

*Caracterização da P149 – uma nova proteína humana
que interage com membros da via Wnt*

Isabel Pereira de Castro

RESUMO

A via de sinalização Wnt é uma das vias mais importantes em processos de desenvolvimento, organogénese e tumorigénese. No epitélio intestinal, a transcrição dos genes alvo desta via é controlada primariamente por complexos que contêm o factor de transcrição TCF4, pelo que a identificação e caracterização dos seus parceiros é de fundamental importância.

Recentemente foi identificada uma nova proteína humana (aqui designada P149) que interage com o factor de transcrição TCF4. O conhecimento disponível sobre esta proteína na literatura é bastante escasso, sabendo-se apenas que pertence a uma sub-família de proteínas envolvida em processos de desenvolvimento embrionário (a sub-família NET) numa grande variedade de espécies animais. A confirmação da interacção P149-TCF4 em células humanas, a demonstração da sua capacidade de repressão da transcrição mediada pelo TCF4 e o facto de proteínas da sub-família NET interagirem com co-repressores da família Groucho, que participam na via Wnt por associação a TCFs, levaram-me a tentar caracterizar melhor a P149, em particular no que diz respeito à sua estrutura, expressão, localização celular e interacção com outras proteínas da via Wnt.

Neste trabalho, para além de se confirmar que a P149 pertence de facto à sub-família NET, foi possível identificar cinco domínios proteicos altamente conservados evolutivamente: três domínios já conhecidos (domínio SP, domínio Btd Box e *Zinc finger* do tipo C₂H₂) e ainda dois novos domínios identificados pela primeira vez nesta sub-família (um domínio rico em tirosinas na parte central e um domínio na parte C-terminal da proteína). A identificação de 25 novas proteínas pertencentes à sub-família NET, para além dos sete membros previamente descritos, veio demonstrar que esta sub-família é mais extensa que o anteriormente descrito. No que diz respeito à localização celular da P149, demonstrou-se que tem uma localização nuclear, apresentando um padrão ponteadado, em concordância com a sua função de repressor da transcrição. Verificou-se também que é expressa ubiquamente num painel de linhas celulares humanas de origem tumoral e que o seu ortólogo em *Mus musculus* é também ubiquamente expresso em tecidos normais. Ao contrário do que se pensava, foi demonstrado que não existe uma segunda isoforma desta proteína. Foi ainda comprovado que a P149 interage em células humanas com a proteína co-repressora Grg 5, um outro membro da via Wnt. Por último, comprovou-se que os aminoácidos conservados dos domínios Btd Box e *Zinc finger* C₂H₂, que se pensavam importantes para as interações proteicas, assim como a própria estrutura do *Zinc finger*, não são essenciais para as interações da P149 com TCF4 e Grg 5.

*Characterization of P149 – a novel human protein
that interacts with members of the Wnt signalling pathway*

Isabel Pereira de Castro

ABSTRACT

The Wnt signalling pathway is considered one of the most important pathways in developmental processes, organogenesis and tumorigenesis. In the intestinal epithelium, the transcription of target genes of this pathway is primarily controlled by complexes containing the TCF4 transcription factor. The identification and characterization of TCF4 partners is, therefore, of vital importance.

Recently, a novel human protein (here named P149) that interacts with the TCF4 transcription factor has been identified. Very little is known about this protein beyond the fact that it belongs to a subfamily of proteins (the NET subfamily) involved in embryonic development in various animal species. The confirmation of the P149-TCF4 interaction in human cells, the demonstration of its ability to repress TCF4-mediated transcription and the interaction between proteins of the NET subfamily and co-repressors of the Groucho family, that are involved in the Wnt pathway by association with TCFs, lead me to try to start characterizing P149's structure, expression, cellular localization and interaction with other proteins of the Wnt signalling pathway.

This study confirmed the inclusion of the P149 in the NET subfamily and allowed the identification of five highly conserved domains: three already known (SP domain, Btd Box and C₂H₂ *Zinc finger*) and two never described in this subfamily (a tyrosine-rich domain and a C-terminal domain located in the central and final portions of the protein, respectively). The identification of 25 novel NET subfamily proteins, in addition to seven members previously described, demonstrated the wide distribution of this subfamily. P149 was found to have a nuclear localization with a punctuated pattern, in agreement with its function in transcription repression. Moreover, this study revealed that P149 is ubiquously expressed in a panel of human tumoural cell lines, and that its ortholog in *Mus musculus* is also ubiquously expressed in normal tissues. Contrary to what was previously reported, my results suggest that the putative B isoforma of P149 does not naturally occur in cells. I have also demonstrated that P149 interacts with another member of the Wnt signaling pathway - the Grg 5 co-repressor, in human cells. Finally, it was shown that highly conserved amino acids on the Btd Box and *Zinc finger* C₂H₂ domains, as well as the *Zinc finger* structure, are not critical for the binding of P149 to TCF4 or Grg 5.