas de l'hormona tiroïdal s'han descrit accions no genòmiques localitzades a la membrana plasmàtica, al citoplasma i a certs orgànuls com ara mitocondries. Aquestes accions no genòmiques inclouen la regulació de canals iònics o de la transcripció de gens mitocondrials (Basset et al., 2003). El propi TR és també responsable d'alguns d'aquests efectes no genòmics de l'hormona tiroïdal. En aquest sentit TR unit al seu lligand podria estar regulant la via de la PI3-cinasa/Akt en cèl·lules de l'endoteli vascular, cosa que explicaria els efectes aguts vasodilatadors i neuroprotectors de l'hormona tiroïdal (Hiroi et al., 2006).

La transcripció gènica i les respostes no genòmiques a les hormones es podrien regular recíprocament, de manera que hi hauria una interrelació entre aquestes respostes.

## **8. Interacció entre receptors i coreguladors. La caixa LxxLL.**

Com ja hem esmentat, la majoria de coreguladors s'uneixen a l'LBD dels receptors nuclears. La unió del lligand estabilitza l'hèlix 12 del LBD, que conté el domini de transactivació AF-2, en una posició que genera una estructura que permet la unió del coactivador. Els coactivadors que s'uneixen a l'AF-2 ho fan a través d'un motiu que s'anomena caixa NR, que consisteix en una seqüència 'LxxLL', on 'L' correspon a Leucina i 'x' a qualsevol aminoàcid. Hi ha dos residus del receptor que són importants per aquesta interacció: un Glutamat de l'hèlix 12 i una Lisina de l'hèlix 3 (**figura 7a**), que formen unions d'hidrogen amb la cadena peptídica del motiu LxxLL. D'aquesta manera les cadenes laterals de les leucines s'empaqueten en una cavitat hidrofòbica de la superfície del LBD. En absència de lligand, l'hèlix 12 no està ben posicionada per generar un lloc funcional d'unió de coactivadors. En aquestes condicions s'uneixen al LBD corepressors, i ho fan a través d'una seqüència diferent de la caixa NR, però molt relacionada: 'Lxx I/H Ixxx I/L', on 'L' és leucina, 'I' és Isoleucina, 'H' és Histidina i

'x' qualsevol aminoàcid. Aquesta caixa d'unió dels corepressors es pot veure com una caixa NR més allargada (**figura 7b**).



**Figura 7. a)** Residus de Glutamat i Lisina importants per la interacció (Savkur et al., 2004).  
**b)** Analogia en la interacció amb coactivadors i corepressors (adaptat de Glass et al., 2000).

Tot i que la majoria de coactivadors s'uneixen al domini AF-2 del receptor, la interacció també pot tenir lloc pel domini N-terminal AF-1; és el cas de coactivadors com BRCA1 o ANT-1 (Park et al., 2000; Zhao et al., 2002). A més coactivadors com p300, CBP o SRC-1 interaccionen tant amb l'AF-1 com amb l'AF-2; la interacció amb els dos dominis és important per exercir la completa capacitat transactivadora d'aquests coactivadors (Kobayashi et al., 2000). En alguns casos minoritaris, la unió del coactivador amb el receptor nuclear es pot donar fins i tot per regions del receptor que no siguin ni l'AF-1 ni l'AF-2, com per exemple pel domini D o frontissa del receptor (Jackson et al., 1997).

D'altra banda la caixa LxxLL no està limitada a les unions coactivador↔receptor nuclear; hi ha altres exemples d'interaccions entre proteïnes que utilitzen caixes NR. Alguns coactivadors són en aquest sentit bi-funcionals, és a dir, tenen tant caixes LxxLL com dominis que s'hi uneixen. Els coactivadors CBP i p300, per exemple, tenen la capacitat d'unir caixes LxxLL, com ara les dels factors de transcripció c-Myb i CREB (Zor et al., 2004; Radhakrishnan et al., 1997) o les d'altres coactivadors (Torchia et al., 1997).

### **9. Coactivadors i corepressors.**

La definició de coactivador és purament funcional: l'activació transcripcional, dirigida per 'activadors' que s'uneixen a seqüències específiques de DNA (receptors nuclears o altres factors de transcripció) requereix aquestes proteïnes addicionals anomenades coactivadors.

Cinèticament la iniciació de la transcripció es pot veure com un procés en dos passos: primer, un alliberament de la repressió imposada per l'estructura de la cromatina; després la unió de la maquinària de la RNA polimerasa II i l'inici de la transcripció. En aquest sentit els coactivadors es poden dividir de forma general en dues classes. D'una banda els que modifiquen l'estructura de la cromatina, fent-la més accessible per a proteïnes que s'uneixen al DNA. De l'altra els que interaccionen amb components de la maquinària de transcripció basal, de manera que ajuden a situar la RNA polimerasa II al lloc on s'ha d'iniciar la transcripció.

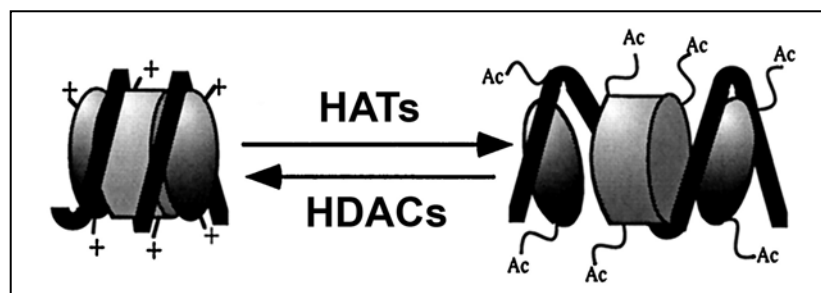
Entre els coactivadors que interaccionen amb la maquinària de transcripció basal hi ha les proteïnes del complex TRAP/DRIP/ARC o 'Mediator'. Aquest complex serveix d'adaptador entre el receptor i l'extrem carboxi-terminal de la RNA polimerasa II (Ito et al., 2001).

Els coactivadors que modifiquen l'estructura de la cromatina tenen en comú que posseeixen una activitat enzimàtica que els dóna aquesta capacitat. Així, els coactivadors de la família p160 (que inclou membres com SRC-1), CBP o p300 tenen activitat Histona Acetil-Transferasa (HAT). Això els permet acetilar les histones, així com altres proteïnes de l'entorn del promotor. L'acetilació de les histones és potser el mecanisme més ben estudiat en l'activació de la transcripció. En ser acetilades, les histones perden part de la càrrega positiva neta que els permet interaccionar fortament amb la càrrega negativa de la cadena de DNA. D'aquesta manera la interacció entre les histones i el DNA es debilita, i l'estructura es fa més accessible (**figura 8**) (McKenna et al., 2002). Altres coactivadors com CARM1 i PRMT1 tenen activitat histona metil-transferasa; la metilació de les histones coopera amb l'acetilació en la remodelació de l'estructura de la cromatina (Chen et al., 1999). Com en el cas de l'acetilació, la metilació també pot afectar a altres proteïnes del promotor. Els coactivadors del

complex SWI/SNF, en canvi, posseeixen la capacitat de remodelar la cromatina dependent d'ATP, però sense modificar les histones covalentment (Martens et al., 2003).

La iniciació de la transcripció és un procés ordenat: coactivadors amb diferent activitat enzimàtica són reclutats al promotor seqüencialment i preparen el camí per a que actuïn els següents coactivadors, que contribueixen a l'alteració del promotor per aconseguir una RNA polimerasa II funcional (Perissi et al., 2005).

Els corepressors, com és lògic, actuen de forma inversa als coactivadors, provocant els canvis en l'estructura de la cromatina en el sentit contrari. Així hi ha coactivadors com NCoR que recluten complexes amb activitat histona desacetilasa (HDAC) (Jones et al., 2003). Desacetilant les histones es torna a generar una estructura compacta amb el DNA, menys accessible (**figura 8**).



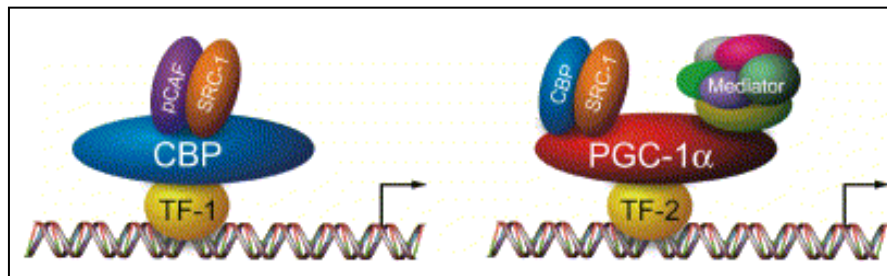
**Figura 8.** Efectes contraris de HATs i HDACs en la compactació de les histones amb el DNA (McKenna et al., 1999).

També trobem complexos SWI/SNF que remodelen la cromatina de forma dependent d'ATP en sentit contrari als coactivadors. En aquest sentit és important considerar que el paper d'un determinat coregulador pot ser dependent de context: en alguns casos el mateix coregulador pot actuar com a coactivador o com a corepressor en funció del context en què es trobi i per tant no sempre és possible predir quin serà el resultat del reclutament d'un determinat coregulador a un promotor (Chiba et al., 1994; Underhill et al., 2000). Alguns coreguladors com TIF2/GRIP-1/SRC-2 tot i ser identificats inicialment com a coactivadors, poden actuar també com a corepressors dependents de promotor (Rogatsky et al., 2001).

## Introducció

Com hem dit, en general els receptors nuclears no units a lligand s'uneixen preferentment a corepressors, mentre que quan estan units a lligand s'uneixen a coactivadors. Tot i això alguns corepressors com LCoR (Ligand-dependent nuclear receptor CoRpressor), RIP140 (Receptor Interacting Protein-140) i REA (Repressor of Estrogen Receptor Activity) poden unir-se a receptors nuclears de manera dependent de lligand, i competir amb els coactivadors per la unió del receptor, desplaçant-los i actuant així com a corepressors. (Delage-Mourroux et al., 2000; White et al., 2004). El balanç entre l'acció dels coactivadors i la dels corepressors defineix la magnitud i naturalesa de les respostes al lligands dels receptors nuclears.

Els coactivadors es poden dividir també en primaris i secundaris. Els que s'uneixen directament al factor de transcripció i tenen una activitat enzimàtica que activa la transcripció es defineixen com a coactivadors primaris. Els coactivadors secundaris s'uneixen al factor de transcripció però la seva funció és la d'unir altres proteïnes que tinguin aquestes activitats enzimàtiques. Així coactivadors com CBP poden actuar de coactivadors primaris o com a proteïna accessòria per un coactivador secundari com PGC-1 (figura 9) (Knutti et al., 2001).



**Figura 9.** Exemple de coactivador primari (CBP) i secundari (PGC-1 $\alpha$ ).

En l'anàlisi dels mecanismes d'acció dels coactivadors la majoria de l'atenció s'ha centrat en la iniciació de la transcripció; tot i això queda cada cop més clar que alguns coactivadors tenen papers en processos posteriors a la iniciació de la transcripció. La regulació de la transcripció és un procés complex que té lloc en diferents passos, on s'inclouen la transcripció, l'splicing, la modificació dels extrems del transcrit (5'-capping i poliadenilació), la sortida del transcrit del nucli i la seva estabilitat. Així proteïnes involucrades en una determinada etapa podrien tenir un paper en etapes

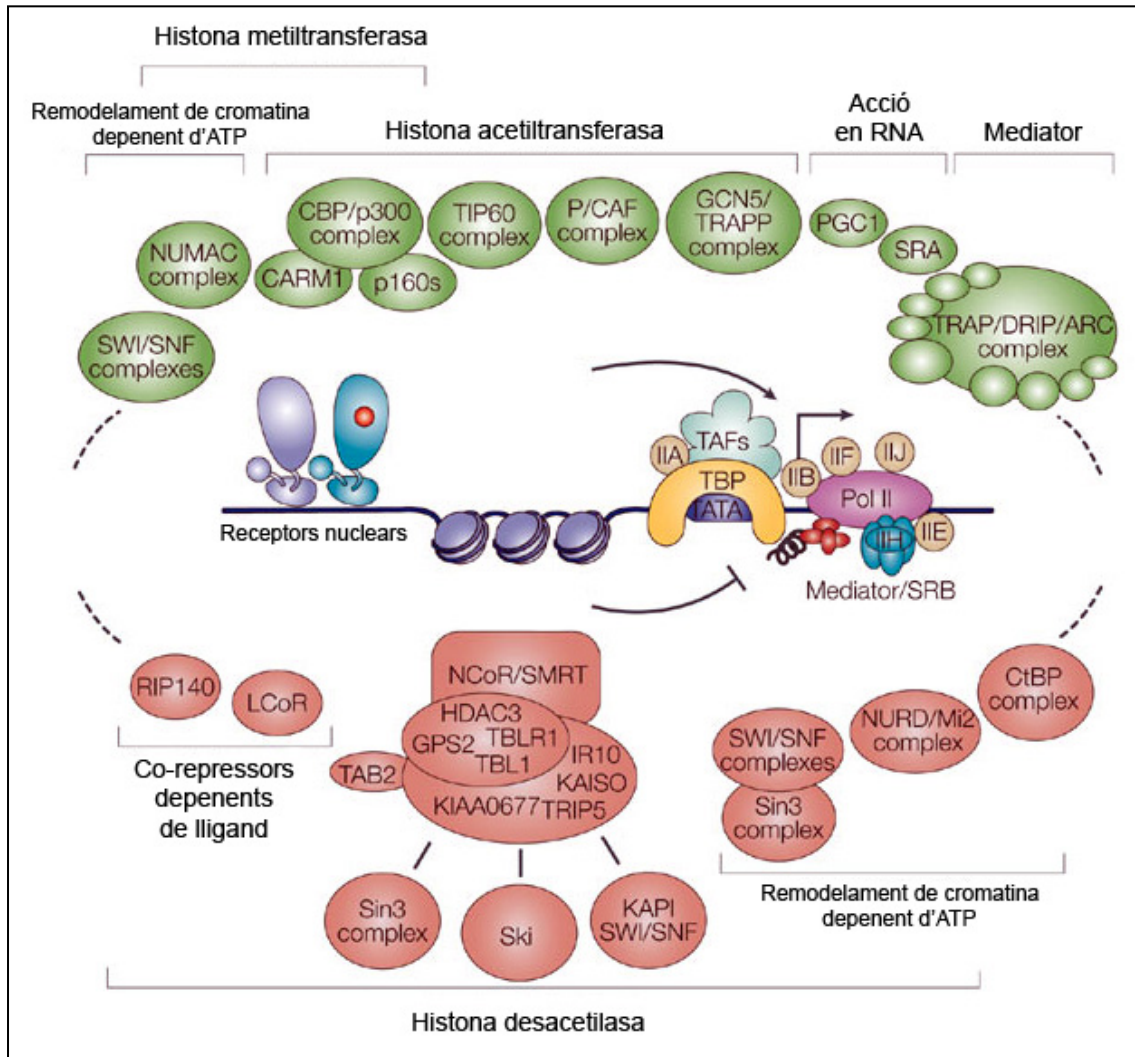
posteriors. Determinats coactivadors poden actuar, a més de en la iniciació de la transcripció, en etapes posteriors com ara en el splicing o fins i tot (i paradoxalment) en l'acabament de la transcripció (Lonard et al., 2005).

En mamífers aproximadament el 60% dels gens tenen diverses formes de splicing; això indica que aquest aspecte de la regulació gènica pot ser un punt important d'actuació per proteïnes reguladores com els coactivadors. En aquest sentit sembla que l'splicing és un procés que podria estar significativament regulat per coreguladors (Auboeuf et al., 2007). Així coactivadors com PGC-1 $\alpha$  tenen dominis d'unió a RNA i participen en el procés d'splicing (Monsalve et al., 2000).

D'altra banda la transcripció és un procés cíclic, i és necessari que acabi per a que pugui tornar a començar. En aquest sentit el sistema de degradació de proteïnes ubiquitina-proteasoma participa també en la transcripció. Coactivadors de la família p160, CBP o p300 són ubiquitinats, i la seva degradació pel proteasoma podria ser un pas necessari per a que altres coactivadors puguin unir-se al receptor i fer la seva funció (Lonard et al., 2005). A més, enzims del sistema ubiquitina-proteasoma són reclutats als promotors de gens diana on actuen com a coactivadors (Nawaz et al., 2004).

Contínuament s'estan descobrint nous coreguladors, i aquests inclouen factors pels quals no era imaginable que tindrien aquesta funció, com ara SRA (Steroid Receptor Activator), un RNA que actua de coactivador de receptors d'hormones esteroïdals (Lanz et al., 1999), o diverses proteïnes que uneixen actina (Loy et al., 2003; Huang et al., 2004). Això fa pensar que la regulació de la transcripció no es pot veure simplement com un procés independent basat en la cromatina sinó que està lligat a molts altres processos cel·lulars. En aquesta complicada xarxa de coreguladors, un gran nombre de proteïnes i activitats enzimàtiques diferents convergeix als promotors, permetent així una regulació molt precisa de l'expressió gènica (**figura 10**).

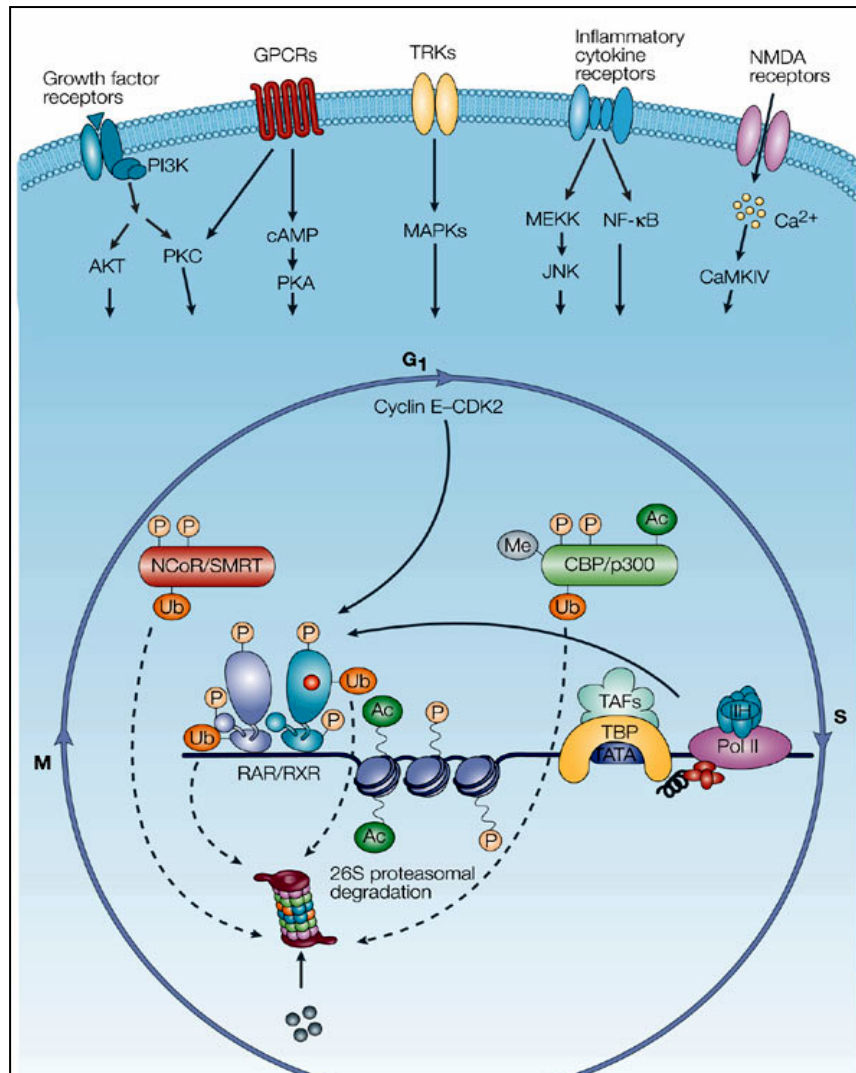




**Figura 10.** Complexes coactivadors i corepressors regulant la transcripció (adaptat de Perissi et al., 2005)

## 10. Receptors nuclears i coreguladors com a diana de vies de transducció de senyal.

Per entendre la globalitat de la regulació de l'activitat transcripcional dels receptors nuclears s'ha de tenir en compte que aquests no solament responen a l'acció de les hormones, sinó que també poden integrar informació derivada d'una gran varietat d'estímuls externs. Diverses vies de senyalització tenen un efecte per mecanismes tant directes com indirectes en les respostes mitjançades per receptors nuclears. Així, l'activitat transcripcional dels receptors nuclears es veu modulada per modificacions post-traduccionals del propi receptor o dels coreguladors que vehiculen la seva funció (**figura 11**).



**Figura 11.** Integració de vies de senyalització en la regulació de la transcripció mitjançada per receptors nuclears i coreguladors (Perissi et al, 2005).

S'han descrit diversos exemples de regulació dels receptors nuclears i dels seus coreguladors per fosforilació, acetilació, metilació, sumoïlació o ubiquitinació, i s'ha vist que aquestes modificacions poden afectar a la localització cel·lular, l'activitat enzimàtica, l'estabilitat o la capacitat d'interacció d'aquestes proteïnes. Així per exemple el receptor de l'àcid retinoic (Rochette-Egly et al., 1995; Delmotte et al., 1999; Kopf et al., 2000), els coactivadors CBP i p300 (Ait-Si-Ali et al., 1998; Chawla et al., 1998; Iwao et al., 1999) i els corepressors NCoR i SMRT (Hong et al., 2000; Jonas et al., 2004) són exemples d'aquests tipus de proteïnes regulats per diferents modificacions post-traduccionals. Això constitueix un important mecanisme en la integració de la resposta cel·lular a estímuls. Es podria dir per tant que les vies de transducció de senyal

## **Introducció**

afegeixen un nou grau de regulació a les funcions dels receptors nuclears i els coreguladors.

### **11. Malalties associades a coreguladors.**

Actualment ja coneixem diversos desordres clínics que s'han associat a anomalies en determinats coreguladors. El primer exemple d'això va ser el coactivador AIB1, el qual es va veure que estava sobreexpressat en càncers de mama i d'ovari (Anzik et al., 1997).

Les anomalies en receptors nuclears tenen com a conseqüència l'alteració de la transactivació dels seus gens diana, i això es tradueix en diverses alteracions fisiològiques. En alguns casos en situacions que clínicament correspondrien a un problema en el receptor nuclear es comprova que aquest determinat receptor no té cap anomalia. Els coreguladors són en aquest cas els principals sospitosos de ser els responsables de les alteracions, ja que vehiculen l'acció dels receptors. En aquest sentit trobem per exemple casos de insensibilitat a andrògens sense que hi hagi cap mutació en el gen del receptor d'andrògens, que es deuen a alteracions en un determinat coactivador (Adachi et al., 2000). La **taula 4** és un resum d'un conjunt de malalties que es creu que estan associades a anomalies en coreguladors, ja sigui per problemes en el propi coregulador o per alteracions en la seva expressió, modificacions post-traduccionals o afinitat en la unió del receptor. És de destacar per la seva relació amb el tema d'aquesta tesi l'associació que es pot trobar entre diferents SNPs del gen de PGC-1 amb la susceptibilitat a desenvolupar diabetis mellitus de tipus 2 (Finck et al., 2006).

A. Coregulator disease	
Rubinstein-Taybi syndrome	CBP gene deletions or mutations
Androgen insensitivity syndrome	AR AF-1 specific coactivator abnormality
Multiple hormone resistance	Absence of any defects in the coregulators examined
Refetoff syndrome	Absence of any defects in the coregulators examined
X-linked dementia and hypothyroidism	TRAP230
B. Diseases with coregulator abnormalities or altered interactions with the coregulators	
a. Altered expression or phosphorylation of the coregulators	
Breast cancer	increased expression of AIB1 phosphorylation of AIB1 increased expression of cyclin D1
Prostate cancer	increased expression of SRA isoform increased expression of TIF2 or SRC-1 synergistic action of BRCA1 with the AR-TIF2 complex activation of cyclin E for AR transcription
Adrenal tumor	correlation between COUP-TF-1 and N-CoR mRNA expression
Huntington's disease	increased expression of CA150
Meningioma	increased expression of TIF2
AIDS	activation of Vpr for GR transactivation
b. Altered binding affinity with the coactivators	
Prostate cancer	increased binding affinity between the mutant ARs and TIF2
Kennedy's disease	decreased binding affinity between the AR polyglutamine repeats and TIF2 or SRC-1
Refetoff syndrome	increased binding affinity between the mutant TR $\beta$ s and SRC-1
c. Altered binding affinity with the corepressors	
Refetoff syndrome	impaired dissociation of corepressors from the mutant TR $\beta$ s

**Taula 4.** Malalties associades a anomalies en coreguladors (Yanase et al., 2004).

## 12. La diabetes mellitus.

Després d'una ingesta d'aliments els nivells de glucosa en sang augmenten; en condicions normals, el pàncrees detecta aquest increment i secreta insulina. La insulina actua en els seus teixits diana (principalment fetge, múscul i teixit adipós) promovent la captació de la glucosa de la sang i fent així que els nivells tornin a ser normals.

En els pacients amb diabetis mellitus aquest sistema de regulació falla i els nivells de glucosa es mantenen elevats. Donat que la glucosa té efectes tòxics a altes concentracions, l'exposició crònica a una concentració de glucosa alta en sang té conseqüències importants per qui la pateix, com ara ceguesa, problemes renals, amputacions d'extremitats i risc elevat d'infart de miocardi o d'accident vascular cerebral. En molts casos a més el pacient no és conscient que pateix la malaltia fins que apareix alguna de les complicacions, la qual cosa agreuja el problema.

## **Introducció**

La diabetis mellitus és una malaltia amb una alta prevalença a les societats industrialitzades, afectant al 6% de la població mundial. La diabetis mellitus de tipus 2 n'és la forma més comú, sent més del 90% dels casos de diabetis. És causada per dos defectes fisiològics: la resistència a l'acció de la insulina combinada amb una deficiència en la seva secreció (Taylor, 1999). En el desenvolupament de la diabetis mellitus de tipus 2 influeixen factors ambientals (bàsicament la dieta i el nivell d'activitat física) i factors genètics. L'obesitat és un factor de risc per al desenvolupament de la diabetis; l'alta prevalença de la diabetis en països desenvolupats s'associa clarament a l'alt nombre de persones amb obesitat (Prisant, 2004).

Pel que fa als factors genètics, en la majoria de casos l'origen de la malaltia és multigènic, és a dir, alteracions a diferents gens (amb l'ajuda de factors ambientals) acaben determinant que es desenvolupi la malaltia (Jenkins et al., 2004). La identificació d'alteracions en gens que predisposin al desenvolupament de la diabetis mellitus és, degut a l'alta prevalença de la malaltia, un objectiu molt important de la investigació biomèdica.

### **13. El múscul esquelètic i els receptors nuclears.**

El múscul esquelètic representa el 40% del total de la massa corporal i és un actor principal en el balanç energètic: representa més del 30% de la despesa energètica i és el principal teixit responsable de la captació i emmagatzemament de glucosa estimulada per insulina. Diversos receptors nuclears que s'expressen al múscul milloren la tolerància a la glucosa, la resistència a la insulina i la dislipèmia (Cha et al., 2001). El múscul esquelètic i els receptors nuclears estan emergent com a potencials dianes en el tractament de l'obesitat, la diabetis mellitus de tipus 2 i la dislipèmia (Lau et al., 1999; Hevener et al., 2003; Dressel et al., 2003).

Entre els receptors nuclears importants al múscul esquelètic trobem els receptors d'hormones tiroïdals (TR), que regulen gens importants metabòlicament com GLUT4 (Moreno et al., 2003) i UCP3 (Queiroz et al., 2004) i modulen l'activitat de diversos enzims del cicle de Krebs (dos Santos et al., 2001). Un altre receptor important en el múscul esquelètic és el receptor de glucocorticoides (GR). L'acció dels glucocorticoides en el múscul esquelètic podria atenuar la senyalització de la insulina per mecanismes

com ara la inhibició de la translocació de GLUT4 a la membrana cel·lular (Coderre et al., 1996). En aquest sentit una activitat anormal de GR al múscul esquelètic podria tenir un efecte rellevant en la resistència a la insulina en la diabetis de tipus 2. Un altre grup de receptors importants al múscul esquelètic són els PPARs. Aquests receptors controlen l'expressió de gens involucrats en homeòstasi de lípids i carbohidrats de forma específica de teixit. El principal PPAR expressat a múscul esquelètic és PPAR $\delta$ , tot i que PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  també hi juguen un paper regulador. Així per exemple PPAR $\gamma$  augmenta la sensibilitat a insulina del múscul esquelètic (Ciaraldi et al., 2002; Verma et al., 2004).

### 14. El gen DOR.

Amb l'objectiu d'identificar gens potencialment involucrats en la fisiopatologia de la diabetis mellitus de tipus 2 i l'obesitat es va realitzar al nostre laboratori un experiment d'hibridació sostractiva (PCR-select cDNA subtraction) amb músculs de rates Zucker ZDF obeses i diabètiques i rates control no diabètiques i no obeses (Bach D., Tesi Doctoral 2002, Universitat de Barcelona). Es van aïllar així diversos clons que estaven diferentment expressats en aquestes dues situacions; un d'ells contenia un insert de 260 parells de bases que estava menys expressat en la rata Zucker obesa i diabètica. Aquest clon va permetre la detecció per Northern Blot (utilitzant l'insert com a sonda) d'un mRNA de 4.5 kilobases a diversos teixits. Se'l va anomenar DOR, de l'anglès Diabetes and Obesity Regulated gene. A través d'aquest cDNA de 260 bp es va analitzar una llibreria de cDNA de cor humà i es van aïllar diversos clons, un dels quals contenia el cDNA sencer del DOR humà. Els cDNAs de DOR de ratolí i de rata també van ser seqüenciats i amplificats.

Es va comprovar el resultat de la hibridació sostractiva per Northern Blot, amb mostres obtingudes de RNA de rates control, Zucker (obes) i Zucker ZDF (obes i diabètiques). Es va confirmar així que en les rates Zucker i Zucker ZDF l'expressió de DOR estava significativament reduïda respecte la rata control.

## ***Introducció***

Posteriorment, mitjançant la tècnica de la PCR competitiva-quantitativa es van analitzar mostres de RNA procedents de músculs humans d'individus control, obesos o diabètics de tipus 2. Es va poder observar així que l'expressió de DOR també està disminuïda en humans obesos o diabètics respecte l'expressió d'individus control.

Es va analitzar l'expressió de DOR en teixits humans per Northern Blot; els resultats van indicar que l'expressió de DOR té lloc principalment a múscul esquelètic, cor i teixit adipós, amb una baixa expressió en altres teixits.

D'altra banda es van amplificar i seqüenciar els exons, la regió 5' no traduïda i l'intró 1 del gen DOR a partir del DNA de 30 individus, amb l'objectiu de portar a terme una cerca de polimorfismes (SNP, de l'anglès Single Nucleotide Polimorfism). Això va permetre la identificació de dos SNPs a la regió promotora de DOR, que es van anomenar DOR1 i DOR5, associats en individus humans amb diferent expressió en múscul esquelètic i amb sensibilitat a la insulina i adipositat (Burghardt H., Tesi Doctoral 2005, Universitat de Barcelona).