

INTRODUCCIÓ

1. LA PROTEÏNA DESACOBLADORA UCP3

1.1. LES PROTEÏNES DESACOBLADORES

L'oxidació d'àcids grassos i piruvat té lloc als mitocondris, on l'energia es converteix en ATP, que s'utilitza en els processos cel·lulars. Els electrons obtinguts en l'oxidació d'aquests substrats són transportats per la cadena respiratòria fins a l'oxigen mentre que els protons surten de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana. Així es genera un gradient electroquímic de protons a través de la membrana mitocondrial interna. Els protons poden tornar de l'espai intermembrana a la matriu mitocondrial mitjançant l'ATP sintasa en una reacció lligada a la síntesi d'ATP. La proteïna desacobladora UCP1 (*uncoupling protein-1*) o termogenina desacobla la cadena respiratòria de la fosforilació oxidativa, permetent l'entrada de protons des de l'espai intermembrana a la matriu mitocondrial independentment de la síntesi d'ATP, dissipant-se així l'energia en forma de calor (Nicholls i Locke, 1984) (Fig. 1).

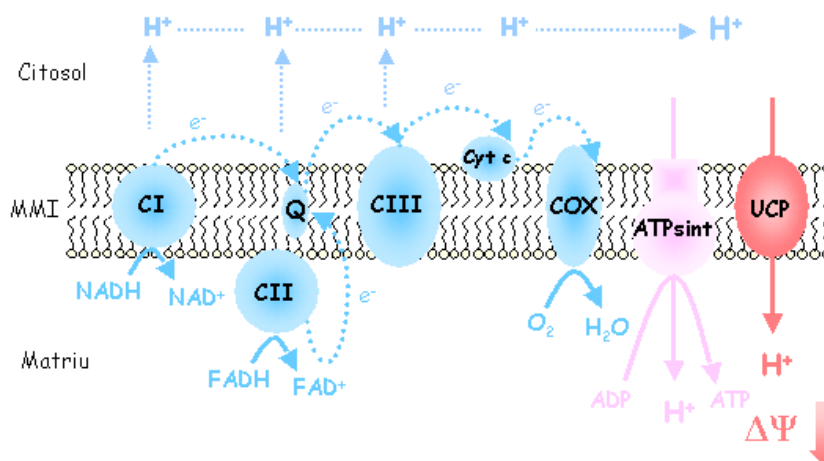


Figura 1. Cadena respiratòria i fosforilació oxidativa. MMI: membrana mitocondrial interna. Els electrons són transportats a través dels complexos de la cadena respiratòria fins a l'oxigen, alhora que els protons surten de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana. Els protons poden tornar a la matriu mitocondrial a través de l'ATP sintasa o bé a través de la proteïna desacobladora (UCP).

UCP1 es troba exclusivament al teixit adipós marró (TAM) de mamífers, que està involucrat en la termogènesi no associada a tremolor induïda pel fred o per la dieta. El TAM és un teixit altament irrigat, conté adipòcits amb nombrosos vacúols lipídics i abundants mitocondris amb un elevat contingut en UCP1. En resposta al fred, s'activa la via adrenèrgica que promou la lipòlisi al TAM. Els àcids grassos alliberats actuen com a substrats per la β -oxidació i com a activadors de la proteïna UCP1, i d'aquesta manera s'obté calor. UCP1 també podria estar implicada en la termogènesi no associada a tremolor induïda per la dieta.

El TAM es troba en mamífers de mida petita, com els rosegadors, així com en nounats de mamífers grans, com els humans. L'abundància de TAM i per tant, la importància d'UCP1 en humans adults és motiu de controvèrsia. Un altre teixit on té lloc la termogènesi no associada a tremolor és el múscul esquelètic. Donat que s'ha observat desacoblament en altres teixits a part del TAM, i per tal de trobar altres proteïnes amb una activitat similar a la d'UCP1 en humans, el 1997 es van clonar els gens *UCP2* i *UCP3*, per similitud amb *UCP1* (Fleury, 1997, Gimeno, 1997, Vidal-Puig, 1997a, Boss, 1997, Gong, 1997). Més recentment s'han clonat els gens de les proteïnes UCP4 (Mao, 1999) i UCP5 o BMCP1 (*brain mitochondrial carrier protein-1*) (Sanchis, 1998) i s'ha demostrat l'existència d'UCP en plantes, ocells i peixos (Laloi, 1997, Stuart, 1999, Vianna, 2001) (Taula 1).

UCP	Identitat de seqüència d'aminoàcids amb UCP1 (%)	Distribució tissular
UCP1	-	Teixit adipós marró (TAM)
UCP2	55	Ubiqua
UCP3	57	Múscul esquelètic, TAM (teixit adipós blanc i cor)
BMCP1	34	Cervell i teixit neuronal
UCP4	29	Cervell i teixit neuronal

Taula 1. Família de proteïnes desacobladores en mamífers.

1.2. LA PROTEÏNA DESACOBLADORA UCP3

1.2.1. LA PROTEÏNA UCP3

Les UCP pertanyen a la família de proteïnes transportadores de la membrana mitocondrial interna, que inclou la translocasa ATP/ADP, el transportador de fosfat, el transportador de 2-oxoglutarat/malat, i el transportador de citrats (tricarboxilats). Cada proteïna està formada per uns 300 aminoàcids, amb una estructura que es repeteix cada 100 aminoàcids. La cristal·lització de la translocasa ATP/ADP ha permès confirmar l'estructura de 6 dominis transmembrana units per llaços polars (Pebay-Peyroula, 2003) que l'anàlisi d'hidrofilicitat d'aquests transportadors ja suggeria. Es creu que les UCP són funcionals en forma d'homodímers.

Es coneixen dues isoformes d'UCP3 humana degudes a un *splicing* diferencial en l'últim intró: la isoforma llarga (L), de 312 aminoàcids (34 kD de pes molecular), i la isoforma curta (S), de 275 aminoàcids, a la que li manca l'últim domini transmembrana (Solanes, 1997). A nivell d'aminoàcids, UCP1 i UCP2 humanes són un 57% i un 71% idèntiques a UCP3L,

respectivament (Vidal-Puig, 1997a, Boss, 1997, Gong, 1997). Les proteïnes UCP3 de rata i ratolí, de 308 aminoàcids, presenten una identitat del 98% entre elles i del 86% respecte a UCP3L humana (Matsuda, 1997, Yoshitomi, 1998b).

1.2.2. EL GEN *UCP3*

El gen *UCP3* es localitza adjacent al gen *UCP2*, a 7 i 8 kb en 5', en ratolins i humans, respectivament (Surwit, 1998, Pecqueur, 1999, Gong, 1999). Aquesta proximitat suggereix que *UCP2* i *UCP3* provenen d'una duplicació gènica. El locus *UCP2/UCP3* es localitza al cromosoma 7 en ratolins, al cromosoma 11 en humans (Solanes, 1997, Gong, 1997, Fleury, 1997, Boss, 1998a) i al cromosoma 1 en rata (Kaisaki, 1998).

El gen *UCP3* humà i de ratolí consta de 7 exons (Solanes, 1997, Urhammer, 1998, Gong, 1999) i l'inici de traducció es troba al segon exó. Als exons sisè i setè del gen humà, s'han localitzat dos codons d'*stop* diferents, que s'utilitzen en funció de l'*splicing* diferencial en l'últim intró (Solanes, 1997).

Durant la realització d'aquesta tesi, diversos estudis han proporcionat informació sobre la regió promotora del gen *UCP3* humà (Acin, 1999, Tu, 2000, Esterbauer, 2000, Riquet, 2003) i de ratolí (Yoshitomi, 1998b, Esterbauer, 2000). Al promotor humà s'han identificat fins a 7 possibles inicis de transcripció i diverses possibles caixes TATA o seqüències similars a caixes TATA (Vidal-Puig, 1997a, Acin, 1999, Tu, 2000, Esterbauer, 2000). Al promotor de ratolí s'ha identificat un únic inici de transcripció i una possible caixa TATA (Yoshitomi, 1998b, Esterbauer, 2000). La regió proximal del promotor d'*UCP3* mostra una elevada similitud de seqüència entre humans i rosegadors (Esterbauer, 2000).

L'anàlisi de la seqüència del promotor humà d'*UCP3* mostra diversos elements consens per la unió de factors de transcripció importants per la regulació de gens musculars, com són MyoD i MEF2, i del cor, com GATA, així com seqüències de DNA per la unió de factors ubics, com una caixa GC i dues caixes CAAT. També s'han identificat possibles elements de resposta a receptors nuclears, com PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*) i TR (*thyroid hormone receptor*), i elements de resposta a cAMP (CRE, *cAMP-response element*) (Fig. 2).

INTRODUCCIÓ

```
-4483 aggattgcaacgatattttctctcagtaactcccagaagaactgacgcagcctgaggggctggggggaaggagacacacctgcccacccCTccgtcagctttgtccagcttgaggagggc...
-3403 gctcacacctgtaatccaaacctttgggaagccgagggcagctagatcacctgaggtcaggagtgtgagactaccctggccaaacctggcaaacccctctctactaaaaaa...
-2203 aagccccaggtaaagaatattctccaaactccactccagctccccgacagcaacctgatcggggtcaggagacacactcctaccccagctgagagcagcctctgataacacaaaagga
-2083 ccctgaggtggagacctcccacactccactccaaacagtggttattttatcaaatcttaccocgggaagtgaaatctatctcccagtgccaaactccgagataaatgacttgaccagggc
-1963 gtgtggcatgatttaaggcatgagatggtttcccaccaccagaaacagccagctggctgcctctctcccttgagccctccctccacagagacctgtgaataggtgtttctgatccct
-1843 aggctggttgatcccaccagagcagcagcctcggtacttctgatctggctggctccagacatggagccaaagcagcagacactggcctgcccctcaagctcccaagctaaagag
-1723 agcctggccctccctcccactaggtttctccagagcctgctgctcctggtttggcttctactctattcttccccacagactccctgcaatttactgcatcacctctagactagcaat
-1603 taE boxgagctcagaaacctacttctgagccttctaatctcagcagccctgacagcactccctcttaacactaatgE boxgagctcttattctgPPREgagcattaaaggtcagggcctggt
-1483 ccaaggaagaggacaggtacagcccagcttE boxgacttgaacatccatgcttctgacE boxgactcctgtgacgtggctctgtgcccagctccagaaaagacttctgctactctcctcctc
-1363 tgcctaccagtaactBREcctttctctccctccctctgctctcactcctcccctccctctctcttcttcttcttctccctccctccatE boxgggccgagctE boxggcccagccc
-1243 ttactctgagtggccE boxgagctcagctcagtagcttctgtggggcaccttccaccaggtcccagctccctggctccagcagtgccatgctaaagcctE boxcaagctgctggtggag
-1123 agaatggtggtcagatgataagcctcccaaaaatgcttacagtttacaggtgagtcaggGC/E boxccccgccagctgctggtacatgacttccccagattccatttctcctcagtaaaataa
-1003 gtgtaagatatttaggatcccagcactaaaaaagaacgaataactgatacagcctccaacatggatC/EBP βgaattttgaagcattactatactaagtgaagaagccagtcacaacaacagcac
-883 atattgtagattccattctaggaagtgtccgaacaggcaaatattagagacagaaagtagattgattagtggtgctgaggtggggagccgggggaaaggggaggtgactaCAAT boxccaatg
-763 tgtacggagttttccaggtgagaggtgatgaaatgMEF 2ctaaaaatagatggttgatggtgtgtgccactcagaatatactaaaaaaE boxcatttgaattgE boxcaactgaaaE boxcagatgaa
-643 ttgtacggtatgtgaattTATA-liketatatcaataaaatctgtaatttaaaaaaaaaaataataggtcgggtgagctggctE boxcacacctataatcccagcactttgcagactgaggcaggaggatE boxpac
-523 E boxagcccaggttcaagaccagcctggggaacacagcaagaacctcgtcctactaaaaaaatttaaattcaaaaaaaaaaagtaaaaaaatagaatcctaatagtacctatctcat
-403 aggattgtgaaaatagtagtaatgtagtaaaaatatttagcacatagtaggcacaaaagaatgacatMEF 2tattattaaaggcctgggagagctgtgccagccctatctgtggaggcctE boxag
-283 PPREacctttggactcaaaaagtgagcaggtCCAC boxccaacccccctatacaccctgtcaccaggaagCRE2gctccE boxgagcttaaaaggagcE boxataataagcaccaccaagtcgaaggactgaaccagat
-163 ctggaactcactE boxcacctccctctE boxcacctcactgccctcaccagccagcctctgtE boxcaagtgatcaggtgtcaaccaactctctagggataTRE PPREaggtttcaggtcagccctgtgtTATA boxtataag
-43 accagtgccaaagccagaagcagcagagacacagtgtaagcacaAGGAGGGCCATCAAT boxCCAATE boxCCCTGTCTE boxCACCTGCTGGGATGGAGCCCTAGGGAGCCCTGTGCTGCCCTGCCGTGGC
+77 AGGACTCACAGCCCCACCCGTGCCTGCAAGCCAGGGGTGTGGAGCAGCCTCTCTCCTTGGACCTCTCTCGGCCCTAAAGGGACTGGGAGACCTTCCAGGACTATG
```

Figura 2. Seqüència de la regió 5' del gen humà *UCP3* (AF127916). Les seqüències consens per elements del promotor i per possibles factors de transcripció estan requadrades. La numeració està basada en +1 pel lloc d'inici de la transcripció. En negreta, el lloc d'*splicing* pel primer intró. Subratllat, l'inici de traducció. Adaptat de Acin, 1999 i Tu, 1999.

1.2.3. DISTRIBUCIÓ TISSULAR D'*UCP3*

El gen *UCP3* s'expressa principalment en teixits termogènics, com són el TAM i el múscul esquelètic. En humans, el gen *UCP3* s'expressa molt específicament a múscul. Trobem elevats nivells de l'mRNA d'*UCP3* al múscul esquelètic i més baixos a cor, glàndula tiroïdal i medulla òssia (Vidal-Puig, 1997a, Boss, 1997). En rata i ratolí, l'expressió del gen *UCP3* és elevada al TAM i al múscul esquelètic, i els nivells de l'mRNA d'*UCP3* són inferiors al cor, al teixit adipós blanc (TAB) i al ronyó (Boss, 1997, Matsuda, 1997, Vidal-Puig, 1997a, Yoshitomi, 1998b)

(Taula 1). Recentment s'ha descrit l'expressió d'UCP3 al cervell en ratolins (Vincent, 2004) i en cèl·lules humanes d'origen neuronal (Gustafsson, 2001, 2004a i 2004b, Leininger, 2004).

Analitzant els nivells d'mRNA o proteïna UCP3 en diferents tipus musculars en humans i rosegadors, s'ha observat que la seva expressió és més alta als músculs de contracció ràpida, glicolítics o glicolítics/oxidatius (*tensor fascia latae*, *tibialis anterior*, *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*), que no pas en músculs de contracció lenta, oxidatius (*soleus*) (Boss, 1997, Hesselink, 2001, Jimenez, 2002, Russell, 2003a i 2003b, Suwa, 2003).

1.3. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *UCP3*

1.3.1. SITUACIONS FISIOLÒGIQUES O PATOLÒGIQUES

Els primers estudis de la regulació d'*UCP3* es van basar en l'elevada identitat amb UCP1, i per tant, es va estudiar l'expressió del gen *UCP3* en diferents situacions fisiològiques que modulen la termogènesi i l'expressió d'*UCP1* al TAM, com són el fred, la dieta, el desenvolupament i l'alletament. Per tal d'estudiar la regulació d'*UCP3* al múscul esquelètic, també s'ha estudiat l'exercici. Finalment, donat que el *locus* d'*UCP2* i *UCP3* correspon a un QTL (*quantitative trait loci*) per obesitat i diabetis, s'ha estudiat l'expressió d'*UCP3* en aquestes patologies (Taula 2).

Situació fisiològica o patològica	Teixit adipós marró	Múscul esquelètic	Cor
Fred			
3-24 h	↑=	↑	=
2-20 dies	↑↓	↓=	
Dieta			
rica en lípids	↑=	↑	↑
dieta hipocalòrica	↓=	↓	
dejuni	↓	↑	↑
realimentació	↑	↓	↓
intralipid		↑	↑
Període perinatal			
naixement	↑	↑	↑
deslletament	=	↓	↓
Alletament (mare)			
alletament	↓	↓	
deslletament	↑	↑	
Exercici			
agut	=	↑	
entrenament	=	↓=	
Obesitat i diabetis			
obesitat		=	
diabetis		↓↑	

Taula 2. Resum de la regulació de l'expressió d'*UCP3* en diferents situacions fisiològiques o patològiques.

EL FRED

El principal estímul fisiològic del TAM és la disminució de la temperatura ambiental, que s'associa a un fort increment en els nivells d'UCP1. Degut a l'elevada identitat entre UCP1 i UCP3 i l'expressió d'UCP3 en teixits termogènics com el TAM i el múscul esquelètic, es va pensar que UCP3 podia participar en la termogènesi no associada a tremolor induïda pel fred.

En rosegadors exposats al fred de manera aguda (3-24h), s'ha observat tant un augment en els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al TAM (Yamashita, 1999, Masaki, 2000a) com una absència de canvis en aquests nivells (Carmona, 1998). En exposicions més perllongades al fred (2-20 dies) s'ha descrit un augment de l'mRNA d'*UCP3* (Boss, 1997, Larkin, 1997, Jakus, 2002) i una disminució en els nivells de proteïna UCP3 al TAM (Jakus, 2002). S'han observat diferències en la resposta d'*UCP3* al fred en funció de l'edat dels animals (Yamashita, 1999).

Pel que fa al múscul esquelètic, el fred agut augmenta l'expressió d'*UCP3* a nivell de l'mRNA (Lin, 1998, Boss, 1999, Masaki, 2000a) i a nivell de proteïna (Simonyan, 2001). Al cor, no s'han observat canvis en l'expressió d'*UCP3* pel fred agut (Lin, 1998). En exposicions més perllongades al fred (2-20 dies), l'expressió d'*UCP3* al múscul, a nivell d'mRNA o de proteïna, no es veu alterada (Boss, 1997 i 1998b, Jakus, 2002) o fins i tot disminueix (Larkin, 1997, Lin, 1998).

De manera global, aquests resultats no semblen indicar que UCP3 participi en la termogènesi induïda pel fred.

LA DIETA

El TAM participa en la termogènesi induïda per la dieta, i per tant, en la regulació del pes corporal (Rothwell i Stock, 1986). El fet que els ratolins transgènics que no tenen TAM (Lowell, 1993) desenvolupin obesitat quan són alimentats amb una dieta rica en lípids (Hamann, 1996), a diferència dels ratolins deficientes en UCP1 (Enerback, 1997), fa pensar en l'existència d'efectors termogènics diferents a UCP1 al TAM. Per tal d'esbrinar si UCP3 està implicada en la termogènesi induïda per la dieta, s'ha estudiat l'efecte de diferents dietes sobre l'expressió d'*UCP3* en rosegadors i humans.

La ingesta d'una dieta rica en lípids durant un llarg període de temps en rosegadors, augmenta els nivells d'expressió de l'mRNA d'*UCP1* al TAM (Felipe, 2003). Diferents estudis en animals sotmesos a una dieta rica en lípids indiquen tant un augment (Felipe, 2003), com una

manca de canvis en els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al TAM (Surwit, 1998, Gong, 1999, Harrold, 2000).

Al múscul esquelètic, la situació és més clara, ja que les dietes riques en lípids incrementen l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA i de proteïna (Matsuda, 1997, Harrold, 2000, Schrauwen, 2001b, Chou, 2001, Young, 2001, Iossa, 2002, Felipe, 2003, Hesselink, 2003). S'ha estudiat la dependència de la composició dels àcids grassos de la dieta, sent millors activadors de l'expressió d'*UCP3* al múscul, els àcids grassos de cadena llarga (Hoeks, 2003) i monoinsaturats (Rodriguez, 2002) o poliinsaturats (n-3) (Tsuboyama-Kasaoka, 1999, Cha, 2001). També s'han descrit diferències en la resposta d'*UCP3* en funció de la soca de rosegador emprada (Gong, 1999), de la resistència a l'obesitat dels animals (Weigle, 2000), el sexe (Rodriguez, 2003) i de la duració de la dieta rica en lípids (Gong, 1999). Al cor, una dieta rica en lípids també augmenta els nivells de l'mRNA d'*UCP3* (Young, 2001, Vettor, 2002, Hoeks, 2003).

Una dieta hipocalòrica disminueix els nivells d'*UCP1* al TAM (Villarroya, 1986). Pel que fa als nivells de l'mRNA d'*UCP3* al TAM en aquesta situació, s'ha descrit que disminueixen (Cusin, 1998) o bé que no es modifiquen (Scarpacè, 1998). Al múscul esquelètic, la restricció moderada de la ingesta disminueix els nivells de l'mRNA d'*UCP3* tant en rosegadors com en humans (Cusin, 1998, Boss, 1998c, Vidal-Puig, 1999, Esterbauer, 1999, Schrauwen, 2000).

En una situació de dejuni, els nivells d'*UCP1* al TAM disminueixen (Trayhurn i Jennings, 1986) i l'expressió d'*UCP1* es restableix amb l'alimentació posterior al dejuni (Samec, 1998b). De la mateixa manera es comporta l'expressió d'*UCP3* al TAM de rosegadors en el dejuni (Boss, 1997, Gong, 1997, Samec, 1998a i 1998b, Sivitz, 1999, Scarpacè, 2000a) i l'alimentació posterior (Samec, 1998b).

Al múscul esquelètic, en canvi, el dejuni en rosegadors i l'elevada restricció calòrica en humans augmenten l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA i de proteïna (Gong, 1997, Millet, 1997, Boss, 1997 i 1998, Tunstall, 2002, Jimenez, 2002). S'ha observat que l'augment en l'expressió d'*UCP3* degut al dejuni és superior en fibres musculars de contracció ràpida que en fibres musculars de contracció lenta (Samec, 1998a, 1998b i 1999, Hildebrandt, 2000, Samec, 2002). El dejuni també provoca un augment en l'expressió d'*UCP3* al cor (Young, 2001, van der Lee, 2001, Muoio, 2002a).

L'alimentació posterior al dejuni retorna els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al múscul esquelètic i al cor, a la situació basal o fins i tot inferiors (Samec, 1998b i 1999, Young, 2001, Pilegaard, 2003). L'alimentació amb una dieta rica en lípids després del dejuni, manté la

l'expressió del gen *UCP3* i el contingut de proteïna UCP3 elevats al múscul esquelètic, respecte a una dieta baixa en lípids (Samec, 1999, Crescenzo, 2003, Pilegaard, 2003).

S'ha demostrat que una infusió de lípids és capaç d'augmentar l'expressió de l'mRNA d'*UCP3* al múscul esquelètic i al cor, en rosegadors i humans (Weigle, 1998, Khalfallah, 2000, Fabris, 2001, Vettor, 2002). S'ha proposat que els àcids grassos no esterificats (NEFA, *nonesterified fatty acids*) en sang poden ser els responsables de la regulació d'*UCP3* en aquests teixits, en resposta al dejuni i a la dieta rica en lípids (Weigle, 1998, Young, 2001, van der Lee, 2001).

Els estudis de la regulació d'*UCP3* en funció de la dieta, indiquen que *UCP3* al TAM es comporta de manera semblant a *UCP1*, d'acord amb una funció en la termogènesi induïda per la dieta. Al múscul esquelètic, l'augment en l'expressió d'*UCP3* durant el dejuni, fa pensar que UCP3 no participa en la termogènesi induïda per la dieta en aquest teixit. A més a més, UCP3 sembla estar relacionada amb el catabolisme dels lípids al múscul, ja que en resposta a diferents dietes l'expressió d'*UCP3* es regula de manera similar a la d'altres gens que hi estan implicats, com els gens de l'*LPL* (*lipoprotein lipase*), *FAT/CD36* (*fatty acid transporter*), *cFABP* (*cytosolic fatty acid binding protein*), *ACS* (*acyl CoA synthetase*), *CPT1 i 2* (*carnitine palmitoyl transferase 1/2*), *LCAD* i *MCAD* (*long/medium chain acyl CoA dehydrogenase*) (Schrauwen, 2000, Hildebrandt 2000, Fabris, 2001, Vettor, 2002, Samec, 2002, Pilegaard, 2003, Arkininstall, 2004, de Lange, 2004, Xiao, 2004b).

EL PERÍODE PERINATAL

En rosegadors, el gen *UCP1* s'expressa durant l'etapa fetal al TAM i, amb el naixement, es produeix un gran augment en la seva expressió, degut a la inducció de la termogènesi pel fred (Carmona, 1998). L'expressió d'*UCP3* al TAM és indetectable durant l'etapa fetal, i augmenta amb el naixement fins a adquirir nivells similars als de l'adult (Carmona, 1998).

Al múscul esquelètic, durant l'etapa fetal no es detecta l'mRNA del gen *UCP3*, però després del naixement, l'expressió d'*UCP3* augmenta degut a la ingesta dels lípids de la llet, tant en rosegadors com en humans (Brun, 1999a i 1999b, Villarroja, 2001, Brauner, 2003). En nounats prematurs, s'ha descrit una disminució en aquesta inducció de l'expressió del gen *UCP3* (Brun, 1999a, Brauner, 2003). En rosegadors, els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al múscul esquelètic es mantenen elevats fins al deslletament, quan disminueix la ingesta de lípids i augmenta la ingesta de carbohidrats (Brun, 1999a i 1999b).

En canvi, al cor de rates, els nivells d'mRNA i proteïna UCP3 romanen indetectables fins la segona setmana després del naixement i comencen a decaure amb el deslletament (Teshima, 1999, Skarka, 2003).

S'ha suggerit que l'increment en els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al múscul esquelètic i al TAM després del naixement podria estar mitjançat per la leptina i/o els nivells de NEFA en sang (Brun, 1999a i 1999b, Villarroya, 2001).

L'ALLETAMENT

Durant l'alletament, en rosegadors, per tal d'obtenir l'energia necessària per a la producció de llet, s'utilitzen les reserves de lípids, augmenta la ingesta i disminueix la termogènesi al TAM. En aquesta situació, el TAM s'atrofia i tant els nivells de l'mRNA com de la proteïna UCP1 disminueixen (Trayhurn i Jennings, 1987, Martin, 1989 i 1995, Pedraza, 2001, Xiao, 2004a). De la mateixa manera, els nivells de l'mRNA i la proteïna UCP3 també disminueixen en aquesta etapa, tant al TAM com al múscul esquelètic (Pedraza, 2000 i 2001, Xiao, 2004a). S'ha suggerit que aquests canvis podrien estar mitjançats per la leptina o els nivells de NEFA en sang, ambdós disminuïts durant l'alletament (Pedraza, 2000 i 2001, Xiao, 2004a). En aquesta situació fisiològica, l'expressió de diversos gens que participen en el catabolisme lipídic, com *CPT1*, *FAT/CD36* i *MCAD*, també està disminuïda al múscul *gastrocnemius* de rates (Xiao, 2004b), suggerint que *UCP3* pot ser un gen més, implicat en aquest procés.

L'EXERCICI

L'exercici afecta al metabolisme del múscul esquelètic. Donat que UCP3 s'expressa al múscul esquelètic i podria tenir un paper relacionat amb el metabolisme dels àcids grassos, s'han estudiat els efectes de l'exercici agut i l'entrenament sobre l'expressió del gen *UCP3*.

Al TAM, ni l'exercici agut ni l'entrenament afecten els nivells de l'mRNA d'*UCP3* (Boss, 1998b, Tsuboyama-Kasaoka, 1998).

L'exercici agut augmenta l'expressió gènica d'*UCP3* al múscul esquelètic en humans (Pilegaard, 2000, Schrauwen, 2002, Noland, 2003) i en rosegadors (Cortright, 1999, Zhou, 2000, Muoio, 2002a, Jones, 2003), de manera transitòria (Tsuboyama-Kasaoka, 1998, Pilegaard, 2000, Hildebrandt, 2003). Aquest increment en la transcripció d'*UCP3* és superior en

les fibres musculars glicolítiques que en les oxidatives, i depèn també de la duració i la intensitat de l'exercici (Hildebrandt, 2003). S'ha observat que la contracció, per la via de l'AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*), pot mitjançar aquest augment en l'expressió del gen *UCP3* al múscul esquelètic de rata *in vitro* i *in vivo* (Zhou, 2000, Pedersen, 2001, Stoppani, 2002, Putman, 2003, Suwa, 2003). També s'ha demostrat que l'augment en els nivells de NEFA degut a l'exercici és necessari per tal que els nivells de l'mRNA d'*UCP3* augmentin (Schrauwen, 2002) i que una disminució en el contingut de glicogen del múscul incrementa encara més l'expressió d'*UCP3* en l'exercici (Pilegaard, 2002).

La regulació d'*UCP3* durant l'exercici agut, és similar a la d'altres gens que participen en el catabolisme d'àcids grassos, com el gen de l'LPL (Pilegaard, 2002, Hildebrandt, 2003), FAT/CD36 i CPT1 (Tunstall, 2002) i gens que protegeixen de les espècies reactives de l'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*) com el gen de l'HO1 (*heme oxygenase 1*) (Pilegaard, 2000, Hildebrandt, 2003) i les Cu,Zn-SOD i Mn-SOD (Cu,Zn/Mn-*superoxide dismutase*) (Hollander, 2001), suggerint que UCP3 podria participar en aquests processos.

Per altra banda, els efectes de l'entrenament en l'expressió gènica d'*UCP3* al múscul esquelètic no estan clars. Alguns estudis descriuen una manca de canvis en l'mRNA d'*UCP3* al múscul en rosegadors i en humans (Cortright, 1999, Tonkonogi, 2000, Ookawara, 2002, Noland, 2003), mentre que en altres s'observa una disminució en els nivells d'mRNA d'*UCP3* o de la proteïna (Boss, 1998b, Schrauwen, 1999a, Hjeltnes, 1999, Russell, 2002, 2003a i 2003b, Fernström, 2004). Aquesta diversitat de resultats pot ser deguda a diferències en el període de temps entre l'últim exercici i l'extracció de les mostres (Tsuboyama-Kasaoka, 1998, Pilegaard, 2000, Hildebrandt, 2003) i/o en la intensitat i duració de l'entrenament (Russell, 2003a). S'ha suggerit que els canvis en l'expressió d'*UCP3* podrien estar relacionats amb les adaptacions que tenen lloc al múscul durant l'entrenament, com els canvis en els tipus de fibres musculars i la seva capacitat oxidativa (Russell, 2002, 2003a i 2003b).

L'OBESITAT I LA DIABETIS

La regió cromosòmica en la que es localitzen els gens *UCP2* i *UCP3*, tant en humans (Solanes, 1997) com en la regió sintènica de ratolí (Yoshitomi, 1998b), correspon a un QTL (*quantitative trait loci*) associat a obesitat i diabetis de tipus II (Solanes, 1997, Fleury, 1997). S'ha estudiat la possible relació entre aquestes malalties i diversos polimorfismes en el gen *UCP3* (Taula 3), entre els quals destaca el polimorfisme -55 C→T, que ha estat associat a diversos paràmetres relacionats amb l'obesitat i la diabetis, en diferents poblacions. Inicialment, aquest polimorfisme es va relacionar amb el nivell d'expressió d'*UCP3* (Schrauwen, 1999b).

Variant	Població	Fenotip associat	Associació	Referència
Exó 3 (Val102Ile), exó 4 codó d'stop (Arg143X) i manca exó 6 juntura d'splicing	Afroamericana i Sierra Leone	Oxidació basal de lípids	50% disminució en heterozigots exó 6	Argyropoulos, 1998
9 variants de seqüència, incloent manca exó 6 juntura d'splicing	Afroamericana	Composició corporal, desacoblament in vitro i consum O ₂	No associació	Chung, 1999
4 substitucions de nucleòtids en introns i 2 variants silencioses d'aminoàcids	Danesa	BMI i massa de greix	No associació	Urhammer, 1998
Variant silenciosa exó 3		Obesitat	Positiva	Otabe, 1999
+5 G→A a l'exó 1, -155 C→T (promotor), inserció A -439	Francesa	BMI i interacció amb activitat física	No associació	Otabe, 2000
Variant silenciosa exó 3		Taxa metabòlica basal i resposta a sobrealimentació i a hormones tiroïdals	Positiva	Ukkola, 2001
Repetició GA microsatèl·lit GAIVS6	Quebec	BMI i composició corporal	Positiva	Lanouette, 2001
Repetició GA microsatèl·lit GAIVS6	Nordamericana	Composició corporal i interacció amb activitat física	Positiva (blancs)	Lanouette, 2002
-55 C→T	Indis Pima	BMI i taxa metabòlica basal	Positiva	Schrauwen, 1999b
-55 C→T	Francesa	BMI i interacció amb activitat física	Positiva	Otabe, 2000
-55 C→T	Francesa	Diabetis de tipus II i perfil aterogènec	Positiva	Meirhaeghe, 2000
-55 C→T	Asiàtica i Europea	Distribució de greix en dones	Positiva	Cassell, 2000
-55 C→T	Danesa	Diabetis de tipus II	No associació	Dalgaard, 2001a
-55 C→T	Danesa	Obesitat	No associació	Dalgaard, 2001b
-55 C→T	Anglesa	BMI	Positiva	Halsall, 2001
-55 C→T	Palauans	BMI i diabetis de tipus II	Positiva	Yanagisawa, 2001
-55 C→T	Xinesa	Obesitat, diabetis de tipus II i dislipèmia	Positiva	Shen, 2002
-55 C→T	Nordamericana	Ingesta i composició corporal	Positiva (dones)	Damcott, 2004
-55 C→T	Escandinava	BMI Nefropatia diabètica	Positiva No associació	Lindholm, 2004

Taula 3. Efectes de les variants d'*UCP3* en els fenotips humans en estudis d'associació. Adaptat de Schonfeld-Warden, 2001 i Villarroja, 2002. BMI, índex de massa corporal (*body mass index*).

També s'han analitzat els nivells d'expressió del gen *UCP3* al múscul esquelètic d'humans i animals d'experimentació amb obesitat i diabetis, però els resultats són sovint contradictoris. En individus obesos, diversos estudis descriuen nivells de l'mRNA d'*UCP3* no alterats (Millet, 1997 i 1998, Nordfors, 1998, Vidal-Puig, 1999, Sbraccia, 2002) i amb una inducció normal en resposta al dejuni (Millet, 1997 i 1998). S'ha observat, però, una disminució

en l'expressió d'*UCP3* en individus obesos que presenten una menor pèrdua de pes durant una dieta hipocalòrica (Harper, 2002). Alguns estudis amb pacients diabètics de tipus II mostren una menor expressió de l'mRNA i de la proteïna UCP3 al múscul esquelètic (Krook, 1998, Schrauwen, 2001a), però en altres s'observa un augment en els nivells de l'mRNA d'*UCP3* (Bao, 1998, Vidal, 1999) i una manca d'inducció en resposta al dejuni (Vidal, 1999). En individus obesos i diabètics, s'han relacionat els nivells d'expressió d'*UCP3* al múscul amb els nivells de NEFA en sang (Bao, 1998, Sbraccia, 2002).

En animals d'experimentació, s'ha descrit una correlació positiva entre els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al múscul abdominal i el sobrepès en rates mascle, que són més resistents a guanyar pes quan són alimentades amb una dieta rica en lípids, respecte a les rates femella (Rodríguez, 2003). Comparant soques de ratolins susceptibles a l'obesitat induïda per la dieta (AKR i C57BL/6J), respecte a soques més resistents a l'obesitat (A/J, C57BL/KsJ), no s'observen diferències en l'expressió d'*UCP3* al múscul ni al TAM (Surwit, 1998, Gong, 1999), suggerint que no és l'expressió d'*UCP3* el que provoca la susceptibilitat a l'obesitat.

1.3.2. REGULADORS DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA D'*UCP3*

S'han estudiat els possibles mitjancers de la regulació d'*UCP3* en resposta a les diferents situacions fisiològiques i patològiques estudiades: la via adrenèrgica, els àcids grassos no esterificats, la leptina, les hormones tiroïdals, l'àcid retinoic i la insulina (Taula 4).

Regulador	Teixit adipós marró	Múscul esquelètic	Cor
La via adrenèrgica			
tractament agut	↑	=↑	
tractament crònic	↓	↓↑	
Leptina	↑	↑	
NEFA		↑	↑
Activadors de PPAR α		↑	↑
Activadors de PPAR β		↑	
Activadors de PPAR γ		↓↑	
Hormones tiroïdals	↑	↑	
Àcid retinoic	↓=	↑	
Insulina		↓	
Rates diabètiques STZ	↓	↑	↑

Taula 4. Resum dels efectes dels principals reguladors de l'expressió d'*UCP3*.

LA VIA ADRENÈRGICA

La resposta del TAM al fred està mitjançada principalment per la via adrenèrgica: sota estímuls hipotalàmics, el sistema nerviós simpàtic allibera noradrenalina, que controla l'expressió d'*UCP1* (Mory, 1984, Himms-Hagen, 1990). S'ha estudiat la regulació dels nivells d'mRNA d'*UCP3* en resposta a agonistes de la via adrenèrgica.

Pel que fa al TAM, el tractament agut amb agonistes β -adrenèrgics augmenta l'expressió d'*UCP3*, però de manera independent a la inervació simpàtica del teixit (Scarpace, 2000a i 2000b). El tractament crònic amb agonistes β_3 -adrenèrgics també augmenta l'expressió d'*UCP3* al TAM (Yoshitomi, 1998a, Savontaus, 1998, Oliver, 2000). S'ha suggerit que la leptina podria estar mitjançant els efectes de la via adrenèrgica sobre l'expressió d'*UCP3* (Oliver, 2000).

Al múscul esquelètic, els efectes de la via adrenèrgica sobre l'expressió d'*UCP3* són controvertits. En un estudi en rates, el tractament agut amb un agonista β_3 -adrenèrgic no modifica l'expressió d'*UCP3* (Gómez-Ambrosi, 1999). En ratolins, s'ha descrit un augment de l'expressió d'*UCP3* degut al tractament agut amb agonistes β_3 -adrenèrgics, però es creu que aquest efecte no està mitjançat per receptors β_3 -adrenèrgics, ja que aquest teixit no sembla expressar quantitats fisiològicament rellevants d'aquest receptor, i l'exposició aguda al fred en ratolins *receptor β_3 -adrenèrgic-KO*, també augmenta l'expressió d'*UCP3* al múscul esquelètic (Boss, 1999). El tractament amb agonistes β_3 -adrenèrgics i antagonistes β_1 i β_2 -adrenèrgics, ha suggerit l'existència d'un possible receptor β_4 -adrenèrgic, que podria mitjançar els efectes. No obstant, en cèl·lules musculars L6 en cultiu el tractament amb adrenalina augmenta l'expressió d'*UCP3* mitjançant receptors β_2 -adrenèrgics, els únics receptors β -adrenèrgics presents en aquestes cèl·lules (Nagase, 2001). En humans, però, el tractament agut amb agonistes β_1 i β_2 -adrenèrgics no altera l'expressió d'*UCP3* al múscul (Hoeks, 2003).

Per altra banda, el tractament crònic amb un agonista β_3 -adrenèrgic en diferents soques de ratolí altera els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al múscul esquelètic de manera oposada, fet que s'ha relacionat amb els nivells de NEFA en sang (Yoshitomi, 1998a, Nakamura, 2001). La utilització de diferents agonistes adrenèrgics, les dosis utilitzades i la duració dels tractaments, i els diferents animals emprats en els experiments poden contribuir a la variabilitat de resultats obtinguts. A més a més, els efectes dels agonistes β -adrenèrgics sobre l'expressió d'*UCP3* *in vivo* poden ser indirectes, per exemple per activació de la lipòlisi i augment dels nivells de NEFA en sang.

LA LEPTINA

La leptina és una hormona implicada en el manteniment del pes corporal i regula l'eficiència metabòlica, la despesa energètica, la ingesta d'aliments i l'adipositat (revisat a Friedman, 2002). L'administració de leptina augmenta la termogènesi al TAM, mitjançant un augment en l'activitat simpàtica (Collins, 1996, Haynes, 1997, Scarpace i Matheny, 1998), amb un increment en el consum d'oxigen i en l'expressió d'*UCP1* (Scarpace, 1997, Kotz, 1998).

L'administració de leptina augmenta l'expressió gènica d'*UCP3*, tant al TAM com al múscul esquelètic (Cusin, 1998, Scarpace, 1998, Sivitz, 1999, Rouru, 1999, Gómez-Ambrosi, 1999, Scarpace, 2000b, Villarroya, 2001). En ratolins *ob/ob* (deficients en leptina), els nivells de l'mRNA d'*UCP3* es troben disminuïts al TAM, però no al múscul esquelètic, i l'administració de leptina n'augmenta l'expressió en ambdós teixits (Gong, 1997, Liu, 1998). En rates *fa/fa* (deficients en el receptor de la leptina), s'ha detectat que els nivells de l'mRNA d'*UCP3* són menors al TAM i al múscul *gastrocnemius*, i són superiors al múscul *soleus* i al cor, respecte a rates primes (Matsuda, 1998, Oberkofler, 2000).

La capacitat de la leptina d'actuar directament sobre el múscul i les cèl·lules adiposes és motiu de controvèrsia (Berti, 1997, Siegrist-Kaiser, 1997, Furnsinn, 1998, Zierath, 1998). S'ha suggerit que la leptina podria activar l'expressió d'*UCP3* mitjançant el sistema nerviós simpàtic (Cusin, 1998) o les hormones tiroïdals (Cusin, 2000).

ELS ÀCIDS GRASSOS NO ESTERIFICATS

Estudiant l'expressió d'*UCP3* en rosegadors i humans, en diverses situacions fisiològiques o patològiques, s'ha demostrat que l'expressió gènica d'*UCP3* al múscul esquelètic està relacionada amb els nivells de NEFA (*nonesterified fatty acids*) en sang. Durant el desenvolupament (Brun, 1999a i 1999b), l'alletament (Pedraza, 2000), en l'obesitat (Boss, 1998c, Sbraccia, 2002), la diabetis (Bao, 1998, Hidaka, 2000), en l'exercici agut (Schrauwen, 2002, Noland, 2003), o en alteracions en la ingesta com el dejuni (Millet, 1997, Weigle, 1998, Boss, 1998) o una dieta hipocalòrica (Boss, 1998) o infusions de lípids (Weigle, 1998, Khalifallah, 2000, Fabris, 2001, Vettor, 2002), s'ha observat una associació entre els nivells de NEFA en sang i els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al múscul esquelètic.

Per tal d'establir el paper dels NEFA en sang en la regulació de l'expressió d'*UCP3* al múscul, s'ha estudiat l'efecte del dejuni, alterant el metabolisme lipídic amb fàrmacs que inhibeixen la lipòlisi al teixit adipós o l'entrada d'àcids grassos als mitocondris. S'ha suggerit que

l'expressió gènica d'*UCP3* en fibres musculars de contracció lenta de tipus oxidatiu (*soleus*) estaria regulada pels NEFA en sang, mentre que en les fibres musculars de contracció ràpida de tipus oxidatiu i glicolític (*tibialis anterior*) vindria regulada pel flux de la β -oxidació, i al múscul *gastrocnemius* (de contracció ràpida, majoritàriament glicolític) no estaria regulada per cap d'aquest dos paràmetres (Samec, 1998a i 1998b, 1999 i 2002). Al cor, la inducció d'*UCP3* deguda al dejuni està relacionada amb els NEFA (van der Lee, 2001).

L'efecte dels àcids grassos sobre l'expressió gènica d'*UCP3* és directe, tal i com s'ha vist en cultius de cèl·lules musculars diferenciades L6 i C2C12 (Nagase, 1999, Hwang, 1999, Cabrero, 2000, Son, 2001) i cèl·lules musculars humanes (Sbraccia, 2002). Els àcids grassos són lligands dels receptors activats per proliferadors peroxisomals (PPAR, *peroxisome proliferator activated receptor*), factors de transcripció de la família dels receptors nuclears d'hormones (veure els receptors nuclears: els receptors activats per proliferadors peroxisomals). Així doncs, l'acció dels NEFA sobre la transcripció d'*UCP3* podria estar mitjançada pels PPAR, tal i com ho demostren experiments *in vivo* amb lligands sintètics específics de PPAR α i/o PPAR δ (Brun, 1999a, Pedraza, 2000, Young, 2001, Muoio, 2002a). La capacitat dels activadors de PPAR γ d'augmentar l'expressió d'*UCP3* *in vivo* depèn de la situació fisiològica, suggerint que el seu mecanisme d'acció és indirecte (Kelly, 1998, Matsuda, 1998, Hwang, 1999, Pedraza, 2000, Emilsson, 2000). Els estudis en cèl·lules musculars diferenciades en cultiu suggereixen que PPAR δ és el principal PPAR inductor de l'expressió d'*UCP3* (Nagase, 1999, Son, 2001, Muoio, 2002a, Dressel, 2003), possiblement degut a la manca d'expressió de PPAR α en línies de cèl·lules musculars en cultiu. Els estudis amb ratolins *PPAR α -KO*, mostren que l'augment en l'mRNA d'*UCP3* en resposta a l'exercici agut i al dejuni és similar a la dels ratolins control (Kersten, 1999, Muoio, 2002a), suggerint que PPAR α no és imprescindible per mitjançar els efectes dels NEFA al múscul.

Al cor s'ha descrit una activació d'*UCP3* en resposta al dejuni, a una dieta rica en lípids, a una infusió de lípids i a un lligand específic de PPAR α (Young, 2001, Muoio, 2002a). Els ratolins *PPAR α -KO* presenten una menor expressió d'*UCP3* al cor en condicions d'alimentació i en resposta al dejuni (Young, 2001, Muoio, 2002a), indicant que PPAR α seria més important que PPAR δ en la regulació de l'expressió d'*UCP3* al cor.

LES HORMONES TIROÏDALS

Se sap que les hormones tiroïdals (TH o *thyroid hormones*) estimulen l'activitat metabòlica de molts teixits, però se'n desconeix el mecanisme molecular. L'hormona tiroïdal T₃ (3,5,3'-L-triiodotironina) pot afectar la transcripció interaccionant amb el seu receptor (TR o

thyroid hormone receptor), que pertany a la família dels receptors nuclears (veure els receptors nuclears: els receptors d'hormones tiroïdals). El fred i la noradrenalina, al TAM, activen l'enzim iodotironina 5'-desiodasa, que converteix la tiroxina (T_4) en la forma més activa de l'hormona, T_3 (Silva i Larsen, 1983). La T_3 , de manera sinèrgica amb el sistema nerviós simpàtic, augmenta l'expressió gènica d'*UCP1* al TAM (Rabelo, 1995, Rabelo, 1996b).

L'administració de TH en rosegadors augmenta l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA i de proteïna, tant al múscul esquelètic (Larkin, 1997, Lanni, 1999, Masaki, 2000b, Jucker, 2000a, Simonyan, 2001, Moreno, 2003, Queiroz, 2004), com al TAM (Larkin, 1997) i al cor (Boehm, 2001). Pel que fa al canvi d'hipotiroïdisme o eutiroïdisme a hipertiroïdisme, s'ha observat un augment en l'expressió d'*UCP3* al múscul (Gong, 1997, Jekabsons, 1999, Cunningham, 2003) associat a un increment en el desacoblament mitocondrial o en la taxa metabòlica basal (RMR o *resting metabolic rate*) en rosegadors (Lanni, 1999, Jucker, 2000a, De Lange, 2001) i humans (Barbe, 2001, Lebon, 2001). En experiments en cèl·lules musculars en cultiu (L6 de rata o cultius primaris humans) s'ha demostrat un efecte directe de les TH sobre l'expressió del gen *UCP3* (Nagase, 1999, Barbe, 2001).

L'ÀCID RETINOIC

L'àcid retinoic (RA, *retinoic acid*), un derivat natural de la vitamina A, afecta molts processos biològics, incloent la morfogènesi, el creixement cel·lular i la diferenciació, majoritàriament modificant la transcripció gènica. L'RA actua a través de dos tipus de receptors, el receptor de l'RA (RAR, *retinoic acid receptor*) i el receptor del retinoide X (RXR, *retinoid X receptor*), membres de la superfamília de receptors nuclears (veure els receptors nuclears: els receptors de retinoides). Existeixen dos isòmers actius de l'RA, l'àcid *all-trans* retinoic i l'àcid *9-cis* retinoic, que afecten la transcripció a través de vies diferents. L'àcid *all-trans* retinoic s'uneix a RAR i activa l'expressió gènica majoritàriament a través d'heterodímers RAR/RXR (Mangelsdorf, 1994). L'àcid *9-cis* retinoic activa el component RAR dels heterodímers RAR/RXR, però també promou l'expressió gènica a través de l'activació d'RXR present en homodímers o heterodímers amb altres receptors nuclears, com PPAR i receptors orfes (Levin, 1992, Mangelsdorf, 1995, Leblanc, 1995).

L'RA activa l'expressió gènica d'*UCP1* al TAM, amb un efecte comparable al de la noradrenalina (Alvarez, 1995, Rabelo, 1996a, Larose, 1996). En canvi, els nivells de l'mRNA d'*UCP3* al TAM disminueixen o no es modifiquen després de l'administració aguda d'RA (Scarpace, 2000b, Felipe, 2003).

Al múscul esquelètic, en ratolins, l'administració aguda d'RA incrementa l'expressió de l'mRNA d'*UCP3* i una dieta suplementada amb vitamina A, augmenta els nivells de l'mRNA i la proteïna UCP3 (Felipe, 2003). El tractament amb àcid *9-cis* retinoic en cèl·lules musculars L6 diferenciades en cultiu, activa l'expressió gènica d'*UCP3* (Nagase, 1999, Son, 2001) i en cultius primaris de cèl·lules musculars diferenciades de rata, activa l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA i proteïna (Guillet-Deniau, 2002).

Els efectes activadors de l'expressió d'*UCP3* per l'àcid *9-cis* retinoic poden estar mitjançats per homodímers RXR o heterodímers d'RXR amb altres receptors nuclears com RAR, PPAR o receptors orfes (Mangelsdorf, 1995, Leblanc, 1995).

LA INSULINA

S'ha descrit que la insulina disminueix l'estimulació adrenèrgica del gen *UCP1* (Klein, 2000), però també que el factor de creixement similar a la insulina (IGF-1, *insulin-like growth factor-1*) i la insulina incrementen la taxa de transcripció del gen *UCP1* en adipòcits marrons (Teruel, 1998).

En rates amb diabetis induïda per la toxina pancreàtica STZ (*streptozotocin*), hipoinsulinèmiques, els nivells de l'mRNA d'*UCP3* estan augmentats al cor i en diferents tipus de múscul esquelètic i disminuïts al TAM (Hidaka, 1999 i 2000, Young, 2001, Hidaka, 2002, Guillet-Deniau, 2002) i l'administració d'insulina en aquests animals inhibeix totalment l'expressió gènica d'*UCP3* al múscul (Hidaka, 2000). Els efectes de la insulina o la diabetis *in vivo* poden ser una conseqüència de les alteracions metabòliques associades (canvis en els nivells de NEFA en sang, glucèmia...). No obstant, estudis en cèl·lules musculars en cultiu indiquen que la insulina inhibeix l'expressió d'*UCP3* mitjançant SREBP-1 (*sterol receptor element binding protein-1*) (Guillet-Deniau, 2002), tot i que no està clar que aquest factor de transcripció hi estigui implicat al múscul *gastrocnemius in vivo* (Commerford, 2004).

1.4. FUNCIO D'UCP3

Tot i que encara no es coneix la funció que realitza la proteïna UCP3, s'han formulat i estudiat diverses hipòtesis sobre el seu paper fisiològic i el mecanisme d'actuació. Inicialment, es va estudiar la relació entre UCP3 i el metabolisme energètic mitjançant pel desacoblament, i posteriorment, s'ha relacionat UCP3 amb el metabolisme dels àcids grassos i la protecció contra les espècies reactives de l'oxigen.

EL DESACOBLAMENT

Degut a l'elevat grau d'identitat entre UCP1 i UCP3, s'ha estudiat la capacitat desacobladora d'UCP3. UCP1 desacobla la cadena respiratòria de la fosforilació oxidativa: augmenta la conductància als protons de la membrana mitocondrial interna, sent activada pels àcids grassos i inhibida per GDP (Nicholls, 1989). En estudis de reconstitució d'UCP3 en liposomes s'observa un transport de protons (Jaburek, 1999, Echtay, 2001, Zackova, 2004). La sobreexpressió d'UCP3 en llevat (Gong, 1997, Liu, 1998, Zhang, 1999, Hinz, 1999, Hagen, 1999), en cèl·lules de mamífer (Boss, 1998c, Hong, 2001, Garcia-Martinez, 2001, Dejean, 2003) i al múscul esquelètic de ratolins (Lanni, 1999, Son, 2004), és compatible amb una activitat desacobladora (disminució del potencial de membrana mitocondrial, augment de la taxa de respiració no associada a la síntesi d'ATP...). A més a més, UCP3 és capaç d'actuar com un desacoblador natural de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa sota la influència d'activadors intracel·lulars (àcids grassos i espècies reactives de l'oxigen) o inhibidors (GDP i ADP) (Echtay, 2001 i 2002). No obstant, s'ha proposat que aquest desacoblament és un artefacte (Heidkaemper, 2000, Winkler, 2001, Harper, 2002, Cadenas, 2002, Guerini, 2002), que també s'ha descrit amb la sobreexpressió d'altres transportadors mitocondrials, com UCP1 (Stuart, 2001b, Harper, 2002). L'expressió d'UCP3 a nivells fisiològics al múscul esquelètic no afecta significativament la bioenergètica mitocondrial (Cadenas, 1999, Jekabsons, 1999, Jucker, 2000b, Bézaire, 2001, Hesselink, 2003). Per altra banda, en ratolins *UCP3-KO* s'ha observat un menor desacoblament als mitocondris del múscul esquelètic (Vidal-Puig, 2000, Cline, 2001), tot i que posteriorment no s'han pogut reproduir aquests resultats (Cadenas, 2002). Així doncs, no està clar que la funció principal d'UCP3 sigui el desacoblament.

LA TERMOGÈNESI

La funció fisiològica d'UCP1 és la producció de calor (Enerback, 1997). La similitud entre UCP1 i UCP3, i l'expressió específica d'UCP3 a teixits termogènics com el múscul esquelètic i el TAM, ha fet pensar que la seva funció podia estar també relacionada amb la termogènesi. Els diferents estudis de la regulació d'UCP3 en resposta al fred no mostren una tendència clara (veure regulació de l'expressió del gen *UCP3*: el fred). Els estudis amb ratolins *KO* indiquen que en absència d'UCP1 l'aclimatació al fred és deguda exclusivament a la termogènesi associada a tremolor (Golozoubova, 2001), i en absència d'UCP3 ni la temperatura basal ni la resposta termogènica no estan disminuïdes (Vidal-Puig, 2000, Gong, 2000). Recentment, però, s'ha demostrat que els ratolins *UCP3-KO* estan protegits dels efectes hipertèrmics provocats per les drogues MDMA (*3,4-methylenedioxymethamphetamine* o èxtasi) i *methamphetamine* (Mills, 2003, Sprague, 2004), suggerint que UCP3 pot estar implicada en la termogènesi.

LA TAXA METABÒLICA

En humans, el metabolisme del múscul esquelètic és determinant en la taxa de consum energètic (representa més del 20% de la taxa metabòlica basal diària). S'ha proposat que la possible activitat desacobladora d'UCP3 en el múscul esquelètic podria jugar un paper important en la regulació de la despesa energètica i per tant, en la regulació del pes corporal (Dulloo, 2001).

Els estudis genètics en humans recolzen una funció d'UCP3 com a reguladora de la taxa metabòlica basal. El *locus UCP2/UCP3* presenta un fort lligament genètic amb la taxa metabòlica en repòs en humans (Bouchard, 1997) i alguns estudis mostren una correlació entre els nivells d'expressió d'UCP3 i la taxa metabòlica basal (Walder, 1998, Schrauwen, 1999b, Harper, 2002). En indis Pima, s'ha descrit una correlació inversa entre els nivells d'expressió d'UCP3 i l'índex de massa corporal (BMI o *body mass index*) (Schrauwen, 1999b). S'ha suggerit, fins i tot, que la regulació de la taxa metabòlica basal deguda a l'hormona tiroïdal T₃ podria estar mitjançada per UCP3 (de Lange, 2001).

En ratolins, la sobreexpressió d'UCP3 al múscul esquelètic comporta una resistència a l'obesitat induïda per la dieta (Clapham, 2000, Son, 2004). No obstant, els estudis amb ratolins *UCP3-KO* no semblen indicar que UCP3 estigui implicada en la regulació del metabolisme energètic (Vidal-Puig, 2000, Gong, 2000, Cline, 2001, Bézaire, 2001) ja que aquests ratolins no tenen alterada la taxa metabòlica i no són obesos, fins i tot amb una dieta rica en greix. No es pot descartar, però, la presència de mecanismes que compensin la manca d'UCP3 en aquests animals, com per exemple l'activitat d'UCP2 o altres mecanismes desconeguts.

PROTECCIÓ CONTRA LES ESPÈCIES REACTIVES DE L'OXIGEN

També s'ha proposat que UCP3, mitjançant un desacoblament moderat, podria estar implicada en reduir la formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*) als mitocondris (Vidal-Puig, 2000, Brand, 2000, Echtay, 2002), protegint les cèl·lules dels seus efectes nocius. Els mitocondris són la principal font de producció de ROS, principalment quan el quocient ATP/ADP és elevat. Com a conseqüència, la cadena respiratòria s'enlenteix. En disminuir la velocitat de transport d'electrons, també ho fa la recircularització de quinones, afavorint-se la producció de radicals lliures (Negre-Salvayre, 1997, Skulachev, 1997 i 1998). Així doncs, els ROS es produeixen a la cadena respiratòria de manera proporcional al potencial de membrana mitocondrial, i per tant, un desacoblament moderat acceleraria la respiració i disminuiria la producció de ROS (Papa i Skulachev, 1997). D'acord amb aquesta teoria, als

ratolins *UCP3-KO* s'ha observat un increment en la producció de ROS al múscul (Vidal-Puig, 2000) i un augment en els efectes nocius deguts als ROS (peroxidació lipídica i dany en proteïnes mitocondrials) (Brand, 2002). A més, s'ha descrit que els superòxids i els aldehids reactius (un producte secundari de la peroxidació de fosfolípids pels ROS) activen el desacoblament als mitocondris, fet que no s'observa als mitocondris de múscul dels ratolins *UCP3-KO* (Echtay, 2002 i 2003, Talbot, 2004).

L'OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS

Donat que UCP3 s'expressa majoritàriament en teixits que metabolitzen àcids grassos i en condicions de catabolisme lipídic, s'ha suggerit que UCP3 en facilitaria l'oxidació (Dulloo & Samec, 2000). Aquesta funció seria útil en situacions en les que la quantitat d'àcids grassos per oxidar excedeix la capacitat d'oxidar-los del mitocondri (Schrauwen, 2001c, Harper, 2002), situacions en les que l'expressió d'UCP3 és superior, com el dejuni (Millet, 1997, Cadenas, 1999, Hildebrandt, 2000), l'exercici agut (Tsuboyama-Kasaoka, 1998, Zhou, 2000, Schrauwen, 2002) i la ingesta d'una dieta rica en greix (Weigle, 1998, Samec, 1999, Schrauwen, 2001b, Hesselink, 2003) i en fibres glicolítiques de contracció ràpida (Hildebrandt, 2000, Hoeks, 2003). L'expressió d'UCP3 és menor en situacions en les que la capacitat d'oxidar lípids és superior, com després de l'entrenament de resistència (Boss, 1998b, Schrauwen, 1999a, Russell, 2003a i 2003b) i de la pèrdua de pes (Vidal-Puig, 1999, Schrauwen, 2000), i en fibres musculars oxidatives de tipus I, que tenen una gran capacitat d'oxidar lípids (Samec, 1998a i 1998b, Hesselink, 2001, Russell, 2003a i 2003b, Hoeks, 2003). A més a més, en ratolins que sobreexpressen UCP3 al múscul (Wang, 2003a) i en ratolins *UCP3-KO* (Bézaire, 2001), s'ha observat un augment i una disminució en l'oxidació d'àcids grassos, respectivament. En humans, s'ha descrit una associació entre un polimorfisme al gen *UCP3* i la taxa d'oxidació de lípids (Argyropoulos, 1998).

Davant d'un augment en l'oxidació d'àcids grassos, UCP3 podria jugar un paper en la prevenció de la lipotoxicitat associada a aquest increment, o bé actuar sobre algun punt de control de la via de la β -oxidació. S'ha proposat que UCP3 podria participar en el transport d'àcids grassos cap a l'interior dels mitocondris, però s'ha observat que UCP3 no és un transportador alternatiu a CPT1 (Jucker, 2000, Garcia-Martinez, 2001). També s'ha suggerit que UCP3 podria transportar anions d'àcids grassos cap a fora del mitocondri (Himms-Hagen i Harper, 2001). Val a dir que el transport d'anions d'àcids grassos de la matriu mitocondrial cap a l'espai intermembrana és un dels possibles mecanismes de desacoblament proposats per les UCP (Jezek, 1998, Skulachev, 1999, Jaburek, 1999, Garlid, 2001, Himms-Hagen i Harper, 2001, Schrauwen, 2001c, 2002 i 2003). D'aquesta manera, el transport d'anions d'àcids grassos podria disminuir la producció de ROS, mitjançant el desacoblament (veure funció d'UCP3:

protecció contra les espècies reactives de l'oxigen). L'exportació d'anions d'àcids grassos de la matriu mitocondrial podria ser important també per prevenir el dany mitocondrial ja que els àcids grassos no esterificats poden ser peroxidats a la matriu mitocondrial. S'ha suggerit també que UCP3 podria transportar àcids grassos peroxidats (Goglia i Skulachev, 2003).

En resum, encara no es coneix de forma inequívoca l'activitat ni el paper fisiològic de la proteïna UCP3. Fins i tot s'han suggerit altres funcions a part de les esmentades, com la regulació del metabolisme de la glucosa (Huppertz, 2001), el control dels nivells d'ATP/ADP (Garcia-Martinez, 2001), la regulació de l'estat redox de la cèl·lula (Ricquier i Bouillaud, 2000) i la modulació de la sensibilitat a l'apoptosi (Dejean, 2004).

2. ELS RECEPTORS NUCLEARS

2.1. GENERALITATS

La superfamília dels receptors nuclears està formada per més de 150 proteïnes que participen en una gran varietat de processos biològics com el creixement, desenvolupament, homeòstasi, diferenciació i morfogènesi. Els receptors nuclears (NR) modifiquen la transcripció dels gens, en resposta a senyals extracel·lulars i intracel·lulars com hormones, factors nutricionals... de naturalesa lipofílica. Les molècules lipofíliques (hormones esteroïdals, tiroïdals, retinoides, calcitriol, proliferadors peroxisomals) poden travessar la membrana plasmàtica. Dins de la cèl·lula es poden convertir en formes biològicament més actives, i unir-se al seu NR. L'activitat dels NR també pot ser modulada mitjançant modificacions covalents degudes a altres vies de senyalització. Aquests NR interaccionen directament amb seqüències de DNA localitzades habitualment en la zona promotora de gens, actuant com a factors de transcripció i modulant l'expressió (Fig. 3).

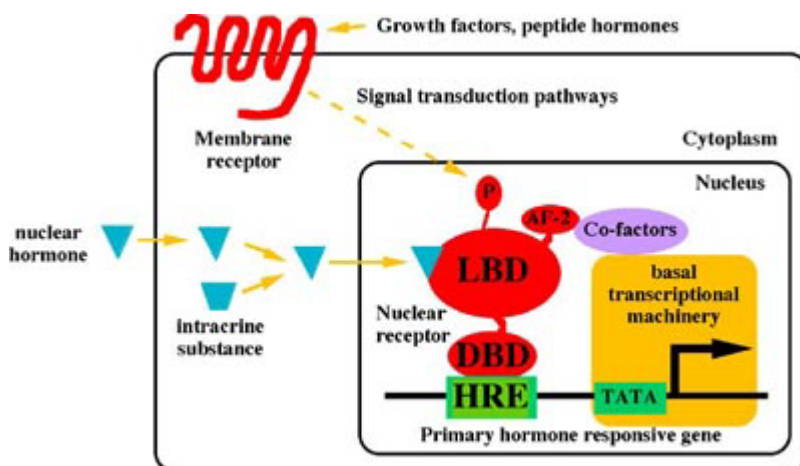


Figura 3. Vies de senyalització que regulen la transcripció mitjançant els NR. L'activitat dels NR pot ser regulada per la unió de lligands lipofílics, interaccions proteïna-proteïna amb altres factors de transcripció, o per modificació covalent com la fosforilació després de l'estimulació dels receptors de la superfície cel·lular o per quinases dependents de ciclins.

La superfamília d'NR està formada per la família de receptors esteroïdals, a la que pertanyen entre altres, els receptors d'estrògens i els de glucocorticoides; i la família de receptors no esteroïdals, a la que corresponen els receptors d'hormones tiroïdals, els de retinoides, els de vitamina D₃, i els d'activadors de la proliferació de peroxisomes. Donada la seva elevada homologia, també queden englobats en la superfamília els receptors orfes (de lligand per ara desconegut).

Els NR s'uneixen als elements de resposta a hormones (HRE, *hormone response element*), seqüències de DNA derivades del motiu canònic PuGGTCA, que es situen generalment a les regions 5' reguladores del promotor. Tot i que alguns NR s'uneixen com a monòmers a la seqüència consens, la majoria d'aquests receptors s'uneixen com a dímers (homodímers o heterodímers) i, per tant, són necessàries dues còpies de la seqüència consens, per constituir un HRE funcional. Els dos motius hexamèrics estan separats per pocs nucleòtids (espaiadors) i poden estar disposats com a repeticions directes, palíndroms o palíndroms invertits. Les seqüències flanquejants també són importants per al reconeixement. Els diferents NR poden unir-se a diferents seqüències HRE amb major o menor afinitat.

Un cop el receptor reconeix l'element de resposta, la transactivació pot dur-se a terme per interacció directa amb el complex de preiniciació de la transcripció, o mitjançant molècules que actuen de pont entre la maquinària de transcripció i el receptor, com adaptadors, coactivadors, proteïnes accessòries... que poden regular la transcripció impedit o afavorint la unió del receptor a l'element de resposta. També podem trobar regulació negativa de la transcripció per la unió, per part del receptor, a elements de resposta negatius o per competència amb altres factors que actuen en *trans*.

2.2. CLASSIFICACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS

Els NR es classifiquen en funció de les característiques del lligand que reconeixen, de dimerització i de les propietats d'unió al DNA (Mangelsdorf, 1995).

Els receptors de classe I són els receptors d'hormones esteroidals, entre els que trobem els receptors de glucocorticoides, de progesterona, de mineralocorticoides i d'estrògens. En absència de lligand, es troben al citoplasma, associats a *heat-shock proteins*. La unió de l'hormona allibera el receptor, que és translocat al nucli. S'uneixen en forma d'homodímers a seqüències de DNA formades per palíndroms.

Els receptors de classe II són els que heterodimeritzen amb el receptor de l'àcid 9-*cis* retinoic (RXR, *retinoid X receptor*), com els receptors activats per proliferadors peroxisomals (PPAR, *peroxisome proliferator activated receptor*), els receptors d'àcid retinoic (RAR, *retinoic acid receptor*), d'hormones tiroïdals (TR, *thyroid hormone receptor*), de vitamina D₃ (VDR, *vitamin D receptor*) i alguns receptors orfes. S'uneixen principalment a repeticions directes de DNA que varien en el nombre de nucleòtids espaiadors, encara que també poden utilitzar elements organitzats com palíndroms o palíndroms invertits. En aquest grup, la localització nuclear és independent d'activació per part del lligand.

Els receptors de classe III s'uneixen a repeticions directes de DNA com a homodímers i inclou receptors com RXR, HNF-4 (*hepatocyte nuclear factor-4*) i COUP-TF (*chicken ovoalbumin upstream promoter-transcription factor*). Generalment, activen o reprimeixen la transcripció de manera constitutiva.

Els receptors de classe IV s'uneixen com a monòmers a hexanucleòtids i activen la transcripció de manera constitutiva. NGFI-B (*nerve growth factor inducible gene-B*) pertany a aquest grup.

2.3. ESTRUCTURA DELS RECEPTORS NUCLEARS

La superfamília dels NR presenta una estructura comú formada per diferents dominis funcionals i estructurals (Tsai i O'Malley, 1994) (Fig. 4).

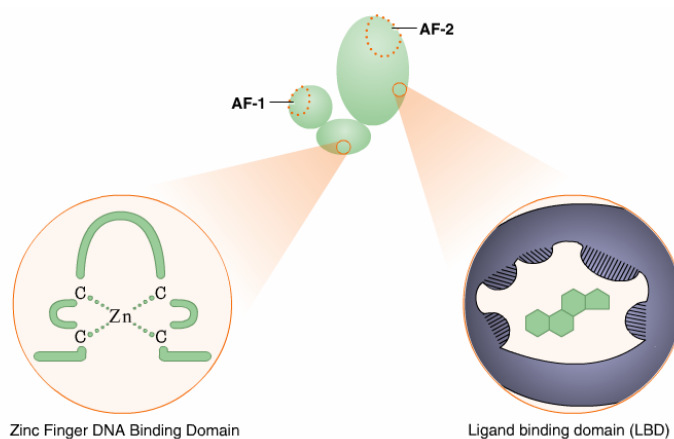


Figura 4. Organització funcional i estructural dels NR. Els dominis funcionals inclouen el domini d'unió al DNA (DBD, *DNA-binding domain*), un domini d'unió al lligand (LBD, *ligand-binding domain*) C terminal i dos funcions d'activació de la transcripció AF-1 en la regió N terminal i AF-2 en el LBD.

El domini A/B N terminal és el menys conservat de tots i conté una regió amb funció transactivadora constitutiva independent de lligand (AF-1), que sovint és deguda a modificacions covalents de la proteïna.

El domini C conté el domini d'unió al DNA (DBD, *DNA binding domain*). És el més conservat degut a la seva important funció de reconèixer seqüències específiques del DNA, els HRE. Conté dos dits de zinc amb una hèlix α a cada un, que intervenen en el reconeixement i la unió específica del nucli de l'HRE, i una extensió C terminal (CTE, *carboxy-terminal extension*) amb una hèlix α , que reconeix les seqüències flanquejants de l'HRE. El domini C també participa en la dimerització.

El domini D o *hinge region* és una regió molt poc conservada, que uneix el DBD amb el domini d'unió al lligand (LBD, *ligand binding domain*). Proporciona flexibilitat per facilitar la unió dels NR als HRE i permet canvis conformacionals quan s'uneix al lligand. A través d'aquest domini, el receptor interacciona amb coactivadors i repressors.

El domini E conté l'LBD, seqüències implicades en la dimerització i en l'associació a *heat-shock proteins*, senyals de localització nuclear i la funció de transactivació dependent de lligand (AF-2), que interacciona amb coactivadors o repressors.

El domini F és el domini C terminal i no se li ha atribuït cap funció específica.

2.4. ELS RECEPTORS DE RETINOIDES

La vitamina A i els seus derivats actius, els retinoides, juguen un paper crític en el desenvolupament i l'homeòstasi dels teixits a través dels seus efectes en la diferenciació, proliferació i apoptosi cel·lular (Ross, 2000, Altucci i Gronemeyer, 2001). El mecanisme pel qual els retinoides afecten l'expressió gènica es va posar de manifest amb la identificació i clonació del receptor de l'àcid retinoic (RAR, *retinoic acid receptor*) i el receptor del retinoide X (RXR, *retinoid X receptor*) (Leid, 1992, Chambon, 1994, Giguère, 1994, Gronemeyer i Laudet, 1995, Mangelsdorf i Evans, 1995). RAR heterodimeritza amb RXR i modula la transcripció en resposta als àcids *all-trans* retinoic o *9-cis* retinoic (Levin, 1992, Mangelsdorf, 1994). RXR és activat per l'àcid *9-cis* retinoic i pot formar homodímers o heterodímers amb altres membres de la superfamília de receptors nuclears, com TR i PPAR (Levin, 1992, Mangelsdorf, 1995, Leblanc, 1995).

L'àcid retinoic (RA) és una de les formes actives de la vitamina A o retinol, una vitamina liposoluble. Una altra forma activa de la vitamina A és el seu aldehid, el retinal, implicat en la visió. L'RA prové de la ingesta de retinil esters (RE) de teixits animals i carotenoides de vegetals. A l'intestí, els RE i els carotenoides es converteixen en retinol, que és esterificat als enteròcits. Els RE són empaquetats en quilomicrons i secretats a la circulació mitjançant el sistema limfàtic. El retinol pot ser captat i emmagatzemat en teixits perifèrics, com el teixit adipós, el ronyó i els pulmons, per hidròlisi d'una part dels RE dels quilomicrons mitjançant la lipoproteïna lipasa. Els RE presents en els quilomicrons romanents són captats pel fetge, que és l'òrgan on s'emmagatzema majoritàriament la vitamina A, en forma de RE. El retinol hepàtic pot ser alliberat al torrent sanguini unit a la proteïna d'unió a retinol (*retinol-binding protein*, RBP). El retinol-RBP circula associat a transtiretina. El retinol-RBP no complexat arriba als teixits diana i s'associa a la proteïna cel·lular d'unió a retinol (*cellular retinol-binding protein*, CRBP). El

retinol-CRBP és el substrat òptim per l'esterificació de retinol o l'oxidació primer a retinal, i després, de forma irreversible, a RA. La majoria de cèl·lules tenen els enzims necessaris per la isomerització entre les formes actives, els àcids *all-trans* i *9-cis* retinoic. Dins la cèl·lula, l'RA es troba unit a la proteïna cel·lular d'unió a àcid retinoic (*cellular retinoic acid binding protein*, CRABP), que regula l'activitat i especificitat dels enzims que metabolitzen l'RA, i allibera l'RA dins del nucli, on exercirà les seves funcions biològiques. En general, l'RA actua dins de la mateixa cèl·lula on ha estat produït a partir de retinol, encara que petites quantitats poden ser secretades i actuar a cèl·lules veïnes o fins i tot arribar a la circulació, on s'uneix a albúmina (revisat a Villarroya, 2004).

Donat que els àcids *all-trans* i *9-cis* retinoic poden isomeritzar-se degut al metabolisme intracel·lular, s'han desenvolupat lligands sintètics no isomeritzables específics de RAR (TTNPB, Am80, Ch55) i d'RXR (LG100268, AGN194204, Methoprene), per tal d'estudiar els efectes de cada receptor (revisat a Villarroya, 2004) (Taula 5).

També s'han identificat alguns àcids grassos naturals, com l'àcid fitànic o l'àcid docosahexaenoic, com a activadors d'RXR. L'àcid fitànic (àcid 3,7,11,15-tetrametilhexadecanoic), un derivat de la cadena lateral fitòlica de la clorofil·la, és capaç d'unir i activar diferents subtipus d'RXR (Kitareewan, 1996, Lemotte, 1996). En humans, l'àcid fitànic prové de la ingesta d'aliments d'origen animal que continguin greix o de l'oxidació del fitol present en aliments d'origen animal o vegetal. L'àcid docosahexaenoic, un àcid gras poliinsaturat de cadena llarga de la família n-3, i altres àcids grassos insaturats també poden unir i activar RXR (de Urquiza, 2000, Goldstein, 2003). Tot i que el rang d'afinitats d'aquests àcids grassos per unir RXR és inferior a l'afinitat de l'àcid *9-cis* retinoic, és compatible amb les concentracions fisiològiques d'aquests àcids grassos. Curiosament, l'anàlisi de l'estructura de cristall dels heterodímers d'RXR amb altres NR ha detectat la presència d'una molècula d'àcid oleic o d'àcid esteàric unida a RXR (Wurtz, 1996, Bourguet, 2000). Recentment s'ha suggerit que RXR podria ser un receptor nuclear "oportunista", que podria unir diferents lligands amb diferents afinitats, com l'àcid *9-cis* retinoic i els àcids grassos, en funció del context cel·lular i la concentració dels lligands (Egea, 2002).

Els receptors de retinoides units als seus lligands i a l'element de resposta del DNA modulen la transcripció. És freqüent que la unió de l'RA a RAR activi l'expressió dels gens diana, però també existeixen exemples de gens regulats negativament per l'RA. La seqüència consens dels RARE (*retinoic acid response element*) sol ser una repetició directa de l'hexàmer AGGTCA separada per 2 (DR2) o 5 (DR5) nucleòtids, on RXR s'uniria a l'hexàmer en 5' i RAR a l'hexàmer en 3' i en presència de lligand, activarien la transcripció. Els heterodímers RAR/RXR també poden unir-se a seqüències DR1, però ara RAR s'uniria en 5' i RXR en 3', i s'ha descrit una manca de resposta als lligands de RAR (revisat a Bastien i Rochette-Egly, 2004).

Subtipus	Lligands	Expressió tissular
Subfamília RAR		
RAR α ($\alpha 1 \rightarrow \alpha 7$)	AtRA>9cRA; TTNPB, Am80, Ch55	TAB, fetge, pulmó. $\alpha 1$: pell, pulmó, ronyó, cor, múscul, cervell, intestí, fetge. $\alpha 2$: pulmó, intestí, fetge, pell.
RAR β ($\beta 1 \rightarrow \beta 4$)	AtRA>9cRA; TTNPB, Am80, Ch55	Fetge, pulmó, TAB, cor, pell, melsa. $\beta 1/3$: cervell, pulmó, pell. $\beta 2$: cor, cervell, ronyó, fetge, pulmó, múscul.
RAR γ ($\gamma 1, \gamma 2$)	AtRA>9cRA; TTNPB, Am80, Ch55	Pell, pulmó, melsa, TAB, pulmó.
Subfamília RXR		
RXR α	9cRA>>>àc. fitànic, àc. grassos insaturats; methoprene, LG100268, AGN194204	Fetge, múscul, pulmó, ronyó, cor, intestí.
RXR β ($\beta 1, \beta 2$)	9cRA>>>àc. fitànic, àc. grassos insaturats; methoprene, LG100268, AGN194204	Cervell, cor, adrenal, ronyó, pulmó, múscul, intestí, fetge. $\beta 1$: cervell, cor. $\beta 2$: cervell, cor, ronyó.
RXR γ ($\gamma 1, \gamma 2$)	9cRA>>>àc. fitànic, àc. grassos insaturats; methoprene, LG100268, AGN194204	Glàndula tiroïdal, retina, SNC fetal. $\gamma 1$: múscul, cervell, cor, pulmó, hipòfisi. $\gamma 2$: múscul, cor, cor, fetge, ronyó, adrenals.
Subfamília T₃R		
T ₃ R α ($\alpha 1$; $\alpha 2, \alpha 3, \Delta\alpha 1, \Delta\alpha 2$)	T ₃ >T ₄ no uneixen lligand	$\alpha 1$: cervell, intestí, cor, múscul, TAM, pulmó, hipòfisi, ronyó, cor, melsa, fetge. $\alpha 2$: testicle, cervell, cor, múscul, pulmó.
T ₃ R β ($\beta 1, \beta 2, \beta 3$; $\Delta\beta 3$)	T ₃ >T ₄ no uneix lligand	$\beta 1$: hipòfisi, fetge, ronyó, cor, cervell, múscul. $\beta 2$: hipòfisi. $\beta 3$: fetge, ronyó, pulmó, múscul, cor, melsa, cervell. $\Delta\beta 3$: melsa, pulmó, cervell.
Subfamília PPAR		
PPAR α	Àc. grassos insaturats; leucotriè B ₄ , àc. fitànic; Wy14,643 (10 μ M), bezafibrat, ETYA.	Retina, fetge, ronyó, adrenals, cor, TAM, intestí, múscul, timus, testicles.
PPAR β/δ	Àc. grassos insaturats; Wy14,643 (100 μ M), bezafibrat, GW501516, L165041.	Cervell, retina, múscul, cor, TAB, epidermis, intestí, fetge, pàncrees, ronyó, melsa, plaques de Peyer, cèl. Sertoli, testicles.
PPAR γ ($\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$)	Àc. grassos poliinsaturats: àc. linoleic, àc. linolènic, 9-HODE, 13-HODE; prostaglandines: 15d-PGJ ₂ ; thiazolidinediones (TZD): BRL-49653; Wy14,643 (100 μ M).	$\gamma 1$: TAM, TAB, múscul, fetge, cor, melsa, monòcits i macròfags, plaques de Peyer, retina, intestí. $\gamma 2$: TAM, TAB, múscul (humans). $\gamma 3$: macròfags, intestí, TAB.

Taula 5. Subfamílies de receptors nuclears RAR, RXR, T₃R i PPAR. Relació dels diferents subtipus de receptors pertanyents a cada subfamília, possibles activadors i/o lligands naturals o sintètics i patró d'expressió tissular a nivell d'mRNA. Nivells d'expressió relativa: **alta**, mitjana, **baixa**. Lligands: **naturals**, **sintètics**.

INTRODUCCIÓ

Abreviatures:

AGN194024	3,7-dimethyl-6S,7S-methano-7-[1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphth-7-yl] 2(E),4(E) heptadienoic acid.
Am80	4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-carbamoyl] benzoic acid.
AtRA	Àcid <i>all-trans</i> retinoic.
BRL49653	Rosiglitazone ((+/-)-5-([4-[2-Methyl-2(pyridylamino)ethoxy] phenyl] methyl) 2,4-thiazolidinedione).
Ch55	(E)-4-[3-(3,5-di-tert-butylphenyl)-3-oxo-1-propenyl] benzoic acid.
9cRA	Àcid <i>9-cis</i> retinoic.
ETYA	5,8,11,14-eicosatetraynoic acid.
GW501516	2-methyl-4-(((4-methyl-2-(4-trifluoromethylphenyl)-1,3-thiazol-5-yl)-methyl)sulfanyl)phenoxy)acetic acid.
HODE	Àcid hidroxyoctadecadienoic (derivat de l'àcid linoleic).
L165041	4-[3-(4-Acetyl-3-hydroxy-2-propylphenoxy)propoxy]phenoxyacetic acid.
LG100268	6-[1-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)cyclopropyl]nicotinic acid.
Methoprene	Isopropyl (2E, 4E)-11-methoxy-3,7,11-trimethyl-2-1,4-dodecadienoate.
T ₃	Triiodotironina.
T ₄	Tiroxina.
TTNPB	4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl] benzoic acid.
Wy14,643	Àcid pirinixic. (4-chloro-6-[2,3-xylidino]-2-pyrimidiny) thioacetic acid.

Bibliografia:

1. A. Astrom, U. Pettersson, A. Krust, P. Chambon, J. J. Voorhees, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 173, 339-345 (1990).
2. J. Berger et al., *J.Biol.Chem.* 274, 6718-6725 (1999).
3. D. J. Bradley, W. S. Young, III, C. Weinberger, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 7250-7254 (1989).
4. O. Braissant, F. Fougère, C. Scotto, M. Dauca, W. Wahli, *Endocrinology* 137, 354-366 (1996).
5. A. M. de Urquiza et al., *Science* 290, 2140-2144 (2000).
6. P. R. Devchand et al., *Nature* 384, 39-43 (1996).
7. P. Dolle, V. Fraulob, P. Kastner, P. Chambon, *Mech.Dev.* 45, 91-104 (1994).
8. J. T. Goldstein, A. Dobrzyn, M. Clagett-Dame, J. W. Pike, H. F. DeLuca, *Arch.Biochem.Biophys.* 420, 185-193 (2003).
9. R. Haq and F. Chytil, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 176, 1539-1544 (1991).
10. M. A. Harmon, M. F. Boehm, R. A. Heyman, D. J. Mangelsdorf, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 6157-6160 (1995).
11. I. Issemann and S. Green, *Nature* 347, 645-650 (1990).
12. H. Kagechika, E. Kawachi, Y. Hashimoto, T. Himi, K. Shudo, *J.Med.Chem.* 31, 2182-2192 (1988).
13. H. Kagechika, E. Kawachi, Y. Hashimoto, K. Shudo, *J.Med.Chem.* 32, 834-840 (1989).
14. H. Keller et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 2160-2164 (1993).
15. S. Kitareewan et al., *Mol.Biol.Cell* 7, 1153-1166 (1996).
16. S. A. Kliewer et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 7355-7359 (1994).
17. S. A. Kliewer and T. M. Willson, *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8, 576-581 (1998).
18. J. M. Lehmann et al., *J.Biol.Chem.* 270, 12953-12956 (1995).
19. P. K. LeMotte, S. Keidel, C. M. Apfel, *Eur.J.Biochem.* 236, 328-333 (1996).
20. P. Leroy et al., *EMBO J.* 10, 59-69 (1991).
21. Q. Liu and E. Linney, *Mol.Endocrinol.* 7, 651-658 (1993).
22. D. J. Mangelsdorf, *Nutr.Rev.* 52, S32-S44 (1994).
23. D. J. Mangelsdorf et al., *Genes Dev.* 6, 329-344 (1992).
24. D. J. Mangelsdorf, E. S. Ong, J. A. Dyck, R. M. Evans, *Nature* 345, 224-229 (1990).
25. T. Mitsuhashi and V. M. Nikodem, *J.Biol.Chem.* 264, 8900-8904 (1989).
26. T. Mitsuhashi, G. E. Tennyson, V. M. Nikodem, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, 5804-5808 (1988).
27. M. B. Murray, N. D. Zilz, N. L. McCreary, M. J. MacDonald, H. C. Towle, *J.Biol.Chem.* 263, 12770-12777 (1988).
28. T. Nagata, Y. Kanno, K. Ozato, M. Taketo, *Gene* 142, 183-189 (1994).
29. W. R. Oliver, Jr. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 5306-5311 (2001).
30. J. H. Oppenheimer, H. L. Schwartz, H. C. Shapiro, G. Bernstein, M. I. Surks, *J.Clin.Invest* 49, 1016-1024 (1970).
31. B. M. Spiegelman, *Diabetes* 47, 507-514 (1998).
32. S. Strickland et al., *Cancer Res.* 43, 5268-5272 (1983).
33. A. Sugawara, P. M. Yen, Y. Qi, R. M. Lechan, W. W. Chin, *Endocrinology* 136, 1766-1774 (1995).
34. M. L. Sznajdman et al., *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 13, 1517-1521 (2003).
35. P. Tontonoz, E. Hu, B. M. Spiegelman, *Cell* 79, 1147-1156 (1994).
36. F. Villarroya, R. Iglesias, M. Giralt, *Curr.Med.Chem.* 11, 795-805 (2004).
37. A. Zelent, A. Krust, M. Petkovich, P. Kastner, P. Chambon, *Nature* 339, 714-717 (1989).
38. A. Zelent et al., *EMBO J.* 10, 71-81 (1991).

RXR pot formar homodímers i heterodímers amb altres NR. La seqüència consens de l'element de resposta als homodímers RXR és una repetició de l'hexàmer AGGTCA que pot estar disposada formant un palíndrom o una seqüència DR1. Normalment es considera que els heterodímers d'RXR amb altres receptors poden ser activats només per la unió del lligand del membre que no és RXR, com en els heterodímers RAR-RXR, TR-RXR i VDR-RXR, o poden ser permissius a l'activació per RXR, com en els heterodímers PPAR-RXR (Kliwer, 1992, Keller, 1993, Gearing, 1993, Lemberger, 1996, revisat a Giguère, 1999). No obstant, dades recents indiquen que RXR pot retenir la sensibilitat al lligand quan forma part dels heterodímers RAR-RXR i TR-RXR (Germain, 2002, Li, 2002 i 2004).

Existeixen tres subtipus diferents de RAR i d'RXR: α , β i γ , que són codificats per gens diferents i mostren uns patrons d'expressió específics de cada teixit i etapa del desenvolupament (revisat a Mangelsdorf i Evans, 1995). Per cada subtipus existeixen dues o més isoformes generades per la utilització de promotors alternatius o per *splicing* diferencial. Els RAR i RXR s'expressen pràcticament a tot l'organisme en l'embrió i l'adult (revisat a Mangelsdorf, 1994). RAR α s'expressa de manera ubiqua, mentre que RAR β i RAR γ presenten un patró d'expressió que varia en funció del teixit i l'estadi del desenvolupament. De la mateixa manera, RXR β s'expressa de manera ubiqua, mentre que RXR α i RXR γ presenten un patró més restringit. RXR γ s'expressa de manera més abundant al múscul i al cervell (Taula 5). L'acció de l'RA pot ser regulada a nivell d'expressió de RAR i RXR, i s'ha vist que l'expressió d'alguns d'aquests receptors és regulada pels propis retinoides.

L'activitat dels receptors de retinoides està altament regulada. Per una banda, l'expressió de les diferents isoformes varia entre diferents teixits, entre ells el múscul esquelètic, i en diferents situacions. Per altra banda, la capacitat de transactivació ve condicionada per la presència d'RA, modificacions covalents com la fosforilació, interaccions amb altres proteïnes i la competència per RXR i els HRE (veure interaccions entre les vies de senyalització dels NR i amb altres vies de senyalització).

Els efectes dels retinoides es van observar ja fa més de 50 anys en rates en les que la carència de vitamina A produïa defectes en el desenvolupament embrionari dels fetus (Wilson, 1953). Per altra banda, els efectes teratogènics produïts per dosis farmacològiques de RA, posen de manifest que els retinoides són morfògens i reguladors essencials en l'embriogènesi. En adults, els retinoides també regulen la proliferació i la diferenciació, i en alguns tipus de càncer s'ha observat una desregulació en la via de transducció de senyal dels retinoides. Totes aquestes funcions involucren el control transcripcional d'un elevat nombre de gens pels heterodímers RXR/RAR.

Els gens diana dels receptors de retinoides identificats fins ara codifiquen per proteïnes implicades en el metabolisme de l'RA (CRBPI, CRBPII i CRABPII, Mangelsdorf, 1991, Smith, 1991, Durand, 1992), els propis receptors de retinoides (RAR β , Sucov, 1990), proteïnes implicades en el desenvolupament (Hox i HNF, Dupe, 1997, Qian, 2000) i en la diferenciació de teixits, com el múscul (MyoD, Alric, 1998) (veure reguladors positius de la miogènesi).

2.5. ELS RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS PEROXISOMALS

2.5.1. GENERALITATS

L'any 1990, Issemann i Green van descriure l'existència d'un factor de transcripció que interaccionava específicament amb molècules que causaven la proliferació dels peroxisomes al fetge de ratolins (Issemann i Green, 1990). El van anomenar receptor activat per proliferadors peroxisomals (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR), posteriorment PPAR α , degut al descobriment d'altres subtipus. Els PPAR pertanyen a la classe II de la superfamília dels NR i tradueixen estímuls de tipus nutricional, farmacològic i metabòlic, en canvis en l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme, especialment lipídic.

La família dels PPAR inclou tres subtipus diferents: PPAR α , PPAR δ (també anomenat PPAR β , *nuclear hormone receptor-1* (NUC 1) o *fatty acid activated receptor* (FAAR)) i PPAR γ , codificats per gens diferents. Tots tres tipus han estat clonats a *Xenopus laevis*, ratolins i humans (Issemann i Green, 1990, Dreyer, 1992, Kliewer, 1994). El gen que codifica per PPAR γ humà genera tres mRNA, degut a la presència de dos promotors alternatius i a *splicing* diferencial: PPAR γ_1 , PPAR γ_2 i PPAR γ_3 . Les proteïnes que provenen dels mRNA γ_1 i γ_3 són iguals i difereixen de γ_2 en l'extrem N terminal, el patró d'expressió i la funcionalitat (Fajas, 1997 i 1998). Per PPAR α humà s'ha descrit que un *splicing* diferencial genera una isoforma truncada, amb l'activitat transcripcional alterada i capaç d'actuar com a dominant negatiu (Gervois, 1999b, Gilde i van Bilsen, 2003).

Els PPAR dimeritzen amb RXR i s'uneixen als elements de resposta a PPAR (PPRE). Comparant la capacitat d'unió i transactivació dels PPAR-RXR a diferents PPRE, s'ha definit un PPRE consens com una seqüència d'aproximadament 17 parells de bases que conté una regió flanquejant en 5', un nucli DR1 imperfecte i una adenina com a nucleòtid espaiador dels dos hexàmers AGGTCA (Palmer, 1995, Ijpenberg, 1997, Nakshatri, 1998): 5' AACT AGGNCA A AGGTCA 3'. La presència d'una seqüència flanquejant en 5' del DR1 fixa una polaritat de l'heterodímer en reconèixer la seqüència de DNA. El receptor PPAR s'uneix a l'hexàmer en 5', mentre que RXR es situa en la seqüència en 3' dins de l'element de resposta (Ijpenberg, 1997). La regió flanquejant està relacionada amb l'especificitat per un determinat subtipus de PPAR. La

conservació d'aquesta seqüència és essencial per a la unió de PPAR α , però no sembla tan important per PPAR γ (Juge-Aubry, 1997). La unió dels PPAR a un determinat tipus de PPRE està modulada pel subtipus d'RXR amb el que dimeritza. S'ha demostrat que RXR γ augmenta la capacitat dels PPAR per a unir-se a l'element de resposta, especialment per PPAR γ , mentre que RXR α potencia la unió de PPAR α a determinats PPRE que tenen una baixa afinitat per aquests receptors (Juge-Aubry, 1997).

L'activitat dels PPAR es regula a diferents nivells: els nivells d'expressió varien en diferents teixits i situacions, i la capacitat de transactivació ve condicionada per la presència de lligand, modificacions covalents, la disponibilitat d'RXR, interaccions amb altres proteïnes i la competència per l'element de resposta (veure interaccions entre les vies de senyalització dels receptors nuclears i amb altres vies de senyalització).

2.5.2. PATRÓ D'EXPRESSIÓ DELS DIFERENTS PPAR

Els diferents subtipus i isoformes de PPAR presenten divergències en el seu patró d'expressió en els diferents teixits d'acord amb la funció que desenvolupen (Taula 5).

PPAR α , a nivell d'mRNA, s'expressa principalment a teixits amb una elevada capacitat oxidativa, com el fetge, el ronyó, el TAM, el múscul esquelètic i el cor (Issemann i Green, 1990, Sher, 1993, Mukherjee, 1994, Braissant, 1996).

PPAR δ és el subtipus d'expressió més ubiqua. L'mRNA de PPAR δ s'expressa en gran quantitat a diferents teixits com cervell, múscul esquelètic i cardíac, epidermis i TAB (Dreyer, 1992, Schmidt, 1992, Amri, 1995). També és present a la mucosa de tot el tracte digestiu, al fetge, al pàncrees, als ronyons, als centres de proliferació limfocitaris del sistema immunitari i als testicles (Kliwer, 1994, Larsen, 2002).

L'mRNA de PPAR γ s'expressa majoritàriament al TAB i al TAM. La isoforma γ_1 s'expressa també al fetge, al cor i al múscul esquelètic (Greene, 1995, Vidal-Puig, 1997b, Fajas, 1997). La isoforma γ_2 s'expressa principalment al TAB i al TAM (Tontonoz, 1994). En humans, també es detecta al múscul esquelètic (Vidal-Puig, 1997b). L'expressió de l'mRNA de PPAR γ_3 està restringida a macròfags, a l'intestí i al teixit adipós (Ricote, 1998, Fajas, 1998).

Tant al cor com al múscul esquelètic l'expressió relativa de l'mRNA de PPAR δ és superior a la de PPAR α i aquesta és superior a la de PPAR γ , en rosegadors (Escher, 2001, Muoio, 2002a).

2.5.3. ACTIVADORS DELS PPAR

A diferència d'altres NR, cada PPAR és capaç d'unir diversos lligands estructuralment diferents. A més a més, els heterodímers PPAR-RXR poden ser activats també per l'àcid *9-cis* retinoic (Kliwer, 1992, Keller, 1993, Gearing, 1993, Lemberger, 1996).

Els àcids grassos són activadors naturals dels PPAR. Estudis *in vitro* indiquen que els àcids grassos de cadena llarga, àcids grassos mono i poliinsaturats, uneixen PPAR α i PPAR β/δ amb una afinitat similar (Gottlicher, 1992, Issemann, 1993, Forman, 1997, Johnson, 1997, Kliwer, 1997, Xu, 1999, Desvergne i Wahli, 1999), mentre que PPAR γ presenta una baixa afinitat pels àcids grassos saturats (Forman, 1997, Johnson, 1997, Xu, 1999, Desvergne i Wahli, 1999). PPAR α té preferència pels C18 insaturats, especialment pels àcids oleic (C18:1), linoleic (C18:2) i linolènic (C18:3) (Krey, 1997). En canvi, els àcids grassos monoinsaturats de cadena molt llarga, els àcids grassos saturats i els de cadena curta (menys de 10 carbonis) tenen una afinitat molt baixa per aquests receptors. Recentment s'ha descrit que els esters acil-CoA d'àcids grassos de cadena llarga també interaccionen amb PPAR α , però actuant com a inhibidors (Elholm, 2001). L'àcid fitànic, un activador d'RXR, i el seu producte del metabolisme, l'àcid pristànic, també són capaços d'activar PPAR α (Ellinghaus, 1999).

L'àcid araquidònic i els seus derivats són lligands naturals de PPAR α i PPAR γ . El leucotriè B₄ i l'àcid 8(S)-hidroxi-eicosatetranòic (8(s)-HETE), que participen en la resposta inflamatòria, són lligands de PPAR α (Devchand, 1996, Krey, 1997, Forman, 1997). El lligand natural amb més afinitat per PPAR γ és el derivat de la prostaglandina J₂ (PG J₂) 15-deoxi- Δ 12,14-PG J₂ (Forman, 1995). D'altra banda, les prostaglandines (PG) de les sèries A, D i J, activen els tres subtipus quan són aplicades a relativament baixes concentracions (10 μ M).

Entre els lligands de PPAR α d'origen sintètic, trobem alguns fibrats (WY14,643, clofibrat, ciprofibrat, bezafibrat), fàrmacs emprats per tractar hiperlipèmies i clàssics proliferadors peroxisomals. L'àcid 4-cloro-6-(2,3-xilidina)-pirimidiniltioacètic (WY14,643) és l'agonista més potent de PPAR α (Kliwer, 1994). *In vitro*, actua a baixes concentracions (10 μ M) com a activador específic de PPAR α i a concentracions superiors (100 μ M) activa els tres subtipus de PPAR. *In vivo*, sembla que WY14,643 activa només PPAR α , perquè en ratolins *PPAR α -KO*, WY14,643 no té efecte biològic, tot i haver-hi els altres PPAR. El bezafibrat és un lligand de PPAR α però també activa PPAR δ *in vivo*, tal i com s'ha demostrat en ratolins *PPAR α -KO* i *PPAR δ -KO* (Peters, 2003). Recentment s'han desenvolupat lligands sintètics específics per PPAR δ com GW501516, L165041 (Berger, 1999, Oliver, 2001, Dressel, 2003).

Les tiazolidindiones (TZD) com el BRL49653 o rosiglitazona, la troglitazona, la pioglitazona i la ciglitazona són activadors sintètics específics de PPAR γ (Spiegelman, 1998). S'utilitzen en el tractament de la diabetis de tipus II per disminuir la resistència a la insulina, però no es coneix exactament el seu mecanisme d'actuació.

2.5.4. EFECTES DELS PPAR

Podríem considerar els PPAR com a missatgers clau responsables de la traducció d'estímuls nutricionals, farmacològics i metabòlics, en canvis en l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic.

PPAR α

En general, molts dels gens activats per PPAR α tenen relació amb el catabolisme lipídic. Al fetge, els primers estudis ja van indicar que PPAR α regula directament l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes implicades en el transport d'àcids grassos (*fatty acid binding protein* o FABP) (Motojima, 1998), la β -oxidació mitocondrial (*medium chain acylCoA dehydrogenase* o MCAD) (Gulick, 1994), la β -oxidació peroxisomal (acilCoA oxidasa) (Dreyer, 1992), ω -oxidació microsomal (CYP4A) (Kroetz, 1998), la cetogènesi (β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA sintasa o HMGCoA sintasa mitocondrial) (Rodríguez, 1994) i les lipoproteïnes (apolipoproteïna C-III, Fruchart, 2001). Els estudis amb ratolins *PPAR α -KO* han confirmat que PPAR α és essencial per l'augment en l'expressió d'aquests gens, en el dejuni (Leone, 1999, Kersten, 1999) o en resposta a lligands sintètics com els fibrats (Lee, 1995b, Peters, 1997, Aoyama, 1998). Els ratolins *PPAR α -KO* no presenten un fenotip obvi quan són alimentats amb una dieta normal, però en condicions de dejuni o de dieta rica en greix, presenten esteatosi al fetge. El dejuni en aquests animals també comporta hipoglucèmia, hipocetonèmia, i un augment en els nivells de NEFA, indicant un defecte en l'oxidació d'àcids grassos i en la capacitat de producció de glucosa i cossos cetònics al fetge (Leone, 1999, Kersten, 1999).

Al cor, el metabolisme lipídic també està molt afectat en els ratolins *PPAR α -KO*. L'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic (*mCPT1*, *MCAD*, *acilCoA oxidasa*) és menor en condicions basals (Watanabe, 2000) i pràcticament no s'indueix en resposta al dejuni (Leone, 1999). Al múscul esquelètic, el defecte en l'oxidació d'àcids grassos és menys sever i els gens de PDK4 (piruvat deshidrogenasa quinasa-4) i UCP3 responen al dejuni i a l'exercici de la mateixa manera que els ratolins control (Muoio, 2002a). S'ha suggerit que PPAR δ , que s'expressa de manera abundant al múscul esquelètic, pot compensar la manca de PPAR α (Wang, 2003b).

PPAR δ

Els estudis amb ratolins transgènics i amb lligands específics han demostrat que PPAR δ està implicat en la regulació del catabolisme dels lípids i l'homeòstasi energètica.

Els ratolins *PPAR δ -KO* presenten seriosos problemes en la implantació de l'embrió, la mielinització, el metabolisme lipídic i l'adipositat (Peters, 2000, Michalik, 2001, Barak, 2002). Els pocs ratolins que sobreviuen presenten una reducció en la quantitat de teixit adipós (Peters, 2000, Barak, 2002), i una predisposició a l'obesitat quan són sotmesos a una dieta rica en greix (Wang, 2003b). L'expressió d'una forma activada de PPAR δ al teixit adipós produeix ratolins primis resistents a obesitat, a la hiperlipidèmia i a l'esteatosi induïda genèticament o per una dieta rica en greix (Wang, 2003b). En cèl·lules musculars, s'ha descrit que un lligand selectiu de PPAR δ és capaç de regular gens del catabolisme lipídic, UCP3, i augmentar la taxa d'oxidació de lípids (Muio, 2002a, Dressel, 2003). Experiments amb lligands de PPAR δ *in vivo*, o amb ratolins *PPAR α -KO* o amb ratolins transgènics que sobreexpressen PPAR δ al múscul esquelètic, indiquen que PPAR δ promou l'oxidació de lípids al múscul (Oliver, 2001, Muio, 2002a, Luquet, 2003, Tanaka, 2003, Wang, 2004).

PPAR γ

Nombroses evidències experimentals han portat a la conclusió que PPAR γ és un dels principals reguladors de l'adipogènesi (Rosen, 2000). L'expressió de *PPAR γ* augmenta durant la diferenciació adipocitària, els activadors de PPAR γ són potents inductors de la diferenciació adipocitària (Hallakou, 1997, Gurnell, 2000), i l'expressió ectòpica de PPAR γ en cèl·lules no adipogèniques, les converteix en adipòcits madurs (Tontonoz, 1994). En ratolins *PPAR γ -KO* (moren durant l'embriogènesi) i en ratolins heterozigots per *PPAR γ* s'ha observat que PPAR γ és necessari pel desenvolupament del teixit adipós (Barak, 1999, Rosen, 1999, Kubota, 1999).

2.6. ELS RECEPTORS D'HORMONES TIROÏDALS

Les hormones tiroïdals (TH) són essencials per al desenvolupament, creixement i metabolisme en els animals vertebrats (Oppenheimer, 1987, revisat a Yen, 2001). Diverses accions de les hormones tiroïdals estan mitjançades pels receptors d'hormones tiroïdals (TR), receptors nuclears de classe II que reconeixen elements de resposta específics (TRE) i modulen la transcripció gènica. D'altres accions de les TH tenen lloc de manera ràpida i independent de la transcripció.

La síntesi i secreció de TH està regulada per l'eix hipotàlem-hipòfisi-glàndula tiroïdal, mitjançant un sistema de *feed-back* negatiu. La glàndula tiroïdal sintetitza la pro-hormona 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T_4) junt amb una petita quantitat d'hormona activa 3,5,3'-L-triiodotironina (T_3). La major part de T_3 i T_4 circula associada a proteïnes; aproximadament només el 0.03% de T_4 i el 0.3% de T_3 és lliure i pot entrar a les cèl·lules i generar una resposta biològica. La major part de T_3 circulant es genera degut a les activitats enzimàtiques iodotironina deiodinasa D1 i D2, que converteixen T_4 en T_3 per 5'-monodeiodinació. Contràriament, l'enzim D3 inactiva T_4 i T_3 per 5-monodeiodinació. Així doncs, els nivells intracel·lulars de T_3 depenen de les activitats relatives d'aquestes 3 deiodinases (Bianco, 2002).

El 1986, es van clonar els cDNA que codifiquen pels TR (Sap, 1986, Evans, 1986), homòlegs cel·lulars del producte viral oncogènic v-erbA. Existeixen dos subtipus de TR, que provenen dels gens *thra* i *thrb*: $TR\alpha$ i $TR\beta$. La utilització de promotors alternatius, *splicing* diferencial i la utilització d'inicis de traducció diferents genera fins a 9 isoformes diferents a nivell d'mRNA ($TR\alpha_1$, α_2 , α_3 , $\Delta\alpha_1$, $\Delta\alpha_2$, β_1 , β_2 , β_3 i $\Delta\beta_3$) de les quals s'han detectat 4 isoformes ($TR\alpha_1$, α_2 , β_1 , β_2) a nivell de proteïna *in vivo* (Lazar, 1993, Chassande, 1997, Williams, 2000). Les isoformes $TR\alpha_2$, $TR\alpha_3$, $TR\Delta\alpha_1$ i $TR\Delta\alpha_2$, $TR\Delta\beta_3$, que no són capaces d'unir T_3 *in vitro*, poden actuar com a antagonistes. Al mitocondris s'han trobat les isoformes truncades $TR\alpha$ p28 i p43. Curiosament, la cadena oposada del gen *thra* codifica per rev-erbA, un altre membre de la superfamília dels NR. Les isoformes de TR trobades a humans, rata i ratolí presenten una elevada identitat en la seqüència d'aminoàcids, suggerint que cada isoforma té una funció especialitzada que es conserva en diferents espècies.

Els mRNA de les nombroses isoformes de TR presenten una expressió variable en funció del teixit i de l'estadi del desenvolupament, tot i que els nivells d'mRNA poden no correlacionar amb les concentracions de proteïna del receptor (Forrest, 1990, Schwartz, 1994). Els mRNA de les isoformes $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$, $TR\beta_1$ i $TR\beta_3$ s'expressen de manera ubiqüa mentre que $TR\beta_2$ s'expressa majoritàriament a l'eix hipotàlem-hipòfisi, on participa en el *feed-back* negatiu de la síntesi de T_3 . L'mRNA de $TR\alpha_1$ presenta una major expressió al múscul esquelètic i al TAM, mentre que l'mRNA de $TR\beta_1$ s'expressa més al cervell, fetge i ronyó (Taula 5).

Els TR s'uneixen als elements de resposta (TRE) majoritàriament com a heterodímers amb RXR, però també poden unir-s'hi com a monòmers i homodímers *in vitro*. $TR\beta_1$ té més tendència a formar homodímers que $TR\alpha_1$. La majoria de gens regulats positivament per TH contenen dues o més seqüències consens (G/A)GGT(C/G)A. Els hexàmers poden estar organitzats com a repeticions directes espaiades per 4 nucleòtids (DR4), palíndroms invertits espaiats per 6 nucleòtids (IP6) o palíndroms sense nucleòtids espaiadors (PAL0). En els TRE fisiològics, les repeticions directes són més freqüents que les invertides, que són més freqüents

que els palíndroms (Yen, 2001). S'ha observat també que els TR poden unir i transactivar dèbilment en DR5 i DR6, i fins i tot un únic octàmer, potser com a monòmer. En les seqüències palindròmiques no s'ha observat una disposició específica d'RXR i TR, mentre que en els DR4, RXR es col·loca a 5' i TR a 3', i aquesta orientació sembla important per l'activitat transcripcional.

Els gens diana de T_3 poden ser regulats positivament o negativament per l'hormona, però en un estudi mitjançant *microarray* al fetge, es va observar una repressió de la majoria de gens regulats per T_3 (Feng, 2000). En els TRE regulats positivament, els TR mitjancen una repressió basal del gen en absència de T_3 , però la unió de l'hormona n'activa la transcripció. En els TRE regulats negativament, els TR mitjancen una expressió gènica constitutiva en absència de T_3 i la unió del lligand indueix la repressió activa de la transcripció gènica, tot i que no es coneix el mecanisme precís.

Els efectes de les TH són crítics per la diferenciació, el creixement i el metabolisme. Els estats d'hipotiroïdisme i hipertiroïdisme han posat de manifest que les TH són reguladors clau del desenvolupament i controlen moltes funcions cel·lulars, metabòliques i fisiològiques en els animals vertebrats. Són destacables els efectes que exerceixen les TH sobre el consum d'oxigen i la taxa metabòlica (Oppenheimer, 1987). Alguns dels efectes de les TH són deguts a canvis en l'expressió gènica mitjançats pels TR, però encara no està clar com aquests canvis en l'expressió expliquen els efectes fisiològics (revisat a Yen, 2001).

Entre els gens diana de les TH identificats, hi ha gens implicats en la regulació de la síntesi de les pròpies hormones (TRH o *thyrotropin releasing hormone*, $TSH_{\alpha/\beta}$ o *thyroid stimulating hormone- α/β* , 5' DI o *5' deiodinase*), gens implicats en el metabolisme del fetge (Feng, 2000), en el desenvolupament del múscul esquelètic i del cor ($MHC_{\alpha/\beta}$ o *myosin heavy chain- α/β* , Yu, 2000) i en la termogènesi (UCP1, Rabelo, 1995 i 1996b).

2.7. INTERACCIONS ENTRE LES VIES DE SENYALITZACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS I AMB ALTRES VIES DE SENYALITZACIÓ

Les vies de senyalització dels NR estan regulades a diferents nivells. L'abundància dels diferents NR i dels seus lligands, en funció del tipus cel·lular i de la situació, i la relació que s'estableixi entre ells, determinaran la regulació de l'expressió dels gens. A més a més, les vies de senyalització dels NR també poden interaccionar amb altres vies de senyalització.

La via de senyalització d'un NR pot afectar la pròpia expressió gènica i la d'altres membres de la superfamília. S'ha observat que l'activació de $PPAR_{\alpha}$, al fetge, augmenta

l'expressió de PPAR α , i alhora disminueix l'expressió de RAR β i TR α 1 i TR β 1, a nivell d'mRNA (Bonilla, 2001). Per al gen de RAR β s'ha descrit una regulació positiva molt sensible per l'RA (Sucov, 1990) i per al gen de RAR γ , una regulació positiva per retinoides, que alhora inhibeix l'expressió de PPAR γ 2 i inhibeix la diferenciació adipocitària (Kawada, 2000).

També s'ha observat que els RAR, TR i PPAR controlen l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme de les pròpies hormones. RAR regula l'expressió de *CRBPI*, *CRBPII* i *CRABP* (Mangelsdorf, 1991, Smith, 1991, Durand, 1992). La síntesi de TH està regulada negativament per la pròpia hormona, que inhibeix l'expressió de TSH (Nakano, 2004). Els PPAR estan involucrats en el metabolisme dels àcids grassos. Curiosament, s'ha observat que els ratolins *acilCoA oxidasa-KO* presenten una activació constant dels gens regulats per PPAR α (Qi, 2000, Meyer, 2003).

Les vies de l'àcid retinoic i dels lligands de PPAR convergeixen, ja que l'heterodímer PPAR/RXR pot ser activat pels lligands d'ambdós receptors, de tal manera que la seva activació màxima es dona per unió simultània d'ambdós lligands (Kliwer, 1992, Keller, 1993, Gearing, 1993, Lemberger, 1996). Els gens que codifiquen per l'ApoAII, la proteïna L-FABP i l'enzim Acil-CoA oxidasa entre d'altres, presenten una expressió regulada per agonistes PPAR, alhora que són activats per l'àcid 9-*cis* retinoic de manera sinèrgica (Vu-Dac, 1996, Poirier, 1997).

També s'ha descrit una cooperació funcional entre PPAR i TR en el promotor del gen de l'acilCoA oxidasa (Hunter, 1996). Els PPAR poden influir de manera positiva o negativa sobre l'acció de la T₃, depenent de l'HRE i del tipus de TR (Winrow, 1996).

Un altre factor que pot modular l'activitat dels NR que dimeritzen amb RXR és la quantitat d'RXR disponible. Per exemple, en miòcits de cor, en condicions d'hipòxia, RXR α es degrada ràpidament, i d'aquesta manera disminueix la transcripció de gens regulats per PPAR (Huss, 2001). Donat que RXR també forma heterodímers amb altres membres de la superfamília, la competència entre els NR per la disponibilitat d'RXR, és un punt important de regulació entre diferents vies. Aquest mecanisme ha estat descrit per la inhibició generada per PPAR α en gens regulats per TR (Juge-Aubry, 1995, Meier-Heusler, 1995, Winrow, 1996, Lemberger, 1996) i la inhibició per TR de gens regulats per PPAR (Chu, 1995). Aquesta inhibició pot involucrar la interacció amb altres molècules, diferents d'RXR. A més a més, PPAR α pot formar heterodímers amb determinats subtipus de TR (Bogazzi, 1994), aquests heterodímers no són funcionals i actuen com un sistema de depleció dels receptors implicats, alterant la taxa de transcripció dels gens regulats per aquests factors.

Els diferents NR també poden competir per la unió a un mateix HRE. Els DR1 són reconeguts per diversos membres de la superfamília com PPAR, RAR, HNF-4, COUP-TF1, COUP-TF2, i RXR, en forma d'homodímers o heterodímers amb RXR. Canvis puntuals en el nucli de la

seqüència i en el nucleòtid espaiador i el context del promotor són els responsables de la preferència d'aquests receptors per un DR1 en particular (Sanguedolce, 1997, Nakshatri, 1998). S'ha demostrat que l'activitat transcripcional dels PPAR és inhibida per COUP-TF (Miyata, 1993, Pereira, 1995, Marcus, 1996), HNF-4 (Sladek, 1994, Hertz, 1995, Rodríguez, 1998) i rev-erb α (Kassam, 1999, Gervois, 1999a) per competència pel PPRE d'alguns dels gens regulats pels PPAR. També s'ha descrit una competència entre PPAR i el receptor d'estrògens (Keller, 1995). Uns altres NR que poden competir pels HRE són les isoformes truncades que no són capaces d'activar la transcripció, com TR α 2 que competeix amb altres TR (Meier-Heusler, 1995). L'abundància d'aquests factors en la cèl·lula determinarà la taxa de transcripció dels gens que regulen.

A part de les vies de senyalització dels NR, altres vies de senyalització poden interaccionar-hi. Diferents senyals hormonals poden modular l'activitat dels NR per modificacions covalents de la proteïna, com la fosforilació. Aquestes modificacions postraduccionals són el punt on creuen senyals hormonals generats a la membrana plasmàtica de la cèl·lula i diferents efectors nuclears. Però els NR poden interaccionar també amb les vies d'altres factors de transcripció nuclears, mitjançant interaccions entre proteïnes.

Un cop els receptors reconeixen l'element de resposta, la transactivació pot dur-se a terme per interacció directa amb el complex de preiniciació de la transcripció, o mitjançant molècules que actuïn de pont entre la maquinària de transcripció i el receptor, com adaptadors, coactivadors, proteïnes accessòries... que poden regular la transcripció impedit o afavorint la unió del receptor a l'element de resposta (veure els coreguladors).

3. ELS COREGULADORS

3.1. GENERALITATS

La transcripció de gens per la RNA polimerasa II requereix la formació d'un complex d'iniciació de la transcripció que es va organitzant sobre la seqüència TATA del promotor (revisat a McKenna, 1999). El primer pas és la unió del complex TFIID constituït pel factor TBP (*TATA-binding protein*) i per diversos TAF_{II} (*TBP-associated factors*). El complex TFIID, en humans, està format per dues poblacions de TAF: els que són comuns entre els diferents complexos TFIID, amb un paper estructural en la integració del complex de transcripció, i els TAF responsables de la interacció específica entre el complex TFIID i els diferents factors de transcripció units a les seqüències del promotor. Posteriorment s'associen altres factors com TFIIB, TFIIF- α i finalment, la RNA polimerasa II.

S'ha proposat que l'accessibilitat del factor TBP a la seqüència TATA és el pas limitant de la transcripció i que els factors de transcripció incrementen la interacció d'aquest factor amb el promotor (Chatterjee i Struhl, 1995). Diversos factors de transcripció, entre ells alguns NR, interaccionen directament amb factors de la maquinària basal de transcripció (Banahmad, 1993, Blanco, 1995, McKenna, 1999). Però sovint, es necessiten els coreguladors per tal que la transcripció es reguli de manera eficient. Aquests coreguladors interaccionen amb els factors de transcripció i amb la maquinària basal d'iniciació de la transcripció. Els coreguladors es classifiquen com a coactivadors o corepressors en funció de la seva capacitat per activar o reprimir l'expressió d'un gen. Molts dels complexos associats als factors de transcripció en els que participen els coreguladors, contenen activitats enzimàtiques que poden modular l'estructura de la cromatina, mitjançant la remodelació de la cromatina dependent d'ATP, l'acetilació, la metilació i la fosforilació d'histones (revisat a Kraus i Wong, 2002). Aquests canvis en l'estructura de la cromatina regulen l'accessibilitat de la RNA polimerasa II al DNA, i per tant, la transcripció.

3.2. COACTIVADORS

Actualment, es coneix un gran nombre de coactivadors dels NR. La presència de lligand o la fosforilació dels NR per proteïnes quinasa de les vies de transducció de senyal, provoquen canvis conformacionals en els NR que afavoreixen la interacció amb els coactivadors (Fig. 5).

Els coactivadors més estudiats han estat els de la família de proteïnes p160/SRC (*steroid receptor coactivator*), integrada per diverses proteïnes com SRC1, SRC2 i SRC3 (Glass i

Rosenfeld, 2000), que potencien notablement l'activitat transcripcional dependent de lligand d'alguns NR com GR, ER, PR, TR, RXR, RAR, HNF4 i PPAR (Oñate, 1995, revisat a McKenna, 1999). Aquests coactivadors i d'altres, com TRAP/DRIP/ARC (*thyroid hormone receptor-associated proteins/vitamin D receptor-interacting proteins/activator-recruited cofactor*) i CBP/p300 (*CREB-binding protein/E1A-associated 300 kDa protein*) contenen una hèlix α amfipàtica formada per la caixa NR o motiu LXXLL (on L és leucina i X pot ser qualsevol aminoàcid) (Heery, 1997). Aquesta hèlix α interacciona en el *pocket* hidrofòbic del LBD del NR, amb una hèlix AF2 reposicionada per la unió del lligand (Renaud i Moras, 2000). La família p160/SRC també coactiva altres factors de transcripció, com l'interferó α , CREB (*cAMP regulatory element binding protein*), AP-1 (*activating protein-1*), NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) i SRF (*serum response factor*) (Lee, 2000).

La unió de coactivadors de la família p160/SRC recluta altres factors essencials per a la transactivació, incloent CBP/p300 (Glass i Rosenfeld, 2000). CBP i p300 són proteïnes d'una gran mida amb una estructura i funció molt conservada entre els mamífers. Gràcies a la seva similitud són denominades CBP/p300 per simplificar. CBP/p300 funcionen com a coactivadors de manera dependent de lligand dels receptors nuclears ER, TR, RXR, RAR i PPAR (Chakravarti, 1996, Dowell, 1997), i per a un gran nombre de factors de transcripció, entre ells MyoD, p53, AP-1, SREBP, STAT (*signal transducer and activator of transcription*), NF- κ B i CREB (Arias, 1994, Oliner, 1996, Kamei, 1996, Yuan, 1996, Lill, 1997, Perkins, 1997, Puri, 1997a, Horvai, 1997). La concentració de CBP/p300 es manté a nivells limitants a les cèl·lules i en determinades situacions, dues senyals poden competir per la disponibilitat dels coactivadors, tal i com s'ha descrit per l'antagonisme entre AP-1 i alguns NR (Kamei, 1996). Altres factors poden interactuar sinèrgicament a través de CBP/p300, de manera que diferents vies que actuen sobre el mateix promotor es poden estar potenciant gràcies a compartir el coactivador. Diversos autors proposen que CBP/p300 actuen com una gran plataforma proteica que interacciona amb diferents coactivadors i factors de transcripció, de manera que coordina diferents respostes específiques, actuant com un cointegrador de múltiples senyals sobre un mateix promotor.

CBP/p300 a la vegada interaccionen amb altres coactivadors, com p/CAF (*p300/CBP-associated factor*) (Yang, 1996). p/CAF també és capaç d'interaccionar amb altres coactivadors de la família de p160/SRC (Chen, 1997) i també amb NR com RAR (Blanco, 1998). D'aquesta manera es van reclutant diferents cofactors que configuraran un complex multiproteic d'activació modulable a diferents nivells.

Els coactivadors poden afavorir la transcripció modificant l'estructura de la cromatina, mitjançant la remodelació de la cromatina dependent d'ATP, l'acetilació, la metilació i la fosforilació d'histones (revisat a Kraus i Wong, 2002). La hipòtesi sobre "el codi de les histones"

proposa que les diverses modificacions en les histones actuen interdependentment per modular l'estructura de la cromatina (Strahl i Allis, 2000).

Els complexos SWI/SNF, remodelen la cromatina de manera dependent d'ATP alhora que potencien la unió de factors de transcripció al DNA. Aquesta remodelació de la cromatina és necessària però no suficient per la transcripció mitjançada pels NR.

Alguns coactivadors, com CBP/p300, p/CAF i la família de proteïnes p160/SRC, posseeixen activitat HAT (*histone acetyltransferase*) (Ogryzko, 1996, Yang, 1996, Spencer, 1997). Les HAT (N^ε-)acetilen reversiblement els residus de lisina carregats positivament de les cues N terminal de les histones que integren el nucleosoma, relaxant així la seva associació amb el DNA, i facilitant la descondensació de la cromatina i l'accés subsegüent de la maquinària transcripcional als promotors. CBP/p300 també pot acetilar residus de lisina de proteïnes no histones, com MyoD (Poleskaya i Harel-Bellan, 2001), p53 (Barlev, 2001), SRC3 i ER (Chen, 2000) i alterar-ne l'activitat transcripcional. Curiosament, p/CAF és capaç d'autoacetilar-se i aquesta acetilació és important per la seva localització nuclear (Santos-Rosa, 2003). p/CAF també acetila MyoD (Sartorelli, 1999, Mal, 2001). L'acetilació de factors de transcripció i factors basals afavoreix les interaccions DNA-proteïna i proteïna-proteïna i l'activació de la transcripció (revisat a Armstrong i Emerson, 1998).

Algunes HMT (*histone methyltransferases*) de la família PRMT (*protein arginine methyltransferase*), com CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase*) i PRMT1, interaccionen amb SRC2 i augmenten l'activitat de diversos NR (revisat a Kraus i Wong, 2002). Aquestes HMT metilen histones, però també metilen proteïnes no histones, com CBP/p300 i STAT-1, regulant-ne l'activitat transcripcional.

Finalment, algunes quinases també poden fosforilar histones, tant H1, com les histones que formen els nucleosomes (revisat a Kraus i Wong, 2002). H1 pot reprimir la transcripció mitjançada pels NR, facilitant la compactació de la cromatina. La fosforilació de l'H1 per cdk2 de manera dependent de lligand, allibera l'H1 i dels seus efectes repressors, de la regió promotora. La fosforilació d'histones del nucleosoma també augmenta la transcripció.

La relació entre aquests mecanismes d'activació és complexa: *in vitro* diferents metilacions afavoreixen o inhibeixen acetilacions, i viceversa, i la fosforilació d'histones pot modular l'acetilació de les mateixes. Curiosament, s'ha observat una cooperació funcional entre CARM1 i p300 durant l'estimulació de l'activitat de l'ER (Chen, 2000).

S'ha postulat un model seqüencial d'acció dels coactivadors en el que els NR reclutarien factors modificadors de la cromatina, activitats acetiltransferasa i finalment els complexos que interaccionen directament amb la maquinària basal de transcripció, com el complex TRAP/DRIP/ARC (revisat a McKenna i O'Malley, 2002). Aquest complex coactiva diversos NR, com VDR, TR i RAR (Rachez, 1999), i factors de transcripció com SREBP-1a, NFκB, VP16 i Sp1 (Näär, 1999).

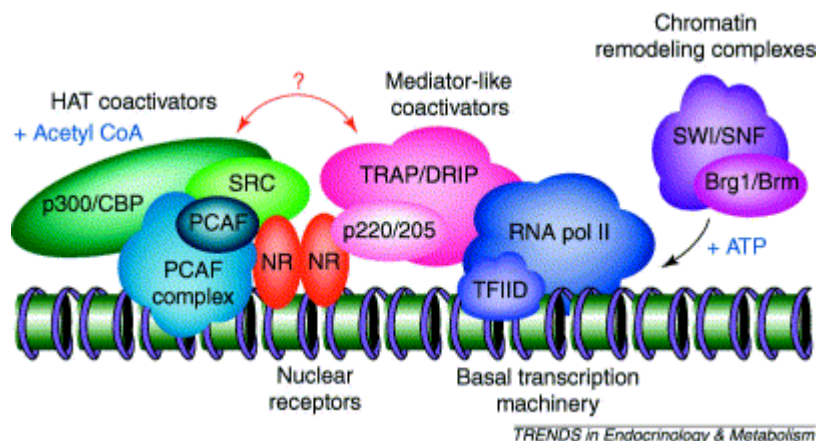


Figura 5. Nombroses interaccions físiques i funcionals entre NR, coactivadors, remodeladors de cromatina i la cromatina, condueixen a una seqüència d'esdeveniments que culminen en la transcripció de gens regulats per hormones, incloent: (1) interacció de coactivadors dependent de lligand amb NR units a cromatina, (2) complexos remodeladors de cromatina dependents d'ATP, (3) acetilació d'histones per coactivadors HAT i (4) contactes entre NR i la maquinària basal de transcripció pels coactivadors (TRAP/DRIP). No està clar si existeixen interaccions funcionals entre els coactivadors SRC-p300/CBP-PCAF i el complex TRAP/DRIP (?). Abreviatures: acetyl CoA, acetyl coenzyme A (el donador per la reacció d'acetilació); CBP, *CREB-binding protein*; CREB, *cAMP-response element-binding protein*; HAT, *histone acetyltransferase*; NR, *nuclear receptor*; PCAF, *p300/CBP-associated factor*; p220/205, TRAP220/DRIP205; RNA pol II, *RNA polymerase II*; SRC, *steroid receptor coactivator*; TFIID, *transcription factor IID* [que conté *TATA-binding protein* (TBP) i TAF, *TBP-associated factors*]; TRAP/DRIP, *thyroid hormone receptor-associated proteins/vitamin D receptor-interacting proteins*.

3.3. COREPRESSORS

Alguns NR inhibeixen l'expressió gènica en absència de lligand o en presència d'antagonistes. Aquesta repressió requereix la unió dels NR a proteïnes accessòries, els corepressors, que interaccionen amb components clau de la maquinària basal de transcripció (TFIIB, TAF_{II}32 i TAF_{II}70) (Muscat, 1998). Les anàlisis de doble híbrid en llevat van identificar dues proteïnes que interaccionaven amb NR en absència de lligand, NCoR (*nuclear receptor corepressor*) (Horlein, 1995) i SMRT (*silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors*) (Chen i Evans, 1995, Nagy, 1997). Inicialment se'ls va identificar com corepressors de membres de la família de TR i RAR, però la llista de NR que requereixen d'aquests corepressors per inhibir l'expressió gènica ha anat augmentant amb COUP-TF i PPAR en absència de lligand (Shibata, 1997, Dowell, 1999) i ER i PR units a un antagonista (Smith, 1997, Jackson, 1997). La interacció dels NR amb els corepressors té lloc a través de motius LXXI/HIXXXI/L presents a NcoR i SMRT (Perissi, 1999). La unió del lligand al receptor provoca un canvi de conformació del NR que desplaça NCoR o SMRT. NCoR també és corepressor per altres factors de transcripció, com MyoD (Bailey, 1999).

NCoR o SMRT formen part de complexos multiproteics que contenen HDAC (*histone deacetylases*), que promouen la condensació de la cromatina per hipoacetilació dels residus de

lisina de les histones i reprimeixen la transcripció (Heinzel, 1997, Alland, 1997, Nagy, 1997). La unió del lligand al receptor o el bescanvi d'un factor inhibidor per un activador desplaça al complex amb HDAC per un complex coactivador format per diverses activitats HAT, afavorint l'expressió gènica (Torchia, 1998).

S'han identificat tres famílies d'HDAC en relació amb repressors transcripcionals de llevat. Les classes I (HDAC1, 2, 3 i 8) i II (HDAC4, 5, 6 i 7) d'HDAC, que comparteixen una similitud significativa en els seus centres catalítics, són homòlegs de les deacetilases de llevat Rpd3p i Hda1p, respectivament. La classe III d'HDAC és la família de proteïnes Sir2 (*Silent information regulator-2*) dependents de NAD⁺ (*nicotine adenine dinucleotide*), homòloga a Sir2p de llevat, i no presenta identitat de seqüència amb les classes I i II. NCoR i SMRT formen part de diferents complexos que contenen diferents HDAC de classe I o II (Rosenfeld i Glass, 2001). NCoR i SMRT i aquestes HDAC, poden interaccionar de manera directa (Huang, 2000, Kao, 2000), o mitjançant altres proteïnes, com Sin3 (Heinzel, 1997, Nagy, 1997). S'ha descrit que la interacció entre HDAC3, i NCoR i SMRT pot regular l'activitat HDAC (Guenther, 2001). *In vitro* també s'han descrit interaccions entre HDAC i proteïnes d'unió a histones com RbAp46/48 (Wolffe, 2000, Urnov, 2001). A més a més, les HDAC també poden deacetilar proteïnes no histones, incloent p53 i NF-κB (Chen, 2001, Luo, 2001, Vaziri, 2001).

La classe III d'HDAC també deacetila proteïnes histones i no histones. L'homòleg de Sir2p de llevat, Sirt1 en humans, pot regular l'acetilació d'histones directament, a través de la interacció amb factors d'unió a seqüències específiques del DNA, com CTIP1 i CTIP2 (*COUP-TF-interacting proteins*) (Senawong, 2003). Sirt1 també deacetila diverses proteïnes no histones com TAF₆₈ (Muth, 2001), un factor de transcripció necessari per la regulació del complex de la RNA polimerasa I, les proteïnes repressores de la transcripció hHES1 i hHEY2 (Takata, 2003), i el coactivador p/CAF i el factor de transcripció miogènica MyoD (Fulco, 2003) i el supressor de tumors p53 (Vaziri, 2001, Luo, 2001). S'ha especulat que la taxa metabòlica de la cèl·lula pot ser important en la regulació de la funció de Sirt1, donat que la seva activitat enzimàtica depèn de NAD.

En general la unió del lligand condueix a l'activació del NR, però hi ha casos en els que la unió del lligand al NR inhibeix la transcripció (revisat a Fernandes i White, 2003). TIF1α (*transcriptional intermediary protein 1α*) i LCoR (*ligand-dependent corepressor*) són cofactors que s'uneixen a NR units a lligand i reprimeixen la transcripció (Nielsen, 1999, Fernandes i White, 2003). RIP140 (*receptor interacting protein*) va ser identificat com a coactivador, però s'ha vist que competeix amb p160 per la unió als NR units a lligand, i bloqueja la coactivació *in vivo* (Eng, 1998). Finalment, també s'han identificat coreguladors que contenen alhora activitats activadores i repressores, com NSD1 (*nuclear receptor-binding SET domain-containing protein*), que interacciona amb NR de manera dependent o independent de lligand (Huang, 1998).

4. LA MIOGÈNESI

4.1. GENERALITATS

La formació del múscul esquelètic durant l'embriogènesi es coneix com a miogènesi. En aquest procés hi intervenen dos esdeveniments: la determinació i la diferenciació. La determinació és el procés pel qual les cèl·lules embrionàries pluripotencials esdevenen determinades al llinatge miogènic. Les cèl·lules mesodèrmiques del somita reben senyals específics dels teixits que l'envolten per tal de determinar diferents llinatges cel·lulars, entre ells les cèl·lules precursors de múscul anomenades mioblasts. La diferenciació és el mecanisme pel qual els mioblasts adquireixen i expressen un fenotip específic de múscul. Els mioblasts proliferen, en alguns casos migren, i s'alineen, aturen la proliferació cel·lular i augmenten l'expressió de gens necessaris per al desenvolupament i la funció del múscul, alhora que es fusionen per formar un sinciti, diferenciant-se així en miotubs (Fig. 6).

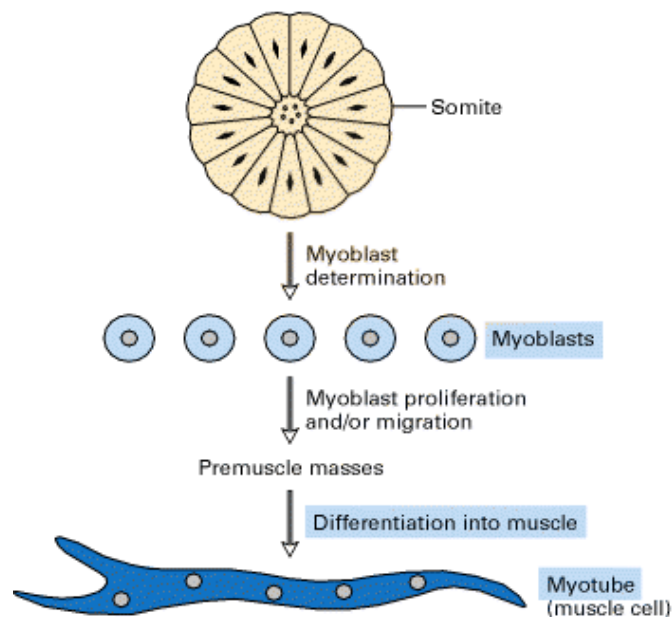


Figura 6. Diagrama esquemàtic dels diferents estadis en el desenvolupament del múscul esquelètic en mamífers. Els somites són col·leccions de cèl·lules embrionàries mesodèrmiques, algunes de les quals esdevenen determinades a mioblasts, les cèl·lules precursors del múscul. Una subclasse de mioblasts migra per formar les masses de múscul de les extremitats, on es diferencien en cèl·lules musculars multinucleades, anomenades miotubs. Altres mioblasts proliferaran i es diferenciaran per formar la musculatura axial.

La determinació i diferenciació de les cèl·lules del múscul esquelètic en els organismes vertebrats està influenciada per múltiples vies, que regulen positivament o negativament la transcripció de gens específics de múscul, amb funcions reguladores i estructurals (Lassar i Münsterberg, 1994, Molkentin i Olson, 1996b, Yun i Wold, 1996, Arnold i Winter, 1998).

4.2. REGULADORS POSITIU DE LA MIOGÈNESI

S'han identificat diverses proteïnes activadores de la miogènesi, entre les quals trobem diversos factors de transcripció generals o específics de múscul, i coactivadors (Fig. 7 i Fig. 9).

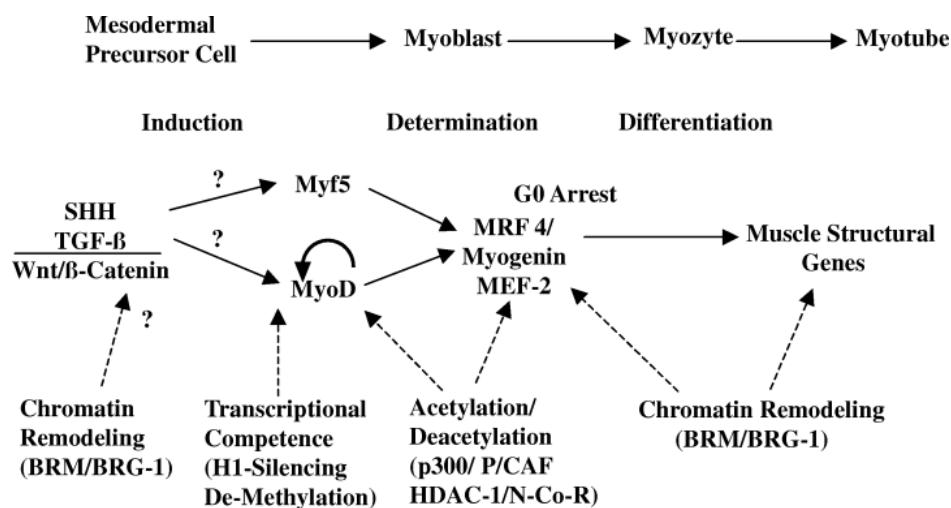


Figura 7. Diagrama simplificat del programa de diferenciació muscular en vertebrats. Les fletxes contínues simbolitzen la progressió a través del desenvolupament. Les fletxes discontinües defineixen les contribucions epigenètiques; els interrogants indiquen mecanismes que no estan clars (la inducció de MyoD o Myf5).

Els MRF (*muscle regulatory factors*) són els principals factors de transcripció activadors de la miogènesi (Fig. 7). Cada un dels membres de la família MRF, MyoD (*myogenic determination gene D*), miogenina, Myf-5 i MRF4 o Myf-6 o herculina (Weintraub, 1993), és capaç d'activar el programa de miogènesi esquelètica quan és introduït en cèl·lules no musculars (revisat a Lassar i Münsterberg, 1994). Els MRF són factors de transcripció que s'uneixen a seqüències de DNA anomenades *Ebox* (CANNTG), presents en els promotors de gens específics de múscul (Lassar, 1989), com la creatina quinasa, algunes miosines, la desmina, el receptor de l'acetilcolina i els propis MRF. En els promotors dels gens de l'acetil CoA carboxilasa-β i la MCHIIB (*myosin heavy chain IIB*), s'han descrit seqüències de DNA, diferents de les *Ebox*, properes a l'inici de transcripció, que també mitjancen la transactivació pels MRF (Takeda, 1995, Lee, 2001). Els MRF presenten una estructura bàsica hèlix-gir-hèlix (bHLH, *basic helix-loop-helix*), flanquejada per dos dominis d'activació (Fig. 8). La unió eficient al DNA té lloc en forma d'heterodímers amb proteïnes E, unes altres proteïnes bHLH, d'expressió ubiqüa, que provenen dels gens E2A (E12, E47) i HEB (Murre, 1989, Lassar, 1991). L'estudi de l'estructura de la regió bHLH de MyoD indica que la regió bàsica interacciona amb el DNA, mentre que la regió HLH està implicada en la dimerització (Ma, 1994).

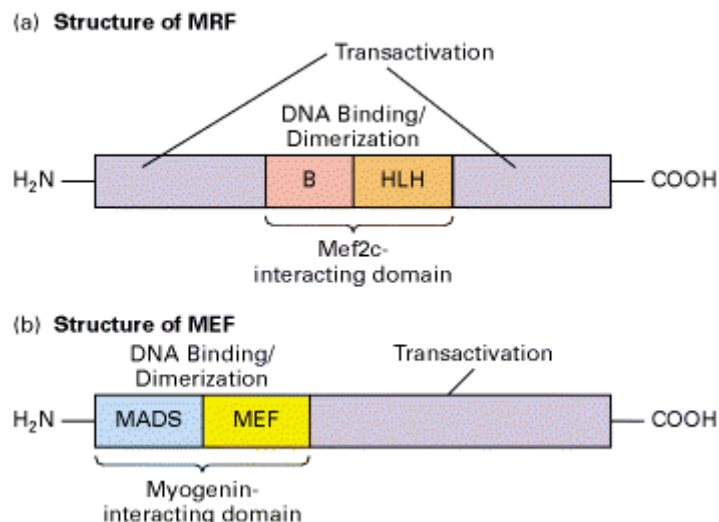


Figura 8. Diagrama esquemàtic de l'estructura de dues classes de factors de transcripció que participen en la miogènesi. Els MRF (*muscle regulatory factors*) són específics del múscul, mentre que els MEF (*myogenic enhancer factors*) s'expressen en diversos teixits a part del múscul en desenvolupament. La interacció entre els MEF i MRF promou l'activitat miogènica dels MRF.

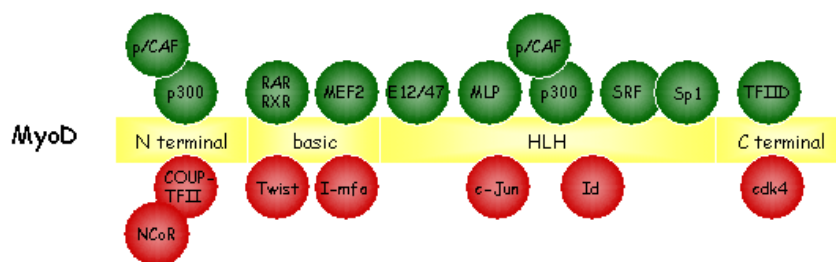
La importància dels diferents MRF en la determinació i la diferenciació del múscul esquelètic s'evidencia en el fenotip de ratolins *KO* per un o més dels gens *MRF*. Els ratolins *MyoD-KO* són viables i aparentment tenen el múscul esquelètic normal (Rudnicki, 1992). Els ratolins nomenats *Myf-5-KO* també presenten un múscul esquelètic normal però moren en l'estat perinatal com a conseqüència de deformitats en les costelles (Braun, 1992, Tajbakhsh, 1996). En canvi, els ratolins que no expressen ni *Myf-5* ni *MyoD* presenten una absència completa de mioblasts i miofibres (Rudnicki, 1993). La miogenina té un paper essencial com a factor regulador de la diferenciació muscular, ja que els ratolins sense miogenina són viables però no es poden moure en néixer i els seus mioblasts no es diferencien eficientment en miotubs. Tot i així, aquest defecte no s'observa en mioblasts *miogenina*^{-/-} cultivats *in vitro* (Hasty, 1993, Nabeshima, 1993). El quart factor miogènic, *MRF4*, actua en etapes posteriors de la via miogènica i és capaç de promoure la diferenciació muscular de manera semblant a la miogenina (Zhu, 1997, Rawls, 1998). Els ratolins *MRF4-KO* produeixen un múscul feble i, per tant, menys funcional (Braun, 1995, Patapoutian, 1995, Zhang, 1995).

La seqüència temporal d'activació dels gens *MRF* durant l'embriogènesi, i els fenotips que presenten els mutants d'aquests gens, permet resumir el procés de miogènesi esquelètica en dos esdeveniments: a) l'activació inicial de *Myf-5* i *MyoD* per la determinació de les cèl·lules premyogèniques del somita en mioblasts i b) l'activació dels factors *miogenina* i *MRF4*, que regulen l'expressió de gens induïts durant i després de la fusió i formació dels miotubs. A part de la regulació de l'expressió dels *MRF*, la seva activitat transcripcional està controlada mitjançant la fosforilació, acetilació, ubiquïtinació i la interacció amb altres proteïnes (Puri i Sartorelli, 2000).

La família de factors de transcripció muscular del factor miogènic potenciador-2, MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) (Olson, 1995) coopera de manera sinèrgica amb les proteïnes MRF per activar la transcripció (Molkentin i Olson, 1996a). En els vertebrats s'han descrit quatre gens *MEF2* (*MEF2A*, *B*, *C* i *D*) que codifiquen per proteïnes que formen homodímers o heterodímers i s'uneixen a seqüències de DNA riques en A i T que es troben a les regions promotores de molts gens específics de múscul. Els MEF2 presenten un domini MADS (*MCM1*, *Agamous*, *Deficiens*, *Serum response factor*) N terminal, un domini MEF adjacent i un domini d'activació C terminal (Fig. 8). L'efecte sinèrgic pot donar-se a través de la interacció entre el domini MADS de les proteïnes MEF2 i el domini bHLH dels heterodímers MRF/ proteïna E (Molkentin, 1995, Black, 1998). També s'ha descrit una cooperació funcional independent de la interacció MyoD-MEF2 (Novitch, 1999). Freqüentment, les seqüències de DNA d'unió de MEF2 es troben pròximes a seqüències *Ebox* en promotors específics de múscul.

Aquestes proteïnes tenen papers importants en la miogènesi: en *Drosophila* el gen MEF2D és absolutament essencial per a la diferenciació de les cèl·lules musculars (Bour, 1995, Lilly, 1995, Ranganayakulu, 1995) i, en ratolins, la mutació del gen MEF2C impedeix la morfogènesi i la miogènesi cardíaca (Lin, 1997).

reguladors positius per interacció directa



repressors per interacció directa

repressors per mecanismes indirectes

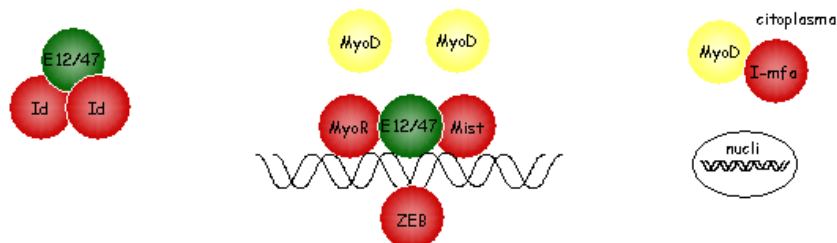


Figura 9. Reguladors positius i negatius de MyoD per associació directa o per mecanismes indirectes. Diferents regions de MyoD, que s'associen a proteïnes activadores o repressores. Mentre algunes d'aquestes associacions tenen lloc per interacció física (MyoD-E12/47), altres poden ser mitjançades per proteïnes pont. MyoD pot representar els factors MRF en general, tot i que algunes de les interaccions no han estat descrites per miogenina, Myf5 o MRF4. Altres modalitats de repressió de MyoD i més en general, dels MRF, inclouen el segrest de *partners* heterodimèrics (Id-E12/47), desplaçament de la unió al DNA (MyoR, Mist i ZEB), i retenció dels MRF al citoplasma. Adaptat de Puri i Sartorelli, 2000.

Un altre factor específic de múscul que influencia la diferenciació muscular és la proteïna MLP (*muscle LIM protein*), que interacciona amb els MRF (Kong, 1997), però no amb proteïnes E o MEF2. Donat que MLP no té dominis funcionals d'activació de la transcripció, es creu que actua augmentant la interacció dels dímers MyoD/ E47 amb el DNA.

Diversos factors de transcripció generals també intervenen en la diferenciació muscular. El factor de resposta al sèrum (SRF, *serum-response factor*) (Treisman, 1992) és un factor de transcripció MADS (Nurrish i Treisman, 1995), que s'uneix a la seqüència consens de DNA CARG (Minty i Kedes, 1986) que es troba en la majoria de promotors musculars, sovint juxtaposada a *Ebox* (Sartorelli, 1990, Catala, 1995). S'ha descrit una interacció directa entre SRF i els heterodímers MRF/ E12 (Groisman, 1996), que explica la manca de transactivació per MyoD en absència de la caixa CARG en el promotor de l' α -actina cardíaca humana (Sartorelli, 1990). De manera semblant, Sp1 s'associa a proteïnes MRF (Biesiada, 1999) i MEF2 (Grayson, 1998), i els llocs d'unió d'Sp1 són necessaris per l'activació de l'expressió gènica muscular (Gustafson i Kedes, 1989, Sartorelli, 1990). Finalment, les proteïnes MRF, SRF i Sp1 s'han trobat formant part d'un complex transcripcional específic de múscul (Biesiada, 1999).

Alguns coactivadors també participen en la regulació de la miogènesi. Tot i que MyoD pot contactar directament amb la TBP (*TATA-binding protein*) present en el complex TFIID (Heller i Bengal, 1998), la interacció amb el coactivador p300 també pot facilitar el reclutament de MyoD a la maquinària basal de transcripció de l'RNA polimerasa II (Eckner, 1994, Eckner, 1996, Yuan, 1996, Puri, 1997a, Sartorelli, 1997). S'han identificat complexos formats per MyoD, CBP/p300 i p/CAF sobre *Ebox* (Puri, 1997a i 1997b). CBP/p300 interacciona directament amb MyoD i MEF2C i proteïnes presents en el complex TFIID i TFIIB (Eckner, 1996, Yuan, 1996, Sartorelli, 1997). CBP/p300 i p/CAF poden regular la transcripció remodelant la cromatina a través de l'acetilació d'histones i factors de transcripció (Struhl, 1998, Giordano i Avantaggiati, 1999) (veure els coreguladors: coactivadors). S'ha observat que CBP/p300 i p/CAF acetilen MyoD (Yuan, 1996, Puri, 1997c, Sartorelli, 1999, Polesskaya, 2000, Mal, 2001, Polesskaya i Harel-Bellan, 2001) en tres residus de lisina evolutivament conservats entre espècies diferents i presents en altres membres de la família MRF (Sartorelli, 1999). La substitució d'aquestes lisines per arginines, no acetilables, disminueix l'activitat de MyoD. Quan les lisines són acetilades augmenta l'afinitat de MyoD pel DNA i canvia la conformació de MyoD unit al DNA (Sartorelli, 1999). Durant la diferenciació muscular, l'acetilació de MyoD augmenta, tot i que en mioblasts també es detecta un cert grau d'acetilació (Sartorelli, 1999). La importància de CBP/p300 i p/CAF en la diferenciació muscular es posa de manifest en experiments de microinjecció d'anticossos contra CBP/p300 i p/CAF en cèl·lules musculars, que eviten la sortida del cicle cel·lular, l'activació de l'expressió gènica muscular i la diferenciació terminal (Eckner, 1996, Puri, 1997c).

Alguns NR també estan implicats en la miogènesi (Muscat, 1995a i 1995b). En cèl·lules musculars l'RA promou l'aturada de la proliferació, i la miogènesi (Albagli-Curiel, 1993) i RXR α és essencial per tal de mitjançar aquests efectes (Froeschlé, 1996). L'RA regula l'expressió d'alguns MRF (Albagli-Curiel, 1993, Carnac, 1993a i 1993b) i l'expressió del gen *MyoD* està regulada per RXR (Alric, 1998).

Les TH influencien el desenvolupament i la funció del múscul. Prenatalment, les TH indueixen els mioblasts a sortir del cicle cel·lular, diferenciar-se i expressar el fenotip específic de múscul (Muscat, 1995a). Coincidint amb l'augment perinatal en els nivells circulants de TH (Fisher, 1977, Berthon, 1993), es reprimeix progressivament l'expressió de les isoformes embrionària i noutatal de la cadena pesada de la miosina (MyHC, *myosin heavy chain*) i s'acumula la isoforma adulta de MyHC (Schiaffino i Reggiani, 1994). Postnatalment, les TH canvien els nivells de transcripció dels factors reguladors de la miogènesi, alterant les propietats metabòliques, i induint canvis de MyHC I (lenta) a MyHC II (ràpida) (Polk, 1989, Dauncey, 1996).

La importància dels receptors d'hormones tiroïdals (TR) i dels receptors de l'àcid retinoic (RAR/RXR) en la diferenciació muscular s'ha establert en estudis que mostren que els elements de resposta a TR i RAR/RXR són rellevants per l'activació de promotors específics de múscul, incloent *MyoD* i miogenina (Carnac, 1992, Albagli-Curiel, 1993, Downes, 1993, Halevy i Lerman, 1993, Downes, 1994, Muscat, 1994, Alric, 1998). No obstant, altres estudis indiquen que l'efecte de l'àcid retinoic en la miogènesi *in vivo* pot ser més complex i podria dependre de la influència d'altres senyals extracel·lulars (Xiao, 1995). En cèl·lules musculars en cultiu s'ha descrit una interacció entre *MyoD* i RAR/RXR (Froeschlé, 1998). També s'ha descrit una interacció entre MEF2 i TR, i en menor grau amb RAR (Lee, 1997), en la que podria intervenir CBP/p300 (De Luca, 2003). Aquestes associacions poden ser importants per la regulació de gens com l' α -MHC (α -*myosin heavy chain*), d'expressió controlada per les TH i l'RA.

La proteïna retinoblastoma pRb també està implicada en la diferenciació muscular. La sortida del cicle cel·lular és un prerequisit per a l'activació del programa de diferenciació del múscul esquelètic. Les quinases dependents de ciclines o CDK (*cyclin-dependent kinases*) regulen les transicions del cicle cel·lular formant complexos amb ciclines específiques que controlen la fosforilació de pRb. L'expressió de les proteïnes inhibidores de CDK, CKI (*CDK-inhibitors*) p21 i p57 s'incrementa a l'inici de la miogènesi. D'aquesta manera s'inhibeixen les CDK i s'afavoreix la hipofosforilació de pRb, necessària per a la sortida irreversible dels mioblasts del cicle cel·lular en resposta a *MyoD* i per a l'activació transcripcional de promotors específics de múscul per part de *MyoD* (Walsh, 1997). La forma activa de pRb, hipofosforilada, inhibeix l'activitat E2F, que antagonitza la miogènesi (Corbeil, 1995, Kiess, 1995, Shin, 1995, Guo i Walsh, 1997, Puri, 1997b). S'ha descrit un sinergisme entre pRb i *MyoD* en activar el programa miogènic (Gu, 1993, Novitch, 1996, Sellers, 1998). S'ha proposat un mecanisme en el

que la forma activa de pRb, s'uneix a HDAC1, permetent l'acumulació de MyoD acetilada (activa) i bloquejant la transcripció gènica per E2F (Walsh i Perlman, 1997, Brehm, 1998, Magnaghi-Jaulin, 1998).

La proteïna pRb també està involucrada en la regulació de l'activació de MEF2C, però no participa en la unió d'aquest factor de transcripció al DNA (Novitch, 1999).

4.2. REGULADORS NEGATIUS DE LA MIOGÈNESI

S'han aïllat diverses proteïnes amb activitat repressora de la miogènesi. Aquests inhibidors de la transcripció miogènica empen diferents mecanismes per dur a terme la seva activitat, incloent l'associació física directa amb els MRF, el desplaçament d'E12/47, la competència per la unió al DNA o per coactivadors, i modificacions en la distribució subcel·lular i en l'estat de fosforilació i acetilació dels MRF (Fig. 9).

La proteïna Id (inhibidora de la unió al DNA), amb una estructura HLH, no presenta el domini bàsic d'unió al DNA i actua segregant proteïnes bHLH i formant complexos que no s'uneixen al DNA (Langlands, 1997).

De manera semblant, la proteïna bHLH Twist també pot reprimir la transcripció muscular segregant proteïnes E en complexos inactius (Spicer, 1996). Twist també és capaç d'inhibir l'acció de les proteïnes MyoD i MEF2 interaccionant-hi directament (Spicer, 1996, Hamamori, 1997) o inactivant l'activitat acetiltransferasa de CBP/p300 i p/CAF necessària per la funció de MyoD (Hamamori, 1999).

Mist1 és una proteïna bHLH que actua regulant negativament l'activitat de MyoD mitjançant la formació d'heterodímers inactius MyoD-Mist1 i homodímers Mist1 que bloquegen les *Ebox* (Lemerrier, 1998).

MyoR és una altra proteïna bHLH, que després de dimeritzar amb proteïnes E, s'uneix a *Ebox* i reprimeix la transcripció (Lu, 1999).

La proteïna I-mfa s'associa a MyoD i n'evita la translocació al nucli, i també interfereix en la unió dels MRF al DNA (Chen, 1996).

ZEB (*zinc finger/Ebox binding*) s'uneix a *Ebox* dels gens musculars i n'impedeix la transcripció fins que és desplaçat per altes concentracions de factors MRF, durant la diferenciació (Postigo i Dean, 1997). ZEB també suprimeix l'activitat de MEF2 a través d'un mecanisme que sembla inhibir el coactivador p300 (Postigo i Dean, 1999).

Diversos membres de la família Jun reprimeixen l'activitat miogènica de proteïnes MRF (Bengal, 1992). S'ha proposat que el mecanisme antagònic podria implicar la interacció física entre Jun i MRF (Bengal, 1992) o la competència pel coactivador p300 (Puri i Sartorelli, 2000).

El receptor transmembrana Notch també inhibeix la miogènesi. En presència del seu lligand Delta, el receptor Notch és tallat per proteases, i el domini citoplasmàtic interacciona amb MEF2C i inhibeix la unió de MEF2C al DNA i la formació dels complexos MEF2C-MyoD-E12 (Wilson-Rawls, 1999).

El factor de creixement bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) inhibeix l'activitat de MyoD i miogenina mitjançant la proteïna quinasa C (*protein kinase C* o PKC) que fosforila una treonina en el domini bàsic d'aquests MRF (Li, 1992). S'han descrit altres fosforilacions dels MRF que afecten la seva capacitat de dimerització, d'unió al DNA i la seva estabilitat (revisat a Puri i Sartorelli, 2000).

La miogènesi també està influenciada pels corepressors (Struhl, 1998). NCoR inhibeix l'activitat transcripcional de MyoD, l'expressió dels MRF i p21, i la diferenciació muscular (Bailey, 1999). L'activitat HDAC (*histone deacetylase*) present en els complexos corepressors podria estar implicada en la inhibició de MyoD (Bailey, 1999, Mal, 2001, Puri, 2001) i MEF2C (Miska, 1999, Sparrow, 1999, Dressel, 2001). S'ha demostrat que l'HDAC de classe I, HDAC1, interacciona amb MyoD, el deacetila i inhibeix la miogènesi (Mal, 2001, Puri, 2001). Les HDAC de classe II, HDAC4, HDAC5 i HDAC7, interaccionen amb MEF2 i n'inhibeixen l'activitat (Miska, 1999, Wang, 1999, Lu, 2000, Dressel, 2001), i la inducció de la diferenciació muscular implica la translocació d'aquestes HDAC del nucli al citoplasma (McKinsey, 2000, Dressel, 2001). Recentment s'ha observat que l'HDAC de classe III, dependent de NAD⁺, Sir2, forma un complex amb p/CAF i MyoD, i regula la transcripció de gens musculars en funció de l'estat redox de la cèl·lula (Fulco, 2003).

Alguns NR orfes també inhibeixen la diferenciació muscular. COUP-TFII interacciona amb els corepressors NCoR, SMRT i RIP13, i silencia la transcripció. Reprimeix l'expressió de *MyoD* i del regulador del cicle cel·lular *p21* (Muscat, 1995b, Burke, 1996, Bailey, 1997). COUP-TFII també reprimeix la transcripció mitjançada per MyoD, per competència amb el coactivador p300 (Bailey, 1998). Rev-ervA α reprimeix l'expressió dels gens *MyoD* i *miogenina*, suprimint l'activació mitjançada pel receptor d'hormones tiroïdals (Downes, 1995).

OBJECTIUS

OBJECTIUS

El nostre grup d'investigació està interessat en l'estudi de diverses proteïnes mitocondrials, particularment del sistema cadena respiratòria/fosforilació oxidativa, principal font d'energia útil a la majoria de cèl·lules dels mamífers. Amb la clonació d'*UCP3* el 1997, el grup va començar a estudiar la regulació de l'expressió d'aquest gen en situacions fisiològiques associades a modificacions en l'homeòstasi energètica de l'organisme, com l'etapa perinatal, l'alletament i el dejuni. La seva expressió tissular específica i regulada en resposta a diversos estímuls hormonals ha portat a plantejar com a objectiu principal d'aquesta tesi **estudiar la regulació de la transcripció del gen de la proteïna desacobladora UCP3.**

Primerament, i donat que *UCP3* s'expressa preferencialment al múscul esquelètic, hem volgut **determinar els factors en *trans* i els elements en *cis* presents en el promotor del gen *UCP3* responsables de la seva expressió en cèl·lules musculars.**

En segon lloc, i en el context de la identificació de l'àcid retinoic com a molècula reguladora de la transcripció d'*UCP3*, ens hem proposat **estudiar les bases moleculars per les quals l'àcid retinoic és capaç d'activar el promotor del gen *UCP3* en cèl·lules musculars.**

En diferents situacions fisiològiques i patològiques s'ha observat una correlació entre els nivells d'àcids grassos no esterificats i l'expressió d'*UCP3* al múscul esquelètic i s'ha proposat que els PPAR poden mitjançar els efectes dels àcids grassos sobre el gen *UCP3*. Nosaltres ens hem plantejat com a tercer objectiu **establir els mecanismes moleculars pels quals els àcids grassos regulen l'expressió del gen *UCP3* en cèl·lules musculars, i determinar la importància d'aquests mecanismes *in vivo*, al cor i al múscul esquelètic de ratolins.**

Finalment, ja que les hormones tiroïdals activen l'expressió d'*UCP3*, hem volgut **identificar el factors implicats en la regulació de la transcripció del gen *UCP3* per les hormones tiroïdals, en cèl·lules musculars en cultiu i en el múscul esquelètic *in vivo*.**

RESUM GLOBAL

RESUM GLOBAL

El gen *UCP3* s'expressa majoritàriament al múscul esquelètic i al teixit adipós marró, i en menor grau al cor i al teixit adipós blanc en rosegadors, i pràcticament de manera exclusiva al múscul esquelètic en humans. El gen s'activa en resposta a diferents estímuls, entre els quals trobem l'àcid retinoic, els àcids grassos no esterificats i les hormones tiroïdals. L'estudi de la regulació de la transcripció del gen *UCP3* en cèl·lules musculars ens ha permès obtenir informació sobre els mecanismes moleculars responsables de l'expressió d'*UCP3* al múscul esquelètic i de la modulació d'aquesta expressió deguda als estímuls esmentats. L'estudi de la regulació de l'expressió d'*UCP3 in vivo* ens ha permès establir la importància d'alguns d'aquests mecanismes en un context fisiològic.

1. MYOD ÉS NECESSARI PER L'ACTIVITAT DEL PROMOTOR DEL GEN *UCP3*.

1.1. L'EXPRESSIÓ DEL GEN *UCP3* EN CÈL·LULES MUSCULARS S'INDUEIX EN LA DIFERENCIACIÓ.

UCP3 s'expressa al múscul esquelètic, tant en rosegadors com en humans. En aquesta tesi s'ha estudiat l'expressió del gen *UCP3* endogen en cèl·lules musculars L6E9 (de rata) i C2C12 (de ratolí). En aquestes línies cel·lulars en estadi de mioblast, els nivells de l'mRNA d'*UCP3* són indetectables mitjançant la tècnica de *Northern blot*. Només quan les cèl·lules són estimulades a diferenciar-se i adquireixen el fenotip de miotub, l'expressió de l'mRNA d'*UCP3* esdevé detectable per aquesta tècnica. Les anàlisis mitjançant *Real-Time PCR* també indiquen que l'expressió de l'mRNA d'*UCP3* s'indueix durant la diferenciació en cèl·lules C2C12 (Shimokawa, 1998) i en cèl·lules L6E9 (dades no mostrades). Aquests resultats estan d'acord amb l'aparició tardana de l'expressió d'*UCP3* durant l'ontogènia muscular (Brun, 1999b), indicant que el gen *UCP3* pot ser considerat un marcador tardà de l'estat diferenciat de les cèl·lules musculars.

No obstant, els nivells d'expressió d'*UCP3* que s'assoleixen en cèl·lules musculars diferenciades en cultiu són molt baixos en comparació amb el múscul *in vivo*. En un estudi en el que s'han introduït cèl·lules musculars humanes en el múscul de ratolins immunodeficients, la diferenciació aconsegueix uns nivells d'expressió d'*UCP3* similars als que s'observa en el múscul, indicant que senyals *in vivo* que no tenen lloc en els cultius *in vitro* són importants per l'expressió d'*UCP3* (Guigal, 2002).

1.2. MYOD ÉS NECESSARI PER L'ACTIVITAT BASAL DEL PROMOTOR DEL GEN *UCP3*.

Per tal d'identificar els elements que mitjancen l'expressió d'*UCP3* al múscul esquelètic, s'han clonat i seqüenciat 6 kb del promotor humà i 2 kb del promotor de ratolí del gen *UCP3*. S'han realitzat experiments de transfecció transitòria de construccions que contenen -2903 kb del promotor humà i -1946 kb del promotor de ratolí d'*UCP3* fusionades al gen marcador luciferasa en mioblasts L6E9. L'activitat basal dels promotors és molt baixa en aquest estadi indiferenciat, d'acord amb els baixos nivells d'expressió de l'mRNA del gen *UCP3* en mioblasts L6E9 i C2C12. La cotransfecció del vector d'expressió de MyoD, un factor de transcripció miogènic de la família MRF expressat exclusivament al múscul esquelètic, augmenta l'activitat del promotor d'*UCP3* respecte a l'activitat basal, tant en el promotor humà com en el de ratolí. En canvi, la cotransfecció del plàsmid d'expressió de Mef2C, un factor miogènic de la família MADS, no afecta l'activitat del promotor humà d'*UCP3*.

MyoD és un dels principals reguladors del programa de diferenciació de les cèl·lules musculars (Molkentin, 1996b), i la necessitat de MyoD per l'activació dels promotors humà i de ratolí d'*UCP3* indica que MyoD pot ser responsable de l'expressió del gen *UCP3* en cèl·lules musculars diferenciades i de l'expressió preferencial en el múscul esquelètic *in vivo*. Tot i que l'mRNA i la proteïna MyoD s'expressen durant tota la diferenciació muscular a nivells similars en cèl·lules en cultiu C2C12 (Shimokawa, 1998, Liu, 2000) es creu que l'activitat de MyoD està inhibida en estadi de mioblast (Mal, 2001) i s'activa amb la diferenciació (Sartorelli, 1999). Tant en aquestes cèl·lules, com en les cèl·lules L6E9 que no tenen MyoD (Froeschle, 1998), un altre factor miogènic de la família dels MRF podria mitjançar l'augment en l'expressió d'*UCP3* durant la diferenciació. En aquest sentit, la miogenina, un altre factor de transcripció miogènic de la família dels MRF, també és capaç d'activar la transcripció dels promotors humà i de ratolí d'*UCP3* (dades no mostrades). A més a més, cada un dels MRF és capaç d'activar la diferenciació muscular quan és introduït en cèl·lules no musculars (Weintraub, 1991, Olson i Klein, 1994, Lassar, 1994) i s'ha suggerit que l'expressió en un espai i temps determinat és el que diferencia l'acció entre els diferents MRF (Wang, 1996).

In vivo, tot i que tant l'expressió d'*UCP3* com la de MyoD són superiors als músculs de contracció ràpida respecte als músculs de contracció lenta (*UCP3*: Boss, 1997, Hesselink, 2001, Jimenez, 2002, Russell, 2003a i 2003b, Suwa, 2003; MyoD: Voytik, 1993, Neville, 1996, Hughes, 1997, Wheeler, 1999), l'expressió de l'mRNA d'*UCP3* en diferents músculs de ratolins *MyoD-KO* no està alterada significativament. No obstant, no es pot descartar l'existència de mecanismes compensatoris en aquests animals, que presenten, per exemple, uns nivells de NEFA en sang elevats (dades no mostrades, Solanes, 2004).

1.3. MYOD ACTIVA EL PROMOTOR HUMÀ D'*UCP3* A TRAVÉS D'UNA REGIÓ PROPERA A L'INICI DE TRANSCRIPCIÓ. L'ESTAT D'ACETILACIÓ DE MYOD ÉS IMPORTANT PER L'ACTIVACIÓ DEL PROMOTOR D'*UCP3*.

En aquest treball d'investigació, s'ha localitzat el lloc d'acció de MyoD en el promotor humà d'*UCP3*. Els estudis de transfecció transitòria de diferents construccions del promotor (deleccions en 5') en mioblasts L6E9 mostren que la resposta a MyoD es troba en la regió proximal del promotor (-160h*UCP3*). Entre -106 i -101 s'ha descrit una possible *Ebox* (Acin, 1999) i en la seqüència entre -58 i -51, en la que es troba el polimorfisme -55C/T, hi ha un element no canònic semblant al que s'ha descrit que és important per la resposta a MyoD en el promotor humà de l'acetil CoA carboxilasa- β (Lee, 2001). Ni la mutagènesi dirigida de la possible *Ebox*, ni el canvi entre C i T del polimorfisme, no afecten la resposta del promotor a MyoD. En la regió més proximal del promotor, propera a l'inici de transcripció (-29/-9), s'han localitzat 3 elements *Ebox* imperfectes. Tant les anàlisis de l'activitat de diferents construccions del promotor (mitjançant deleccions en 5' o mutacions puntuals) en mioblasts L6E9, com els experiments d'EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) *in vitro*, i immunoprecipitació de cromatina (ChIP) *in vivo* en mioblasts L6E9 i en cultius primaris de cèl·lules musculars humanes, mostren la importància d'aquesta regió per l'acció de MyoD en el gen humà *UCP3*.

En altres gens d'expressió preferencial al múscul, com *MHCIIB* i *acetil CoA carboxilasa- β* (Takeda, 1995, Lee, 2001), també s'han descrit llocs atípics d'acció per MyoD a través de la interacció amb elements propers a l'inici de transcripció. MyoD pot interaccionar amb aquesta regió sol o formant complexos amb altres proteïnes nuclears presents en les cèl·lules L6E9. Mentre que els elements semblants a *Ebox* són necessaris per la unió de MyoD i la transactivació dependent de MyoD, la presència de regions adjacents a prop de l'inici de transcripció condueix a la formació de complexos ternaris que contenen MyoD. S'ha descrit que MyoD pot interaccionar amb la TBP present en el complex TFIID i facilitar l'associació de TFIIB al complex de preiniciació de la transcripció (Heller, 1998). MyoD també pot interaccionar amb coactivadors, com p300 (Yuan, 1996), que facilitarien la interacció amb la TBP (Abraham, 1993). Els coactivadors p300 i p/CAF són capaços d'acetilar MyoD en tres residus de lisina molt conservats entre diferents espècies i també entre els membres de la família MRF (Puri, 1997c, Sartorelli, 1999), i l'estat d'acetilació de MyoD és important per la seva activitat (Sartorelli, 1999, Poleskaya, 2001a i 2001b). En el nostre sistema, la cotransfecció amb els vectors d'expressió dels coactivadors p300 o p/CAF no augmenta la capacitat de transactivació de MyoD. La importància dels processos d'acetilació en la regulació del promotor d'*UCP3* s'ha posat de manifest reprimint els efectes de la cotransfecció de MyoD amb un vector d'expressió d'HDAC1, que modula l'activitat transcripcional per deacetilació, no només d'histones sinó també de MyoD (Mal, 2001). Aquestes dades probablement indiquen que la majoria de MyoD

transfectat en cèl·lules mioblàstiques es troba acetilat per activitats HAT endògenes, com s'ha observat anteriorment (Sartorelli, 1999). El paper específic de l'acetilació de MyoD s'ha confirmat amb la disminució en la capacitat de transactivació d'un mutant de MyoD no acetilable.

Així doncs, MyoD podria interaccionar amb proteïnes associades a la maquinària basal de transcripció en el promotor humà d'*UCP3*. La localització de la unió de MyoD propera a l'inici de transcripció i la interacció amb altres proteïnes associades a aquesta regió està d'acord amb l'elevada dependència de MyoD per l'activitat del promotor humà d'*UCP3*.

2. L'ÀCID RETINOIC ACTIVA EL PROMOTOR DEL GEN *UCP3* EN CÈL·LULES MUSCULARS. MYOD ÉS NECESSARI PER L'ACTIVACIÓ DEL PROMOTOR PER L'ÀCID RETINOIC.

2.1. L'ÀCID RETINOIC ACTIVA L'EXPRESSION DEL GEN *UCP3* EN CÈL·LULES MUSCULARS DIFERENCIADES. MYOD ÉS NECESSARI PER LA RESPOSTA DEL PROMOTOR A L'ÀCID RETINOIC.

Els nostres experiments mostren que l'RA estimula fortament l'expressió d'*UCP3* en cèl·lules musculars L6E9 i C2C12. L'àcid *all-trans* retinoic augmenta l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA entre 8 i 10 vegades, però només quan aquestes cèl·lules estan diferenciades. En miotubs L6E9, tant l'àcid *9-cis* retinoic com l'àcid *all-trans* retinoic són capaços d'augmentar l'expressió de l'mRNA d'*UCP3*, assolint uns nivells de l'ordre dels que s'observen en el múscul *gastrocnemius* de ratolí. Aquestes dades han estat confirmades posteriorment amb el tractament amb l'àcid *9-cis* retinoic en cèl·lules musculars L6 diferenciades en cultiu, a nivell de l'mRNA d'*UCP3* (Nagase, 1999, Son, 2001) i en cultius primaris de cèl·lules musculars diferenciades de rata, a nivell de l'mRNA i la proteïna UCP3 (Guillet-Deniau, 2002). També en ratolins, l'RA administrat *in vivo* incrementa l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA i de proteïna, al múscul esquelètic (Felipe, 2003).

Els experiments de transfecció del promotor humà d'*UCP3* en mioblasts L6E9 són consistents amb el comportament diferencial d'*UCP3* en funció de l'estat de diferenciació de les cèl·lules: l'expressió basal del promotor no és sensible als àcids *9-cis* i *all-trans* retinoic, i MyoD confereix sensibilitat a l'RA al promotor del gen humà *UCP3*.

Els efectes activadors de l'expressió d'*UCP3* per l'àcid *9-cis* retinoic podrien estar mitjançats per homodímers RXR o heterodímers d'RXR amb altres NR com RAR, PPAR o receptors orfes (Mangelsdorf, 1995, Leblanc, 1995). En els experiments de transfecció transitòria en mioblasts L6E9, en presència de MyoD, l'àcid *all-trans* retinoic activa el promotor

humà d'*UCP3* significativament. En aquest model experimental la cotransfecció del vector d'expressió de RAR augmenta la resposta del promotor humà d'*UCP3* a l'àcid *all-trans* retinoic, mentre que l'àcid *9-cis* retinoic via RXR no és efectiu de manera significativa. Aquests resultats indiquen que la resposta d'*UCP3* a l'RA pot estar mitjançada per un RARE, és a dir, un element de resposta a l'RA que uneix heterodímers RAR-RXR i on l'actuació de RAR és fonamental per als efectes de l'RA. El fet que la cotransfecció de RAR i RXR sigui la més efectiva activant el promotor humà d'*UCP3* ho confirma. Tot i que l'activació d'RXR dependent de lligand, com a *partner* de RAR o altres NR no es pot excloure, els experiments de transfecció suggereixen un paper principal per RAR com a mitjancer de la resposta a l'RA en el gen *UCP3*.

2.2. L'ÀCID RETINOIC ACTIVA L'EXPRESSIÓ DEL GEN *UCP3* MITJANÇANT ELS RECEPTORS D'ÀCID RETINOIC I UN DR1 EN LA REGIÓ PROXIMAL DEL PROMOTOR.

S'ha identificat un RARE localitzat a la regió proximal del promotor del gen humà *UCP3*, entre -71 i -59, mitjançant estudis de transfecció transitòria de diferents construccions del promotor humà d'*UCP3* (delecions en 5' i mutacions puntuals) en mioblasts L6E9. Consisteix en un motiu similar a un DR1 que conté dues repeticions de la seqüència consens AGGTCA, una perfecta, i l'altra imperfecta, separades per una base (AGGTTTCAGGTCA). La seqüència sencera es troba completament conservada al promotor del gen *UCP3* de ratolí (Seqüència AB011070, Yoshitomi, 1998b), malgrat la divergència global entre la seqüència dels promotors humà i de ratolí d'*UCP3* (Esterbauer, 2000). Els estudis funcionals indiquen que aquest element DR1 és necessari per a la resposta a l'RA, i les anàlisis d'EMSA mostren que el DR1 uneix complexos proteics nuclears de cèl·lules musculars L6E9 que contenen RAR i RXR. El DR1 (dues repeticions directes separades per una base) és una seqüència característica de diversos RARE (Durand, 1992, Lee, 1995a), tot i que són més freqüents les estructures DR2 i DR5 com a mitjanceres de la resposta a l'RA (Mangelsdorf, 1994). No obstant, a diferència d'aquestes últimes estructures que són molt restrictives per la unió dels heterodímers RAR-RXR, els elements DR1 són altament promiscus i poden ser mitjancers de la resposta biològica a altres heterodímers que continguin RXR, com ara PPAR-RXR, homodímers RXR, i HNF4 o COUP-TF (Nishiyama, 1998). Les diferències subtils en les repeticions i les seqüències flanquejants del DR1 i el context del promotor fan possible la unió i la resposta preferencial als diferents membres de la superfamília dels NR (Sanguedolce, 1997, Nakshatri, 1998). En els experiments d'EMSA observem que la seqüència DR1 del promotor del gen humà *UCP3* uneix, a més de RAR-RXR, altres complexos que contenen RXR provinents de nuclis de les cèl·lules musculars. L'expressió del gen *UCP3* és sensible *in vivo* a diversos senyals hormonals diferents d'RA que també actuen a través d'NR, com per exemple derivats d'àcids grassos (via PPAR) (Brun, 1999b) o les hormones tiroïdals (via TR) (Gong, 1997) (veure més endavant).

Recentment s'ha descrit que RAR i RXR poden interaccionar funcionalment i físicament amb MyoD, sobre el DNA (Froeschle, 1998). La necessitat de MyoD per tal que el promotor del gen *UCP3* respongui a l'RA seria compatible amb aquesta interacció. No obstant, les construccions amb deleció i mutacions puntuals que responen a MyoD però no responen a l'RA, indiquen que el RARE en el promotor del gen *UCP3* és diferent i està separat físicament en el DNA dels elements en *cis* que permeten l'acció de MyoD. Com ja hem dit, MyoD actua a través d'una regió propera a l'inici de transcripció i la dependència de MyoD per l'acció de l'RA sobre el promotor d'*UCP3* fa pensar en una interacció entre MyoD i la maquinària basal de transcripció.

Així doncs, l'acció de l'RA constitueix una nova via de regulació de l'expressió gènica d'*UCP3* que, a més de l'acció de MyoD, podria ser crítica per la regulació dependent de diferenciació i desenvolupament en el múscul esquelètic. L'RA afecta molts processos biològics, incloent el creixement cel·lular i la diferenciació. En cèl·lules musculars en cultiu, l'RA promou la diferenciació miogènica (Gabbert, 1988, Halevy, 1993, Albagli-Curiel, 1993). En aquest sentit, s'ha observat que l'RA indueix l'expressió de proteïnes MRF com MyoD o miogenina (Albagli-Curiel, 1993, Froeschle, 1998), que activen l'expressió de gens específics de múscul (Molkentin i Olson, 1996b). A més, l'RA també és capaç de potenciar l'activitat de MyoD, mitjançant la interacció física entre els receptors d'RA i MyoD (Froeschle, 1998), i MyoD és necessari per tal que l'RA moduli la miogènesi (Froeschle, 1998). Els nostres resultats suggereixen que l'RA podria participar en la regulació de l'expressió d'*UCP3*, durant la diferenciació muscular.

El 1995, es va identificar l'RA com a inductor de l'expressió del gen *UCP1*, tan potent com la via noradrenèrgica clàssica de regulació d'aquest gen (Alvarez, 1995), tot i que no se'n coneix el significat fisiològic exacte. El nostre grup ha descrit que l'àcid *9-cis* retinoic és un dels principals reguladors hormonals de l'expressió del gen *UCP2* en adipòcits marrons (Carmona, 1998). *In vivo*, l'RA també activa l'expressió d'*UCP3* al múscul esquelètic (Felipe, 2003) i en aquest treball observem que la transcripció d'*UCP3* és extremadament sensible a l'RA. Tot i que les funcions fisiològiques de les tres proteïnes UCP en relació amb la termogènesi i el metabolisme mitocondrial semblen diferents, és remarcable que les tres siguin altament sensibles als retinoides. Aquest fet s'hauria de sumar a l'observació que les activitats d'almenys *UCP1* i *UCP2* estiguin directament afectades per l'RA (Rial, 1999). Els derivats de la vitamina A són essencials per al desenvolupament i la diferenciació de diversos teixits, incloent el múscul esquelètic, durant l'ontogènia, i per la funció fisiològica regular de la majoria dels tipus cel·lulars en l'adult. Recentment s'ha suggerit que els efectes de l'RA sobre *UCP3* al múscul podrien estar relacionats amb els efectes de la vitamina A sobre l'expressió de gens implicats en el control del pes corporal (Felipe, 2003).

3. ELS ÀCIDS GRASSOS ACTIVEN EL PROMOTOR DEL GEN *UCP3* MITJANÇANT ELS RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS PEROXISOMALS. MYOD ÉS NECESSARI PER LA RESPOSTA DEL GEN *UCP3* ALS ÀCIDS GRASSOS.

3.1. ELS ÀCIDS GRASSOS ACTIVEN L'EXPRESSIÓ DEL GEN *UCP3* MITJANÇANT PPAR α O PPAR δ . MYOD ÉS NECESSARI PER L'ACTIVACIÓ DEPENDENT DE PPAR.

La transcripció d'*UCP3* és molt sensible a senyals hormonals i metabòlics, especialment aquells relacionats amb la disponibilitat d'àcids grassos. En rosegadors, situacions en les que els nivells de NEFA en sang són elevats, com el dejuni, el desenvolupament postnatal, l'exercici i la dieta rica en lípids, augmenten l'expressió d'*UCP3* (revisat a Ricquier i Bouillaud, 2000), mentre que en situacions en les que els NEFA disminueixen, com l'alletament, l'expressió d'*UCP3* minva (Pedraza, 2000). S'ha suggerit que els PPAR poden mitjançar aquests efectes dels àcids grassos sobre el gen *UCP3*, i l'administració d'activadors de PPAR α i PPAR $\alpha+\delta$ *in vivo*, augmenta l'expressió d'*UCP3* al múscul esquelètic (Brun, 1999a, Pedraza, 2000). Els efectes dels activadors de PPAR γ sobre l'expressió del gen *UCP3* *in vivo* depenen de la situació fisiològica, suggerint un mecanisme d'acció indirecte (Kelly, 1998, Pedraza, 2000, Emilsson, 2000). En cèl·lules musculars diferenciades en cultiu, l'activació per PPAR δ sembla ser la més important, probablement degut a la manca d'expressió de PPAR α en línies de cèl·lules musculars en cultiu (Son, 2001).

Els nostres estudis de transfecció transitòria del promotor humà d'*UCP3* en mioblasts L6E9 són consistents amb aquesta regulació del gen *UCP3*: els àcids grassos activen el promotor, per un mecanisme dependent de PPAR α o PPAR δ , però no PPAR γ . D'acord amb l'expressió del gen *UCP3* pràcticament exclusiva al múscul esquelètic, MyoD és necessari per la sensibilitat a l'activació dels PPAR dependent de lligand.

3.2. L'ACTIVACIÓ DEL GEN *UCP3* PER LA VIA DELS PPAR TÉ LLOC A TRAVÉS DEL DR1 EN LA REGIÓ PROXIMAL DEL PROMOTOR.

L'anàlisi funcional de diferents construccions del promotor humà d'*UCP3* (delecions en 5' i mutacions puntuals) i els experiments d'EMSA indiquen que els llocs que mitjancen l'activació per PPAR i MyoD estan físicament separats en el promotor. L'acció dels PPAR té lloc a través de l'element DR1 en la regió proximal del promotor que també mitjança la resposta a l'RA. Aquest lloc és crític per la inducció d'àcids grassos del promotor *in vivo*, tal i com es demostra per la manca de resposta de construccions del promotor mutades puntualment,

injectades directament a l'extremitat del ratolí nouat, sota l'estímul dels àcids grassos que provenen de la ingesta de llet.

L'estructura de l'element com a DR1 està d'acord amb l'alineament característic dels elements de resposta a PPAR. No obstant, el paper d'aquest DR1 en mitjançar els efectes de l'RA, no només a través de l'activació d'RXR de l'heterodímer PPAR-RXR, sinó també a través de RAR, indica que es comporta com un element regulador multihormonal en el gen humà *UCP3* i està d'acord amb l'estructura del DR1 que és altament permissiva per múltiples respostes mitjançades per NR.

La resposta específica del promotor del gen *UCP3* a PPAR α i PPAR δ i als seus lligands respectius, però la manca de sensibilitat a PPAR γ , és consistent amb la resposta del gen a situacions fisiològiques associades amb un augment en els nivells de NEFA. Una gran varietat d'àcids grassos de diferents longituds i saturacions es comporten com a activadors naturals dels subtipus PPAR α i PPAR δ , però PPAR γ és menys sensible a aquests àcids grassos (Desvergne i Wahli, 1999). Els elements de resposta a PPAR en els gens de mamífer sovint són altament promiscus en resposta als diferents subtipus de PPAR (Juge-Aubry, 1997), i la seva activació per les diferents vies dependents dels subtipus de PPAR és deguda a l'acció de lligands específics o a l'expressió de subtipus específics en les cèl·lules diana (Desvergne i Wahli, 1999, Barbera, 2001). No obstant, també hi ha exemples de respostes parcialment específiques pel subtipus de PPAR (He, 1999), com és el cas del promotor dels gens *UCP1* i *LPL* (Schoonjans, 1996, Barbera, 2001).

3.3. LES VIES DE REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ DE MYOD I PPAR INTERACCIONEN FUNCIONALMENT EN EL PROMOTOR DEL GEN *UCP3*. L'ESTAT D'ACETILACIÓ DE MYOD I DE LES HISTONES ÉS IMPORTANT PER L'ACTIVACIÓ DEL PROMOTOR.

Tot i la localització separada dels llocs de MyoD i PPAR en el promotor humà d'*UCP3*, s'ha estudiat la interacció funcional entre les dues vies de regulació del promotor d'*UCP3*, mitjançant experiments de transfecció transitòria en cèl·lules L6E9. Quan s'han determinat els efectes de diversos coactivadors que se sap que interaccionen amb els NR, com p300, p/CAF, SRC-1 i Tip60, només p300 ha potenciat l'activació dependent de lligand de PPAR. P300 interacciona i coactiva PPAR α (Dowell, 1997), i també acetila histones i MyoD, promovent l'activitat transcripcional de MyoD (Polesskaya, 2001, Polesskaya i Harel-Bellan, 2001). El mutant de p300 que no és capaç d'acetilar inhibeix l'activació mitjançada pels lligands de PPAR, evidenciant la implicació de l'activitat acetilasa de p300 en la regulació del promotor d'*UCP3* per PPAR.

La importància dels processos d'acetilació en la regulació del promotor d'*UCP3* s'ha confirmat reprimint els efectes dependents de MyoD i PPAR α , mitjançant l'expressió d'HDAC1, que modula l'activitat transcripcional per deacetilació d'histones i MyoD (Mal, 2001). A més, l'activació transcripcional del gen humà *UCP3* per MyoD i PPAR α està associada a un augment en l'estat d'acetilació de les histones unides al promotor, tal i com ho demostren les anàlisis de ChIP en cèl·lules musculars humanes. Aquests resultats suggereixen que el complex actiu format quan PPAR α interacciona amb els lligands en presència de MyoD involucra p300 com a molècula pont, i l'acetilació d'histones i MyoD són esdeveniments importants per proporcionar una transcripció activa i una sensibilitat dependent de lligand al sistema. La forma de MyoD no acetilable roman parcialment permissiva a l'activació dependent de PPAR α , indicant que altres factors o histones són acetilades per p300 o que MyoD encara reté un cert grau d'activitat.

Com a resum, proposem un model de control transcripcional del gen *UCP3* per les vies de MyoD i PPAR. Coactivadors com p300 poden proporcionar un mecanisme de pont entre l'activació dependent de PPAR i la maquinària basal de transcripció, que inclou MyoD. L'acetilació per p300 o altres acetilases, sobre MyoD i histones, estaria associada amb l'estat transcripcionalment actiu del gen, en condicions basals i especialment en resposta a l'activació dependent de PPAR. Els resultats suggereixen que aquest mecanisme proporciona les bases moleculars per la regulació transcripcional del gen *UCP3* per àcids grassos al múscul esquelètic humà.

4. PPAR α PARTICIPA EN EL CONTROL DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *UCP3* DE RATOLÍ DE MANERA DIFERENCIAL AL COR I AL MÚSCUL ESQUELÈTIC I EN FUNCIÓ DE L'ESTADI DEL DESENVOLUPAMENT.

Per tal d'estudiar la importància de PPAR α en la regulació de l'expressió d'*UCP3* pels NEFA *in vivo*, s'ha estudiat l'expressió d'*UCP3* en ratolins PPAR α -KO en dues situacions fisiològiques en les que els NEFA activen l'expressió d'*UCP3*, el dejuni en adults i l'alimentació en nounats, i en dos teixits que expressen UCP3, el múscul esquelètic i el cor.

4.1. PPAR α PARTICIPA EN EL CONTROL DE L'EXPRESSION DEL GEN *UCP3* DE MANERA DIFERENCIAL AL COR I AL MÚSCUL ESQUELÈTIC EN RATOLINS ADULTS.

PPAR α s'expressa de manera més abundant en teixits amb una elevada capacitat oxidativa (com el fetge, el cor i el múscul esquelètic), en els que promou l'expressió de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos (Su, 1996, Braissant, 1996). Els ratolins *PPAR α -KO* adults, en un estat d'alimentació, no mostren una afectació metabòlica aparent: els nivells de glucosa, NEFA i cossos cetònics en sang són semblants als dels ratolins control, com ja s'havia observat (Kersten, 1999, Muoio, 2002a). Però quan els ratolins *PPAR α -KO* adults són sotmesos al dejuni, els seus nivells de NEFA augmenten més que en els ratolins control, els nivells de glucosa disminueixen més que en els ratolins del genotip control i els nivells de cossos cetònics augmenten menys que en els ratolins control, degut a una menor capacitat d'oxidació d'àcids grassos (Leone, 1999) i una alteració en la biosíntesi de cossos cetònics (Le May, 2000). Aquest comportament metabòlic dels ratolins *PPAR α -KO* ha estat descrit prèviament tant per animals de la soca C57BL/6J, com en ratolins de la soca SV/129 (Kersten, 1999, Muoio, 2002a).

L'expressió d'*UCP3* al múscul esquelètic dels ratolins *PPAR α -KO* adults no presenta alteracions ni en estat basal, ni en resposta al dejuni. En una situació d'alimentació, l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA al múscul *gastrocnemius* és semblant entre els ratolins *PPAR α -KO* i els ratolins control. En resposta al dejuni, es produeix un augment significatiu en l'expressió d'*UCP3* similar en ambdós genotips. Als músculs *soleus* i *tibialis anterior*, l'augment en l'expressió d'*UCP3* degut al dejuni tampoc està disminuït en els ratolins *PPAR α -KO* (Amat, Rosell i Iglesias, dades no mostrades). El fet que la resposta d'*UCP3* al dejuni estigui conservada al múscul esquelètic en els ratolins *PPAR α -KO*, fa pensar que PPAR α no és l'únic mitjancer d'aquesta resposta en aquest teixit. Els àcids grassos estan considerats com els senyals efectors de l'augment en l'expressió d'*UCP3* degut al dejuni (Weigle, 1998). En estudis previs en animals *PPAR α -KO*, l'increment en l'expressió d'*UCP3* degut al dejuni ha estat superior al múscul esquelètic dels ratolins *PPAR α -KO* (Kersten, 1999, Muoio, 2002a), fet que s'ha associat al major increment en els nivells de NEFA en sang. En el nostre estudi, tot i que el dejuni reproduïx aquest increment més marcat en els nivells de NEFA en sang en els ratolins *PPAR α -KO*, l'expressió d'*UCP3* al múscul *gastrocnemius* no augmenta més que en els ratolins control, indicant una possible afectació en la resposta d'*UCP3* als àcids grassos deguda a la manca de PPAR α .

Al cor, l'expressió d'*UCP3* està afectada en els ratolins *PPAR α -KO*, tant en condicions d'alimentació com de dejuni. L'expressió basal d'*UCP3* és significativament menor en els animals *PPAR α -KO*, i en resposta al dejuni, en els dos genotips es produeix un increment significatiu de l'expressió d'*UCP3*, tot i que els nivells assolits pels ratolins *PPAR α -KO* són significativament

menors als dels ratolins del genotip salvatge. Aquests resultats concorden amb els observats prèviament per Muoio (Muoio, 2002a), i suggereixen que al cor, PPAR α és imprescindible per regular correctament l'expressió d'*UCP3*.

4.2. PPAR α ÉS NECESSARI PER MITJANÇAR L'AUGMENT EN L'EXPRESSIÓ D'*UCP3* DEGUT A LA INGESTA DE LLET DESPRÉS DEL NAIXEMENT TANT AL MÚSCUL ESQUELÈTIC COM AL COR DELS RATOLINS NOUNATS.

La capacitat d'oxidar àcids grassos al múscul esquelètic i al cor augmenta en rosegadors després del naixement junt amb l'elevada disponibilitat de lípids provinents de la ingesta de llet (Glatz i Veerkamp, 1982, Carroll, 1983). Els nivells de NEFA circulant mesurats en el present estudi en nadons d'ambdós genotips són comparables als nivells assolits en estudis anteriors realitzats al nostre laboratori per la Dra. Brun en ratolins de la soca Swiss, en els que els NEFA presenten un increment molt marcat a les 16 hores del naixement degut a la ingesta de llet materna, molt rica en lípids (Brun, 1999b). El fet que els nivells de NEFA no estiguin alterats significativament en els ratolins *PPAR α -KO* indica que el comportament alimentari no està modificat en aquests animals. La ingesta de llet també incrementa els nivells de cossos cetònics degut a l'activació de la cetogènesi associada a l'alimentació preferentment lipídica (Ferré, 1978). En el nostre estudi, els ratolins *PPAR α -KO* presenten menors nivells de cossos cetònics que els ratolins control, indicatius que la β -oxidació i la cetogènesi estan afectades, d'acord amb la disminuïda expressió gènica d'enzims cetogènics al fetge dels ratolins *PPAR α -KO* (Yubero, 2004).

En el moment del naixement (0 hores), els nivells d'expressió de l'mRNA d'*UCP3* són molt baixos i semblants entre els ratolins *PPAR α -KO* i els ratolins control, al múscul esquelètic. L'alimentació (8 i 16 hores després del naixement) incrementa l'expressió d'*UCP3* al múscul de ratolins nounats, tal i com ja s'havia descrit (Brun, 1999b). L'increment en l'expressió d'*UCP3* al múscul dels ratolins nounats *PPAR α -KO* (8 i 16 hores) és inferior al dels ratolins control, indicant que PPAR α és important per aquest augment. Aquesta menor activació no és atribuïble a diferents nivells dels NEFA en sang entre ambdós genotips, com s'ha esmentat. Així doncs, la necessitat de PPAR α per a la regulació d'*UCP3* en resposta als NEFA al múscul esquelètic varia en funció de l'estadi del desenvolupament, sent més rellevant en el període perinatal que en l'adult.

Al cor, l'augment postnatal en l'expressió d'*UCP3* en els ratolins control difereix dels resultats publicats prèviament en rates, en els que l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA i de proteïna és pràcticament indetectable fins la segona setmana de vida (Teshima, 1999, Skarka,

2003). En el nostre estudi, en els ratolins del genotip control, l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA al cor és molt baixa en el moment del naixement, i augmenta significativament a les 16 hores de vida. Els nivells d'expressió d'*UCP3* són similars en el moment del naixement entre ratolins dels dos genotips, però l'augment postnatal, atribuït a la ingesta de llet, és superior en els ratolins del genotip salvatge que en els ratolins *PPAR α -KO*. Per tant, al cor, *PPAR α* és imprescindible per la regulació correcta de l'expressió d'*UCP3* en resposta als àcids grassos, tant durant el dejuni en els animals adults, com en la resposta a la ingesta de llet, en els ratolins nounats.

Així doncs, existeixen mecanismes alternatius a *PPAR α* per mitjançar la regulació de l'expressió d'*UCP3* pels àcids grassos. Els àcids grassos poden actuar sobre altres factors de transcripció, com altres *PPAR* i fins i tot *RXR α* (de Urquiza, 2000, Goldstein, 2003). En cèl·lules musculars humanes en cultiu, s'ha descrit que tant *PPAR α* com *PPAR δ* poden mitjançar l'acció dels àcids grassos sobre l'expressió d'*UCP3* (Muoio, 2002a i 2002b).

4.3. *PPAR α* O *PPAR δ* PODEN MITJANÇAR L'ACTIVACIÓ DEL PROMOTOR D'*UCP3* DE RATOLÍ EN RESPOSTA ALS ÀCIDS GRASSOS. MYOD ÉS NECESSARI PER LA INDUCCIÓ D'AQUEST PROMOTOR DEPENDENT DELS ÀCIDS GRASSOS.

Per tal d'identificar els mitjancers de l'activació d'*UCP3* en resposta als àcids grassos, s'ha analitzat el comportament del promotor de ratolí d'*UCP3* transfectat transitòriament en cèl·lules L6E9. L'anàlisi funcional de 1946 kb d'aquest promotor mitjançant la cotransfecció dels vectors d'expressió dels diferents *PPAR* i el tractament amb àcid oleic i lligands específics dels *PPAR*, indica que els àcids grassos actuen a través de *PPAR α* o *PPAR δ* , però no *PPAR γ* . Com en el cas del promotor humà d'*UCP3*, *MyoD* és necessari per tal que aquests *PPAR* puguin activar el promotor de ratolí. La cotransfecció amb el vector d'expressió d'*RXR* i el tractament amb àcid oleic o agonistes específics d'*RXR* indiquen que aquest NR no és capaç de mitjançar l'activació d'*UCP3* pels àcids grassos.

4.4. L'EXPRESSIÓ DE *PPAR δ* A NIVELL D'MRNA AL MÚSCUL ESQUELÈTIC I AL COR NO MOSTRA UNA COMPORTAMENT COMPENSATORI PER LA MANCA DE *PPAR α* .

Els resultats obtinguts en cèl·lules musculars en cultiu indiquen que tant *PPAR α* com *PPAR δ* són capaços de mitjançar l'activació del promotor d'*UCP3* en resposta als àcids grassos. La necessitat diferencial de *PPAR α* per activar *UCP3* en resposta al dejuni al cor i al múscul

esquelètic podria ser deguda a l'expressió relativa entre PPAR α i PPAR δ en aquests teixits: al cor, l'expressió de PPAR α és preferencial respecte a PPAR δ (a nivell d'mRNA), mentre que al múscul esquelètic l'expressió de PPAR α i PPAR δ (a nivell d'mRNA) és similar (Muio, 2002a). En resposta al dejuni, observem un augment en els nivells de l'mRNA de PPAR δ al múscul esquelètic, i s'ha descrit un increment de PPAR δ a nivell de proteïna, i una manca de canvis en l'mRNA de PPAR α al múscul *gastrocnemius* de ratolins (Holst, 2003), indicant que PPAR δ pot tenir un paper més important que PPAR α en mitjançar la resposta al dejuni en aquest teixit. Al cor, en canvi, el dejuni no augmenta l'expressió de PPAR δ a nivell d'mRNA, d'acord amb dades observades prèviament tant a nivell d'mRNA com a nivell de proteïna (Holst, 2003).

D'acord amb la importància de PPAR α en l'expressió d'*UCP3* al múscul en l'època postnatal, estudis previs realitzats en el nostre laboratori en ratolins de la soca Swiss indiquen que l'expressió de PPAR α a nivell d'mRNA al múscul esquelètic s'indueix en el naixement (Brun, 1999a). Els nivells de l'mRNA de PPAR δ disminueixen 16 hores després del naixement, d'acord amb els elevats nivells de l'mRNA de PPAR δ en el fetus a finals de la gestació i la disminució en el moment del naixement (Brun, 1999a). Al cor, els nivells de l'mRNA de PPAR δ també disminueixen després del naixement.

Ni al múscul esquelètic ni al dels ratolins *PPAR α -KO* l'expressió de PPAR δ a nivell d'mRNA no mostra un comportament compensatori per la manca de PPAR α que sigui compatible amb la regulació de l'expressió d'*UCP3*. Els nivells de PPAR δ existents al múscul adult podrien ser suficients per mitjançar l'expressió d'*UCP3* en absència de PPAR α .

S'ha suggerit que *UCP3* pot jugar un paper en l'oxidació d'àcids grassos. En diferents situacions estudiades que afecten el catabolisme dels àcids grassos, la regulació de l'expressió d'*UCP3* es comporta de manera paral·lela a la d'altres gens que hi estan implicats.

Tant l'activació de PPAR α com la de PPAR δ en cèl·lules musculars poden regular l'expressió de gens relacionats amb el catabolisme lipídic (*PDK4*, *CPT1* i *MCD*) i *UCP3* i augmentar l'oxidació de lípids (Muio, 2002a i 2002b, Holst, 2003). Els estudis en ratolins *PPAR α -KO*, indiquen que PPAR δ és capaç de mitjançar la resposta d'aquests gens als àcids grassos en absència de PPAR α , al múscul esquelètic (Muio, 2002a).

Al cor, estudis *in vivo* i *in vitro* han demostrat que PPAR α regula la capacitat d'oxidar àcids grassos mitjançant la regulació de l'expressió de gens relacionats amb el catabolisme dels àcids grassos i alhora *UCP3* (Leone, 1999, Van der Lee, 2000, Watanabe, 2000, Young, 2001). En cardiomiòcits en cultiu, tant l'activació de PPAR α com la de PPAR δ poden modular l'expressió de gens implicats en el catabolisme lipídic (*MCPT-1*, *ACS*, *LCAD*), i augmentar l'oxidació d'àcids grassos (Gilde, 2003). No obstant, els estudis en ratolins *PPAR α -KO*, mostren un menor increment en l'expressió dels gens de l'oxidació de lípids i *UCP3* al cor en resposta al dejuni (Leone, 1999, Muio, 2002a). Durant el desenvolupament prenatal, l'expressió de diversos

enzims implicats en l'oxidació dels àcids grassos és baixa al cor i augmenta sobtadament després del naixement (Kelly, 1989, Nagao, 1993, Disch, 1996), de manera paral·lela al patró d'expressió de PPAR α (Lehman, 2000) i *UCP3*, en l'estudi present.

Totes aquestes dades indiquen que *UCP3* es comporta com un gen més, implicat en el catabolisme dels lípids, al múscul esquelètic i al cor, tant en una situació basal com en resposta a l'activació per àcids grassos deguda al dejuni. Tal i com s'ha descrit per altres gens que participen en l'oxidació d'àcids grassos, PPAR α seria més important per la regulació d'*UCP3* al cor, mentre que PPAR δ seria capaç de mitjançar la regulació d'*UCP3* per àcids grassos al múscul esquelètic. Durant el desenvolupament postnatal, PPAR α seria més important per la regulació de l'expressió de d'*UCP3*, coincidint amb l'augment en l'expressió de PPAR α i de gens regulats per PPAR α , implicats en el catabolisme lipídic al múscul esquelètic i al cor.

5. LES HORMONES TIROÏDALS ACTIVEN L'EXPRESSIÓ DELS GENS *UCP3* HUMÀ I DE RATOLÍ A TRAVÉS DELS RECEPTORS D'HORMONES TIROÏDALS I L'ELEMENT DR1 EN LA REGIÓ PROXIMAL DEL PROMOTOR.

5.1. LES HORMONES TIROÏDALS ACTIVEN L'EXPRESSIÓ DELS GENS *UCP3* HUMÀ I DE RATOLÍ *IN VIVO*.

Se sap que les TH regulen el metabolisme energètic, augmentant la respiració i la despesa energètica i disminuint l'eficiència metabòlica, però se'n desconeix el mecanisme molecular. En rosegadors, les TH augmenten el desacoblament mitocondrial en diversos teixits, incloent el múscul (Brand, 1994, Harper, 1994, Lombardi, 2002). En diversos estudis, s'ha associat l'administració de TH amb un augment en l'expressió d'*UCP3* a nivell d'mRNA i de proteïna al múscul esquelètic, i un augment en el desacoblament mitocondrial o la taxa metabòlica basal en rosegadors (Lanni, 1999, Jucker, 2000a, De Lange, 2001) i humans (Barbe, 2001, Lebon, 2001). Els experiments en cèl·lules musculars en cultiu (L6 de rata o cultius primaris humans) suggereixen que l'efecte de les TH sobre l'expressió del gen *UCP3* és directe (Nagase, 1999, Barbe, 2001).

L'estudi de la regulació del gen *UCP3* en humans és particularment complex donat que en mioblasts humans en cultiu l'expressió d'*UCP3* és molt baixa. Per això, nosaltres hem determinat els efectes de T₃ sobre el gen humà *UCP3* en uns ratolins transgènics que expressen un clon P1 humà que conté el gen *UCP3* (obtinguts en el laboratori del Dr. Lowell). En aquests animals, el gen *UCP3* humà manté la regulació específica de teixit pròpia de l'espècie, és a dir, s'expressa preferencialment al múscul esquelètic i no s'expressa pràcticament al TAM ni al cor, on els nivells de l'mRNA d'*UCP3* són importants en rosegadors (Vidal-Puig, 1997a). L'expressió

del gen humà *UCP3* en el ratolí transgènic es regula en resposta al dejuni, tal i com s'ha descrit anteriorment (Millet, 1997). En aquesta situació, l'expressió del gen humà *UCP3* en el ratolí transgènic augmenta de manera semblant a l'expressió del gen de ratolí al múscul esquelètic, degut a l'estimulació mitjançada pels NEFA.

L'administració aguda de T_3 en aquest ratolí transgènic activa l'expressió del gen humà *UCP3 in vivo*, d'acord amb els experiments anteriors realitzats en humans (Barbe, 2001). No obstant, aquesta estimulació per T_3 no és capaç d'augmentar els nivells d'mRNA d'*UCP3* de ratolí, suggerint que el gen humà *UCP3* és més sensible a l'estimulació dependent de T_3 , que el gen de ratolí.

5.2. L'ACTIVACIÓ DELS GENS *UCP3* HUMÀ I DE RATOLÍ PER LES HORMONES TIROÏDALS ESTÀ MITJANÇADA PELS RECEPTORS D'HORMONES TIROÏDALS I EL DR1 EN LA REGIÓ PROXIMAL DEL PROMOTOR. MYOD ÉS NECESSARI PER LA RESPOSTA DELS PROMOTORS A LES HORMONES TIROÏDALS.

Les TH poden induir la lipòlisi i l'oxidació d'àcids grassos (Freake, 1995) i l'hipertiroidisme augmenta els nivells de NEFA en sang (Pucci, 2000). La majoria de les situacions fisiològiques o patològiques en les que l'expressió d'*UCP3* està modificada al múscul esquelètic estan associades a canvis paral·lels en la disponibilitat d'àcids grassos al múscul. Els efectes de les TH sobre l'expressió d'*UCP3 in vivo* podrien ser deguts a l'acció dels àcids grassos mitjançant PPAR α o PPAR δ . A més a més, les TH indueixen factors de transcripció per l'expressió de gens mitocondrials, com els *nuclear respiratory factors*, que poden afectar l'expressió gènica d'*UCP3* (Rodríguez-Pena, 2002). No obstant, els nostres resultats estableixen que l'acció de les TH és directa i mitjançada per la unió de TR a la regió proximal del promotor del gen *UCP3* humà. Els estudis de transfecció transitòria dels promotors humà i de ratolí d'*UCP3* en cèl·lules L6E9 indiquen que l'efecte de T_3 està mitjançat per TR i que MyoD és necessari per la resposta dels promotors a l'hormona. La inducció de l'activitat del promotor d'*UCP3* de ratolí és inferior a la del promotor humà a qualsevol de les concentracions de T_3 utilitzades, indicant que el promotor humà d'*UCP3* és més sensible a les TH que el promotor de ratolí. Aquesta diferència en la sensibilitat a les TH no depèn del subtipus de TR (α, β) o de l'espècie de la que procedeix el TR (pollastre, humà o rata) emprat en la transfecció.

En la seqüència del promotor humà d'*UCP3* hi ha quatre possibles TRE (Acin, 1999). Entre -3358 i -3343 s'ha descrit un possible TRE, que difereix en una única base de la seqüència consens DR4 (Umesono, 1991). Però els nostres estudis amb diferents construccions del promotor humà d'*UCP3* (delecions i mutacions puntuals) en transfecció transitòria mostren que l'element DR1 en la regió proximal és el necessari per tal que les TH activin aquest

promotor. Les anàlisis d'EMSA *in vitro* i ChIP *in vivo* mostren la unió de complexos que contenen TR-RXR al DR1 entre -71 i -59. L'anàlisi computacional de la regió 5' no codificant del gen *UCP3* de ratolí (*Matinspector*) no indica la presència de seqüències consens similars a TRE, d'acord amb observacions anteriors (Yoshitomi, 1998b). No obstant, la seqüència proximal del promotor de ratolí és molt similar a la regió que conté el DR1 humà, i és la responsable d'unir TR i mitjançar els efectes de T_3 , tal i com indiquen els experiments d'EMSA i transfecció transitòria d'una construcció del promotor de ratolí d'*UCP3* mutada en el DR1. Els experiments d'EMSA comparant la capacitat d'unió dels complexos que contenen TR i RXR entre els elements DR1 humà i de ratolí indiquen que la menor sensibilitat a les TH del promotor de ratolí respecte el promotor humà està associada a una menor afinitat del TRE pels complexos TR-RXR.

L'element DR1 en el promotor humà d'*UCP3* coincideix amb l'element responsable per la resposta a PPAR i retinoides, indicant que aquest HRE es comporta com un element de resposta multihormonal. Aquests resultats suggereixen un *cross-talk* entre aquestes vies reguladores en el promotor d'*UCP3*, tal i com s'ha demostrat per altres gens (Chu, 1995, Hunter, 1996). Recentment s'ha demostrat que una única injecció de T_3 a rates dejunades pot induir encara més l'expressió de l'mRNA d'*UCP3* (Moreno, 2003), mentre que l'administració d'RA i àcids grassos no sembla produir un efecte sinèrgic (Felipe, 2003). La integració de la resposta a l'RA, als àcids grassos i a les TH a través dels receptors nuclears, en aquest element, suggereix una interacció complexa de mecanismes moleculars a nivell del DNA i de factors implicats en la transcripció.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. D'acord amb l'expressió del gen *UCP3* pràcticament de manera exclusiva en cèl·lules musculars en estat diferenciat, el factor de transcripció miogènic MyoD és necessari per l'activitat basal del promotor del gen *UCP3*. MyoD regula l'expressió del gen humà *UCP3* a través d'unes seqüències del DNA semblants a *Ebox* properes al lloc d'inici de la transcripció. L'estat d'acetilació de MyoD és important per l'activitat d'aquest factor de transcripció sobre el promotor del gen *UCP3*. MyoD també és necessari per la resposta transcripcional del gen *UCP3* humà a l'àcid retinoic, els àcids grassos i les hormones tiroïdals.
2. L'àcid retinoic activa l'expressió del gen *UCP3* en cèl·lules musculars diferenciades. La resposta del gen *UCP3* a l'àcid retinoic està mitjançada pels receptors d'àcid retinoic (RAR-RXR) i un element de resposta a hormones DR1 situat a la regió proximal del promotor.
3. Els receptors activats per proliferadors peroxisomals PPAR α o PPAR δ , però no PPAR γ , activen l'expressió del gen *UCP3* en resposta als àcids grassos, en cèl·lules musculars. L'element DR1 en la regió proximal del promotor d'*UCP3* uneix els PPAR i és necessari per tal que els PPAR activin la transcripció del gen. L'activitat acetilasa del coactivador p300 és important per l'activació dependent de lligand de PPAR sobre el promotor del gen *UCP3*. L'acetilació de les histones i de MyoD està implicada en l'activació del promotor.
4. L'estudi de ratolins *PPAR α -KO* indica que l'activació de l'expressió d'*UCP3* pels àcids grassos depèn de PPAR α en funció del teixit i de l'estadi del desenvolupament. Al cor, PPAR α és necessari per l'expressió correcta del gen *UCP3*, tant en adults alimentats, com en la resposta al dejuni, i en el període perinatal. Al múscul esquelètic, en l'etapa perinatal, PPAR α és necessari per l'activació d'*UCP3* deguda a l'alimentació mentre que en adults, PPAR α és prescindible per l'activació d'*UCP3* en el dejuni. L'estudi del promotor *UCP3* de ratolí indica una activació dual per PPAR α i PPAR δ que podria explicar fenòmens de redundància diferencials segons el teixit i l'estadi del desenvolupament.
5. Les hormones tiroïdals activen l'expressió del gen humà d'*UCP3* al múscul esquelètic *in vivo* i en cèl·lules musculars *in vitro*. Els receptors d'hormones tiroïdals (TR) mitjancen els efectes de les hormones tiroïdals sobre el promotor del gen *UCP3*. La regió proximal del promotor que conté l'element DR1 és necessària per tal que els TR units a l'hormona tiroïdal activin la transcripció del gen *UCP3*.

BIBLIOGRAFIA

Durant la realització d'aquesta tesi, la doctoranda ha dut a terme altres treballs per tal de completar resultats inicials obtinguts en el seu Màster Experimental en Bioquímica i que han donat lloc a les següents publicacions:

IMPAIRED EXPRESSION OF THE UNCOUPLING PROTEIN-3 GENE IN SKELETAL MUSCLE DURING LACTATION. FIBRATES AND TROGLITAZONE REVERSE LACTATION-INDUCED DOWNREGULATION OF THE UNCOUPLING PROTEIN-3 GENE.

Diabetes, 49: 1224-1230 (2000).

DIFFERENTIAL REGULATION OF THE EXPRESSION OF GENES ENCODING UNCOUPLING PROTEINS 2 AND 3 IN BROWN ADIPOSE TISSUE DURING LACTATION IN MICE.

Biochemical Journal, 355: 105-111 (2001).

