

DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE
LOS PROMOTORES HUMANOS SREBP1 Y SU
REGULADOR INSIG2.

ANA JULIA FERNÁNDEZ ÁLVAREZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 3 de juliol de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Ramón Bartrons Bach
- Dr. Domingo Baretino Fraile
- Dra. María José Martínez Díaz-Guerra
- Dra. Verónica Noé Mata
- Dr. Ramón Sendra Pérez

Va ser dirigida per:

Dra. Marta Casado Pinna

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Julia Fernández Álvarez

Dipòsit legal: V-4172-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7650-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS PROMOTORES HUMANOS SREBP1 Y SU REGULADOR INSIG2

Memoria presentada por Ana Julia Fernández-Alvarez
para optar al grado de Doctor en Bioquímica

Valencia, 2009



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Departamento
de Bioquímica
y Biología
Molecular



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Instituto de Biomedicina de Valencia



Instituto de Biomedicina de Valencia

D. **Marta Casado Pinna**, Doctora en Farmacia y Científica
Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA:

Que Dña. **Ana Julia Fernández-Alvarez**, licenciada en Bioquímica por la Universidad de Buenos Aires, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Caracterización estructural y funcional de los promotores humanos SREBP1 y su regulador INSIG2".

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora.

En Valencia, a 15 de mayo de 2009

Dra. Marta Casado Pinna

Para la realización de esta Tesis, la autora ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador (BES-2004-6151) del Ministerio de Educación y Ciencia.

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos "Papel de SREBP1c en estados de resistencia a insulina" (SAF2003-01262) y "Caracterización funcional de mutaciones en SREBP-1 asociadas a patologías metabólicas. Estudio del papel de SREBP-1 en ciclo celular y adipogénesis. (SAF2006-06760) del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

A mi madre y mi padre por enseñarme.
Y a mis tres M porque son mi felicidad.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Marta, mi directora, principalmente por darme un lugar en el laboratorio, por enseñarme y por permitir que hacer esta tesis haya sido para mi además de un trabajo una diversión. Pero sobre todo le agradezco que en estos años haya sido no solo mi jefa sino también mi amiga.

Agradezco también a mis compañeras del laboratorio, por su ayuda. A Carme, que compartió todos estos años conmigo y que fue mi guía, la voz de la experiencia. A Belén por escucharme. Y a Sole, que recién llegada, ya se convirtió en indispensable.

Agradezco sinceramente a mucha gente del IBV que en distintos momentos colaboraron conmigo y compartieron parte de este trabajo. A Ada por sus consejos, fundamental en mis comienzos. A los vecinos de UGM, los de hoy y los de ayer, que nos lo dan todo, incluso mas de lo que nos piden, y que son nuestra compañía. Agradezco también a toda la gente que alguna vez interrumpí por los pasillos con mis problemas, por haber intentado y muchas veces haber logrado encontrar una solución. Y doy también las gracias por los amigos que me regaló este lugar, que son pocos pero son de los buenos.

Un gracias enorme a toda mi familia porque me apoyaron desde el primer día que empecé con esta locura de viajar a tan lejos para hacer mi doctorado y porque los hicieron con todas sus fuerzas. Y porque siempre me acompañaron. Doy gracias también a mi familia valenciana por adoptarme y darme su cariño. Y por supuesto a los amigos, los de acá y los de allá porque forman parte de lo que soy.

Y a Manolo, mi compañero de todos los días, porque me aguanta, me quiere y me anima a seguir adelante.

Introducción	1
1 - El Metabolismo Energético y la Vía SREBP	2
1.1 - Familia de factores transcripcionales SREBP	4
1.2 - Procesamiento de SREBP	7
1.3 - Distribución tisular de SREBP	10
2 - Función de las proteínas SREBP	11
2.1 - Activación de la transcripción mediada por SREBP	12
2.2 - Función de las isoformas SREBP in vivo	15
3 - Regulación de SREBP	17
3.1 - Modificaciones postranscripcionales	17
3.2 - Regulación transcripcional de SREBP	19
3.3 - Promotores SREBP1a y 1c	22
4 - INSIG	25
4.1 - Función y regulación de INSIG	27
5 - La vía SREBP en la patología metabólica	29
5.1 - SREBP en diabetes y obesidad	29
5.2 - SREBP y el metabolismo lipídico	31
5.3 - Genética	32
5.4 - INSIG y la patología metabólica	33
Objetivos	35
Material y Métodos	37
1 - Reactivos comunes	38
2 - Plásmidos de expresión de luciferasa	38
2.1 - Promotor humano SREBP1a	38
2.2 - Promotor humano SREBP1c	41
2.3 - Promotor humano INSIG2	44
2.4 - Otros	47
3 - Vectores de expresión de otras proteínas	47
4 - Transformación de bacterias competentes y obtención de plásmidos	48
5 - Cultivos celulares	48
5.1 - Células HEK293T	48
5.2 - Células HepG2	48
5.3 - Hepatocitos de rata en cultivo primario	49
6 - Transfección y Ensayos de Luciferasa	50
6.1 - Células HEK293T	50
6.2 - Células HepG2	51
6.3 - Hepatocitos de rata en cultivo primario	51

7 – RT-PCR	52
8 – siRNA	53
9 – Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	54
<i>9.1 – Western blot</i>	<i>56</i>
10 – Ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	56
11 – Análisis estadístico de los datos	61
Resultados	62
1 – Promotor SREBP1a	63
<i>1.1 – Análisis funcional de la región 5´proximal del promotor humano SREBP1a</i>	<i>63</i>
<i>1.2 – Identificación de los activadores de SREBP1a</i>	<i>67</i>
<i>1.3 – Elementos superpuestos SP1/EGR1 regulan al promotor SREBP1a humano</i>	<i>68</i>
2 – Promotor SREBP1c	73
<i>2.1 – Promotor proximal y actividad basal</i>	<i>73</i>
<i>2.2 – Regulación por insulina</i>	<i>78</i>
<i>2.3 – Regulación por cAMP</i>	<i>80</i>
<i>2.4 – Interacción entre el metabolismo de colesterol y ácidos grasos</i>	<i>81</i>
<i>2.5 – Regulación mediada por PPARs</i>	<i>84</i>
<i>2.6 – Unión de los receptores nucleares in vitro</i>	<i>87</i>
<i>2.7 – Regulación in vivo</i>	<i>91</i>
3 – Promotor INSIG2	95
<i>3.1 – Identificación de las isoformas de INSIG2 en el genoma humano</i>	<i>95</i>
<i>3.2 – Expresión de las isoformas INSIG2</i>	<i>96</i>
<i>3.3 – Clonaje del promotor INSIG2</i>	<i>98</i>
<i>3.4 – Análisis funcional de la región promotora de INSIG2 humano</i>	<i>98</i>
<i>3.5 – Identificación de los elementos que actúan en cis</i>	<i>99</i>
<i>3.6 – Unión de los factores reguladores in vitro</i>	<i>103</i>
<i>3.7 – Regulación in vivo mediada por Ets</i>	<i>105</i>
Discusión	110
Conclusiones	128
Bibliografía	131

FIGURAS

Introducción

Figura 1: Esquema de las principales rutas metabólicas del hígado, tejido adiposo y músculo.	3
Figura 2: Esquema de la organización génica y estructura de las proteínas de la familia SREBP.	5
Figura 3: Estructura de los dominios que componen las proteínas SREBP1a y SREBP2 humanas.	6
Figura 4: Vía de procesamiento y activación de las proteínas SREBP en mamíferos.	7
Figura 5: Modelo de la activación proteolítica de SREBP mediada por las proteasas S1P y S2P.	9
Figura 6: Representación de los sitios responsables de la activación mediada por SREBP en sus genes diana.	13
Figura 7: Modelo de la interacción de cofactores con SREBP en la activación del promotor rLDL.	14
Figura 8: Activación selectiva de las vías metabólicas mediada por SREBP1 y 2.	17
Figura 9: Señales metabólicas que regulan la activación transcripcional de SREBP.	21
Figura 10: Estructura típica de un promotor eucariota activo.	23
Figura 11: Modelo de los elementos cis y trans de regulación de la actividad del promotor SREBP1c de rata.	24
Figura 12: Topología de la proteína INSIG2 humana.	26
Figura 13: Contribución de SREBP1c al desarrollo de patología metabólica.	30

Material y Métodos

Figura 14: Construcción de los vectores de expresión de luciferasa conteniendo el promotor SREBP1a humano.	39
Figura 15: Construcción de plásmido de expresión de luciferasa conteniendo el promotor SREBP1c humano.	42
Figura 16: Construcción de plásmido de expresión de luciferasa conteniendo el promotor INSIG2 humano.	44
Figura 17: Esquema representativo de un experimento de Inmunoprecipitación de cromatina.	57

Figura 18: Sonicado de cromatina extraída de hepatocitos de rata en cultivo primario.	58
Figura 19: Autenticación de los productos de amplificación de las PCR cuantitativas.	61
Resultados	
Figura 20: Expresión de las isoformas SREBP1a y 1c en líneas celulares humanas.	63
Figura 21: Análisis de la actividad transcripcional de la región promotora proximal de SREBP1a humano.	64
Figura 22: Alineamiento de las secuencias del promotor SREBP1a de rata, ratón y humano.	65
Figura 23: Análisis de construcciones mutantes para los diferentes sitios SP1.	66
Figura 24: Análisis de mutantes para sitios NFκB y NFY en el promotor humano.	66
Figura 25: El factor de transcripción SP1 se une al promotor proximal humano SREBP1a.	67
Figura 26: Unión de SP1/EGR1 a sitios superpuestos en el promotor hSREBP1a.	68
Figura 27: Competencia por los sitios de unión de SP1/EGR1 entre ambos factores de transcripción.	69
Figura 28: SP1 y EGR1 se unen al promotor hSREBP1a <i>in vivo</i> en células HEK293T.	70
Figura 29: La sobreexpresión de EGR1 inhibe al promotor SREBP1a.	71
Figura 30: Regulación recíproca del promotor SREBP1a mediada por SP1/EGR1.	72
Figura 31: Comparación de las secuencias del promotor SREBP1c de rata, ratón y humano.	74
Figura 32: Esquema de los promotores SREBP1c y su regulación.	75
Figura 33: Análisis de la actividad transcripcional de la región promotora de SREBP1c humano.	76
Figura 34: Análisis de la actividad transcripcional de mutantes puntuales de la región promotora de SREBP1c humano.	77
Figura 35: Activación mediada por insulina.	78
Figura 36: Sitios responsables de la activación mediada por insulina.	79

Figura 37: Sitios responsables de la inhibición mediada por cAMP.	80
Figura 38: Sitios responsables de la inhibición mediada por oxiesteroles.	82
Figura 39: Inhibición mediada por PUFAs.	83
Figura 40: Activación mediada por WY14643.	85
Figura 41: Activación mediada por receptores nucleares PPAR, LXR y RXR.	86
Figura 42: La activación mediada por sobreexpresión de receptores nucleares es independiente de la activación mediada por ligando exógeno.	87
Figura 43: Unión de receptores nucleares PPAR, LXR y RXR <i>in vitro</i> .	88
Figura 44: Regulación mediada por PPAR en el promotor rSREBP1c.	90
Figura 45: Unión de factores de transcripción al promotor SREBP1c <i>in vivo</i> .	91
Figura 46: Esquema para el análisis de la regulación del promotor y controles para la PCR cuantitativa.	92
Figura 47: Análisis cuantitativo de unión de las proteínas PolIII, SREBP y LXR al promotor rSREBP1c.	93
Figura 48: Análisis cuantitativo de la unión de PPAR y PGC1 al promotor rSREBP1c.	94
Figura 49: Comparación de las secuencias de los promotores INSIG2 de ratón y humano.	96
Figura 50: Expresión de las isoformas INSIG2 en distintas especies.	97
Figura 51: Expresión del promotor INSIG2b de ratón y humano.	98
Figura 52: Análisis de la actividad transcripcional de la región promotora proximal de INSIG2 humano.	99
Figura 53: Análisis de deleciones secuenciales del promotor proximal INSIG2.	100
Figura 54: Análisis de la actividad transcripcional de mutantes puntuales de la región promotora proximal de INSIG2 humano.	101
Figura 55: Análisis de la actividad transcripcional de dobles mutantes en la región promotora proximal de INSIG2 humano.	103
Figura 56: Las proteínas ELK1 y SAP1a se unen <i>in vitro</i> al sitio Ila del promotor INSIG2 humano.	104
Figura 57: Las proteínas ELK1 y SAP1a se unen <i>in vivo</i> al promotor INSIG2 humano.	106

Figura 58: La expresión de SAP1a regula la expresión de hINSIG2 y hSREBP1c.	107
Figura 59: El promotor hINSIG2 es activado por SAP1a y esta activación es dependiente de Ras.	109

TABLAS

Introducción

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los elementos de regulación SRE en distintos genes regulados por SREBP.	12
---	----

Material y Métodos

Tabla 2: Construcción de los plásmidos de expresión de luciferasa conteniendo deleciones seriadas del promotor SREBP1a humano.	40
Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida del promotor SREBP1a.	41
Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida del promotor SREBP1c.	43
Tabla 5: Construcción de los vectores de expresión de luciferasa conteniendo deleciones seriadas del promotor INSIG2 humano.	45
Tabla 6: Oligonucleótidos utilizados para las construcciones seriadas del promotor INSIG2b en vector de expresión de luciferasa.	45
Tabla 7: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida del promotor humano INSIG2.	46
Tabla 8: Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de isoformas de SREBP e INSIG.	53
Tabla 9: Oligonucleótidos utilizados para analizar el DNA purificado de los experimentos de ChIP.	59
Tabla 10: Oligonucleótidos utilizados para analizar el DNA purificado de los experimentos de ChIP.	60

Abreviaturas y Siglas

ACC: AcetilCoA Carboxilase

ADD1: Adipocyte Differentiation and Determination factor-1

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

bHLH-Zip: basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper

BMI: Body Mass Index

BSA: Bovine Serum Albumin

cAMP: cyclic 3'5'- Adenosin Monophosphate

cDNA: copy Desoxyribonucleic Acid

CoA: Coenzima A

CREB: cAMP Response Element Binding protein

dATP: deoxy-Adenosine Triphosphate

dCTP: deoxy-Cytosine Triphosphate

dGTP: deoxy-Guanosine Triphosphate

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfoxide

DNA: Desoxyribonucleic Acid

dNTPs: deoxyribonucleotide Triphosphate

DTT: Dithiothreitol

dTTP: deoxy-Timidine Triphosphate

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGR1: Early Growth Response-1

ELK1: Ets-Like protein-1

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

FAS: Fatty Acid Synthase

FPP: Farnesyl Pyrophosphate

GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

GK: Glucokinase

HEK293T: Human Embrionic Kidney 293 T-antigen cells

HeLa: Henrietta Lacks cervical cancer derived cells

HepG2: Human Hepatocelular carcinoma derived cells

HMG-CoA: 3-Hidroxy-3-Metylglutaryl CoA
HRP: Horseradish Peroxidase
IgG: Inmunoglobulina G
INSIG: Insulin Induced Gene
IRS2: Insulin Receptor Substrate -2
LXR: Liver X Receptor
MAPK: Mytogen Activated Protein Kinase
Max: Myc Associated Factor X
mRNA: messenger Rybonucleic Acid
NFY: Nuclear Factor Y
nSREBP: nuclear SREBP
ORF: Open Reading Frame
PCR: Polymerase Chain Reaction
PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PVDF: Polyvinylidene Fluoride
RE: Retículo Endoplásmico
rLDL: Low-Density Lipoprotein receptor
RNA: Ribonucleic Acid
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RXR: Retinoid X Receptor
S1P: Site 1 Protease
S2P: Site 2 Protease
SCAP: SREBP Cleavage Activation Protein
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate
siRNA: short interference RNA
SP1: Specificity Protein 1
SRE: Sterol Regulatory Element
SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein
SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier
TBE: Tris Boric EDTA Buffer
USF: Upstream Stimulatory Factor-1

Introducción

1 - El Metabolismo Energético y la Vía SREBP

Los organismos, especialmente los mamíferos, deben coordinar diversos procesos metabólicos para satisfacer sus demandas energéticas. La integración de las vías metabólicas específicas de cada tejido junto con los distintos mecanismos reguladores, generalmente mediados por hormonas, aseguran el aporte de nutrientes requerido por cada uno de los tejidos en todo momento, incluso durante el ayuno. El hígado es el principal órgano encargado del metabolismo ya que regula la concentración en sangre de la mayoría de los metabolitos, especialmente la glucosa. En los períodos de déficit calórico la principal fuente de energía proviene del metabolismo lipídico (Murray, 1988).

Los lípidos están formados por tres clases de moléculas en los organismos multicelulares: 1) los ácidos grasos, que son fuente de energía, principalmente almacenados en forma de triglicéridos en el tejido adiposo; 2) los fosfolípidos y el colesterol, que son los componentes fundamentales de la membrana celular; y 3) pequeñas moléculas bioactivas derivadas de lípidos como son las hormonas esteroideas, vitaminas y ácidos biliares (Desvergne et al., 2006). Los requerimientos de lípidos de un organismo se abastecen mediante la dieta y la síntesis endógena (lipogénesis) cuya distribución tisular varía ampliamente entre especies. En humanos, por ejemplo, la síntesis de novo ocurre principalmente a nivel hepático mientras que en rata se observa una participación similar de hígado y tejido adiposo (Vernon et al., 1999).

Los triacilglicerolos están formados por ácidos grasos que tras ser activados por conjugación con acetil-CoA son esterificados con glicerol-3-fosfato. Cuando disminuye el aporte de glicerol-3-fosfato, es decir cuando disminuye la glucosa de la que deriva, los adipocitos hidrolizan los triacilglicéridos y los ácidos grasos se liberan al torrente sanguíneo. De esta forma, los niveles de absorción de glucosa por los adipocitos, que están regulados por la insulina así como también por la disponibilidad de glucosa, son los que controlan la formación y liberación de triacilglicéridos en este tejido (**Figura 1**).

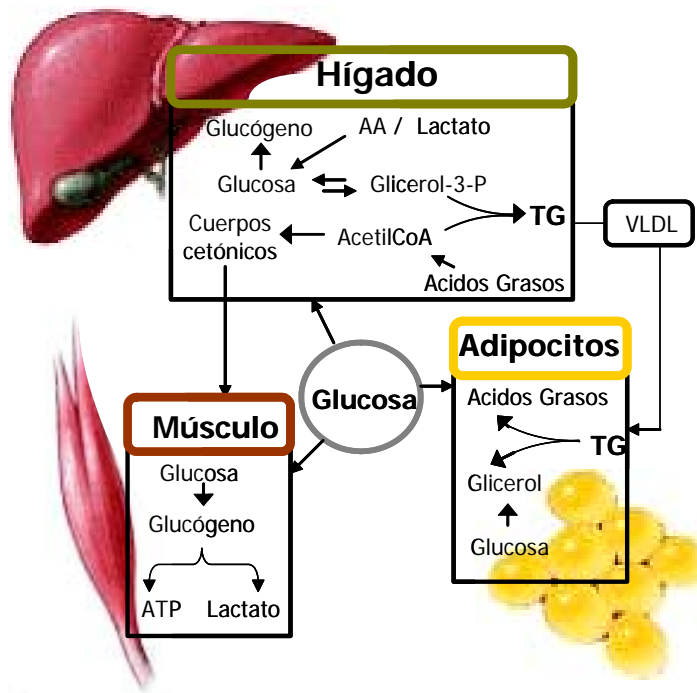


Figura 1: Esquema de las principales rutas metabólicas del hígado, tejido adiposo y músculo.

Los ácidos grasos también son objeto de distintas rutas metabólicas en el hígado. Cuando se presenta una gran demanda de combustible, los ácidos grasos se degradan a acetil-CoA (β -oxidación) y luego a cuerpos cetónicos para distribuirlos por la sangre a los tejidos periféricos. Cuando disminuyen las demandas metabólicas, los ácidos grasos son en cambio utilizados para sintetizar triacilgliceroles que se secretan en forma de VLDL para ser absorbidos en el tejido adiposo o ser incorporados como fosfolípidos (Figura 1).

El acetil-CoA formado en los tejidos por β -oxidación de los ácidos grasos tiene varios destinos pudiendo ser oxidado completamente en la vía del ácido cítrico o ser utilizado para la síntesis de colesterol y sus esteroides derivados. El colesterol es un

componente estructural esencial de la membrana plasmática de las células eucariotas y determina las características biofísicas de la bicapa de la superficie celular. El control de la homeostasis de colesterol es particularmente importante ya que cuando se encuentra en exceso forma cristales sólidos que matan a la célula. El exceso de colesterol en el torrente sanguíneo es también perjudicial ya que se deposita en las arterias iniciando el proceso de aterosclerosis.

La homeostasis lipídica está regulada por factores de transcripción llamados **Proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides** ó **SREBP** (sterol regulatory element binding protein). Las proteínas SREBP activan a nivel transcripcional la cascada enzimática de la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos (Brown and Goldstein, 1997; Horton et al., 2002). Así, las proteínas SREBP son consideradas reguladores fundamentales de la colesterogénesis y la lipogénesis. Además estos factores tienen una función fundamental en la regulación de la diferenciación adipocitaria y en la expresión génica dependiente de insulina (Shimomura et al., 1999b; Foretz et al., 1999).

1.1 - Familia de factores transcripcionales SREBP

Las proteínas SREBP fueron descritas por primera vez en el año 1993 por el grupo de J. L. Goldstein y M. S. Brown en un estudio sobre la regulación del promotor del gen del receptor de las LDL (rLDL) (Briggs et al., 1993; Wang et al., 1993). Simultáneamente el grupo de B. M. Spiegelman identificaba a SREBP como un factor determinante en la diferenciación adipocitaria en rata al que denominó ADD1 (adipocyte differentiation and determination factor-1) (Tontonoz et al., 1993). En los años posteriores se describió que la regulación de la HMG-CoA reductasa y otras enzimas involucradas en distintos pasos de la biosíntesis del colesterol eran dependientes de las proteínas SREBP (Vallett et al., 1996; Jackson et al., 1996). Finalmente, se describió el control transcripcional que ejercían estas proteínas en las enzimas de la vía biosintética de los ácidos grasos, como por ejemplo la ácido graso sintasa (FAS) (Bennett et al., 1995). Esto demostró que la familia SREBP tenía una función central en la coordinación de la regulación de la síntesis de todos los compuestos

lipídicos que forman las membranas biológicas, es decir ácidos grasos y colesterol (Eberle et al., 2004b; Weber et al., 2004).

Existen tres miembros de la familia SREBP (**Figura 2**). Las variantes SREBP1a y SREBP1c, presentes al menos en hamster, ratón y humano, son producidas por *splicing* alternativo a partir de un único gen (localizado en humanos en el cromosoma 17p11.2). SREBP2 es codificada por un gen diferente en posición 22q13. Las variantes SREBP1a y 1c difieren en su primer exón y en humanos también en los 2 últimos, que corresponden a los exones 18 y 19. El resto de exones son comunes a ambas isoformas. El *splicing* en posición 3' no está presente en el gen de ratón. Existe aproximadamente un 50% de identidad de secuencia entre las proteínas SREBP1 y 2 (Brown and Goldstein, 1997).

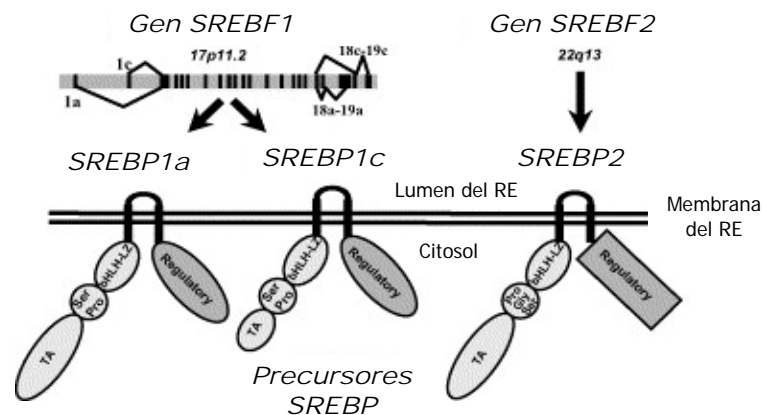


Figura 2: Esquema de la organización génica y estructura de las proteínas de la familia SREBP (Adaptado de Eberle et al., 2004b).

Las proteínas SREBP pertenecen a la gran familia de los factores de transcripción del tipo básico hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina (bHLH-Zip). Son sintetizados como precursores inactivos unidos a la membrana del retículo endoplásmico (RE), gracias a la presencia de 2 dominios transmembrana. Todas las proteínas SREBP precursoras, de unos 125 kDa de peso molecular y aproximadamente 1150 aminoácidos, comparten la misma estructura

con 3 dominios fundamentales (**Figura 3**). El primero, un dominio amino terminal de unos 480 residuos, contiene el dominio bHLH-Zip y una región acídica en el extremo más amino terminal. El dominio bHLH-Zip consiste en una región básica que le otorga la capacidad de unión al DNA y otra región que le confiere la capacidad de dimerización. El dominio acídico, por su parte, es esencial para la función transcripcional, ya que cuando se elimina, el dominio bHLH-Zip aislado mantiene su capacidad de unión al DNA pero pierde la capacidad de actuar como factor de transcripción (Shimano et al., 1997a). SREBP1a y 2 tienen aproximadamente 40 aminoácidos en el dominio acídico que son capaces de interactuar con distintos coactivadores, lo que es necesario para ejercer su máxima actividad transcripcional. Este dominio es más corto en SREBP1c (24 aa) convirtiendo a esta proteína en un activador más débil.

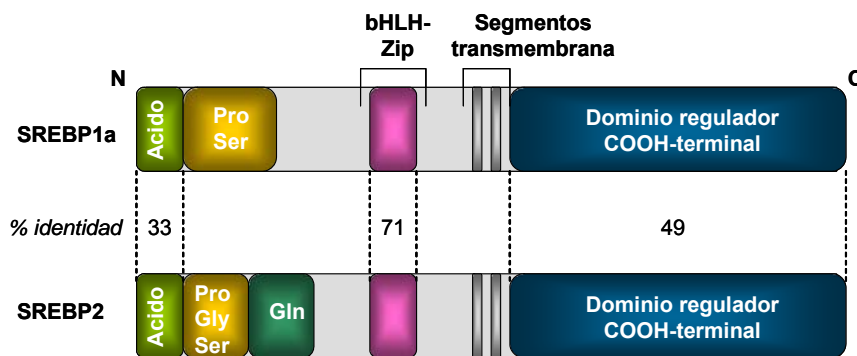


Figura 3: Estructura de los dominios que componen las proteínas SREBP1a y SREBP2 humanas (Adaptado de Brown and Goldstein, 1997).

El resto de la proteína SREBP no presenta homología con la familia de proteínas con dominio bHLH-Zip. Está compuesta por un dominio de aproximadamente 80 aminoácidos formado por dos dominios transmembrana separados por un loop hidrofóbico y una región reguladora carboxilo terminal de unos 590 residuos que controla su procesamiento para dar origen a la proteína madura también llamada SREBP nuclear (nSREBP).

1.2 - Procesamiento de SREBP

Las proteínas SREBP adquieren actividad transcripcional sólo cuando son transferidas desde el RE al complejo de Golgi donde ocurre la digestión proteolítica y su extremo amino terminal es liberado de la membrana. Los precursores inactivos permanecen unidos a la membrana del RE formando un complejo con la proteína SCAP (SREBP Cleavage activation protein), que acompañará a SREBP hasta el complejo de Golgi para su activación, sólo en presencia de bajos niveles de esteroides (Sakai et al., 1997).

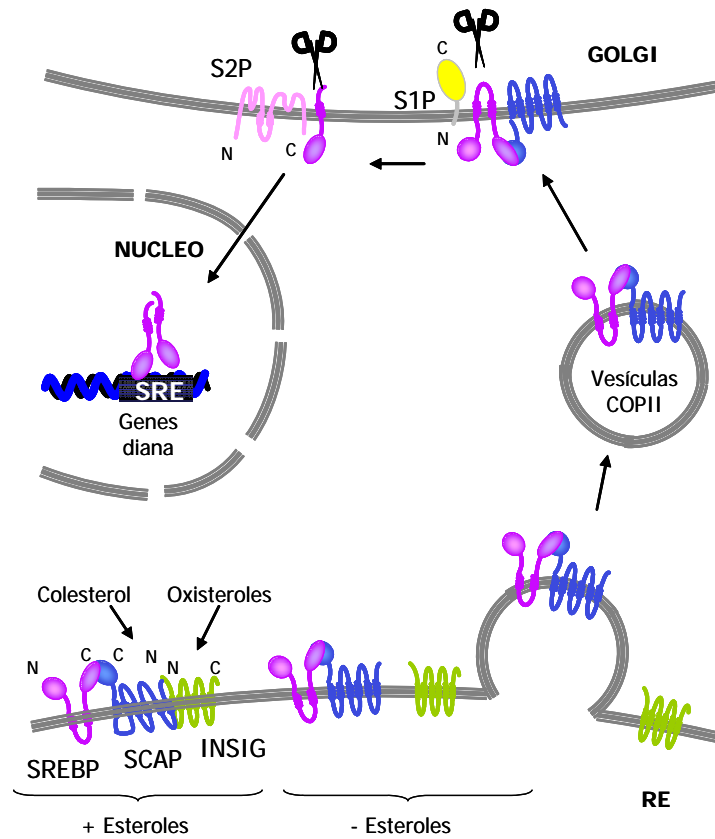


Figura 4: Vía de procesamiento y activación de las proteínas SREBP en mamíferos (Adaptado de Espenshade and Hughes, 2007).

En condiciones de altos niveles de esteroides, el complejo SREBP/SCAP permanece anclado en el RE aislado del complejo de Golgi donde se encuentran localizadas las proteasas encargadas de la activación de SREBP: la proteasa S1P (Site-1 protease) y la proteasa S2P (Site-2 protease) (DeBose-Boyd et al., 1999; Nohturfft et al., 2000). La retención del complejo SREBP/SCAP en el RE es a su vez mediada por la unión, también dependiente de esteroides, a la proteína INSIG (Insulin induced gene), que reside en el RE. SCAP funciona en este sistema como un sensor de colesterol; cuando hay suficiente colesterol en la célula la proteína SCAP se une al colesterol lo que promueve su unión a INSIG evitando su salida del RE. Cuando los niveles de esteroides disminuyen, SCAP se libera de INSIG permitiendo que el complejo SREBP/SCAP salga del RE formando parte de las vesículas llamadas COPII (Espenshade and Hughes, 2007; **Figura 4**).

La proteína SREBP precursora asociada a membrana permanece en el RE formando lo que se ha denominado estructura en bucle. La porción amino terminal de la molécula conteniendo el dominio bHLH-Zip y el dominio regulador carboxilo terminal protruyen al citosol. Una vez en el complejo de Golgi las proteasas S1P y S2P actúan secuencialmente para liberar la proteína SREBP madura (**Figura 4**). La liberación de la membrana mediada por la cascada proteolítica es iniciada por la proteasa que corta en el sitio 1 (S1P), que se encuentra aproximadamente en medio del bucle luminal y separa a la proteína en 2 mitades. Esta proteasa corta entre una leucina y una serina pertenecientes a la secuencia RSVLS. Este corte es absolutamente dependiente de un residuo con carga positiva, que puede ser arginina o lisina, en la posición 1 de esta secuencia. De esta forma se rompe la unión entre los 2 dominios transmembrana, aunque ambas mitades de la proteína permanecen aún ancladas a la membrana (Brown and Goldstein, 1997; **Figura 5**).

Después de la acción de la proteasa S1P una segunda proteasa intramembrana S2P corta en el sitio 2 que se localiza dentro del primer dominio transmembrana. De esta forma se libera el dominio amino terminal al citosol permitiendo que entre rápidamente al núcleo, aparentemente con una porción del dominio transmembrana aún adherido al extremo carboxilo terminal. El corte

en el sitio 2 es fuertemente dependiente de la presencia del tetrapéptido DRSR que precede al primer dominio transmembrana (Figura 5). Una vez que la proteína madura SREBP entra al núcleo se une a las secuencias SRE (*sterol regulatory element*), y con la ayuda de los coactivadores transcripcionales activa, entre otros, los genes necesarios para la síntesis de colesterol. Tras la liberación de SREBP parece ser que SCAP se recicla desde el aparato de Golgi nuevamente al RE para participar en una nueva activación de SREBP.

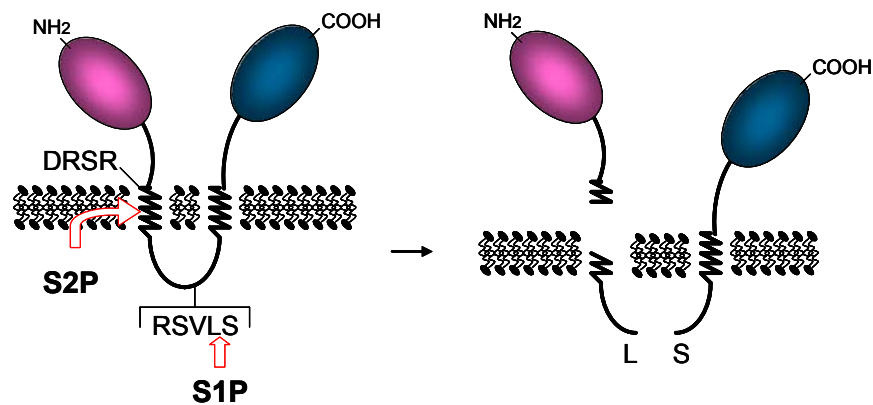


Figura 5: Modelo de la activación proteolítica de SREBP mediada por las proteasas S1P y S2P (Adaptado de Brown and Goldstein, 1997).

A diferencia de lo que ocurre con SCAP, la actividad de las proteasas S1P y S2P no está regulada por esteroides. En cambio, la proteólisis de SREBP está regulada por la separación compartimental entre las proteasas y SREBP. La proteína nSREBP liberada tras la acción de las proteasas es transportada al núcleo como un dímero por la importina- β a través de interacciones con su dominio hélice-bucle-hélice. Aunque la activación proteolítica es idéntica para todas las proteínas SREBP, parece que la regulación mediada por esteroides del complejo SCAP/INSIG es exclusiva de las proteínas SREBP1a y 2. La activación proteolítica de la proteína SREBP1c ocurre en cambio en condiciones de ayuno seguido de realimentación. El procesamiento de SREBP en hepatocitos de rata se estimula en presencia de insulina

y se inhibe por acción del cAMP (Hegarty et al., 2005; Yellaturu et al., 2005). Sin embargo no existen evidencias claras del mecanismo por el cual la insulina podría regular la estabilidad de la unión del complejo SCAP/INSIG.

1.3 - Distribución tisular de SREBP

La expresión tisular de las distintas isoformas de SREBP1 varía tanto en cantidad como en relación entre ellas. En hígado y tejido adiposo el mRNA de SREBP1c es respectivamente 9 y 3 veces más abundante que SREBP1a, mientras que en el bazo SREBP1a es 10 veces más abundante (Shimomura et al., 1997). El hecho de si esta diferencia en la relación de expresión se refleja también en variaciones en la cantidad de cada proteína es algo que aún no ha sido determinado. Al contrario de lo que ocurre en los sistemas *in vivo*, en todas las líneas celulares examinadas SREBP1a se expresa a niveles más altos que la variante 1c. SREBP2, al igual que SREBP1, se expresa en gran cantidad de tejidos adultos y fetales, así como también en diversos cultivos celulares (Hua et al., 1993). En líneas celulares adipocitarias como las células 3T3-L1, los niveles de mRNA de SREBP2 sobrepasan 10 veces los niveles de SREBP1a mientras que SREBP1c está prácticamente ausente. Por el contrario, en el tejido adiposo de ratón y humano SREBP2 está muy poco expresada mientras que SREBP1c es la forma predominante (Shimomura et al., 1997).

La razón por la que los distintos tejidos expresan cantidades variables de cada una de las isoformas es algo que aún no está del todo claro. Se ha propuesto que SREBP1a, una proteína transcripcionalmente más potente, tiene una expresión preferente cuando hay una alta demanda de colesterol y ácidos grasos, por ejemplo cuando se requiere nueva síntesis de membrana en períodos de división celular acelerada. Los niveles de mRNA de SREBP1c son mayores en hígado y adipocitos adultos, lo que sugiere que esta isoforma es la proteína encargada de los procesos SREBP1 dependientes en estos tejidos. Considerando todos los datos disponibles sobre la expresión de las distintas isoformas queda claro que los promotores y *enhancers* que controlan la transcripción de los

genes que codifican SREBP1a, 1c y 2 deben estar controlados independientemente por elementos reguladores que responden a factores órgano específicos así como a cambios en el metabolismo celular.

2 – Función de las proteínas SREBP

Una vez ocurre la cascada proteolítica, la proteína activa SREBP entra al núcleo donde se une a secuencias específicas del DNA de sus genes diana activando su transcripción. Como miembros de la familia de factores de transcripción bHLH-Zip, las proteínas SREBP forman dímeros que reconocen, a través de su región amino terminal, a la repetición invertida 5'-CAMMTG-3' denominada Caja E (E-box). Las subfamilias del grupo bHLH se pueden clasificar de acuerdo a su preferencia por bases específicas en la posición media del sitio E-box. Las proteínas SREBP pertenecen a la misma familia que Myc/Max y USF con preferencia por la secuencia 5'-CACTGT-3'. Pero estos factores se distinguen además porque no sólo son capaces de unirse a esta repetición invertida sino que también se unen a la repetición directa llamada SRE y secuencias similares. Esta flexibilidad se debe a un único residuo de tirosina en el dominio básico de SREBP que corresponde a una arginina en el resto de proteínas de la familia bHLH capaces de unirse únicamente a sitios E-box (Kim et al., 1995; Parraga et al., 1998).

Todos los genes que son activados por las proteínas SREBP descritos hasta la fecha contienen un sitio SRE en su promotor proximal (**Tabla 1**), mientras que sólo algunos presentan sitios de unión E-box. La función de los sitios E-box en la transcripción dependiente de SREBP no está del todo clara. La secuencia nucleotídica del sitio SRE presenta gran variedad entre los distintos promotores, aunque se ha descrito una secuencia consenso 5'-nTCACnCCACn-3'. De acuerdo a la secuencia SRE los promotores que responden a SREBP se dividen en dos grupos. Los del primer grupo, que incluye a rLDL, contienen un sitio SRE clásico (ATCACCCAC) o un sitio modificado llamado SRE3 (CTCACACGCG) (Amemiya-Kudo et al., 2002). El segundo grupo lo forman promotores como el de la ATP-citrato liasa en donde los sitios de unión son de secuencia más

diversa con respecto a la secuencia consenso y por eso se los denomina SRE-like.

Gen	Secuencia SRE
<i>Uptake/síntesis colesterol</i>	
Receptor LDL	ATCACCCAC
HMG-CoA sintasa	CTCACCCAC
	GCCACCCTAC
HMG-CoA reductasa	ACCGCACCAT
	CTCTCACCAC
FPP sintasa	CTCACACGAG
Escualeno sintasa	ATCACGCCAG
	CGATGCTGAG
SREBP2	ATCACCCAC
<i>Síntesis de Ácidos Grasos</i>	
Acetil-CoA carboxilasa	GGAGGACCAT
	CTCACGTCGC
Ácido Graso sintasa	ATCACCCAC
Estearoil-CoA desaturasa 1	AGCAGATTGCG
Estearoil-CoA desaturasa 2	AGCAGATTGTG
Glicerol-3-fosfato aciltransferasa	CTCAGCCTAG
<i>Otros</i>	
ATP-citrato liasa	TCAGGCTAG

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los elementos de regulación SRE en distintos genes regulados por SREBP (Adaptada de Edwards et al., 2000).

2.1 - Activación de la transcripción mediada por SREBP

Las proteínas SREBPs son por si mismas activadores débiles de la transcripción por lo que necesitan actuar coordinadamente con otros factores de transcripción para producir una actividad máxima de los genes diana. En los promotores que han sido estudiados, los factores SREBP funcionan sinérgicamente en los sitios SRE junto con factores ubicuos como son SP1, NFY y CREB (cAMP response element binding protein). La identidad del factor asociado así como la posición del sitio de unión con respecto al o los sitios de unión de SREBP es diferente en cada promotor. El promotor de la FPP sintasa presenta actividad máxima cuando NFY interactúa directamente con SREBP (Ericsson et al., 1996; Jackson et al., 1998) mientras que el

promotor de HMG-CoA sintasa requiere además la presencia de la proteína CREB (Dooley et al., 1999). Por otro lado la activación de la HMG-CoA reductasa y el receptor de LDL es dependiente de SP1 y CREB (Bennett and Osborne, 2000). En el caso del promotor FAS la regulación parece estar mediada por la acción de SP1 y NFY con sitios de unión adyacentes al sitio SRE (Xiong et al., 2000; **Figura 6**).

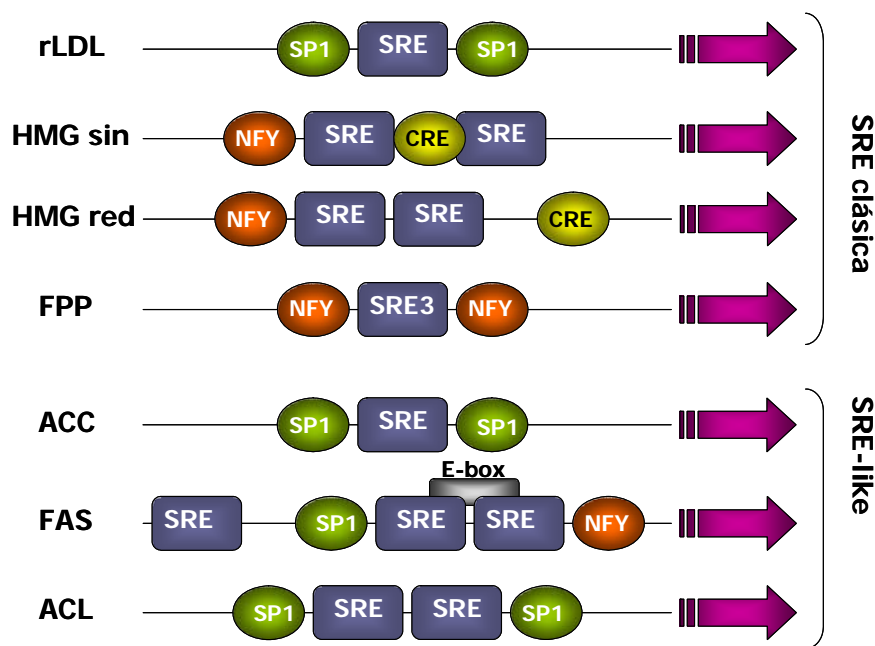


Figura 6: Representación de los sitios responsables de la activación mediada por SREBP en sus genes diana.

Una vez se ha formado un complejo estable en la región promotora, otras proteínas tales como CBP (CREB binding protein), ARC (activated recruited factor), DIC (Vitamin D receptor interacting protein) o TBP (TATA-box binding protein) serán reclutados al complejo de inicio de la transcripción (Naar et al., 1998; Weber et al., 2004). La acetilación de histonas también es un requisito necesario para la activación completa de los genes diana. La activación de SREBP resulta en un aumento de los niveles de acetilación

específicamente en la histona H3. Estos complejos han sido demostrados utilizando SREBP1a y SREBP2 pero no con SREBP1c lo que puede ser consecuencia de la activación más débil de este último.

Algunos estudios han demostrado también la interacción de las proteínas SREBP con diversos coactivadores. CBP y p300 interaccionan con el dominio de activación de las proteínas SREBP aumentando su actividad transcripcional. Estudios más recientes han identificado nuevas proteínas capaces de coactivar la transcripción dependiente de SREBP. PGC1 β , un coactivador que actúa entre otros sobre la actividad de algunos receptores nucleares, es también coactivador de SREBP1c (Lin et al., 2005b). Los dominios de activación de SREBP1a, SREBP1c y SREBP2 interactúan con las subunidades ARC105/MED15 del "Mediator activator complex" y esta interacción parece ser importante para la actividad transcripcional de SREBP como ocurre en la activación del promotor rLDL (Yang et al., 2006; **Figura 7**).

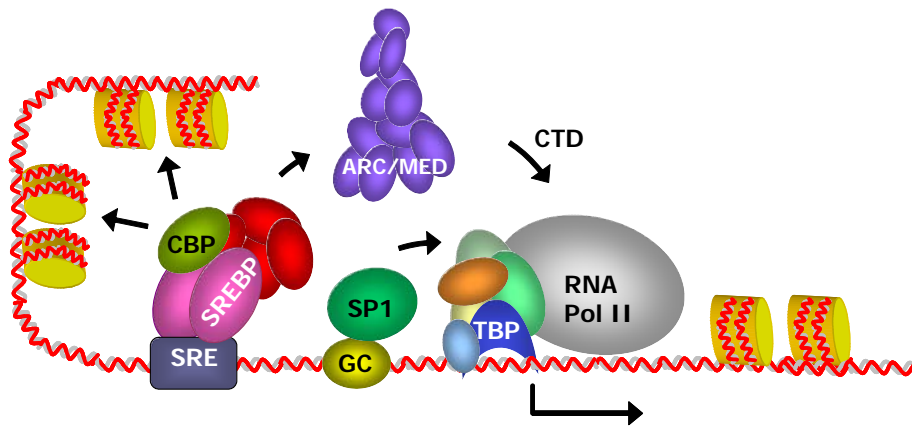


Figura 7: Modelo de la interacción de cofactores con SREBP en la activación del promotor rLDL (Adaptado de Naar et al., 1998 y Yang et al., 2006).

Queda aún por determinar si todos los coactivadores son reclutados simultáneamente o si existen coactivadores específicos que actúan en cada uno de los genes diana de SREBP (Bengoechea-

Alonso and Ericsson, 2007). El uso común de la proteína SREBP sugiere un mecanismo para la coordinación de la regulación de los distintos promotores. Sin embargo, las diferencias en los cofactores y en la arquitectura de cada uno de los promotores que responden a SREBP permiten una regulación específica de cada promotor. Así la célula es capaz de integrar distintas vías mediadas por cada uno de los nutrientes que regulan la homeostasis lipídica.

2.2 – Función de las isoformas SREBP in vivo

El uso de animales transgénicos, especialmente a nivel hepático, ha sido de fundamental ayuda para estudiar las funciones particulares de cada una de las variantes de SREBP. La sobreexpresión hepática en ratones de la proteína nSREBP1a altera profundamente la síntesis lipídica (Shimano et al., 1996). En estos animales se observa un aumento de la expresión de genes involucrados en la síntesis de colesterol, como por ejemplo la HMG-CoA sintasa, la HMG-CoA reductasa y la escualeno sintasa, a la vez que activa genes responsables de la síntesis de ácidos grasos como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS). De esta forma la sobreexpresión hepática de la isoforma 1a produce un acúmulo tanto de colesterol como de triglicéridos, por lo que se dice que SREBP1a actúa en ambas vías al menos a nivel hepático.

En el caso de ratones que sobreexpresan la forma SREBP1c en hígado, se ha demostrado una inducción selectiva de los genes lipogénicos sin efecto sobre los genes relacionados con la síntesis de colesterol. Pero estos ratones mantienen elevados los niveles de mRNA de las enzimas colesterogénicas así como de FAS y rLDL en condiciones de ayuno, donde normalmente se observa una disminución de la abundancia de la proteína SREBP y de la expresión de sus genes diana (Horton et al., 1998a). Esto sugiere que SREBP1c, a pesar de ser un muy débil activador de la transcripción, es capaz de mantener niveles basales tanto de las enzimas de la vía de los ácidos grasos como del colesterol. En hepatocitos aislados se ha demostrado que la isoforma SREBP1c es necesaria no sólo para la inducción de los genes lipogénicos sino también para la inducción de la glucoquinasa (GK), que es fundamental en la utilización de la

glucosa en el hígado y está regulada a nivel transcripcional por la insulina (Foretz et al., 1999).

En los experimentos de sobreexpresión de la isoforma SREBP2 se produce una activación preferencial de los genes relacionados con la biosíntesis del colesterol, produciendo sólo una leve activación de los genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (Horton et al., 1998b).

La sobreexpresión de cada una de las isoformas de SREBP1 en adipocitos dio unos resultados inesperados. La isoforma 1c en exceso inhibe la diferenciación adipocitaria provocando un cuadro similar a la lipodistrofia humana a la vez que desarrollan resistencia a la insulina, mientras que la sobreexpresión adipocitaria de la isoforma 1a resulta en una hipertrofia de células totalmente diferenciadas acompañada de una débil esteatosis hepática (Shimomura et al., 1998; Horton et al., 2003). Parece ser que las dos isoformas SREBP1a y 1c tiene funciones distintas en los adipocitos *in vivo*.

El fenotipo de los animales *knock-out* para el gen *Srebp1*, que codifica las isoformas SREBP1a y 1c, también sugiere una función hepática diferencial entre SREBP1 y SREBP2 (Shimano et al., 1997b). La mayoría de los ratones *knock-out* homocigotos para SREBP1 mueren *in útero*. Los animales SREBP1^{-/-} que sobreviven muestran una síntesis reducida de ácidos grasos, debida a una expresión disminuida de los mRNAs de las enzimas responsables de su síntesis. Los niveles hepáticos de nSREBP2 aumentan en estos ratones, probablemente por compensación por la pérdida de nSREBP1. Como resultado se presenta un aumento de la transcripción de los genes de la biosíntesis de colesterol, que en el caso del hígado es de 3 veces.

Como se puede inferir a partir de todos estos datos, las 3 proteínas SREBP no activan exactamente a los mismos genes. En forma general se dice que *in vivo*, y considerando que la expresión de SREBP1a es despreciable en la mayoría de tejidos, SREBP1c actúa preferentemente sobre el metabolismo y la síntesis de ácidos grasos mientras que SREBP2 actúa a nivel de la homeostasis del colesterol (Figura 8).

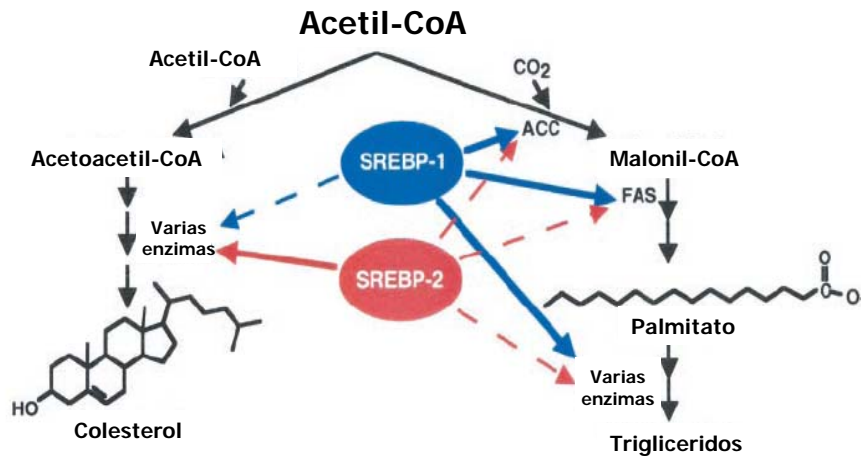


Figura 8: Activación selectiva de las vías metabólicas mediada por SREBP1 y 2 (Adaptado de Osborne, 2000).

3 – Regulación de SREBP

La expresión y activación de las proteínas SREBP se encuentra estrictamente regulada a varios niveles. El procesamiento proteolítico descrito en el apartado 1.2 es quizás el evento regulador más característico y también el más estudiado. Además existe un control a nivel de la estabilidad del RNA mensajero, importantes modificaciones postranscripcionales, así como también una estricta regulación a nivel transcripcional. La expresión de la proteína SREBP1a es aparentemente constitutiva mientras que la expresión de SREBP1c y SREBP2 varía en función de diversas condiciones, como por ejemplo en situaciones de ayuno/realimentación. Así, la expresión de SREBP1c, disminuye durante el ayuno con un marcado incremento tras la realimentación con una dieta rica en carbohidratos.

3.1 – Modificaciones postranscripcionales

Dentro del núcleo, la actividad transcripcional de la proteína SREBP madura está regulada por varias modificaciones

postranscripcionales que incluyen fosforilación, acetilación, sumoilación y ubiquitinación. La primera evidencia de una modificación postranscripcional de SREBP se describió en un estudio realizado por Kim y colaboradores, donde mostraban que la insulina aumentaba la actividad transcripcional de la proteína nSREBP1c sobreexpresada en células Rat1-IR (Kim et al., 1998). Estudios posteriores demostraron que la insulina estimulaba la actividad transcripcional de todas las proteínas SREBP a través de la vía de las MAPK (Kotzka et al., 1998). El residuo Ser 115 es el principal sitio de fosforilación de SREBP1a y las Ser-432 y Ser-455 son los diana de fosforilación de SREBP2 (Kotzka et al., 2004). Estas modificaciones no alteran la capacidad de unión al DNA pero aumentan su capacidad transcripcional. El papel de la MAPK en la fosforilación de SREBP1c está aún en discusión ya que se han observado resultados contradictorios. Aunque la serina diana de esta fosforilación está presente en SREBP1c, el uso de inhibidores de la vía de las MAPK en hepatocitos en cultivo no antagoniza los efectos de la insulina sobre los genes diana de SREBP1c (Eberle et al., 2004b).

También se ha demostrado que en el núcleo las proteínas nSREBPs son modificadas por ubiquitinación y rápidamente degradadas por el proteasoma 26S (Hirano et al., 2001). Posteriormente se demostró que la estabilidad de las proteínas SREBP es dependiente de su actividad transcripcional (Sundqvist and Ericsson, 2003). Tanto el dominio de transactivación como el de unión al DNA son necesarios para la degradación de la proteína, y la interacción con coactivadores aumenta su degradación a la vez que aumenta su actividad transcripcional. En presencia de inhibidores del proteasoma se aumenta la estabilidad de las proteínas nucleares y se estimula la actividad de los genes diana.

SREBP1 y SREBP2 son también modificadas por SUMO1 (small ubiquitin-ligated modifier) (Hirano et al., 2003). Los residuos de lisina que son objeto de modificación por sumoilación son distintos de los sitios principales de ubiquitinación. Esta sumoilación por lo tanto no afecta a la ubiquitinación, con lo cual no afecta a la estabilidad de las proteínas pero reprime su actividad transcripcional. La independencia de estos dos procesos implica que la inactivación de SREBP está doblemente regulada por ubiquitinación y sumoilación,

con lo que ambos procesos serán necesarios para un control eficiente de la expresión de los genes que responden a SREBP y la homeostasis del metabolismo lipídico. También se ha demostrado que las proteínas SREBP son acetiladas en residuos de lisina mediante la actividad acetiltransferasa de p300 y CBP y que la acetilación inhibe el proceso de ubiquitinación (Giandomenico et al., 2003).

3.2 – Regulación transcripcional de SREBP

La regulación transcripcional de las proteínas SREBP es especialmente compleja. SREBP1c y SREBP2 son sujeto de distintas formas de regulación transcripcional, mientras que SREBP1a parece estar constitutivamente expresada a bajos niveles en el hígado y en la mayoría de los demás tejidos. Un mecanismo de regulación compartido por SREBP1c y SREBP2 involucra la autorregulación mediada por los sitios SREs presentes en los promotores de ambos genes. A través de esta autorregulación las proteínas nSREBP activan la transcripción de sus propios genes y, de la misma forma, cuando disminuye la cantidad de proteína SREBP hay una disminución concomitante de los mRNAs que codifican ambas variantes de la proteína (Horton et al., 2002).

A diferencia de SREBP2 y 1a, la expresión y la abundancia nuclear de SREBP1c no aumenta cuando disminuyen los niveles de colesterol. De hecho, en los roedores, son los cambios en el estado nutricional los que regulan la expresión de la proteína SREBP1c en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. El hígado es el órgano responsable de la conversión del exceso de carbohidratos a ácidos grasos para ser almacenados como triglicéridos o utilizados por el músculo. Una acción clásica de la insulina es la estimulación de la síntesis de ácidos grasos en el hígado durante los períodos de exceso de carbohidratos. La acción de la insulina es opuesta a la acción que ejerce el glucagón a través del efector cAMP. Distintas evidencias sugieren que los efectos estimuladores de la insulina sobre la síntesis de ácidos grasos está mediada por un aumento de los niveles de SREBP1c. *In vivo* la cantidad total de SREBP1c en hígado y tejido adiposo disminuye durante el ayuno, donde la liberación de insulina se encuentra suprimida y aumentan los niveles de glucagón, mientras

que esta cantidad aumenta cuando se realimenta (Horton et al., 1998a). De la misma forma, los niveles de mRNA de SREBP1c caen cuando las ratas se tratan con estreptozotocina, un agente alquilante que destruye las células β -pancreáticas impidiendo la secreción de insulina, y estos niveles se recuperan cuando se inyecta la hormona (Shimomura et al., 1999b). En hepatocitos aislados el tratamiento con insulina aumenta la cantidad de mRNA de SREBP1c en paralelo con un aumento de los niveles de mRNAs de sus genes diana (Foretz et al., 1999). Exactamente lo contrario ocurre cuando se incuban los hepatocitos en presencia de glucagón o cAMP, disminuyendo los niveles de mRNA de SREBP y sus genes diana. También se ha demostrado que la insulina produce un aumento de la abundancia en retículo de la proteína precursora SREBP mediado por la vía de la PI3-quinasa (Azzout-Marniche et al., 2000). Los efectores de esta vía no están del todo claros pero hay evidencias de la posible implicación de PKB/Akt y PKC λ . También se ha propuesto que la glucosa es un activador transcripcional de SREBP (Hasty et al., 2000) aunque otros autores han encontrado que la glucosa no tiene efecto sobre la transcripción de estas proteínas (Eberle et al., 2004b).

SREBP1c es también regulado a nivel transcripcional por los oxisteroles, derivados del colesterol, a través de los receptores nucleares LXR/RXR (Schultz et al., 2000; Repa et al., 2000). Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes involucrados en la excreción y aclaramiento del colesterol. Estudios *in vivo* han identificado un papel de LXR en la inducción de SREBP1c y los genes lipogénicos. Animales *knock-out* para LXR presentan una expresión basal disminuida de SREBP1c, FAS, ACC y SCD1 (Peet et al., 1998). Por el contrario, animales alimentados con una dieta rica en colesterol (un protocolo que resulta en un marcado descenso de la activación de SREBP1a y 2), y el uso de agonistas sintéticos de los oxisteroles han demostrado un aumento selectivo del mRNA y proteína nuclear SREBP1c, una inducción de la expresión de los genes lipogénicos y elevada velocidad de lipogénesis. Así, LXR funciona como un sensor de los niveles de colesterol, por lo que se ha propuesto que induce la expresión de SREBP1c con el fin de generar los ácidos grasos necesarios para la formación de los ésteres de colesterol que

tamponan la concentración de colesterol libre (Tontonoz and Mangelsdorf, 2003).

Esta regulación dual mediada por insulina y oxisteroles parece ser fundamental en la regulación de la homeostasis energética mediada por SREBP (Figura 9). Mientras que la regulación transcripcional y postranscripcional mediada por insulina sería fundamental en el control de la lipogénesis, la influencia de los oxisteroles estaría ligada también al balance del colesterol. También se ha demostrado que los LXR funcionan como un sensor de glucosa (Mitro et al., 2007). Se ha propuesto que la activación de la transcripción mediada por los LXR actuaría como una forma de proveer a la célula de proteína SREBP1c precursora lista para un procesamiento inmediato mediado por insulina y por lo tanto de un sistema que responde con gran flexibilidad a los ciclos de alimentación diarios (Hegarty et al., 2005).

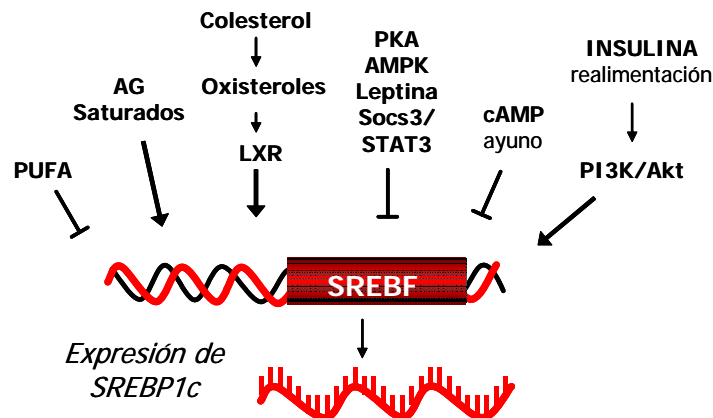


Figura 9: Señales metabólicas que regulan la activación transcripcional de SREBP.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son agentes hipolipidémicos que ejercen su acción suprimiendo la síntesis y la secreción lipídica a nivel hepático a la vez que inducen su oxidación en hígado y músculo esquelético. Se ha demostrado que los PUFAs regulan la abundancia de SREBP1c a nivel transcripcional, estimulan la degradación del mRNA e inhiben su activación proteolítica, sin

modificar la expresión de SREBP2 (Kim et al., 1999; Xu et al., 1999). El mecanismo por el cual se produce esta inhibición no está aún determinado. Existen evidencias de que la acción es mediada por antagonismo de la activación de LXR dependiente de ligando, pero también se ha demostrado la inhibición independiente de este receptor nuclear (Ou et al., 2001; Pawar et al., 2003; **Figura 9**).

3.3 – Promotores SREBP1a y 1c

Los promotores eucarióticos reconocidos por la RNA polimerasa II están formados por 2 partes: el promotor mínimo y el promotor proximal. El promotor mínimo está a su vez formado por varios elementos: la caja TATA, a una distancia de entre 25 y 30 nucleótidos desde el sitio de iniciación de la transcripción, el sitio de reconocimiento de TFIIB llamado BRE justo por encima de la caja TATA, un iniciador o Inr ubicado en el sitio de iniciación de la transcripción al que se une TFIID, y más alejado un *downstream promoter element* (Lee and Young, 2000; **Figura 10**). Sin embargo, la mayoría de los promotores carecen de versiones reconocibles de una o más de estas secuencias. La caja TATA es el elemento de los promotores de clase II más estudiado. Su secuencia consenso es TATAAA aunque existen numerosas excepciones a esta regla. En el genoma humano casi un 70% de los genes no presentan una secuencia TATA reconocible, por lo que se denominan TATA-*less* y pertenecen normalmente a 2 tipos de genes (Thomas and Chiang, 2006). La primera clase está formada por genes *housekeeping* que se encuentran constitutivamente activos en casi todos los tipos celulares ya que controlan rutas bioquímicas comunes. Estos genes muchas veces contienen cajas GC que parecen compensar la falta de la caja TATA (Heintzman and Ren, 2007). La segunda clase de genes TATA-*less* son aquellos regulados durante el desarrollo. En general, los genes especializados que codifican proteínas que sólo se expresan en determinados tipos celulares presentan cajas TATA. Los promotores SREBP1a y SREBP1c pertenecen a la categoría de los promotores TATA-*less*. En estos promotores se reconoce fácilmente la presencia de cajas GC inmediatamente por encima del sitio de iniciación de la transcripción, responsables del reclutamiento de la

maquinaria de iniciación de la transcripción característico de los promotores TATA-*less* (Smale, 1997).

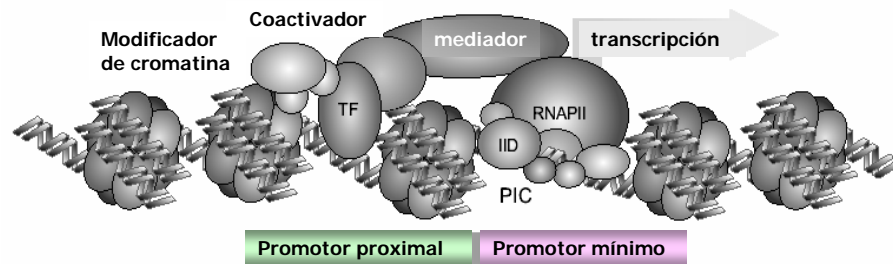


Figura 10: Estructura típica de un promotor eucariota activo (Adaptado de Heintzman and Ren, 2007).

El análisis del promotor SREBP1c murino ha revelado la complejidad de los elementos que actúan en cis y que median la activación por insulina y otros factores nutricionales. La secuencia completa del promotor proximal de ratón capaz de responder a insulina posee un 97% de identidad con el promotor de rata. En ambos promotores es necesaria la unión de los LXRs a ambos sitios LXREs para tener una respuesta óptima a la insulina y esta respuesta disminuye cuando se mutan estos sitios. De la misma manera, la activación de SREBP1c se bloquea utilizando siRNA para LXR α en hepatocitos primarios (Raghow et al., 2008).

El tratamiento con insulina resulta en un incremento de la tasa de transcripción, del procesamiento postranscripcional y de la translocación nuclear de SREBP1c, que se une a su propio promotor para iniciar un bucle autoregulator que amplifica la respuesta transcripcional inicial del gen *Srebp1*. Los últimos experimentos demostraron que los sitios LXRs no son suficientes para activar completamente SREBP1c en rata en respuesta a insulina (Deng et al., 2007). La unidad de respuesta a insulina consiste en un sitio SRE rodeado por una serie de motivos de unión a distintos factores. Estos incluyen una E-box y un sitio NFY que se localizan inmediatamente adyacentes al sitio SRE (Cagen et al., 2005). Además hay al menos 5

sitios de unión a SP1 que contribuyen a la actividad basal del promotor SREBP1c y al menos 3 de ellos son necesarios para la respuesta a insulina. Por lo tanto al menos 4 elementos de unión a factores de transcripción diferentes constituyen la unidad de respuesta a insulina del promotor de rata y ratón.

Los estudios más recientes se han orientado a la búsqueda de la elucidación de las interacciones entre los distintos activadores transcripcionales y los coactivadores que se postulan como reguladores del promotor SREBP1c. Por ejemplo, SP1 ha sido co-inmunoprecipitado junto con LXR α y SREBP1c, planteando la posibilidad de que la insulina active la transcripción modulando estas interacciones. De la misma forma, se ha demostrado que la proteína SRC1 (steroid receptor co-activador 1) interacciona con LXR α y SREBP1c, y que la insulina facilita la unión de estas proteínas en el promotor SREBP1c. Finalmente, CBP es reclutada al promotor SREBP1c pero la insulina no tiene influencia sobre esta interacción según demuestran los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (Figura 11).

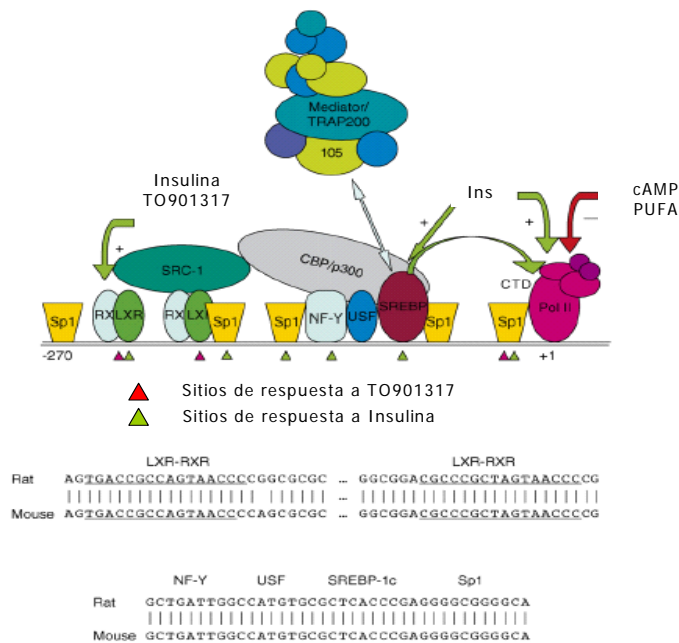


Figura 11: Modelo de los elementos cis y trans de regulación de la actividad del promotor SREBP1c de rata (Adaptado de Raghov et al., 2008).

Las regiones activas asociadas al promotor murino SREBP1a están claramente identificadas. El promotor de ratón está contenido en una pequeña región proximal que contiene 2 sitios de unión al factor de transcripción SP1 que son fundamentales para la actividad del promotor (Zhang et al., 2005). Estos sitios se encuentran en una región altamente conservada entre especies, destacando la importancia de estos elementos *cis-acting*.

La actividad de SREBP2 está también regulada a nivel transcripcional por esteroides a través de la unión al promotor de la propia proteína SREBP2 en conjunto con NFY. Un estudio de la región flanqueante 5' del gen humano *SREBP2* demostró que el promotor proximal está comprendido por 140 pares de bases que contienen los sitios funcionales SRE y NFY (Sato et al., 1996).

4 - INSIG

La proteína INSIG1 fue identificada por primera vez en un estudio transcripcional de regeneración hepática (Diamond et al., 1993). En esos estudios se observó que la proteína INSIG1 representaba el 25% del total de los mRNAs inducidos en este órgano en presencia de insulina, siendo un gen de respuesta inmediata. La proteína INSIG1 se expresa especialmente en los tejidos gluconeogénicos hígado y riñón pero tiene niveles detectables en muchos tejidos (Peng et al., 1997). La relación de esta proteína con la vía SREBP se demostró casi 10 años más tarde (Yang et al., 2002), cuando se describió que INSIG1 era la proteína que interactuaba con la proteína SCAP en el RE en presencia de esteroides y que su sobreexpresión inhibía la activación de SREBP.

El genoma de mamíferos contiene 2 genes INSIG que codifican las proteínas INSIG1 (277 aa) e INSIG2 (225 aa) con un 59% de identidad en su secuencia aminoacídica y que presentan un patrón de expresión tisular muy similar (Yabe et al., 2002). Ambas proteínas difieren en dos aspectos fundamentales. Por un lado INSIG1, pero no INSIG2, es gen diana de la acción de SREBP de forma que en respuesta a insulina se observa una inducción de los niveles del

mRNA de INSIG1 como efecto indirecto de la activación de SREBP1c. De esta forma SREBP induce la expresión de su propio regulador negativo. Por otro lado, a altos niveles de expresión sólo INSIG1 es capaz de bloquear el procesamiento de SREBP en ausencia de esteroides exógenos. INSIG1 tiene además una vida media más corta debido a su degradación por la vía del proteasoma. La ubiquitinación y degradación de INSIG1 está regulada negativamente por los esteroides ya que su unión al complejo SCAP/SREBP en presencia de esteroides le confiere estabilidad. Sin embargo, hasta la fecha, las proteínas INSIG1 e INSIG2 son, en cuanto a su función, mutuamente intercambiables. Recientemente se ha descrito la existencia en ratón de 2 variantes de mRNA denominadas INSIG2a e INSIG2b, que difieren en su primer exón no codificante y que por lo tanto dan lugar a la misma proteína INSIG2. El transcrito INSIG2a es específico de hígado y está regulado por insulina (Yabe et al., 2003).

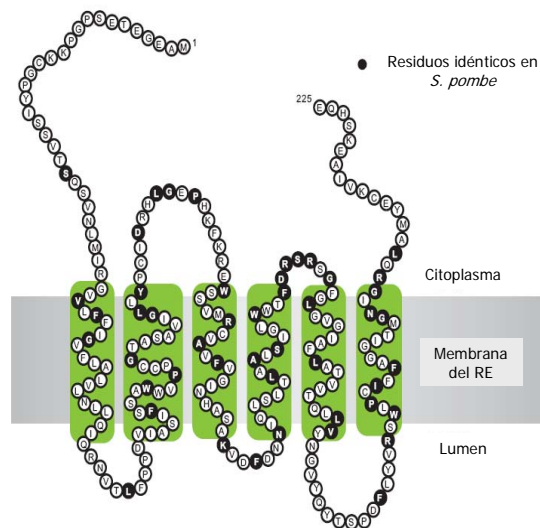


Figura 12: Topología de la proteína INSIG2 humana (Adaptado de Espenshade and Hughes, 2007).

Las proteínas INSIG se localizan en el retículo endoplásmico y tienen un papel fundamental en el control de la síntesis lipídica en las

células animales. Del total de la proteína, aproximadamente la mitad se dispone dentro de la membrana formando seis segmentos transmembrana separados por 5 bucles cortos luminales y citosólicos de entre 5 y 16 aminoácidos (**Figura 12**). Presenta además dos segmentos cortos amino y carboxi terminal que se extienden en el citosol (Feramisco et al., 2004). La naturaleza intramembranosa de INSIG es consistente con su unión dependiente de esteroides a los dominios hidrofóbicos sensores de las proteínas SCAP y HMG-CoA reductasa.

Las proteínas INSIG son necesarias para la retención del complejo SREBP/SCAP en el RE en presencia de esteroides. Cultivos celulares y hepatocitos de ratón a los que les falta INSIG muestran una activación constitutiva de SREBP (Engelking et al., 2005). Consistente con esta función de INSIG como proteína de retención de SCAP, las mutaciones de SCAP en el dominio de respuesta a esteroides que provocan una activación constitutiva de SREBP inhiben también su unión a INSIG. Las proteínas INSIG tienen además una función totalmente distinta ya que median la degradación esteroide-dependiente de la HMG-CoA reductasa, uno de los genes diana de SREBP (Sever et al., 2003). La HMG-CoA reductasa es sintetizada en la membrana del RE igual que SCAP. El dominio catalítico de la enzima está unido a la membrana a través de un segmento N-terminal que contiene 8 hélices transmembrana. La porción que se encuentra dentro de la membrana tiene también un dominio sensor de esteroides. Cuando se acumulan los esteroides en la membrana del RE se induce la unión de la HMG-CoA reductasa a las proteínas INSIG, iniciando un proceso por el cual esta enzima es ubiquitinizada y posteriormente degradada (DeBose-Boyd, 2008).

4.1 – Función y regulación de INSIG

Los niveles de colesterol celular están controlados no sólo por el producto final, colesterol, sino también por sus derivados oxigenados, los oxisteroides que contienen grupos hidroxilo o ceto adicionales en la posición 7 del anillo B o en las posiciones 24, 25 y 27 de la cadena lateral. Los oxisteroides son intermediarios en la síntesis de ácidos biliares y su función es la eliminación del exceso

de esteroides de los tejidos. Los oxisteroides están presentes a bajas concentraciones en los tejidos si se compara con los niveles de colesterol, y tienen un papel muy importante en la regulación de la homeostasis del colesterol. Los oxisteroides, como por ejemplo el 25-hidroxicolesterol, han sido siempre considerados como inhibidores de la síntesis de esteroides, pero el mecanismo por el que los oxisteroides regulan la expresión de las proteínas SREBP se ha clarificado sólo recientemente (Espenshade and Hughes, 2007).

Tanto el colesterol como los oxisteroides inducen la unión de SCAP a INSIG y evitan la incorporación del complejo SCAP/SREBP a las vesículas COPII (Adams et al., 2004; Sun et al., 2005). Sin embargo, a diferencia del colesterol, el 25-OH-colesterol no se une directamente a SCAP ni es capaz de inducir un cambio conformacional de SCAP en células que carecen de INSIG. Una explicación para estas acciones diferenciales entre el colesterol y los oxisteroides se deriva de estudios recientes que han demostrado que INSIG es una proteína capaz de unir oxisteroides, mediando su acción sobre el procesamiento de SREBP. Los oxisteroides y el colesterol actúan a través de distintos receptores intracelulares para inducir la unión de SCAP e INSIG. El colesterol se une a SCAP e induce su unión a INSIG, mientras que los oxisteroides se unen a INSIG y provocan su unión a SCAP. En ambos casos esta unión entre INSIG y SCAP provocará un cambio conformacional en SCAP que evitará el acceso de las proteínas de las vesículas COPII a la secuencia de reconocimiento MALADL, resultando en la retención del complejo SREBP/SCAP en el RE.

En el ratón este sistema es aún más complejo ya que ambos genes *Insig* y *Srebp1* se encuentran bajo regulación recíproca. La expresión de *Insig1* en hígado es dependiente de la isoforma SREBP1c, y la transcripción del gen *Srebp1c* es a su vez inducida por insulina. Así, el mRNA de *Insig1* desaparece durante el ayuno cuando los niveles de insulina son bajos y la expresión de *Srebp1c* está reprimida. De la misma forma, la expresión de *Insig1* aumenta tras la realimentación. Por el contrario, la expresión hepática del gen *Insig2* es dependiente de un promotor hepatoespecífico (INSIG2a), que se reprime en presencia de insulina. En condiciones de ayuno, cuando INSIG1 disminuye, INSIG2a aumenta (Engelking et al., 2005).

5 - La vía SREBP en la patología metabólica

El Síndrome Metabólico (SM) se caracteriza por la presencia de dislipidemia, resistencia a insulina, obesidad y elevada presión arterial que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por la combinación de factores genéticos y ambientales asociados al estilo de vida (Reaven, 1988); publicación de la Organización mundial de la Salud WHO/NCD/NCS/99.2; 31-3). Actualmente la resistencia a insulina se considera responsable de la mayor parte de las anomalías presentes en el síndrome metabólico, fundamentalmente de la hiperglucemia, la hipertensión arterial, el aumento en la producción hepática de VLDL y triglicéridos y la estimulación de la proliferación endotelial causante del inicio del proceso de aterosclerosis (Anderson et al., 2001).

Los mecanismos moleculares causantes de la insulino-resistencia y por lo tanto del SM no están claros pero, teniendo en cuenta el rol fundamental que tienen los factores de transcripción SREBP en la regulación de la homeostasis de la lipogénesis y la colesterogénesis, estas proteínas parecen excelentes candidatos responsables de la aparición del conjunto de signos y síntomas clínicos característicos del síndrome. De hecho, los factores de transcripción SREBP ya se han relacionado con el desarrollo de patologías como la obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia, aterosclerosis y lipodistrofia.

5.1 - SREBP en diabetes y obesidad

La estrecha relación entre los factores SREBP y el metabolismo de los ácidos grasos y la glucosa llaman la atención inmediatamente sobre la diabetes. SREBP1c es un factor de transcripción esencial en las acciones genómicas de la insulina sobre el metabolismo lipídico y de carbohidratos. Una alteración de la actividad de este factor podría ser clave a nivel molecular en el vínculo entre la resistencia a insulina y los desórdenes metabólicos en esta enfermedad. De hecho, se ha observado una disminución en los niveles de mRNA de SREBP en tejido adiposo en dos estados caracterizados por resistencia a la insulina como son la obesidad y la diabetes tipo 2. (Ducluzeau et al., 2001; Sewter et al., 2002; Oberkofler et al., 2002). Esta disminución

selectiva de la abundancia adipocitaria de SREBP1c en los individuos obesos prevendría la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, promoviendo su movilización a otros tejidos como hígado y músculo, donde la lipotoxicidad perjudicaría la acción y/o secreción de insulina. Por el contrario, se ha observado un aumento en la expresión de SREBP1c en hígado de ratones obesos (ob/ob), en ratones deficientes de IRS2 (insulin receptor substrate-2) y en modelos transgénicos de lipodistrofia (Shimomura et al., 1999a; Shimomura et al., 2000; Tobe et al., 2001). Muchos individuos que presentan obesidad o resistencia a insulina presentan además un cuadro de hígado graso. La evidencia indica que este efecto hepático de la resistencia a la insulina es causado por SREBP1c, que se eleva en respuesta a los altos niveles de insulina y activa la lipogénesis hepática (Figura 13).

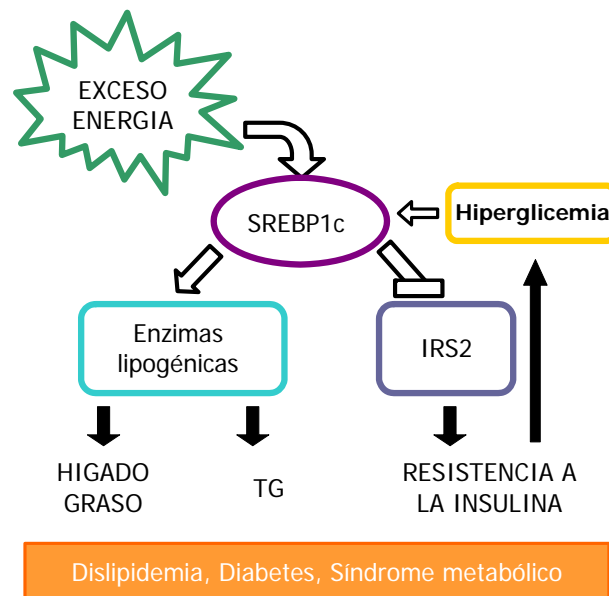


Figura 13: Contribución de SREBP1c al desarrollo de patología metabólica (Adaptado de Shimano, 2007).

Además, las proteínas SREBPs son represoras de la transcripción de IRS2, la principal molécula implicada en la

señalización de la insulina en hígado y célula β -pancreática (Takahashi et al., 2005). La supresión de IRS2 en el hígado inhibe los procesos que regulan la señalización por insulina, como la síntesis de glucógeno, y contribuye a un cambio en el estado fisiológico favoreciendo la síntesis de ácidos grasos en estados de bajo aporte energético. IRS2 es además una molécula esencial en la regulación de la masa de células β , regulando su supervivencia y proliferación. Una masa de células β disminuída es determinante en el desarrollo de la diabetes. La inhibición mediada por SREBP1c de IRS2 afecta a la masa de estas células y por lo tanto promueve al desarrollo de la enfermedad diabética (Shimano, 2009; **Figura 13**).

5.2 – SREBP y el metabolismo lipídico

La lipogénesis hepática, controlada por SREBP1c, está asociada con la producción de partículas VLDL ricas en triglicéridos que son secretadas a la circulación como fuente de energía en los tejidos periféricos. Así es posible que la activación de SREBP1c contribuya a la aparición de hiperlipidemia, especialmente hipertrigliceridemia. Experimentos en animales han demostrado que la sobreexpresión de SREBP1a y 1c está asociada con hiperlipidemia en condiciones en que el aclaramiento de lipoproteínas que contienen apoB está retardado (ratones KO para el receptor de las LDL).

Numerosos estudios han demostrado la función protectora que ejercen los aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en las enfermedades cardiovasculares. Estos compuestos inhiben la lipogénesis y disminuyen los triglicéridos plásmaticos y tisulares a través de la inhibición de SREBP1c. Los mecanismos moleculares que dirigen esta inhibición son múltiples y complejos, y son aún objeto importante de investigación. Los PUFAs inhiben la expresión de SREBP1c y parece que también inhiben su procesamiento. Se ha visto que estos compuestos mejoran la resistencia a insulina y la esteatosis hepática en modelos de ratones obesos (Shimano, 2009). También se ha visto que en células β -pancreáticas el palmitato perjudica mientras que el ácido eicosapentaenoico mejora la secreción de insulina al parecer mediado por la regulación de SREBP1c (Kato et al., 2008).

También se ha demostrado una alteración de los niveles de SREBP1 asociada al daño hepático en pacientes HIV-positivos que presentan lipodistrofia insulino-resistente asociada a la terapia retroviral combinada (Lemoine et al., 2006).

Dado que la isoforma SREBP2 es fundamental en la homeostasis del colesterol, se ha estudiado la contribución del gen *SREBF2* a la patogenia de las hipercolesterolemias y aterosclerosis de origen poligénico. En distintos estudios se han detectado varios polimorfismos y variantes raras de este gen y algunos de ellos parecen mostrar un efecto significativo en los niveles de lípidos plasmáticos (Miserez et al., 2002; Robinet et al., 2003; Duan et al., 2005).

5.3 – Genética

Distintas aproximaciones genéticas también han resaltado la contribución de los factores de transcripción SREBPs en el desarrollo de los desórdenes metabólicos. Por estudios de cartografía genética se relacionó la región 17p11 que contiene el locus del gen *SREBF1* humano, con las concentraciones de leptina plasmáticas en familias obesas y con el BMI en un análisis de cuatro grupos étnicos. Un meta-análisis realizado con 4 grupos de *screening* genómico demostró un ligamiento entre las regiones 17p11.2 y q22 con la diabetes tipo 2 (Eberle et al., 2004b). En los últimos años se han realizado distintos estudios focalizados en la búsqueda de variantes de SREBP1c asociadas a este tipo de patologías. El grupo de Foufelle describió una serie de SNPs en el gen *SREBF1* asociados a obesidad y diabetes tipo 2 en pacientes franceses (Eberle et al., 2004a). Los SNPs descritos estaban asociados además a hipertrigliceridemia masculina dentro del grupo de obesos. Al mismo tiempo se identificó en dos estudios independientes una variante intrónica común asociada en una de la cohortes al riesgo de diabetes tipo 2 en hombres y a los niveles plasmáticos de colesterol en la segunda población estudiada (Laudes et al., 2004). Védie y colaboradores observaron que un SNP en el gen *SREBF1* se asociaba con un perfil lipídico aterogénico en hombres con riesgo cardiovascular (Védie et al., 2001). En nuestro laboratorio, se realizó un análisis de SNPs en el gen *SREBF1* en

pacientes con diabetes tipo 2. Entre las variantes encontradas se describió una mutación en el exón 3 común a ambas isoformas SREBP1 que produce una modificación funcional de la proteína (Vernia et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito un polimorfismo en la región de inicio de la transcripción de SREBP1a relacionado con el desarrollo de aterosclerosis en población con riesgo cardiovascular (Vedie et al., 2001).

5.4 – *INSIG* y la patología metabólica

A diferencia de lo que ocurre con SREBP pocos estudios pueden encontrarse que relacionen a las proteínas reguladoras de SREBP, es decir a SCAP e INSIG, con la patología. Debido al rol fundamental de las proteínas INSIG1 e INSIG2 en la regulación tanto de SREBP como de HMG-CoA, distintos investigadores han focalizado su búsqueda en posibles asociaciones de variantes de estos genes con la dislipidemia y especialmente la hipercolesterolemia.

En el año 2005 se identificó a *INSIG2* como un gen de susceptibilidad para los niveles de colesterol plasmático mediante un estudio integrativo de QTL (quantitative trait locus) y análisis de alta densidad de SNP en ratón (Cervino et al., 2005). Un año más tarde se publicaba en la revista Science un estudio que identificaba la asociación de una variante alélica a 10 kb del gen *INSIG2* con obesidad (Herbert et al., 2006). Un estudio realizado en población japonesa describió que este SNP se asociaba a hipercolesterolemia en mujeres que sin embargo no presentó asociación fenotípica en un estudio realizado en población caucasiana (Oki et al., 2008) (Hall et al., 2006). Posteriormente aparecerían 3 comentarios al artículo original publicado por Herbert *et al*, reportando resultados contradictorios en grupos independientes de Francia, Alemania y Reino Unido. En nuestro laboratorio hemos identificado una variante localizada en el promotor proximal *INSIG2* asociada con un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2 (Tesis doctoral realizada por Vernia Miralles, S; <http://hdl.handle.net/10261/4808>).

Un análisis de polifomismos comunes en *INSIG1* permitió identificar una asociación de una sustitución en la posición -169 del promotor de este gen con concentraciones reducidas de glucosa

plasmática (Krapivner et al., 2007). Los mismos autores utilizaron la técnica de siRNA encontrando que una disminución de los niveles de INSIG1 se correlacionaba con una disminución de PCK2, un gen fundamental en la homeostasis de la glucosa. Recientemente, un estudio de asociación en base de haplotipos indicaba que *INSIG1* pero no *INSIG2* se encontraba asociado a enfermedad coronaria, relacionando estos resultados con las diferencias en la regulación mediada por esteroides y en la vida media entre ambas variantes. Se ha demostrado que tanto INSIG1 como INSIG2 tienen efectos antilipogénicos en la esteatosis hepática en ratas obesas ZDF (*fa/fa*). La sobreexpresión hepática de cada una de estas proteínas reduce además la hipertrigliceridemia por un mecanismo mediado por SREBP1c tal como se predecía en los estudios realizados en células *in vitro*. Además, esta sobreexpresión disminuye la respuesta clásica a la realimentación de las enzimas reguladas por SREBP (Takaishi et al., 2004).

Objetivos

Un estudio del Instituto Wellcome Trust Sanger ((Stranger et al., 2007)) ha mostrado recientemente que las enfermedades complejas se relacionan preferentemente con variaciones en regiones que controlan la actividad de los genes más que en regiones codificantes, reforzando la importancia de conocer en profundidad la regulación de la expresión génica tanto en cis (promotores y *enhancers*) como en trans (factores de transcripción generales, histoespecíficos y todas las proteínas reguladoras con capacidad de unión al ADN).

Teniendo en cuenta que variaciones en la expresión de las proteínas SREBP se han relacionado con enfermedades complejas, y la importancia que se está dando a las regiones reguladoras en la etiopatogenia de este tipo de enfermedades, el objetivo de esta tesis ha sido caracterizar la regulación a nivel transcripcional de la vía SREBP con tres objetivos concretos:

I - Caracterización del Promotor humano SREBP1a, comparándolo con los datos previos del promotor murino.

II - Caracterización del Promotor humano SREBP1c, focalizándonos en la regulación transcripcional mediada por factores nutricionales, comparándolo con los datos existentes en otras especies.

III - Identificación del Promotor humano INSIG2, caracterizando su región proximal.

Material y Métodos

1 – Reactivos comunes

Los reactivos utilizados en el laboratorio han sido proporcionados por Fermentas, Fluka, Invitrogen, Lonza, Panreac, Pronadisa, Roche, Scharlau, Sigma y Takara.

2 – Plásmidos de expresión de luciferasa

2.1 – Promotor humano *SREBP1a*

Usando como molde DNA genómico humano de individuos control, se amplificaron por PCR dos fragmentos de 1545 pb (Spro) y 1202 pb (Pro) que corresponden a una secuencia de 1700 pb de la región 5' *upstream* del ATG del gen humano *SREBF1*. Para la amplificación se utilizaron 50 ng de DNA molde, 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M de oligonucleótidos directo y reverso, 2,5 U de DNA polimerasa *PfuTurbo*[®] (Stratagene) en 50 μ L de volumen final conteniendo buffer de reacción 1X con una concentración final de Mg^{2+} 2 mM. El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 90 segundos a 72°C, finalizando con un ciclo de 10 minutos a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se diseñaron mediante el programa Primer Express V2.0 (Applied Biosystems) y fueron: SPro directo: 5'-GCAAGTAAACTGTGCCGAACC-3', SPro reverso: 5'-GCAGTGAGCTCCCTGTCCC-3', Pro directo: 5'-CCCCTGATGAGTTTCCTGGAC-3' y Pro reverso: 5'-GAGCTCAGAGACACCGGAAG-3'. Los dos fragmentos obtenidos fueron tratados con dATP durante 15 minutos a 70°C e insertados en el vector pGEMT-easy (Promega) para construir los vectores denominados pSPro-easy y pPro-easy respectivamente (**Figura 14**). Ambas construcciones se verificaron por secuenciación y se utilizaron como molde para la construcción de los plásmidos de expresión de luciferasa.

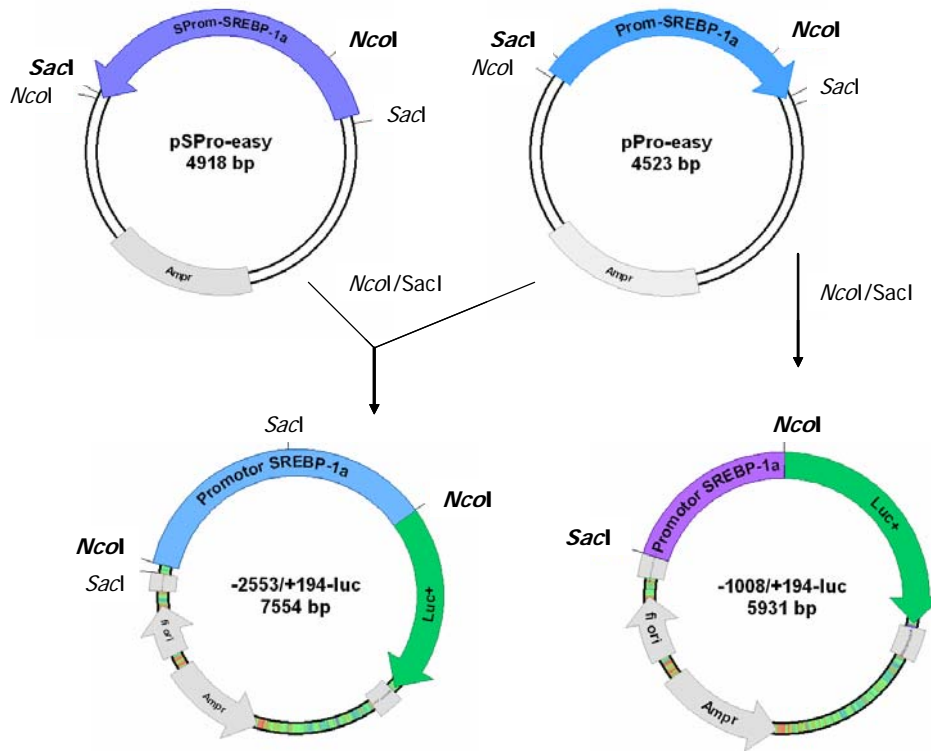


Figura 14: Construcción de los vectores de expresión de luciferasa conteniendo el promotor SREBP1a humano. Las secuencias amplificadas por PCR se clonaron en el vector pGEMT-easy (Promega) y a continuación se subclonaron en posición 5' al ORF de la luciferasa en el vector pGL3-basic (Promega).

A partir de los vectores pSPro-easy y pPro-easy se construyó el plásmido -2553/+194-luc mediante corte con enzimas de restricción *NcoI/SacI* e inserción de los 2 fragmentos consecutivos en el sitio *NcoI* del vector pGL3-basic de expresión de luciferasa (**Figura 14**). A partir de pPro-easy se construyó el plásmido -1008/+194-luc mediante digestión con enzimas de restricción *SacI/NcoI* e inserción en sitio *SacI/NcoI* del vector pGL3-basic (**Figura 14**). El resto de construcciones que contienen secuencias del promotor SREBP1a en el vector de luciferasa se realizaron mediante restricción enzimática a

partir de cada uno de estos 2 plásmidos (Tabla 2). Todas las construcciones se verificaron por secuenciación.

Construcción	Molde	Corte	Inserción
-1648/+194	-2553/+194	<i>Bgl</i> II	Religado
-889/+194	-1008/+194	<i>Sex</i> AI/ <i>Pst</i> I + Klenow + <i>Nco</i> I	<i>Sma</i> I/ <i>Nco</i> I
-717/+194	-1008/+194	<i>Bp</i> I/ <i>Pst</i> I + Klenow + <i>Nco</i> I	<i>Sma</i> I/ <i>Nco</i> I
-360/+194	-1008/+194	<i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I	<i>Bgl</i> II/ <i>Nco</i> I
-75/+194	-1008/+194	<i>Sma</i> I/ <i>Nco</i> I	<i>Bgl</i> II/ <i>Nco</i> I +Klenow

Tabla 2: Construcción de los plásmidos de expresión de luciferasa conteniendo delecciones seriadas del promotor SREBP1a humano. Cada una de las construcciones se realizó por digestión utilizando enzimas de restricción con el fin de conservar el sitio de inicio de la transcripción de la luciferasa y obtener secuencias con delecciones seriadas a partir del promotor completo.

Las construcciones que contenían secuencias mutadas del promotor SREBP1a se realizaron mediante el Kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Para la amplificación se utilizaron 30 ng del vector pPro-easy como DNA molde, 200 μ M de dNTPs, 0,3 μ M de oligonucleótidos directo y reverso, 5 U de DNA polimerasa *PfuTurbo*[®] (Stratagene) en 50 μ L de volumen final conteniendo buffer de reacción 1X con una concentración final de Mg^{2+} 2 mM. El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 40 segundos a 95°C seguida de 18 ciclos de 40 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C y 10 minutos a 68°C. El producto de amplificación se trató con 2 μ L de *Dpn*I a 37°C durante 1 hora. Los oligonucleótidos específicos utilizados para cada mutación se muestran en la **tabla 3**.

Mutante	Oligonucleótido
SP1A	GGCTCGAGATCTCAAGGTCTTTGGAGGCCGTCTATCTGGGAGGG
SP1B	CCGTCTATCTGGGAGTGGAGGTCCTCCCCGAAAGGC
SP1C	CCTCCCCGAAAGGACTTTCTCCGCCTCGACCGCCC
mNFKBp	GCAGACCGGGGATCAAGTGTCCGCCGCTCTCT
mNFY	CCGGCTGAGGGGAGGTCGTGGCGCAGACCGGGG
mNFKBd	GGCCTGGGGCTTCCACTCCGCATCTTTGCTTGGTGCTGG

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida del promotor SREBP1a. El oligonucleótido directo utilizado para cada una de las amplificaciones se muestra en la figura, resaltando en gris las bases mutadas. El oligonucleótido reverso corresponde a la secuencia reversa complementaria del oligonucleótido directo.

2.2 - Promotor humano SREBP1c

De la misma forma que con el promotor SREBP1a, intentamos amplificar la secuencia del promotor SREBP1c a partir de DNA genómico de individuos controles. Esta amplificación no fue posible ya que, debido a la presencia de una zona de aproximadamente 150 pb con un 100% de bases G y C en el promotor SREBP1c humano, todos los productos obtenidos en estas condiciones presentaban una delección de esta región. Para solventar este problema cambiamos el molde utilizado para la reacción de PCR reemplazando al DNA genómico por un BAC purificado a partir del clon RP1-253P7 (BACPAC Resources, Children's Hospital Oakland Research Institute), que contiene al gen completo *SREBF1* (AC122129). Un fragmento de 1801 pb se amplificó por PCR en una reacción que contenía 100 ng de DNA molde, 200 μ M de dATP+dCTP+dTTP, 200 μ M 7-deazaG+dGTP, 0,2 μ M de oligonucleótidos directo y reverso, 1,2 uL de formamida y 2,5 U de DNA polimerasa *PfuTurbo*[®] (Stratagene) en 50 μ L de volumen final conteniendo buffer de reacción 1X con una concentración final de Mg²⁺ 2 mM. El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 100 segundos a 72°C, finalizando con un ciclo de 10 minutos a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados para la

amplificación se diseñaron mediante el programa Primer Express V2.0 (Applied Biosystems) y fueron: Pro1c directo 5´-GCTTGTGGTCTCACCACATT-3´ y Pro1c reverso 5´-CGAGCTGGTAACTGTCACACC-3´. El producto de esta amplificación tras ser tratado a 70°C durante 15 minutos con dATP, se insertó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) para construir el pPro1c-TOPO (Figura 15). A partir de este plásmido, un fragmento de 1568 pb se subclonó en el sitio *NcoI* del vector de expresión de luciferasa pGL3-basic (-1564/+1-luc). La construcción -1564d158-luc se realizó mediante la misma reacción de PCR en ausencia de 7-deazaG y cambiando la formamida por DMSO.

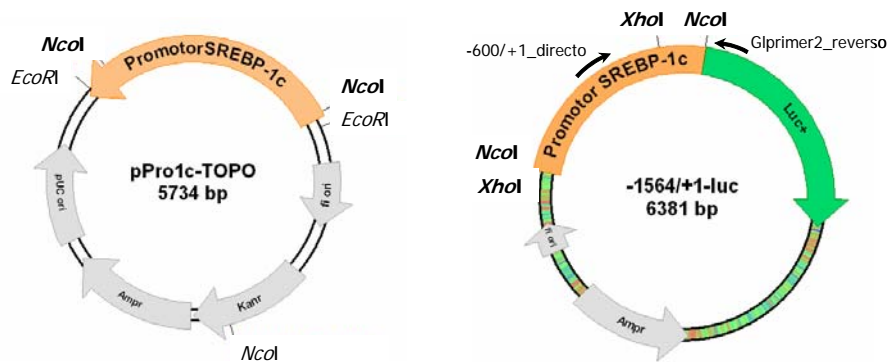


Figura 15: Construcción de plásmido de expresión de luciferasa conteniendo el promotor SREBP1c humano. Las secuencias amplificadas por PCR se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y a continuación se subclonaron en posición 5´ al ORF de la luciferasa en el vector pGL3-basic (Promega). Esta última construcción se utilizó como molde para las distintas construcciones de este promotor.

Para la construcción del plásmido -620/+1-luc se realizó la PCR en las mismas condiciones utilizando como molde el plásmido -1564/+1-luc, el oligonucleótido 1c620 directo 5´-GGAGGGTACCAGGCTCGCTCAGGGTGCCAGC-3´ con sitio de corte para *KpnI* y el oligonucleótido reverso GLprimer2 5´-CTTTATGTTTTTGCGTCTTCCA-3´ que reconoce al plásmido de la

luciferasa por encima del sitio de corte para *NcoI*. El producto de esta amplificación debidamente digerido se insertó en el sitio *KpnI/NcoI* del vector pGL3-basic. Para la construcción -310/+1-luc se realizó una digestión enzimática con *XhoI* y posterior religado a partir del vector -1564/+1-luc (**Figura 15**).

Las construcciones de secuencias mutantes se realizaron de la misma forma que para el promotor SREBP1a utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la **tabla 4**.

Mutante	Oligonucleótido
mPDX1	CGACGCCAGGGAGACAGCGACTGTCCTGTTTTCTGG
mHNF4	GGGCCAGGACTTCTCTGATCCGACCCTTTAACGAAGGG
mLXRE1	GGAGCTGAGGGCCAGCGCGGATAGACCAACCGGCAGACGCTGG
mLXRE2	CGGGTTAAAGGCGGAGACTGCCAGATACGCCAACCCCATTCAGC
mSRE1	CCATTCAGCGCCGCGAGATAAAACTCGAGCCCC
mSRE2	GGCCGCGCGCGCTTATCTCATGCCCGGCCCGC
mNFY	CGGCAGCGCGGCCGCTGGTACCCCGCGCGCGC
mSP1	CCGCCGTGGGGAGTTGGTGGAGGGGCCGGGGCCGGG

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida del promotor SREBP1c. El oligonucleótido directo utilizado para cada una de las amplificaciones se muestra en la figura, resaltando en gris las bases mutadas. El oligonucleótido reverso corresponde a la secuencia reversa complementaria del oligonucleótido directo.

La construcción del promotor SREBP1c de rata se realizó por PCR utilizando como molde DNA genómico de rata obtenido en el laboratorio, y utilizando los oligonucleótidos 1cRATA directo 5´-AGTGGTACCGCTGGACACGGCCTGTACA-3´ y 1cRATA reverso 5´-GCAAGATCTTAGGGCGTGACAGCGCTACCCCTA-3´ con sitios de corte para *KpnI* y *BglII* respectivamente e insertando el producto de la PCR en el vector pGL3-basic debidamente digerido.

2.3 – Promotor humano *INSIG2*

Para el clonaje del promotor *INSIG2* se utilizó como molde DNA genómico humano (Roche) para amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos hINSIG2 directo 5'-GCCTGGCACACAGAAAGTG-3' y hINSIG2 reverso 5'-GTTGGGGGTCTCCCGGC-3'. Un producto de 3388 pb se insertó en el vector pGEMT-easy (Promega) generando el plásmido pProInsig2b-easy (Tesis doctoral realizada por Vernia Miralles, S; <http://hdl.handle.net/10261/4808>). A partir de este vector se subclonó un fragmento de 3625 pb en el sitio *SacI* del vector pGL3-basic y se denominó pProInsig2b-luc (Figura 16). Este plásmido se utilizó para la construcción de los distintos plásmidos de expresión de luciferasa con inserciones decrecientes de secuencias del promotor mediante digestión enzimática (Tabla 5).

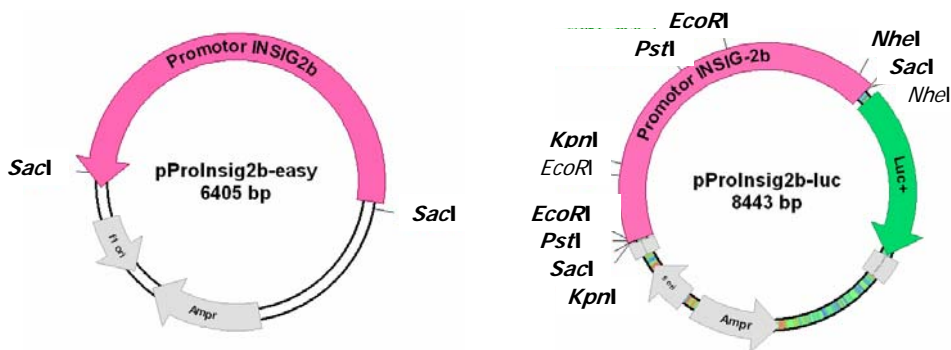


Figura 16: Construcción de plásmido de expresión de luciferasa conteniendo el promotor *INSIG2* humano. Las secuencias amplificadas por PCR se clonaron en el vector pGEMT-easy (Promega) y a continuación se subclonaron en posición 5'al ORF de la luciferasa en el vector pGL3-basic (Promega).

Construcción	Molde	Corte	Inserción
-12912/-11	ProInsig2b	<i>KpnI</i>	Religado
-1887/-11	ProInsig2b	<i>PstI</i>	Religado
-1422/-11	ProInsig2b	<i>EcoRI</i>	Religado
-152/-11	ProInsig2b	<i>NheI/SacI</i>	<i>NheI/HindIII</i> +Klenow

Tabla 5: Construcción de los vectores de expresión de luciferasa conteniendo deleciones seriadas del promotor INSIG2 humano. Estrategia llevada a cabo para obtener construcciones con deleciones seriadas a partir del promotor completo gracias al empleo de las enzimas de restricción indicadas, conservando en todas ellas el sitio de inicio de la transcripción de la luciferasa.

La construcción -859/-11 se realizó por digestión controlada con BAL31 e inserción en el sitio *SmaI* del vector pGL3-basic. Las construcciones restantes se realizaron por PCR con oligonucleótidos directos específicos con sitio de corte para *KpnI* (Tabla 6) y utilizando como oligonucleótido reverso el GLprimer2. El producto amplificado se insertó en el sitio *KpnI/SacI* del vector pGL3-basic. Las construcciones mutantes se realizaron de la misma forma que para el promotor SREBP1a utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 7.

Construcción	Oligonucleótido
-347/-11	GGCGGTACCCGGAACGCGCTCCTTTC
-285/-11	CCTCGGTACCTGTGCGTGTATCAGTGCATGAT
-231/-11	CTGGGGTACCGTCATTACCTACGGCTGCCTG
-202/-11	TGGTGGTACCACAACAGCAGATCCGACAACC

Tabla 6: Oligonucleótidos utilizados para las construcciones seriadas del promotor INSIG2 en vector de expresión de luciferasa. En la tabla se muestran los oligonucleótidos directos utilizados para cada una de las amplificaciones.

Mutante	Oligonucleótido
Mut I - Snail	CCTCGTTGGCCGCACTTTTCGCAGTGGAGCTCG
Mut IIa - Elk1	TTGACAGCAGGAACAAGAAGCTCTTCTGCCCC
Mut IIb - Elk1	GTTTCCCGCAGACAAGAAGCCCTTTTGCCCCGGC
Mut IIIa - E2F	CCGGAAGCCCTAAAGCCCCGGCTCGCAGG
Mut IIIb - E2F	CTCCAGAAACCCGCAGACCGGAAGCCC
Mut IV - SOX	GCCTGGTCAGCAAGGGACAGCAGATCCGACAAC
Mut V - ATF	GTCTGGGCATCGGGCCACCTACGGCTGCCTG
Mut V - AML1	GCATGATTCCTTTACTCCAACACAGGGTCTGG

Tabla 7: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida del promotor humano INSIG2. En la tabla se muestran los oligonucleótidos directos utilizados para cada una de las amplificaciones, resaltando en gris las bases mutadas. El oligonucleótido reverso corresponde a la secuencia reversa complementaria del oligonucleótido directo.

La construcción que expresa la luciferasa bajo el control del posible promotor INSIG2a humano se obtuvo por PCR utilizando como molde DNA genómico humano (Roche) y los oligonucleótidos hINSIG2a directo 5'-TCTCGGTACCTACATTTGCTATGTGGCCAAGG-3' y hINSIG2a reverso 5'-ATAAGAGCTCAATTCACAGCCTGGAAATGCA-3' con sitios de corte para *KpnI* y *SacI* e inserción en los sitios correspondientes en el vector pGL3-basic. Para la amplificación se utilizaron 100 ng de DNA molde, 200 μ M de dNTPs, 0,3 μ M de oligonucleótidos directo y reverso, 2,5 U de DNA polimerasa *PfuTurbo*[®] (Stratagene) en 50 μ L de volumen final conteniendo buffer de reacción 1X con una concentración final de Mg²⁺ 2 mM. El programa de amplificación utilizado fue TD6050 que consiste de una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C seguida de 3 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C, 20 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos con rampa descendiente a 3°C/segundo hasta 50°C y 2 minutos a 72°C y 9 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C.

La construcción de plásmidos con promotor INSIG2a y 2b de ratón se realizó por PCR utilizando como molde DNA genómico obtenido a partir de colas de ratón. El programa de amplificación utilizado fue el TD6050 y los oligonucleótidos rINSIG2a directo 5'-AACTGGTACCTGAAGTCATGTGAAAACGCCA-3', rINSIG2a reverso 5'-

GATGGAGCTCAAGCAAGCTAGTCCAGCTCAC-3', rINSIG2b directo 5'-TGTGGGTACCGGTCTTTGACCCAAGTCTCTCGA-3' y rINSIG2b reverso 5'-TCACCTGAGCTCTGCCCGGAGACCCCA-3' que presenta sitios de corte para *KpnI* y *SacI* en directo y reverso respectivamente que permite su inserción en el vector pGL3-basic debidamente digerido.

2.4 – Otros

Los vectores pEBS14-luc y pAldGCB4-luc de respuesta a EGR1 y SP1 respectivamente, fueron donados por Gerard Thiel, Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Saarland Medical center, D6641 Hamburg, Germany (Al-Sarraj et al., 2005).

3 – Vectores de expresión de otras proteínas

Los vectores de expresión para EGR1 y SP1 se adquirieron en Addgene y fueron: pcDNA3-EGR-1 (Addgene número 11729; Yu et al., 2004) y pCMV-SP1 (Addgene número 12097, autor Robert Tijan). Los vectores pCMX, pCMX-PPAR, pCMX-LXR α , pCMX-LXR β y pCMX-RXR fueron donados por el Dr. Antonio Castrillo del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid. El vector de expresión de ELK1 (pcDNA-ELK1) fue donado por el Dr. Robert A. Hipskind del Institute de Génétic Moléculaire de Montpellier, Francia (Janknecht and Nordheim, 1992). Los plásmidos pCAGGS, pCA-SAP1a y pCA-SAP1a-DBD fueron donados por Hiroshi Kubota, Department of Molecular and Cellular Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Japón (Yamazaki et al., 2003). El vector pcDNA-Sap1a se contruyó a partir de pCA-SAP1a por corte con *EcoRI* e inserción en el vector pcDNA3.1. El vector pcDNA-E2F fue cedido por el Dr. Yoshikuni Nagamine del Friedrich Miescher Institute, Basel, Suiza (Johnson et al., 1993). Los vectores pcDNA-NRF2 α y pcDNA-NRF2 β fueron cedidos por el Dr. José Blesa, Unidad de Genética Molecular, Instituto de Biomedicina de Valencia. El vector de expresión de Ras pCEFL-K5-KrasV12 fue cedido por el Dr. José María Rojas Cabañeros del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

4 - Transformación de bacterias competentes y obtención de plásmidos

Todas las construcciones se transformaron en bacterias DH5 α competentes por electroporación a 1700 eV, y se crecieron en placas con medio LB con los antibióticos correspondientes. Los plásmidos se obtuvieron mediante sistemas de purificación de plásmidos Rapid Plasmid Miniprep (Marligen) y PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep (Invitrogen). Brevemente, un lisado de bacterias se aplica a columnas con membrana de sílica en las que el DNA es selectivamente retenido. Tras una breve centrifugación el DNA plasmídico retenido se eluye con buffer TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8), 0,1 mM EDTA).

5 - Cultivos celulares

5.1 - Células HEK293T

Las células HEK293T (Human embryonic kidney 293T) se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada al 5% CO₂ en medio DMEM conteniendo 25 mmol/L de glucosa, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina suplementado con 10% de suero bovino fetal. Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos con una densidad de 5x10⁵ células por pocillo el día previo a la transfección para ensayos de luciferasa y siRNA o el día previo a la extracción de RNA para los ensayos de RT-PCR. Las mismas células se sembraron en placas de 10 cm con una densidad de 2,5x10⁶ células por placa el día previo para la extracción de cromatina.

5.2 - Células HepG2

Las células HepG2, línea de hepatocarcinoma humano, se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada al 5% CO₂ en medio DMEM conteniendo 25 mmol/L de glucosa, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina suplementado con 10% de suero bovino fetal. Las células se sembraron en placas de cultivo de 24

pocillos con una densidad de $1,5 \times 10^5$ células por pocillo el día previo a la transfección para ensayos de luciferasa, en placas de 6 pocillos con una densidad de 5×10^5 el día previo a la transfección para ensayos de siRNA o el día previo a la extracción de RNA para los ensayos de RT-PCR, y en placas de 10 cm a una densidad de 4×10^6 células por placa el día previo para la extracción de cromatina.

5.3 – Hepatocitos de rata en cultivo primario

Los hepatocitos de hígado de rata se obtuvieron por perfusión *in situ* con colagenasa en ratas Wistar (Hannover) según el método descrito por Hue y colaboradores (Hue et al., 1978). Las ratas se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal con Pentotal 5 mg/mL con una dosis de 0,1 mL por gramo de peso. Una vez anestesiado se inyectó al animal en la vena femoral 0,3 mL de heparina al 1% para evitar la coagulación sanguínea y facilitar el lavado del hígado de su contenido hemático. La canulación se llevó a cabo en la vena porta y la perfusión hepática se realizó con un flujo de 40 mL/min de solución Hepes sin calcio (Hepes 20 mM, KCl 1 mM, $MgSO_4$ 1 mM, KH_2PO_4 5 mM, NaCl 150 mM y glucosa 10 mM a pH 7,4). Para permitir el drenaje se abrió una salida en la vena cava inferior por debajo de la desembocadura de las venas renales. A continuación se abrió la cavidad torácica para permitir el drenaje por la porción torácica de la vena cava inferior y se continuó la perfusión utilizando 60 mg de colagenasa en 150 mL de solución Hepes con $CaCl_2$ 1mM a 37°C a través de vena porta hasta disgregación completa del órgano. Los hepatocitos aislados y filtrados se lavaron 3 veces con medio de siembra, se centrifugaron 5 min a 500 rpm y se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de $1,5 \times 10^6$ células por pocillo en medio WilliamsE (Lonza) conteniendo 25 mmol/L de glucosa, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, 100 nM de insulina, 1 µM de Dexametasona, suplementado con 5% de suero bovino fetal.

6 – Transfección y Ensayos de Luciferasa

6.1 – Células HEK293T

Para los ensayos de luciferasa, las células HEK293T se transfectaron por el método de fosfato cálcico. Tres horas antes de la transfección se cambió la mitad del medio de siembra por medio fresco. La mezcla de reacción se preparó con: 88,3 μL de H_2O , 850 ng de plásmido de expresión de Firefly luciferasa, 50 ng de plásmido de expresión de Renilla luciferasa (pRL-TK) utilizado como control de transfección, 100 μL de HBS 2X (NaCl 0,3 M, Na_2HPO_4 0,66 mM, HEPES 50 mM pH 7,05) y 10 μL de CaCl_2 2 M en este orden y agregando todos los componentes gota a gota. La mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se añadió gota a gota al cultivo celular al 90% confluencia distribuyéndolo por todo el pocillo. En los experimentos de transactivación de gen reportero por sobreexpresión ectópica de factor de transcripción, se co-transfectaron 100 ng de los siguientes vectores de expresión: pcDNA3, pcDNA3-EGR1, pCMV ó pCMV-SP1. Las actividades de transactivación se midieron 24 hs post-transfección en un luminómetro Wallac 1420 VICTOR utilizando el sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) y siguiendo las instrucciones del manual técnico. Brevemente, se quitó el medio de cultivo y se lisaron las células con Passive Lysis Buffer durante 15 minutos en agitación. Se recogió el volumen completo de buffer de lisis de cada pocillo en tubo eppendorf. En una placa de 96 pocillos se mezclaron 60 μL del sustrato de la Firefly luciferasa LAR II (Luciferase Assay Substrate en Luciferase Assay Buffer) con 20 μL de extracto celular, y se midió la actividad luciferasa. A continuación se agregaron 60 μL de Stop & Glo[®] Reagent que detiene la reacción de la Firefly luciferasa y contiene el sustrato para la Renilla luciferasa, midiéndose nuevamente la actividad luciferasa. Los valores obtenidos se expresan como actividad luciferasa relativa Firefly/Renilla.

6.2 – Células HepG2

Las células HepG2 se transfectaron utilizando el método de la Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en medio Opti-MEM I (Invitrogen). Brevemente, por cada pocillo a transfectar se diluyeron 750 ng de plásmido de expresión de Firefly luciferasa y 50 ng de plásmido de expresión de Renilla luciferasa (pRL-TK) en medio Opti-MEM con un volumen final de 50 μ L. En los experimentos del promotor INSIG2 se utilizaron 500 ng del vector -347/+11-luc, 50 ng de Renilla, 50 ng de vector de expresión de ELK1 o SAP1a y 10, 25 o 50 ng de vector de expresión de Ras. En otro tubo se mezclaron 2 μ L de Lipofectamina con 48 μ L de medio Opti-MEM I y después de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se juntaron el DNA diluido con la Lipofectamina diluida y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos DNA-Lipofectamina. La mezcla de reacción se agregó a cada pocillo con células a 70% confluencia. Las actividades de transactivación se midieron 24 hs post-transfección de la misma forma que para las células HEK293T.

6.3 – Hepatocitos de rata en cultivo primario

Los hepatocitos en cultivo primario se transfectaron 4 hs post-siembra con el método de la Lipofectamina 2000 en medio WilliamsE sin antibióticos. Para la transfección se utilizaron 3,8 μ g de plásmido de expresión de Firefly luciferasa y 200 ng de plásmido de expresión de Renilla luciferasa (pRL-TK) en un volumen final de 100 μ L de medio Opti-MEM I, que se mezclaron con 10 μ L de lipofectamina disueltos en 90 μ L del mismo medio por cada pocillo a transfectar. En algunos experimentos se cotransfectó con 1 μ g de los siguientes vectores de expresión: pCMX, pCMX-PPAR α , pCMX-LXR α , pCMX-LXR β , pCMX-RXR. 24 hs post-transfección las células se pusieron en medio de inducción basal (WilliamsE, 0,75% de BSA, 100 nM Dexametasona y 20 mM Glucosa) agregando las sustancias indicadas para cada tratamiento. Para los hepatocitos se utilizaron los siguientes tratamientos: insulina 100 nM, TO901317 1 μ M, ácido araquidónico 100 μ M, WY14643 10 μ M, pCRT-cAMP 100 μ M + teofilina 100 μ M. Las actividades de transactivación se midieron 24

horas post-tratamiento de la misma forma que para las células HEK293T.

Para determinar la concentración de uso del ácido araquidónico se realizó una curva dosis respuesta, midiendo la actividad luciferasa del vector -1564/+1-luc a concentraciones crecientes de ácido araquidónico desde 0 a 500 μM y calculando la viabilidad celular a cada concentración mediante el kit CellTiter-Glo® Luminiscent Cell Viability Assay (Promega). Este kit se basa en la cuantificación del ATP presente, marcador de la presencia de células metabólicamente activas.

7 – RT-PCR

El RNA total de las células HepG2, HEK293T, HeLa o hepatocitos de rata sembradas en placas de 6 pocillos se extrajo utilizando el método del reactivo de Trizol (Invitrogen), basado en el método de Chomczynsky y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Brevemente, se extrajeron las células de cada pocillo con 600 μL de reactivo de Trizol, incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se agregaron 120 μL de cloroformo, se agitó durante 30 segundos y se centrifugó para separar las fases. La fase acuosa superior se traspasó a nuevo tubo y se agregaron 300 μL de isopropanol para precipitar el RNA. El precipitado se lavó con EtOH al 70% y se disolvió en 30 μL de H_2O libre de RNAsas. La integridad y pureza del RNA extraído se analizó en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio y mediante el análisis de la relación de absorbancia a 260/280.

La síntesis de cDNA se realizó por transcripción reversa a partir de 1 μg de RNA total, realizando una desnaturalización mediante incubación de 10 minutos a 65°C en presencia de 50 pmoles de *random* hexámeros, seguido de una reacción de amplificación incubando 10 minutos a 30°C y 45 minutos a 42°C con 37,5 U de transcriptasa reversa *Expand Reverse Transcriptase* (Roche) en presencia de 20 U de inhibidor de RNasa, 10 mM DTT y 1 mM dNTPs en buffer de transcriptasa reversa 1X (el buffer 5X es

TrisHCl 250 mM, KCl 200 mM, MgCl₂ 25 mM, Tween-20 2,5% v/v, pH 8,3). El cDNA obtenido se utilizó como molde para PCR convencional, utilizando oligonucleótidos específicos de las isoformas de SREBP1 e INSIG2 de cada especie estudiada (**Tabla 8**). Como control endógeno se midió la expresión de GAPDH.

Isoforma	Especie	Oligonucleótido
SREBP1a	Humano	dir CGCTGCTGACCGACAT
		rev CAAGAGAGGAGCTCAATG
SREBP1c	Humano	dir GCCATGGATTGCACTTT
		rev CAAGAGAGGAGCTCAATG
INSIG2a	Rata	dir TCTTGATCCAAAGGCAGCGGT
		rev GATGCTGGTGATCACATCTGGT
INSIG2b	Rata	dir TGAAGTGGGGTCTCCCGCA
		rev GATGCTGGTGATCACATCTGGT
INSIG2a	Ratón	dir GAGTAGGTCGGGGGCCGGTCCCT
		rev TGCTCGTGATCACATCTGGTGGAA
INSIG2b	Ratón	dir ATGTCTGTTTATGTGAGCTGGAC
		rev TGCTCGTGATCACATCTGGTGGAA
INSIG2a	Humano	dir TGAGAGTTCTCAGTTGACTTGC
		rev TGCTTGCAATCACATCAGGTG
INSIG2b	Humano	dir GTACGGGGGCTGGTCCCAGAAGAT
		rev TGCTTGCAATCACATCAGGTG
GAPDH	Humano	dir AGCCACATCGCTCAGACACC
		rev ACCCGTTGACTCCGACCTT

Tabla 8: Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de isoformas de SREBP e INSIG. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para identificar la expresión de cada una de las isoformas indicadas. Ante la ausencia de datos en la bibliografía acerca de la secuencia correspondiente a INSIG2 en hamster, para el análisis del mRNA de células CHO se utilizaron los oligonucleótidos utilizados para las isoformas de origen murino.

8 – siRNA

Las células HEK293T y HepG2 fueron transfectadas 48 hs previo a la extracción de RNA total con una mezcla que contenía 100 nM de RNA corto de interferencia sintético prediseñado (siRNA) contra EGR1 humana (siRNA ID#:146223), SP1 humana (siRNA

ID#:1116547 y 143158), ELK1 humana (siRNA ID#:42834), ELK4 (Sap1a) humana (siRNA ID#:3286) o un control negativo (ID#:14611G) (Ambion). Tras la transcripción reversa, el cDNA se utilizó como molde para el análisis por PCR cuantitativa en un sistema de detección 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La cantidad relativa de mRNA de ELK1, SAP1a e INSIG2 se calculó utilizando el método de comparación de la segunda derivada del Ct, normalizada con respecto a la cantidad de GAPDH utilizado como control endógeno. Los oligonucleótidos y sondas Taqman utilizados para analizar el cDNA fueron *Assays-on-demand gene expression product* (Applied Biosystems). La cantidad relativa de mRNA de SREBP1c se calculó mediante cuantificación absoluta con oligonucleótidos específicos por el método de Syber Green utilizando como control endógeno GAPDH. Los oligonucleótidos utilizados fueron: SREBP1c directo 5'-CCATGGATTGCACTTTTCGAA-3', SREBP1c reverso 5'-GGCCAGGGAAGTCACTGTCTT-3', GAPDH directo 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3', y GAPDH reverso 5'-ACCCGTTGACTCCGACCTT -3'.

En algunos experimentos, las células HEK293T fueron co-transfectadas con siRNA y un vector de expresión de luciferasa SREBP1a-luc o los vectores control pEBS1⁴-luc ó pAld-GCB⁴-luc. En estos experimentos se midió la actividad luciferasa a las 48 hs horas post-transfección y se determinó la expresión relativa al siRNA control negativo.

9 – Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Las proteínas SP1, EGR1, PPAR α , LXR α , RXR, ELK1, SAP1a, E2F y NRF2 α se sintetizaron *in vitro* utilizando 650 ng de los correspondientes vectores de expresión y un sistema acoplado de transcripción/traducción *in vitro* basado en el lisado de reticulocitos de conejo (TNT T7-coupled reticulocyte lysate system; Promega). Para la reacción se utilizaron 500 ng de los vectores de expresión bajo el control del promotor T7.

Los extractos nucleares de células HEK293T transfectadas con pcDNA3-EGR1 se prepararon utilizando una modificación del método descrito por Fougère y cols. (Azzout-Marniche et al., 2000). Brevemente, las células provenientes de 10 placas de 10 cm se lavaron con PBS y se suspendieron en tampón de lisis (TrisHCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, Nonidet P40 0,5% v/v, Complete Mini 1 comprimido/20 mL de tampón) hasta disrupción completa de las células mediante homogeneizador Douncer, comprobando la presencia de núcleos aislados por tinción con Tripán Blue. Tras una centrifugación de 10 minutos a 500g a 4 °C, se resuspendió el pellet en tampón hipotónico (10 mM Hepes, pH 7,4 NaCl 0,42 M, MgCl₂ 1,5 mM, glicerol 2,5 % v/v, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM y Complete mini 1 comprimido/10 mL de tampón). Se mantuvo en agitación a 4°C durante 30 minutos y se centrifugó a 50000 rpm en un rotor TLA110 durante 30 minutos. El sobrenadante que contenía las proteínas nucleares se guardó en alícuotas a -80°C.

Los ensayos de EMSA se realizaron utilizando oligonucleótidos de DNA de doble cadena que fueron marcados en su extremo 3' utilizando ³²P-γ-ATP y T4 polinucleótido kinasa. Los oligonucleótidos de doble cadena se prepararon por hibridación de 4 μg de cada cadena en tampón de hibridación 1X (el tampón 8X es TrisHCl 586 mM pH7,5, MgCl₂ 104 mM, EDTA 10,4 mM, Espermidina 10, 4 mM, DTT 53,6 mM) calentando 10 minutos a 85°C y dejando enfriar durante toda la noche. La reacción de marcaje radiactivo se realizó incubando 300 ng del oligonucleótido doble cadena con 10 μM de ³²P-γ-ATP, 20 U de T4 PNK y tampón de fosforilación 1X (el tampón 10 X es Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM pH7,5) durante 30 minutos a 37°C. Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados utilizando una columna de Sephadex G25.

Las reacciones de unión a DNA se realizaron a temperatura ambiente durante 20 minutos utilizando cantidades variables de las proteínas recombinantes o los extractos nucleares indicados en cada caso, 9 fmol de sonda marcada, 2 μg de Poli-dIdC y 10 μL de tampón de *binding* 2X (Hepes 40 mM pH 8, EDTA 0,2 mM, NaCl 0,1 M, DTT 2 mM, glicerol 10% y MgCl 10 mM₂) en un volumen final de 20 μL. Los ensayos de *supershift* se realizaron añadiendo los anticuerpos específicos a la mezcla de reacción durante 30 minutos en hielo

antes de añadir la sonda radiactiva. En los ensayos de competición se añadió un exceso de 25 veces de sonda sin marcar a la mezcla de reacción. Los complejos DNA-proteína se separaron en un gel de poliacrilamida no-desnaturalizante al 6% p/v en tampón TBE 0,5X (1X TBE es Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 1 mM), analizándose por exposición en pantalla de imagen IP y cuantificación en un sistema FLA5000 (FUJIFILM).

9.1 – Western blot

La identidad de las proteínas sintetizadas *in vitro* así como la sobreexpresión de EGR1 en los extractos nucleares se analizó mediante ensayo de Western Blot. Las proteínas (5 µL de reacción de TNT ó 10 µg de proteína de extracto nuclear en tampón de carga 2X que consiste en TrisHCl 62,5 mM pH6,8, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, azul de bromofenol 0,01 % p/v, β-mercaptoetanol 5% v/v) se separaron por SDS-PAGE. La electroforesis se realizó en un sistema Mini-PROTEAN 3 Cell Electrophoresis System (Bio-Rad) a 200 V y en tampón compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM y SDS 0,1% p/v. La transferencia se realizó a un membrana de PVDF (Millipore) durante 90 minutos a 100 V y en tampón glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM, metanol 20% v/v. El bloqueo de la membrana se realizó en tampón TBS-T (TrisHCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% v/v) con 5% de leche desnatada en polvo. La inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos específicos para cada proteína (Santa Cruz Biotechnology), un anticuerpo secundario marcado con HRP y revelando con el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham Biosciences).

10 – Ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La técnica de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se basa en la identificación de los factores de transcripción unidos a la cromatina *in vivo* mediante la inmunoprecipitación de proteínas fijadas a la cromatina y posterior amplificación de las secuencias asociadas al factor de interés (**Figura 17**).

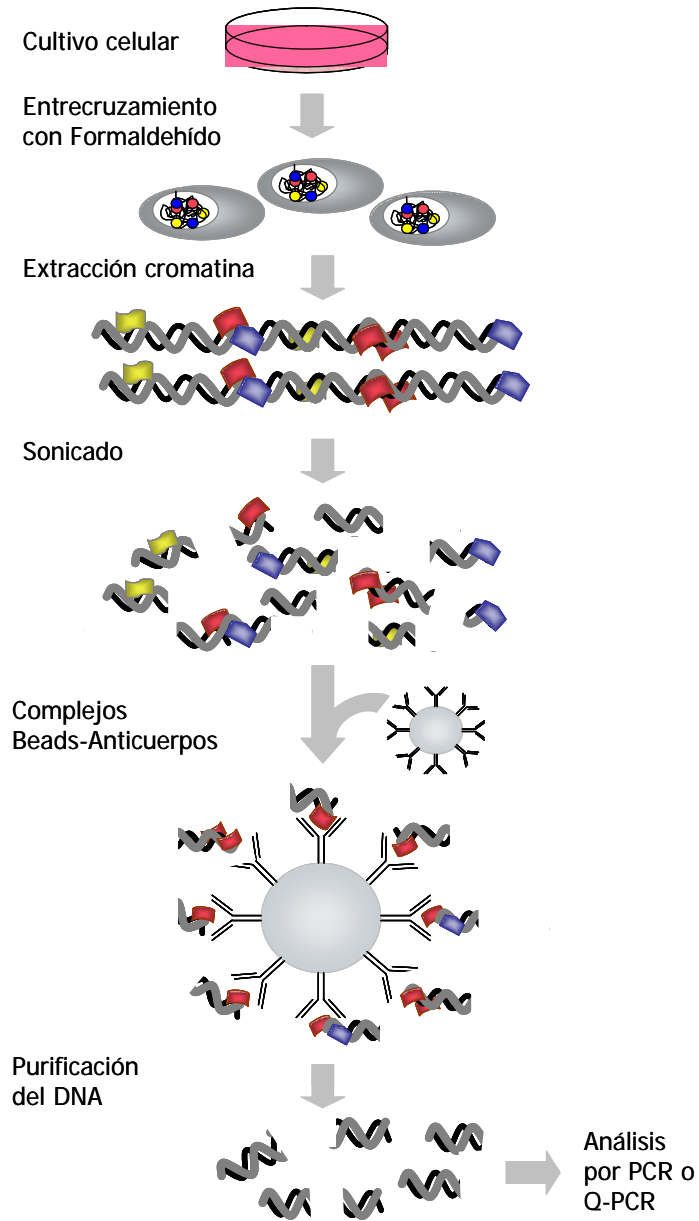


Figura 17: Esquema representativo de un experimento de **Inmunoprecipitación de cromatina**. Las células en cultivo se fijan con formaldehído y se extrae la cromatina que se inmunoprecita con los anticuerpos de interés. El DNA purificado se analiza por PCR o PCR cuantitativa.

Los núcleos aislados de células HEK293T, HepG2 y hepatocitos de rata entrecruzada con formaldehído al 1% durante 10 minutos en agitación, se lisaron y la cromatina fue sonicada en un equipo Bioruptor (Diagenode) hasta alcanzar fragmentos que tuvieran una longitud comprendida entre 200 y 1000 pb (**Figura 18**).

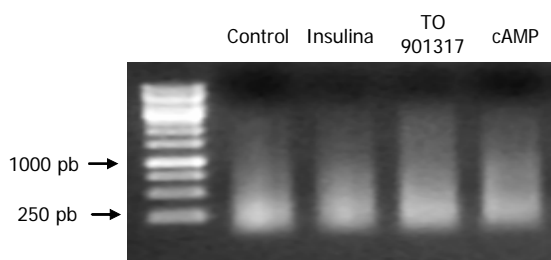


Figura 18: Sonicado de cromatina extraída de hepatocitos de rata en cultivo primario. Las muestras se sonicaron convenientemente hasta alcanzar fragmentos de una longitud comprendida entre 200 y 1000 pb.

La cromatina pre-clarificada se incubó con 2 μ g de los anticuerpos correspondientes contra SP1 (sc-59), EGR1 (sc-110), ELK1 (sc-355), SAP1a (sc-1426), SRF (sc-335), SREBP (sc-8984), LXR (sc-13068), PPAR α (sc-9000), PGC1 (sc-5815), RNA ρ /I (sc-899), IgG de rata (sc-2026) como anticuerpo no reactivo y en ausencia de anticuerpo como control negativo. Una alícuota de la cromatina pre-clarificada sin inmunoprecipitar se utilizó como Input. La cromatina inmunoprecipitada fue eluída con una solución de NaHCO₃ 0,1 M y SDS 1% durante 30 minutos a 65°C y se revirtió el entrecruzamiento incubando a 65°C durante 3 horas, incluyendo la muestra denominada Input. Las muestras se trataron con 1 μ L de RNasaA 10 μ g/mL durante 1 hora a 37°C y se eliminaron las proteínas por tratamiento con 1 μ L de proteinasa K (14-22 mg/mL, Roche) durante 12 hs a 65°C. Tras purificar el DNA de cada una de las muestras mediante un kit de purificación de DNA (QIAquick® PCR purification kit; Qiagen) se analizó el eluido mediante PCR o PCR cuantitativa.

La reacción de PCR se realizó utilizando 4 μ L del DNA purificado de cada una de las muestras, 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M de oligonucleótidos directo y reverso, 4% v/v DMSO, 2 U de Taq DNA polimerasa (Netzyme) en 50 μ L de volumen final conteniendo buffer de reacción 1X con una concentración final de Mg^{2+} 2 mM. El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C y 30 segundos a 72°C, finalizando con un ciclo de 5 minutos a 72°C. Los fragmentos amplificados se analizaron en gel de agarosa al 2,5%. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR se muestran en la **tabla 9**.

Gen	Zona	Oligonucleótido
hSREBP1	Promotor 1a	dir ACTCGGCTTCCTTGCTTGGTGCTG rev CGCCGGCGAAAAGTTCCTCGGA
hSREBP1	Transcribible	dir AGCTTACAGCACAGAACTCCCCTG rev CCCCTGTGGAGCACATGGTG
α -actina (humana)	Promotor	dir TCCAGGTCTAGCCAGTCCTG rev AAAGCTGAGCCACGTCGACC
β -actina (humana)	Promotor	dir TGC ACTGTGCGGCGAAGC rev TCGAGCCATAAAAGGCAA

Tabla 9: Oligonucleótidos utilizados para analizar el DNA purificado de los experimentos de ChIP. Los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta la secuencia diana para la unión de los distintos factores de transcripción en los promotores, de manera que la secuencia de interés se encuentre comprendida dentro del amplicón. Los controles de actina se consideran negativos para la unión de los factores de transcripción estudiados de acuerdo a los datos de bibliografía.

La reacción de PCR cuantitativa se realizó utilizando como sonda fluorescente Syber Green. Para las muestras de hepatocitos de rata se utilizó el reactivo SensiMixTM dT Kit (Quantace), y la concentración final de oligonucleótidos fue 600 nM para los oligonucleótidos del sitio LXRE y 200 nM/300 nM para los oligonucleótidos directo y reverso del sitio SRE. Estas muestras se analizaron en un equipo Rotor-Gene 600 (Corbett), utilizando un

programa de 10 minutos a 95°C, y 35 ciclos 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Para las muestras de células HepG2 y HEK293T se utilizó el reactivo Fast Syber Green (Applied Biosystems), la concentración final de los oligonucleótidos fue 500 nM y las muestras se analizaron en el 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El programa consistió en 20 segundos a 95°C, y 40 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Los oligonucleótidos utilizados en todas las PCR cuantitativas se muestran en la **tabla 10**.

Gen	Zona	Oligonucleótido
rSREBP1	Promotor	dir TGCTGCTGCCATTCAATGCGA
		rev TCGGGTTTCACCGGGTGCTCTG
rSREBP1	Promotor 1c (LXRE)	dir GGACGGCAGTGACCGC
		rev TCACCGGGTGCTCTGAATG
rSREBP1	Promotor 1c (SRE)	dir CTGCTGATTGGCCATGTGC
		rev GCTACCCCTACAGCGTCCG
α-actina (rata)	Transcribible	dir AGGATTCCTACGTGGGCGAC
		rev TAGAGAGACAGCACCGCCTG
β-actina (rata)	Transcribible	dir TTCACCACCCCAGCCATGT
		rev GTGGTACGACCAGAGGCATACA
hINSIG2	Promotor	dir CTCCAGTTTCCCGCAGACC
		rev TCCGGTTCCTGCTGTCAATAA
c-fos (humano)	Promotor	dir GCGAGCAGTTCCCGTCAAT
		rev GAAAGGCCGTGGAAACCTG
GAPDH (humano)	Transcribible	dir AGCCACATCGCTCAGACACC
		rev ACCCGTTGACTCCGACCTT

Tabla 10: Oligonucleótidos utilizados para analizar el DNA purificado de los experimentos de ChIP. Los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta la secuencia diana para la unión de los distintos factores de transcripción en los promotores, así como los sitios negativos utilizados como control.

Para la autenticación de los productos de PCR obtenidos con cada par de oligonucleótidos se realizaron curvas de *melting* para los amplicones, y para la cuantificación se realizaron curvas de calibración utilizando diluciones seriadas 1/10 a partir de la muestra "Input". Para la cuantificación, la dilución 1/10000 se consideró como 1. En la **figura 19** se muestran las curvas de *melting* y calibración

para cada uno de los oligonucleótidos utilizados en las PCRs cuantitativas.

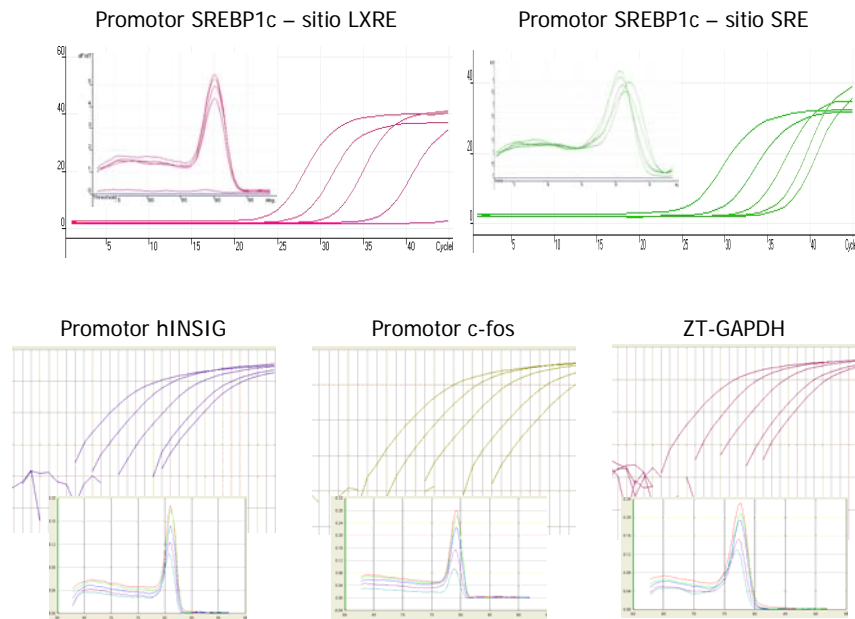


Figura 19: Autenticación de los productos de amplificación de las PCR cuantitativas. Las curvas de *melting* y las curvas de amplificación de los estándares utilizados en la cuantificación se muestran en la figura para cada par de oligonucleótidos utilizados en el análisis de CHIP.

11 – Análisis estadístico de los datos

Los datos se han expresado como medias \pm desvío estándar según el análisis estadístico realizado mediante el test de t de Student de dos colas, considerándose estadísticamente significativos para * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$, como se indica en cada caso.

Resultados

1 – Promotor SREBP1a

Las variantes SREBP1a y 1c presentan una regulación diferencial de su actividad transcripcional. Se dice que la proteína SREBP1a es constitutivamente activa y aunque en la mayoría de tejidos humanos se encuentra expresada a bajos niveles, esta proteína se expresa en gran cantidad en células en cultivo. Sobre la base de estudios previos del promotor SREBP1a en rata nos propusimos estudiar la regulación del promotor de este gen en humanos. En primer lugar analizamos la expresión de las isoformas SREBP1a y 1c en distintas líneas celulares. De esta forma pudimos confirmar que nuestras líneas celulares expresan las proteínas SREBP1 de la forma esperada con mayoría de transcrito SREBP1a (**Figura 20**). Además, en el caso de la línea embrional de riñón HEK293T se observa que existe una expresión única de la isoforma 1a siendo indetectable la isoforma 1c.

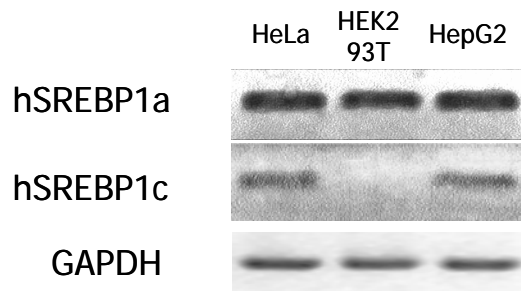


Figura 20: Expresión de las isoformas SREBP1a y 1c en líneas celulares humanas. Se purificó el RNA total de diferentes líneas celulares y se sometió a RT-PCR. La expresión de cada una de las isoformas se analizó mediante PCR con cebadores específicos que reconocen al exón 1a y 1c. SREBP1a es la isoforma predominante en todas las líneas celulares analizadas. En el caso de las células HEK293T la expresión de la isoforma 1c es indetectable por este método. La expresión de GAPDH se utilizó como control.

1.1 - Análisis funcional de la región 5´proximal del promotor humano SREBP1a

Para estudiar la regulación del promotor SREBP1a humano (hSREBP1a) generamos una serie de construcciones mediante

delecciones progresivas del promotor que se extienden hasta 2 kb en posición 5´ desde el codón de iniciación de la traducción ATG (que se considera +1), dirigiendo la expresión del gen reportero luciferasa. Estas construcciones se transfectaron luego en células HEK293T. El análisis de la actividad luciferasa nos reveló que una región de 75 pb *upstream* con respecto al sitio de inicio de la transcripción de este gen es suficiente para mantener la actividad completa del promotor (Figura 21).

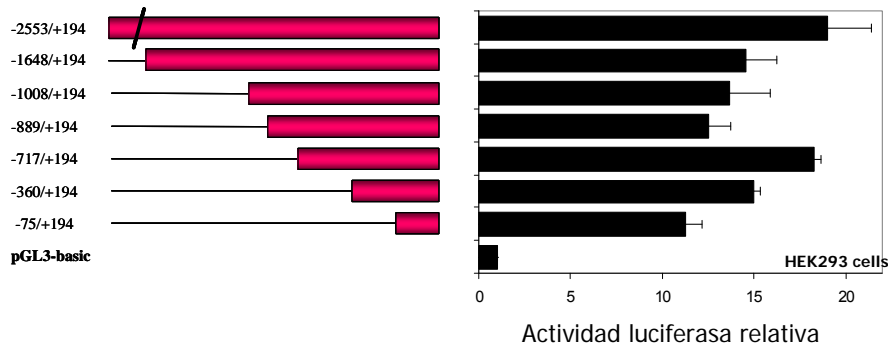


Figura 21: Análisis de la actividad transcripcional de la región promotora proximal de SREBP1a humano. Las secuencias del promotor hSREBP1a en delecciones progresivas se insertaron en el vector de expresión de luciferasa pGL3-basic y se transfectaron en células HEK293T. Se calculó la activación relativa al vector vacío y normalizada con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estandar de al menos 3 experimentos independientes. No existen diferencias significativas entre las distintas construcciones.

La secuencia comprendida entre -310 y +285 del promotor hSREBP1a se analizó utilizando el programa TRANSFAC (Biobase biological databases) de predicción de posibles sitios de unión a factores de transcripción. La secuencia de este promotor no contiene TATA box reconocible mientras que se pueden identificar 3 cajas GC, que corresponden a sitios de unión de factores de la familia SP1. También fueron identificados con una alta probabilidad sitios de unión para otros factores como NFY y NFkB (Figura 22).

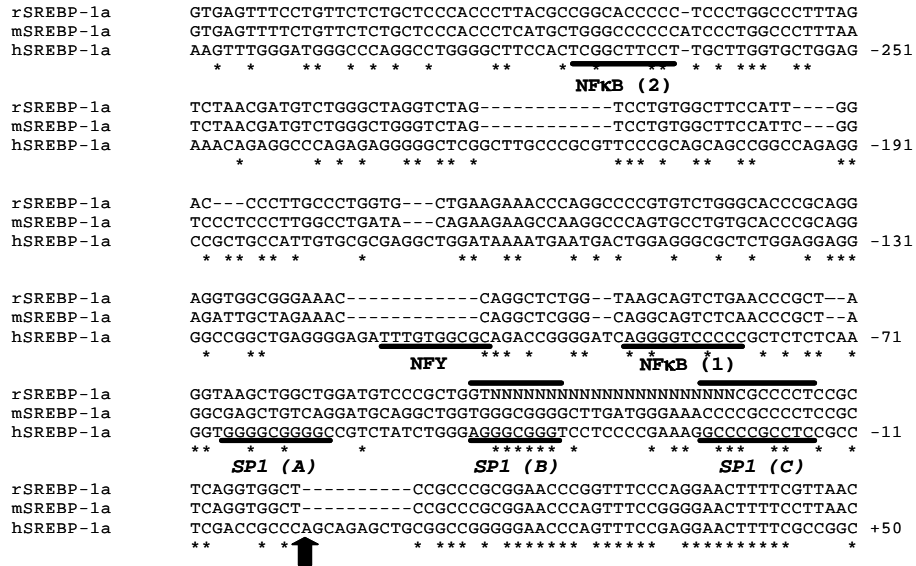


Figura 22: Alineamiento de las secuencias del promotor SREBP1a de rata, ratón y humano. Las secuencias de 1700 pb de los promotores de las 3 especies, incluyendo hasta 200 pb por debajo del ATG se alinearon mediante ClustalW. En la figura se muestran 350 pb del alineamiento incluyendo los resultados del análisis con TRANSFAC que identifica posibles sitios de unión a SP1, NFκB y NFY así como también el sitio de inicio de la transcripción en el gen humano (flecha).

Con el fin de estudiar la contribución de las cajas GC a la activación del promotor se generaron mutantes simples, dobles y triples de los plásmidos reporteros. Tras la transfección transitoria en células HEK293T de los plásmidos mutantes, se observa una caída brusca de la actividad luciferasa con respecto al plásmido silvestre en el mutante simple denominado C, en los dobles AB, AC y BC y en el triple mutante, este último con una actividad similar al vector vacío pGL3-basic. Estos datos indican una activación fundamental, aunque no exclusiva mediada por las cajas GC. Además, el sitio en posición 3' (C) parece ser crucial para la actividad del promotor en células HEK293T (Figura 23).

Resultados

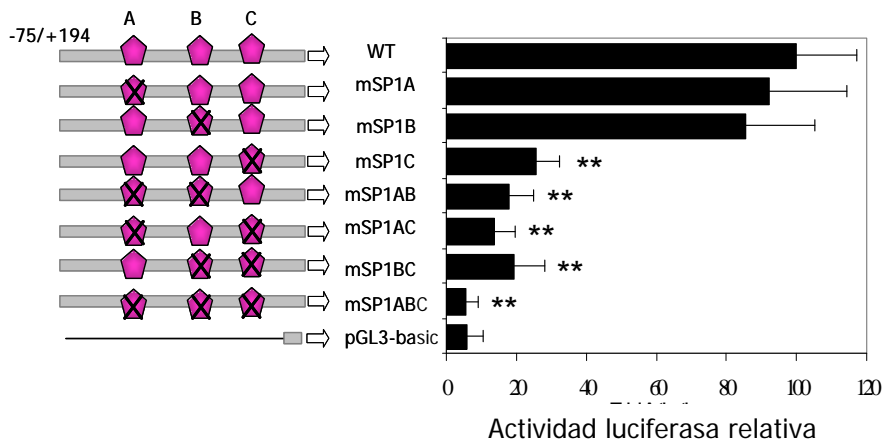


Figura 23: Análisis de construcciones mutantes para los diferentes sitios SP1. En el gráfico se muestra la actividad luciferasa de cada uno de los mutantes con respecto a la construcción silvestre, que se considera como 100%. Los sitios mutados en cada construcción se indican con una X (** p < 0,001).

El análisis computacional (TRANSFAC) del promotor hSREBP1a predice además 2 posibles sitios de unión al factor nuclear kappa B (NFκB) y una caja CCAAT (sitio de unión a NFY) inmediatamente por encima de las cajas GC, que no están presentes en las secuencias de rata y ratón. Sin embargo, la eliminación de cualquiera de estos elementos no produjo ninguna alteración significativa de la actividad del promotor (Figura 24).

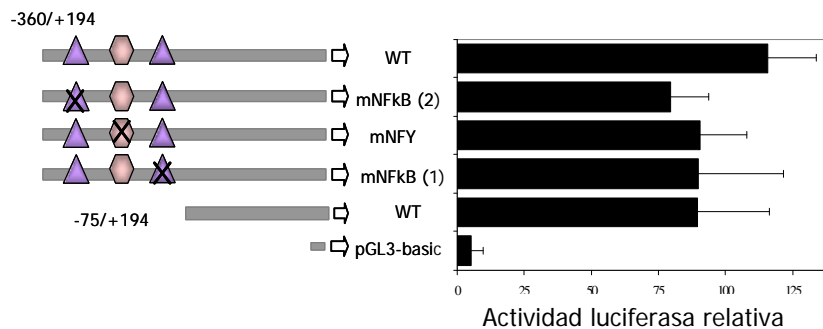


Figura 24: Análisis de mutantes para sitios NFκB y NFY en el promotor humano. En el gráfico se muestra la actividad luciferasa en células HEK293T transfectadas con cada uno de los mutantes con respecto a la construcción silvestre que se considera como 100%. Los sitios mutados en cada construcción se indican con una X. No existen diferencias significativas entre las distintas construcciones.

1.2 - Identificación de los activadores de SREBP1a

Para evaluar la unión *in vitro* de los factores de transcripción SP1 a las cajas GC del promotor mínimo proximal comprendido entre -77/-1 utilizamos el ensayo EMSA. Tres oligonucleótidos conteniendo cada uno de los sitios de unión a SP1, esquematizados en la **figura 25**, se incubaron en presencia de proteína recombinante humana SP1. Los tres sitios analizados son reconocidos por este factor ya que se observa un complejo DNA-proteína que es específicamente retardado con un anticuerpo monoclonal anti-SP1. Además, el complejo desaparece con un exceso de sonda fría, competencia no observada cuando se utilizan oligonucleótidos mutados. Estos resultados demuestran que los elementos de unión a SP1, esenciales para la actividad basal del promotor SREBP1a, son capaces de unirse a este factor *in vitro*.

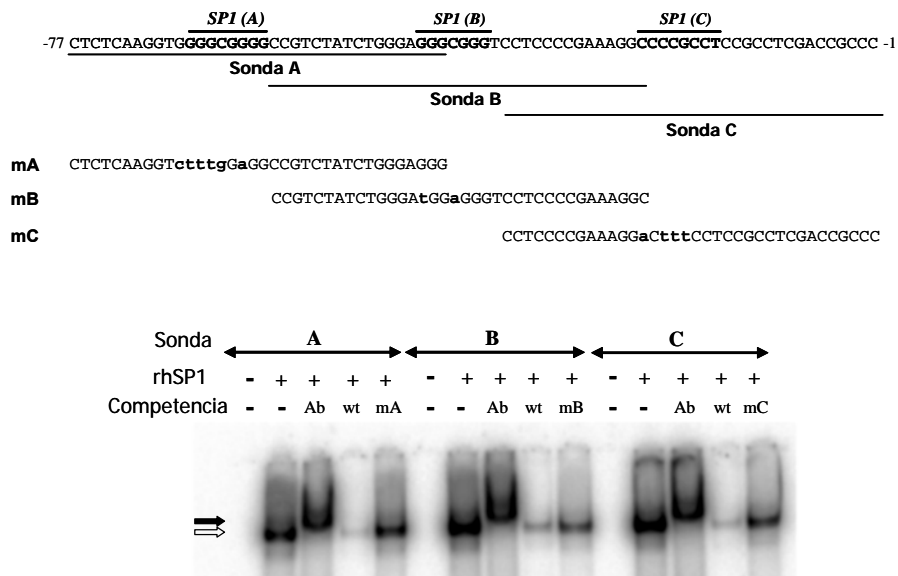


Figura 25: El factor de transcripción SP1 se une al promotor proximal humano SREBP1a. Esquema de los tres oligonucleótidos utilizados como sondas en el ensayo mostrando las secuencias de unión a SP1 y las secuencias de las sondas mutantes. El retardo de unión de esta secuencia a la proteína recombinante se muestra en la autoradiografía para los tres oligonucleótidos (flecha blanca), así como el retardo producido en presencia del anticuerpo específico (flecha negra).

1.3 - Elementos superpuestos SP1/EGR1 regulan al promotor SREBP1a humano

En la secuencia comprendida entre -77 y -1 se observó que los sitios de unión para SP1 contenían sitios superpuestos para el factor EGR1. Por esto, examinamos la posible competencia entre ambos factores utilizando los oligonucleótidos descritos en la **figura 23**. Cuando las sondas de DNA se incuban con cada uno de los factores por separado se observa la formación de 2 complejos con movilidad característica. Además SP1 y EGR1 se unen por separado y específicamente al DNA cuando se incuban simultáneamente. Un anticuerpo específico anti-EGR1 es capaz de desplazar sólo la banda menos retardada correspondiente al complejo con EGR1 sin alterar la banda correspondiente al complejo con SP1. Aunque ambos factores se unen a los 3 sitios, parece que EGR1 presenta mayor afinidad por el sitio C (**Figura 26**).

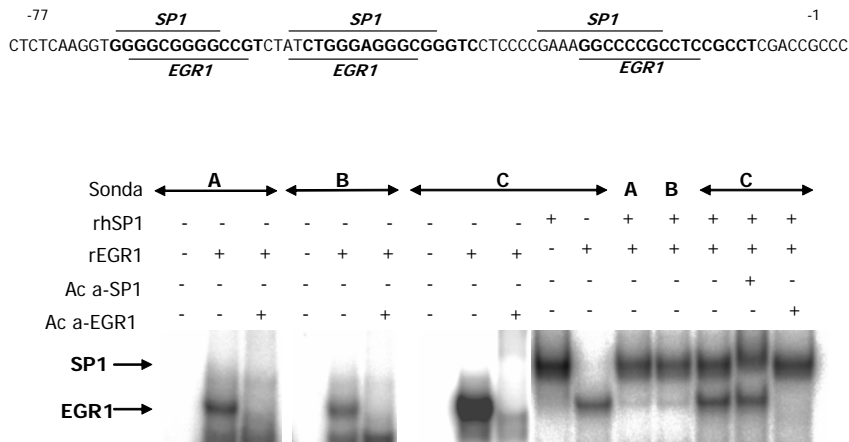


Figura 26: Unión de SP1/EGR1 a sitios superpuestos en el promotor hSREBP1a. La secuencia de 75 pb muestra los sitios de unión superpuestos para ambos factores de transcripción. Las proteínas recombinantes (rhSP1:proteína recombinante humana SP1 (Promega), rEGR1. proteína EGR1 sintetizada in vitro con sistema TNT) se usaron en el ensayo de EMSA para comprobar la unión de ambos factores *in vitro*. La especificidad de cada banda se evaluó utilizando anticuerpos monoclonales anti SP1 y EGR1.

Evaluamos entonces si EGR1 era capaz de unirse a este complejo compitiendo con SP1 en los 3 elementos GC. Cuando se realizó el ensayo utilizando cantidades crecientes de proteína EGR1 manteniendo constante la cantidad de SP1, se observó que la proteína EGR1 se unía a cada uno de los elementos GC compitiendo con SP1 por estos sitios en el promotor (**Figura 27**).

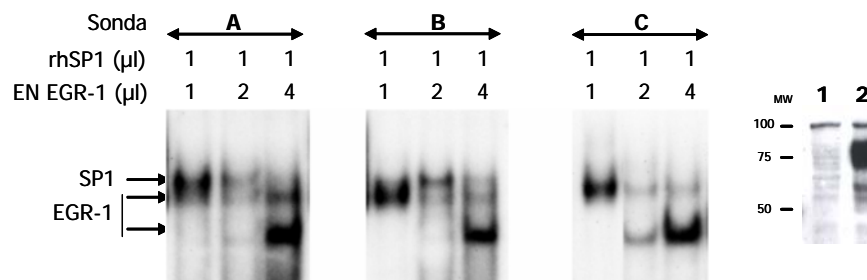


Figura 27: Competencia por los sitios de unión de SP1/EGR1 entre ambos factores de transcripción. Un autoradiograma representativo de tres experimentos muestra la competencia que ejercen cantidades crecientes de EGR1 sobre la unión de SP1 al promotor. El ensayo se realizó con extractos nucleares de HEK293T que sobreexpresan EGR1 (EN EGR1). A la derecha se muestra la expresión de la proteína EGR1 analizada por Western-blot en los extractos nucleares de células transfectadas con vector vacío (1) y con vector de expresión para EGR1 (2).

Para verificar la unión *in vivo* de los factores de transcripción SP1 y EGR1 en el promotor SREBP1a, llevamos a cabo un experimento de CHIP en células HEK293T. Tras la inmunoprecipitación y reversión del entrecruzamiento, se evaluó el enriquecimiento del promotor hSREBP1a mediante amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región -277/+51. Los factores SP1 y EGR1 están presentes en el promotor humano SREBP1a, mientras que no se inmunoprecipita la región correspondiente a la zona transcripcionalmente activa. Como control de los resultados obtenidos, las mismas muestras se utilizaron para un ensayo de RNAPol-CHIP. El anticuerpo α -RNA polimerasa precipita fragmentos tanto del promotor como de la región codificante, confirmando el estado activo del transcrito SREBP1a en células HEK293T (**Figura 28**).

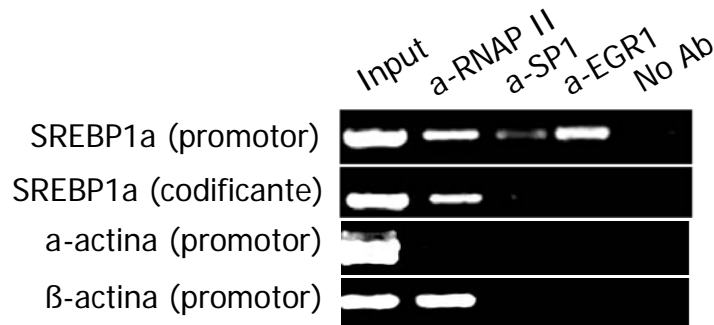


Figura 28: SP1 y EGR1 se unen al promotor hSREBP1a *in vivo* en células HEK293T. La cromatina soluble se preparó a partir de células HEK293T. Se muestra el análisis por PCR del DNA extraído de las muestras input, inmunoprecipitados con los distintos anticuerpos o en ausencia de anticuerpo, con cebadores para las regiones promotoras y codificante de SREBP1a y para α - y β -actina, estos últimos utilizados como control negativo y positivo respectivamente de la inmunoprecipitación con RNA-polIII.

Según los resultados obtenidos previamente, evaluamos si la proteína EGR1 era capaz de afectar directamente a la actividad del promotor humano SREBP1a mediante un ensayo de luciferasa. Como se ve en la **figura 29**, EGR1 es capaz de inhibir la actividad luciferasa de la construcción -75/+194 SREBP1a-luc. La sobreexpresión de EGR1 fue capaz de aumentar la actividad luciferasa del vector reportero pEBS1⁴luc utilizado como control positivo. Este plásmido contiene cuatro sitios de unión sucesivos para EGR1 derivado del promotor de la sinapsina I humana inmediatamente por encima de la TATA box. También se estudió en experimentos de transfección transitoria en células HEK293T el papel esencial de SP1 en la regulación positiva del promotor humano SREBP1a. La expresión de SP1 produjo un aumento de la actividad luciferasa bajo el control del promotor SREBP1a. Un gen reportero bajo el control de cuatro copias de elementos ricos en GC del gen de la aldolasa C, una TATA box, y el *open reading frame* de la luciferasa (pAld-GCB⁴) se utilizó como vector de expresión de luciferasa SP1 dependiente.

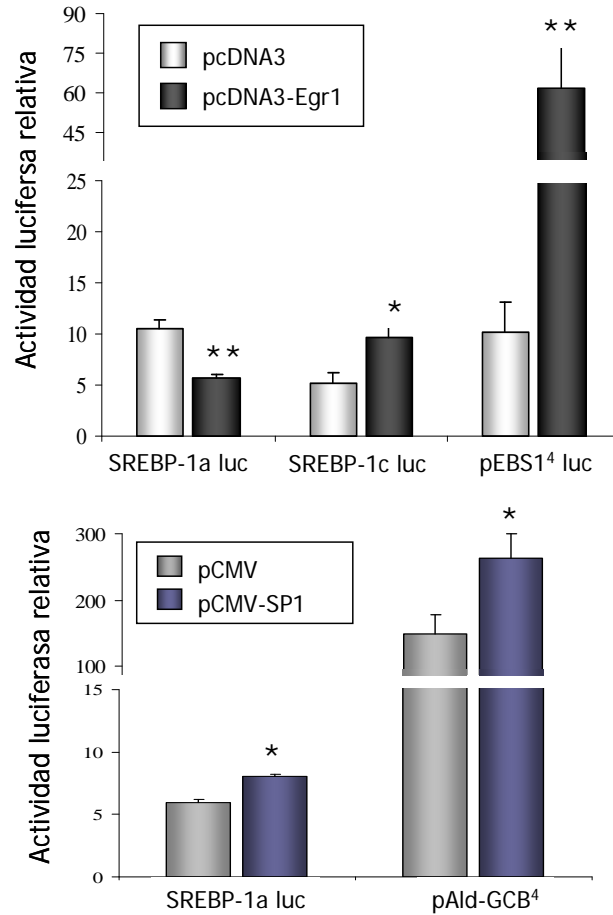


Figura 29: La sobreexpresión de EGR1 inhibe al promotor SREBP1a. Los plásmidos de expresión para SP1 y EGR1 se cotransfectaron en células HEK293T con plásmidos de gen reportero luciferasa conteniendo el promotor de SREBP1a (SREBP1a-luc), el promotor de SREBP1c (SREBP1c-luc) o plásmidos controles para demostrar la activación debida a la sobreexpresión de EGR1 (pEBS1⁴luc) y SP1 (pAld-GCB⁴). 24 hs post-transfección, se lisaron las células y se midió la actividad luciferasa. Las actividades se expresan como la media de la relación firefly/renilla relativo a la actividad del vector vacío (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$).

Para confirmar este papel inhibitorio de EGR1, se transfectaron células HEK293T con siRNA gen específicos para SP1 y EGR1. La transfección con siRNA disminuye un 75% y un 90% la

expresión de mRNA de EGR-1 y SP1 respectivamente. En el caso de siRNA para EGR1, la actividad promotora del fragmento de 75 pb de SREBP1a, así como la expresión endógena de SREBP1, fue significativamente mayor que en aquellas células transfectadas con el siRNA control. Cuando se transfecta con siRNA para SP1 se observa el efecto contrario, disminuyendo la actividad del promotor SREBP1a (Figura 30).

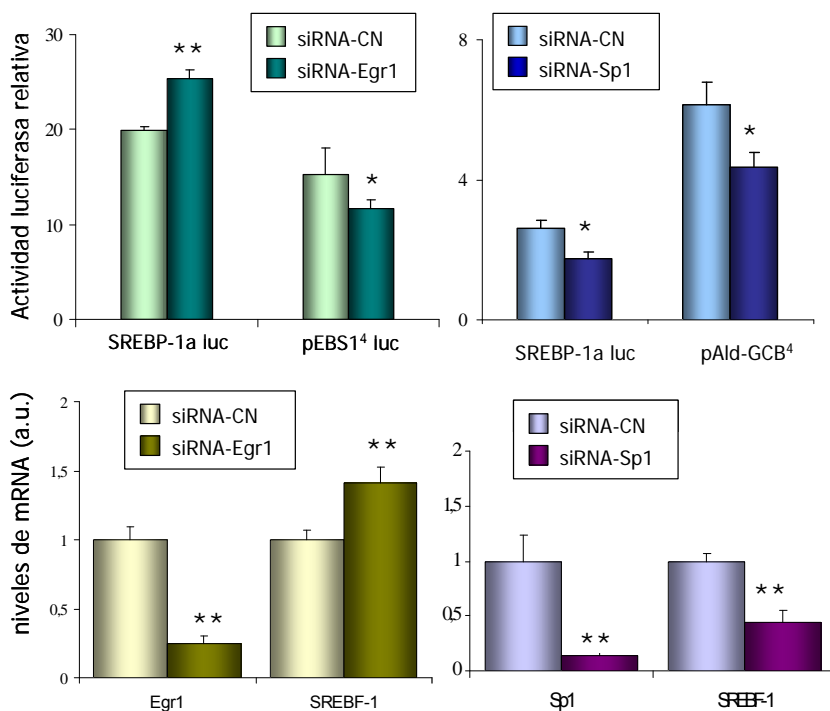


Figura 30: Regulación recíproca del promotor SREBP1a mediada por SP1/EGR1. La células HEK293T se cotransfectaron con siRNA para SP1 o EGR1 y el plásmido reportero para la luciferasa con el promotor SREBP1a o los plásmidos control. Se analizó la actividad por ensayo de actividad luciferasa. En células transfectadas sólo con el siRNA se analizó la expresión de EGR1/SP1 y SREBP endógeno por RT-PCR 48 hs post-transfección (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$).

2 – Promotor SREBP1c

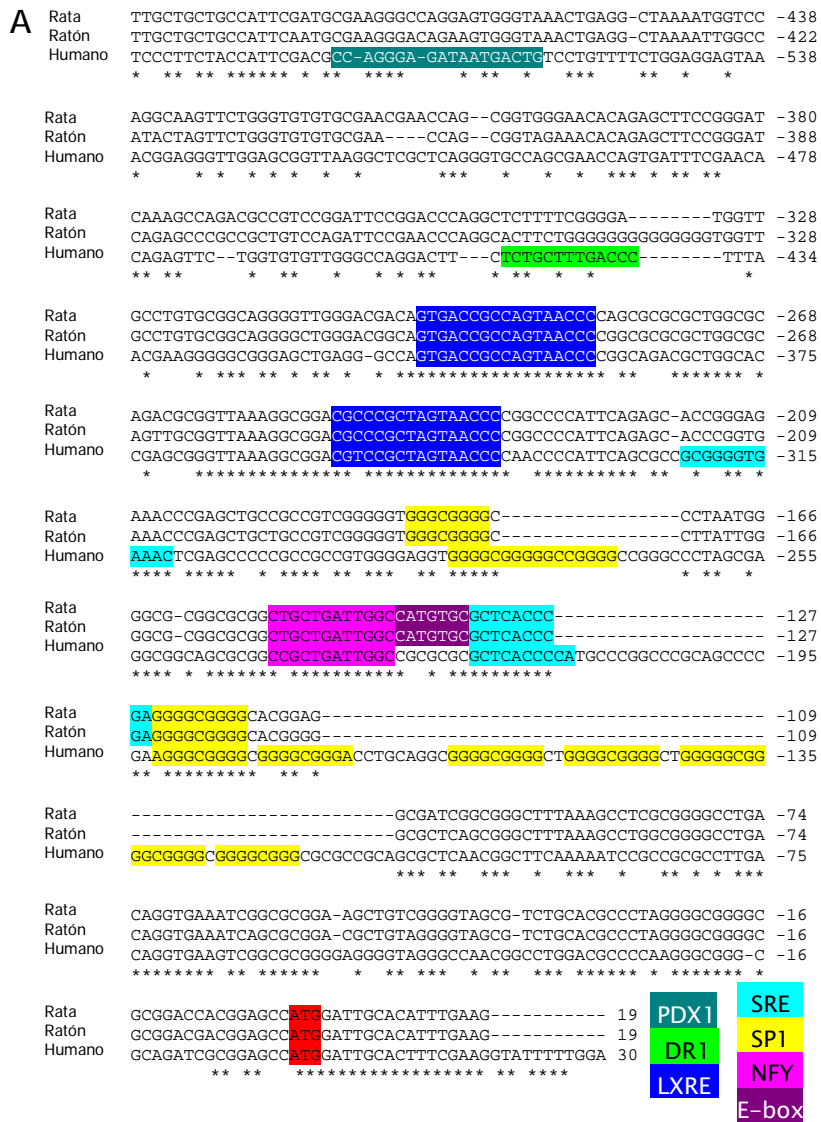
Aunque existen en la bibliografía numerosos datos acerca de la regulación del promotor SREBP1c en rata y ratón, poco se puede encontrar en cuanto a la regulación del promotor humano. Una de las características más relevantes de la regulación de este promotor, especialmente a nivel hepático, es la respuesta a insulina. Curiosamente, y según se ha demostrado en distintos estudios, esta regulación desaparece cuando el análisis se realiza mediante estudios de transfección transitoria en líneas celulares, mientras que existe una clara estimulación del promotor cuando los estudios se realizan en células en cultivo primario. El hecho de que las líneas celulares no expresan la proteína SREBP1c de forma constitutiva podría estar relacionado con esta falta de respuesta. Por esta razón, los estudios de este promotor se realizaron en hepatocitos de rata, ya que no se dispone de ningún modelo de líneas celulares de origen humano en las que SREBP1c responda a insulina de la misma forma que lo hace en los tejidos *in vivo*.

2.1 – Promotor proximal y actividad basal

Para estudiar la regulación del promotor humano SREBP1c (hSREBP1c) se realizó, en primer lugar, un alineamiento de secuencias con las correspondientes al promotor murino y de rata. Aunque existen algunas diferencias claras a nivel distal, se puede observar que en la región cercana al ATG ambos promotores sólo se distinguen por tres características (**Figura 31A**). La primera es la presencia en el promotor de rata y ratón de una caja E ausente en humanos. Sin embargo, aunque éste es un posible sitio de unión para la proteína SREBP, los estudios realizados previamente demostraron que este sitio no afectaba la respuesta a insulina del promotor de rata (Cagen et al., 2005). La segunda diferencia es que en el caso de humanos se pueden identificar varios sitios SP1 adyacentes que corresponden a un único sitio en el promotor de rata.

La tercera diferencia entre ambos promotores es la presencia de un segundo sitio SRE en el promotor hSREBP1c ausente en el de rata y ratón. Esta secuencia constituye un sitio de unión a la misma

Resultados



B

Motivo consenso	RG(G/T)TCA	DR4 consenso	AGTTCA CGTA AGTTCA
DR1	AGGTCA A AGGTCA	LXRE1 SREBP1c (inv)	GGGTTA CTGG CGGTCA
DR1 SREBP1c (inv)	GGGTCA A AGCAGA	LXRE2 SREBP1c (inv)	GGGTTA CTAG CGGACG

Figura 31: Comparación de las secuencias del promotor SREBP1c de rata, ratón y humano. A - Las secuencias de cada especie se compararon utilizando ClustalW. El sitio de inicio de la traducción ATG se indica en rojo. Los sitios putativos de unión de los factores de transcripción estudiados se muestran en la leyenda. **B** - Comparación de los sitios DR1 y LXRE del promotor humano con las secuencias consenso de estos elementos.

proteína SREBP y es responsable de la autoactivación del promotor (Amemiya-Kudo et al., 2000; Cagen et al., 2005). Así, se puede suponer que al menos *in silico* no hay diferencias entre los promotores de las tres especies y por lo tanto la actividad basal del promotor hSREBP1c, comprendida en la región proximal, debería depender de secuencias similares a las de rata y ratón.

En la zona promotora comprendida entre -330 y -500 pb del promotor hSREBP1c se encuentran dos secuencias DR4, reconocidas como sitios LXRE en los promotores de rata y ratón, y una secuencia DR1 posible sitio de unión al factor HNF4. En la **figura 31B** se muestra el alineamiento de las secuencias DR4 y DR1 del promotor hSREBP1c con las secuencias consenso para estos sitios de unión. Aproximadamente a 600 pb del inicio de la traducción se puede reconocer un posible sitio de unión para el factor PDX1. Dado que HNF4 y PDX1 son dos factores relevantes a nivel metabólico, se consideró oportuno incluirlos en nuestro estudio.

En base al alineamiento de secuencias y teniendo en cuenta los estudios realizados previamente en los promotores de rata y ratón, se realizó un esquema de comparación de la estructura de este promotor en ambas especies, incluyendo los principales sitios de regulación (**Figura 32**).

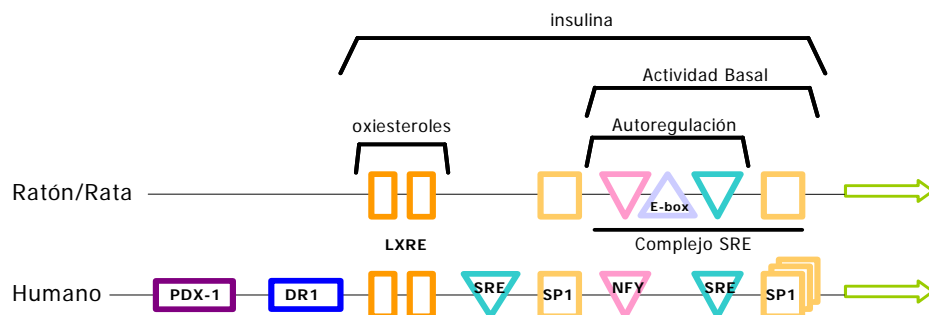


Figura 32: Esquema de los promotores SREBP1c y su regulación. En este esquema se resumen los datos previos de regulación del promotor murino así como la comparación entre especies de los sitios de unión de los factores de transcripción estudiados.

Para el estudio del promotor hSREBP1c se generaron una serie de construcciones dirigiendo la expresión del gen reportero luciferasa mediante deleciones progresivas a partir de una secuencia de 1500 pb que incluye todos los sitios previamente descritos. Los plásmidos obtenidos se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario y se realizó un análisis de actividad luciferasa en condiciones basales. Como se puede observar en la **figura 33**, una construcción de 310 pb que contiene al ATG es capaz de mantener una actividad que es significativamente equivalente a la que presenta la construcción completa -1564/+1-luc. En la misma figura se muestra una construcción en la que se ha delecionado una secuencia de 158 pb que contiene los sitios que se suponen responsables de la actividad basal y que presenta actividad similar al vector vacío. Estos datos demuestran que la actividad basal del promotor humano se encuentra comprendida en 310 pb por encima del ATG del exón 1c del gen *SREBF1*, y que los sitios activos del promotor coinciden con los sitios responsables de la actividad de los promotores de rata y ratón.

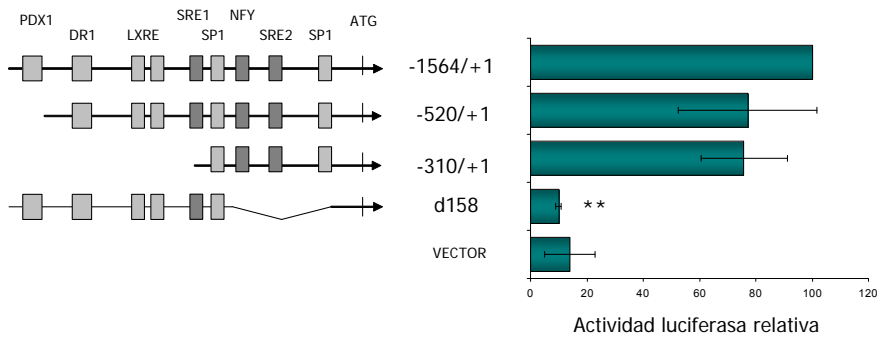


Figura 33: Análisis de la actividad transcripcional de la región promotora de SREBP1c humano. Las secuencias del promotor humano SREBP1c en deleciones progresivas insertadas en el vector de expresión de la luciferasa pGL3-basic, se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. Se calculó la actividad relativa a la construcción -1564/+1, que se considera 100%, y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (** p < 0,001).

A continuación se realizaron mutantes puntuales de tres sitios responsables de la actividad basal comprendidos en la construcción -310/+1 denominados SP1, NFY y SRE2, en el contexto de la construcción -1564/+1 que contiene al promotor hSREBP completo que denominamos 1c1500. Estas construcciones se utilizaron para realizar un nuevo ensayo de luciferasa. Como se puede observar en la **figura 34**, los mutantes NFY y SRE2 produjeron una disminución significativa de aproximadamente un 30% de la actividad del promotor completo. El mutante SP1 no produjo ningún cambio de la actividad del promotor. Este resultado negativo es consistente con la presencia en el promotor hSREBP1c de varios sitios de unión a SP1 cercanos al ATG, capaces de compensar la pérdida de un único sitio. Sólo cuando se eliminaron todos los sitios estudiados a la vez (d158) se anuló por completo la actividad de este promotor.

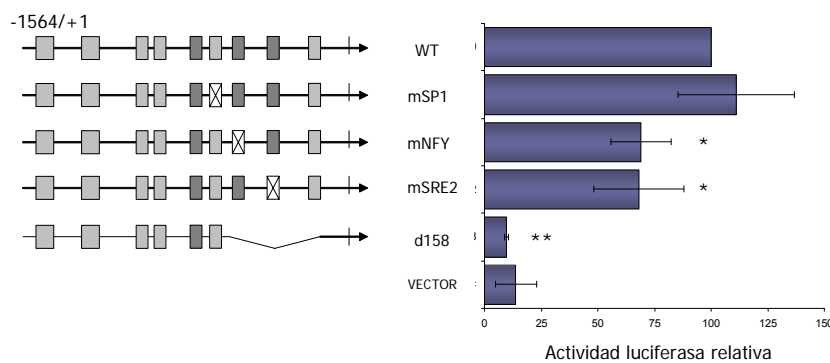


Figura 34: Análisis de la actividad transcripcional de mutantes puntuales de la región promotora de SREBP1c humano. Se realizaron mutantes puntuales de los sitios responsables de la actividad basal del promotor hSREBP1c y se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. Se calculó la actividad relativa al vector pRL-TK utilizado como control de transfección. La construcción silvestre (WT) se considera 100% actividad. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Los sitios de unión a la proteína SP1 presentes en este promotor, al igual que en el caso del promotor hSREBP1a, se encuentran solapados con sitios de unión a EGR1. Pero, a diferencia de este último, la sobreexpresión de EGR1 al igual que la de SP1 produce una activación del promotor hSREBP1c y no una inhibición

(Figura 29). Esto demuestra que existe una regulación diferencial en ambos promotores que puede ser relevante en cuanto a la regulación de la expresión basal de ambas isoformas.

2.2 – Regulación por insulina

En los estudios realizados en rata se ha demostrado que la actividad del promotor SREBP1c aumenta en respuesta a insulina tras un tratamiento en presencia de la hormona de al menos 24 horas (Deng et al., 2002). Para comparar los promotores de ambas especies en cuanto a su respuesta a insulina, se clonaron 1500 pb del promotor SREBP1c de rata en el vector de expresión de luciferasa. Los vectores con cada uno de los promotores se transfectaron en hepatocitos de rata y se realizó un ensayo de actividad luciferasa, previo tratamiento durante 24 horas con 100 nM de insulina o en ausencia de la hormona (control). Como se puede observar en la figura 35, el promotor humano también respondió al tratamiento con insulina aunque a diferencia del de rata que aumentó más de 7 veces en presencia de la hormona, en el promotor humano sólo se observó un aumento de máximo 4,5 veces. Es importante resaltar que la actividad basal del promotor rSREBP1c en los hepatocitos de rata es 2 veces mayor que la del promotor humano. El uso de células de una especie diferente puede ser la razón de estas diferencias.

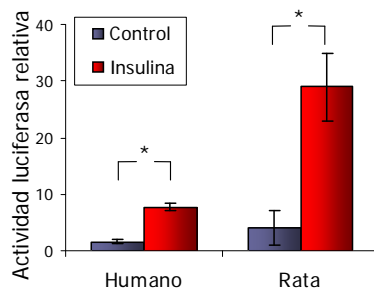


Figura 35: Activación mediada por insulina. Los promotores humano y de rata insertados en el vector pGL3-basic se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. 24 hs post-transfección se trataron con 100 nM insulina durante 24 hs. Se calculó la actividad relativa al vector vacío y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección (* $p < 0,05$).

Uno de los puntos más controvertidos en cuanto a la regulación del promotor SREBP1c se encuentra en la determinación del o los sitios responsables de la acción de la insulina. Mientras que algunos autores apuntan que la insulina actúa a nivel del sitio SRE, a través de la autoregulación, otros aseguran que esta regulación está también mediada por los sitios LXRE. Estudiando la activación por insulina del promotor humano SREBP1c en hepatocitos de rata, hemos podido observar que la activación mediada por esta hormona se anuló por completo cuando se mutaron tanto los sitios SRE como los sitios LXRE, siendo suficiente la delección de uno sólo de cada uno de estos sitios para observar el efecto. La misma respuesta se observó cuando se analizó la construcción humana -310/+1, denominada 1c310, que consta únicamente de un sitio SRE, e incluso en el mutante NFY (Figura 36).

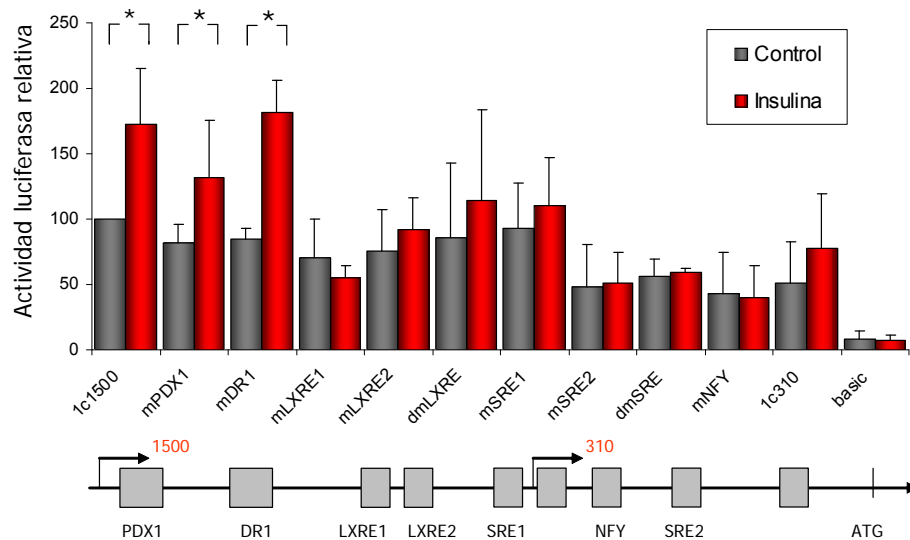


Figura 36: Sitios responsables de la activación mediada por insulina. La construcción 1c1500-luc y los mutantes indicados se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. 24 hs post-transfección se trataron con 100 nM insulina durante 24 hs. Se calculó la actividad relativa al vector vacío y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección (* $p < 0,05$).

2.3 - Regulación por cAMP

Los efectos de la insulina en el metabolismo son contrarrestados por la hormona glucagon que aumenta en períodos de ayuno. Esta hormona actúa en la células a través del efector cAMP. El promotor rSREBP1c está también regulado por esta molécula de forma que inhibe la actividad basal y disminuye significativamente la activación en presencia de insulina (Deng et al., 2002). En nuestros estudios, la actividad del promotor humano completo SREBP1c se inhibió en aproximadamente un 40% en presencia de cAMP (**Figura 37**). Esta actividad, de la misma forma que ocurre con la insulina, no se vió alterada en los mutantes PDX1 y DR1.

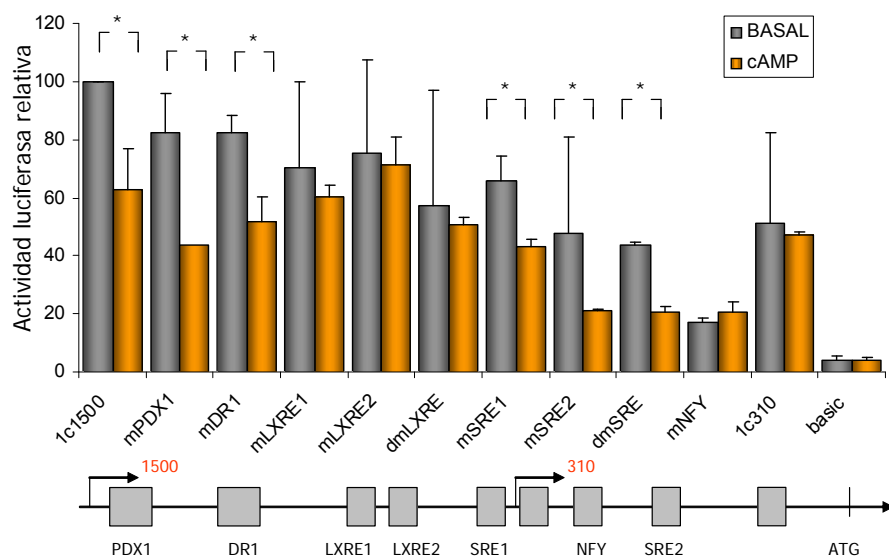


Figura 37: Sitios responsables de la inhibición mediada por cAMP. La construcción 1c1500-luc y los mutantes indicados se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. 24 hs post-transfección se trataron con 100 μ M pCRT-cAMP y 100 μ M teofilina durante 24 hs. Se calculó la actividad relativa al vector vacío y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección (* $p < 0,05$).

En cuanto a las regiones responsables de esta inhibición, se observó que tanto los mutantes simples LXRE como el mutante doble perdieron por completo la respuesta a cAMP, y lo mismo ocurre con la construcción 1c310 que no contiene estos dos sitios de unión. A diferencia de lo que ocurre en tratamiento con insulina, las mutaciones en los sitios SRE no alteraron la respuesta inhibitoria al cAMP. El mutante NFY no respondió a este estímulo, aunque no se puede descartar que esto se deba a que la actividad basal en este mutante está significativamente disminuída.

2.4 – Interacción entre el metabolismo de colesterol y ácidos grasos

Una de las características más estudiadas del promotor SREBP1c es la presencia de 2 sitios LXRE adyacentes separados por aproximadamente 60 pb. Se ha demostrado que estos sitios son capaces de unir dímeros LXR/RXR (Yoshikawa et al., 2001). Estos heterodímeros pertenecen al grupo de los receptores nucleares siendo su ligando natural los oxisteroles, derivados del colesterol. Además el agonista más utilizado de este receptor, el TO901317, es un potente activador del promotor SREBP1c de rata y ratón. El promotor hSREBP1c también se activó por este ligando, produciendo un aumento de más de 5 veces de su actividad basal (**Figura 38**). Además, el uso de distintos mutantes para los sitios LXRE permitió observar claramente que la activación era mediada por ambos sitios. En aquellos mutantes donde se eliminó sólo uno de los sitios LXRE, la activación mediada por el ligando sintético TO901317 era aproximadamente la mitad que en la construcción silvestre (1c1500). Cuando se eliminaron ambos sitios simultáneamente, se pudo observar que la activación mediada por este ligando se eliminó por completo. De la misma forma, la construcción de 310 pb que carece de ambos sitios LXRE no presentó activación alguna cuando se trató con la misma concentración de TO901317. Es de destacar que la alteración de cualquiera de los sitios SRE así como del sitio NFY no produjo cambios significativos en la regulación mediada por agonistas LXR (**Figura 38**).

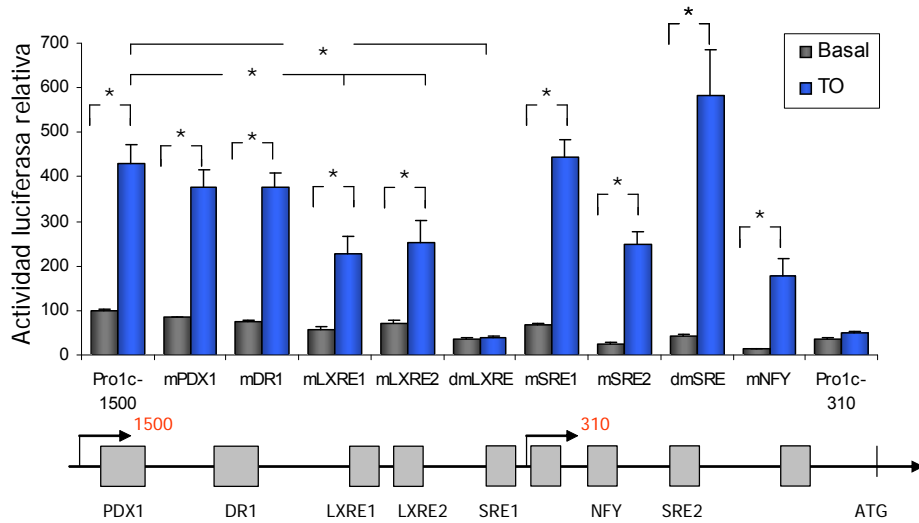


Figura 38: Sitios responsables de la inhibición mediada por oxiesteroles. La construcción de 1c1500-luc y los mutantes indicados se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. 24 hs post-transfección se trataron con TO901317 1 μ M durante otras 24 hs. Se calculó la actividad relativa al vector vacío y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

Otro de los factores que parecen regular al promotor a nivel de los sitios LXRE son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Con el objetivo de estudiar este efecto en los hepatocitos de rata sobre el promotor humano SREBP1c utilizamos una solución de ácido araquidónico (AA). En primer lugar fue necesario determinar la concentración de uso de esta sustancia en el medio de cultivo de los hepatocitos de rata ya que pudimos detectar que concentraciones comunmente utilizadas en otros tipos celulares eran tóxicas para estas células. Realizamos una curva de viabilidad y la comparamos con una curva dosis-respuesta para determinar la concentración de uso. Según los resultados obtenidos, una concentración de 100 μ M fue capaz de inhibir un 50% la actividad del promotor silvestre SREBP1c produciendo una disminución de sólo un 20% de la viabilidad (**Figura 39A**). Esta concentración de ácido araquidónico se utilizó para estudiar los efectos de los distintos mutantes LXRE en la inhibición mediada por ácido araquidónico. La eliminación de los dos sitios LXRE anuló por completo la inhibición que produce este ácido

graso (**Figura 39B**). Lo mismo ocurrió cuando se eliminó sólo el sitio LXRE en posición 3', mientras que el mutante del sitio LXRE1 es inhibido por el ácido araquídónico en un 40%. De esta forma se puede decir que a nivel del sitio LXRE interaccionan en este promotor las vías de los ácidos grasos y la vía del colesterol.

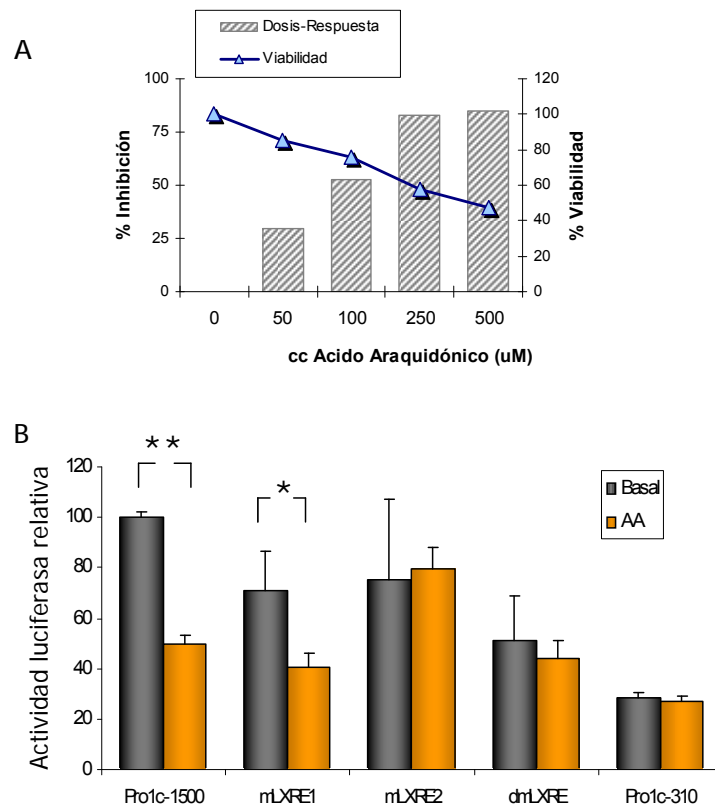


Figura 39: Inhibición mediada por PUFAs. **A**-Determinación de la concentración óptima de tratamiento de hepatocitos con AA. La inhibición de la construcción 1c1500-luc mediada por distintas concentraciones de AA se compara con el cálculo de viabilidad medido con el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). **B**-Esta misma construcción y los mutantes indicados se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. 24 hs post-transfección se trataron con AA 100 µM durante otras 24 hs. Se calculó la actividad relativa al vector vacío y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$).

2.5- Regulación mediada por PPARs

Una de las características diferenciales del promotor humano con respecto al promotor de rata es la presencia de una región descrita previamente como posible sitio de unión al factor HNF4. Esta región se reconoce como una secuencia repetida directa separada por una base y que se denomina DR1. Para evaluar esta actividad realizamos experimentos de sobreexpresión de la proteína HNF4 en presencia del promotor SREBP1c en vector de gen reportero de luciferasa. Según nuestros resultados este promotor no se activa por la proteína HNF4. Esta secuencia DR1 es capaz de unirse también a otros dímeros de receptores nucleares. Un nuevo análisis de la secuencia realizado con el programa Motifviz, reconoce a la secuencia DR1 del promotor hSREBP1c como sitio de unión a los receptores nucleares PPAR o ROR α . Este mismo programa no reconoce ningún sitio de unión a estos receptores nucleares en los promotores de rata y ratón.

Para evaluar el papel de los receptores PPAR en la activación del promotor hSREBP1c, tratamos a los hepatocitos de rata transfectados con el vector de expresión de gen reportero luciferasa bajo el control del promotor SREBP1c silvestre y mutantes, con un agonista de PPAR α denominado WY14643. El promotor SREBP1c silvestre (1c1500) aumentó 2 veces su expresión en presencia de este agonista. Los mutantes simples DR1, LXRE1 y LXRE2 presentaron un leve aumento de la actividad aunque no era estadísticamente significativa. La respuesta fue anulada por completo en los mutantes dobles DR1/LXRE1, DR1/LXRE2 y doble LXRE. La construcción 1c310 que carece de los tres sitios de unión a receptores nucleares no mostró ninguna activación (**Figura 40**).

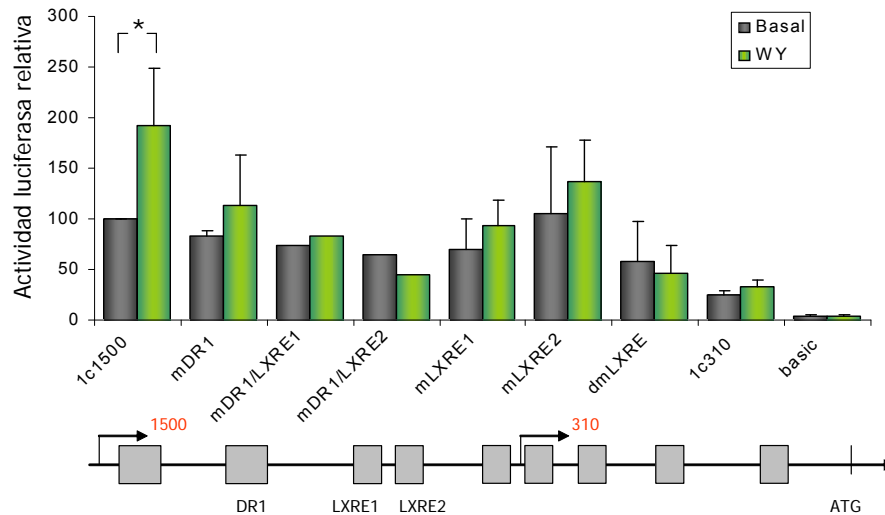


Figura 40: Activación mediada por WY14643. La construcción de 1c1500-luc y los mutantes indicados se transfectaron en hepatocitos de rata en cultivo primario. 24 hs post-transfección se trataron con WY14643 10 μ M durante otras 24 hs. Se calculó la actividad relativa al vector vacío y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

Para confirmar estos resultados, realizamos experimentos de actividad luciferasa transfectando con vectores de expresión de los receptores nucleares PPAR, LXR y RXR. Las proteínas LXR y PPAR actúan *in vivo* en forma de heterodímeros junto con RXR. Como se puede ver en la **figura 41**, PPAR por sí sólo no fue capaz de activar al promotor SREBP1c, mientras que LXR α y RXR produjeron un leve aumento de la actividad. En cambio, cuando se sobreexpresaron las combinaciones LXR/RXR o PPAR/RXR o los tres receptores simultáneamente, se produjo un aumento de más de 15 veces de la actividad del promotor. Esto nos demuestra que este promotor además de ser activado por el heterodímero LXR/RXR es activado por el heterodímero PPAR/RXR. No se puede descartar que haya además una activación mediada por el homodímero RXR. Estos resultados confirman los resultados obtenidos utilizando el agonista PPAR α .

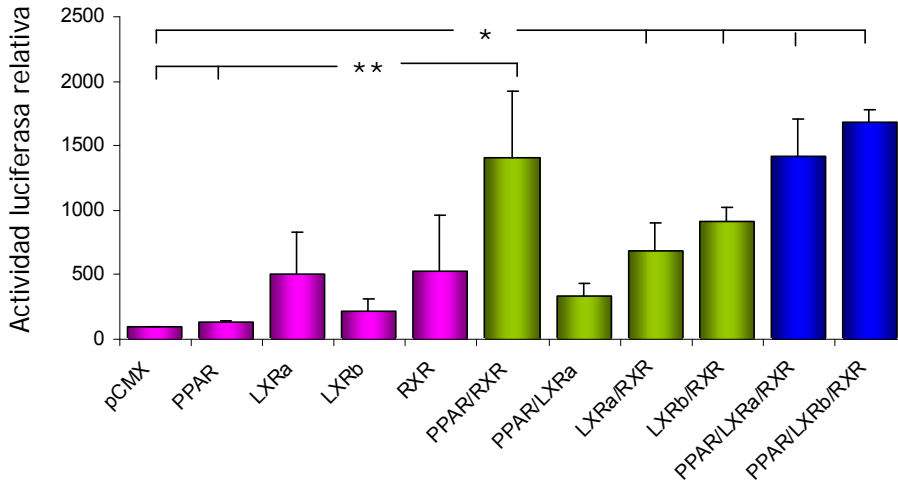


Figura 41: Activación mediada por receptores nucleares PPAR, LXR y RXR. La construcción de 1c1500-luc se cotransfectó en hepatocitos de rata en cultivo primario con plásmidos de expresión de cada uno de los receptores nucleares indicados. Se calculó la actividad relativa al vector vacío y se normalizó con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. En el gráfico se muestran los resultados obtenidos al sobreexpresar un receptor nuclear o el vector vacío (rosa), 2 receptores (verde) o 3 receptores (azul). Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (** $p < 0,001$).

Combinando ambos efectos, los hepatocitos donde se sobreexpresan las proteínas PPAR/RXR se trataron con el agonista WY14643. En condiciones basales, el agonista produjo una activación de casi el doble en la actividad del promotor y lo mismo ocurrió en presencia de PPAR α , mientras que cuando se sobreexpresaban al mismo tiempo PPAR y RXR se observó un aumento de casi 15 veces en la actividad que era independiente de la presencia del agonista (**Figura 42**).

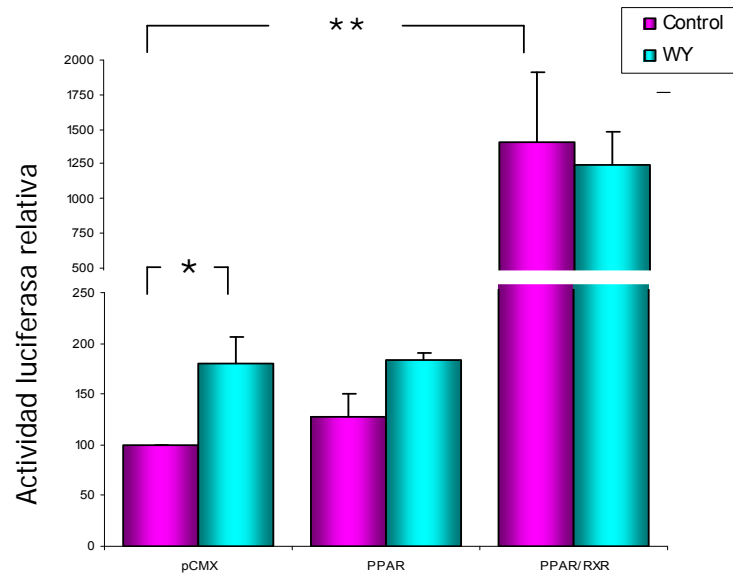


Figura 42: La activación mediada por sobreexpresión de receptores nucleares es independiente de la activación mediada por ligando exógeno. La construcción 1c1500-luc se cotransfectó en hepatocitos de rata en cultivo primario junto con los vectores de expresión de PPAR y RXR y con el vector vacío pCMX. 24 hs post transfección las células se trataron con 10 μ M WY 14643 durante otras 24 hs. En la figura se muestra la actividad luciferasa relativa con respecto al control de transfección pRL-TK. La actividad de la construcción 1c1500 en presencia del vector vacío pCMX y en ausencia de ligando se consideró 100 %. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$).

2.6 – Unión de los receptores nucleares *in vitro*

Como habíamos podido comprobar hasta el momento, el promotor humano SREBP1c contiene tres sitios de unión a receptores nucleares, dos de ellos denominados LXRE1 y LXRE2 y un tercer sitio denominado DR1 que podría ser un sitio de unión para PPAR. Para estudiar si los efectos de activación mediados por los receptores nucleares se debían a la unión de estos factores a los sitios descritos en el promotor hSREBP1c realizamos ensayos de movilidad electroforética utilizando las proteínas sintetizadas mediante transcripción *in vitro*. En estos experimentos se pudo observar que

una sonda que contenía al sitio DR1 se unió al dímero PPAR/RXR (Figura 43A).

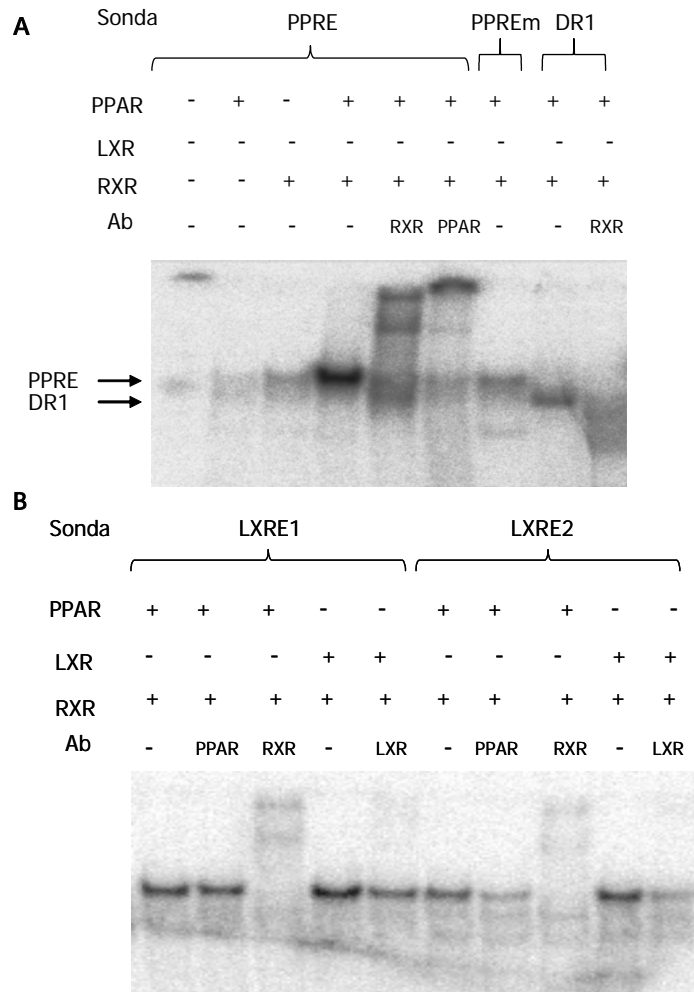


Figura 43: Unión de receptores nucleares PPAR, LXR y RXR *in vitro*. Oligonucleótidos comprendiendo los sitios de unión de cada uno de los receptores nucleares en el promotor hSREBP1c se utilizaron para el ensayo de retardo en gel. Se muestran las autoradiografías de los ensayos realizados con cada una de las sondas indicando las proteínas recombinantes y los anticuerpos utilizados en cada experimento. Como control de la unión de la proteína PPAR utilizamos una sonda consenso de unión a PPAR (PPRE) así como una sonda mutante (PPREm).

Pero la unión de este heterodímero no fue exclusiva de este sitio. Tanto los heterodímeros PPAR/RXR como LXR/RXR se unieron de forma específica a los sitios denominados LXRE1 y LXRE2 que corresponden a secuencias del tipo DR4 (**Figura 43B**). Esto concuerda con los resultados de los experimentos realizados con gen reportero donde se pudo ver que los mutantes simples LXRE y dobles perdían su capacidad de responder al agonista PPAR α . Cuando se utilizaron anticuerpos para cada una de las distintas proteínas que forman los complejos, se pudo ver que el anticuerpo que reconoce al receptor nuclear RXR fue capaz de desplazar completamente al complejo dímero-DNA, mientras que los anticuerpos que reconocen a PPAR y LXR sólo produjeron una disminución en la abundancia del complejo retardado. Sólo cuando utilizamos una sonda control que presenta un sitio clásico de unión a PPAR logramos desplazar el complejo con el anticuerpo anti-PPAR. Por lo tanto se puede decir que en el promotor humano SREBP1c existen 3 sitios de unión *in vitro* al heterodímero PPAR/RXR.

Si el heterodímero PPAR/RXR es capaz de activar al promotor humano SREBP1c a nivel de los sitios de unión LXRE, entonces este heterodímero debería ser capaz de activar al promotor de rata a pesar de la ausencia del sitio DR1. Cuando realizamos el experimento de luciferasa con el promotor de rata los resultados fueron exactamente los mismos que para el promotor humano, observándose una clara activación por el ligando WY14643 (**Figura 44A**). Estos datos se confirmaron realizando una extracción de RNA y posterior RT-PCR a partir de hepatocitos de rata tratados con los distintos efectores y analizando los efectos de cada uno de los tratamientos sobre la expresión de SREBP1 endógeno. En este experimento se observó que con todos los tratamientos se obtuvieron los mismos efectos vistos en el promotor humano tanto para la activación por WY14643 como para los efectos mediados por insulina, cAMP, ácido araquidónico y TO901316 (**Figura 44B,CyD**).

En estas mismas muestras se analizó la expresión de los LXR, con el fin de descartar que el efecto que se observó en presencia de WY14643 fuera debido a una alteración de los niveles de LXR y no a un efecto directo mediado por PPAR. Como se observa en la **figura 44B y C**, los niveles de expresión de LXR permanecieron constantes

tanto en presencia de WY14643 como en presencia de TO901317, ácido araquidónico e insulina. Sorprendentemente se observó una disminución significativa de los niveles de LXR en presencia de cAMP, lo que sugiere un mecanismo indirecto mediado por estos receptores nucleares para la inhibición mediada por cAMP (Figura 44D).

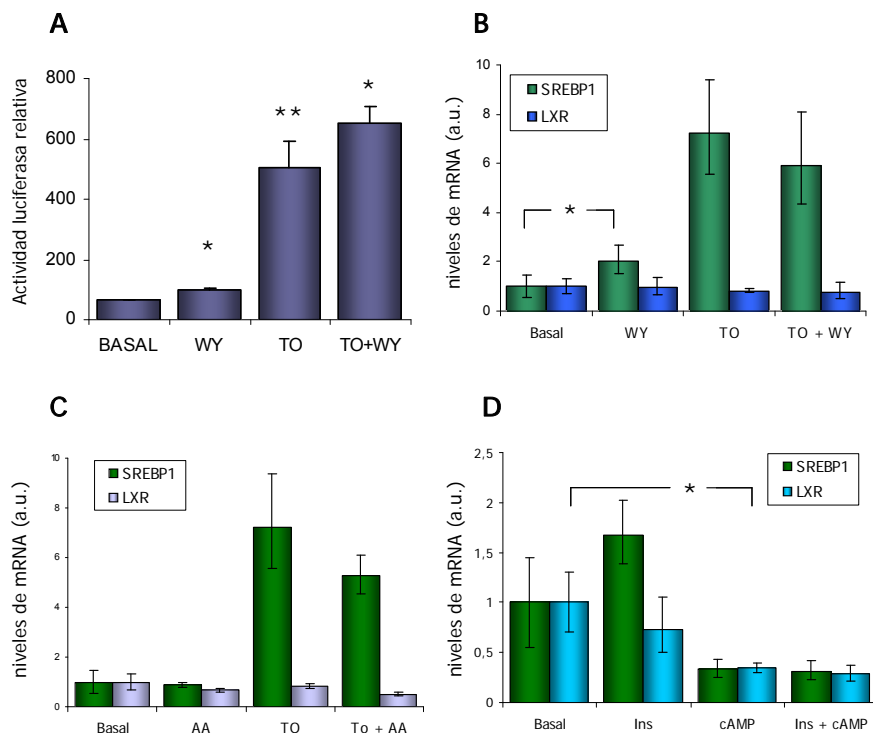


Figura 44: Regulación mediada por PPAR en el promotor rSREBP1c. A-EI promotor de rata insertado en el vector pGL3-basic se transfectó en hepatocitos de rata y se analizó su expresión por ensayo de actividad luciferasa 24 hs post-tratamientos. B, C y D-EI RNA total de los hepatocitos de rata tratados con las sustancias indicadas en cada caso se extrajo y se analizó por RT-PCR cuantitativa para expresión de mRNA de SREBP1c y LXR. Los tratamientos se realizaron con AA 100 μ M, TO901317 1 μ M, WY14643 10 μ M, insulina 100 nM y cAMP 100 μ M. (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$). Las diferencias en los niveles de mRNA en el tratamiento con insulina, TO901317, TO901317+AA, TO901317+WY14643 y cAMP son significativas con respecto a la condición basal, aunque no se indican en la figura.

2.7 – Regulación *in vivo*

Una vez determinados los sitios relevantes para la actividad basal y la regulación hormonal del promotor hSREBP1c, el objetivo siguiente era estudiar esta activación *in vivo*. Como demostramos previamente y a pesar de las diferencias a nivel de secuencia, la activación del promotor en humanos y en rata es similar. Por eso, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de cromatina con el fin de estudiar los reguladores y co-reguladores implicados en la actividad del promotor SREBP1c. Para ello se obtuvo cromatina de hepatocitos de rata en cultivo primario tratados durante 24 hs con los distintos efectores. En primer lugar se analizó la unión de los factores SREBP y LXR a partir de la inmunoprecipitación mediante PCR. Al mismo tiempo se realizó una inmunoprecipitación con PolIII para corroborar la activación del promotor. Oligos para alfa y beta actina se utilizaron como control negativo y positivo respectivamente. Como se puede ver en la **figura 45**, cuando se inmunoprecipitó con anticuerpos que reconocen a LXR y a SREBP se observó que en todas las condiciones analizadas, estos factores de transcripción se mantuvieron unidos al promotor, incluso en condiciones basales.

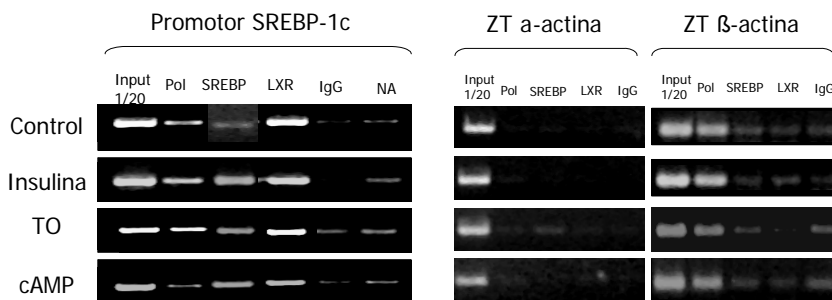


Figura 45: Unión de factores de transcripción al promotor SREBP1c *in vivo*. La cromatina de hepatocitos de rata en cultivo primario fue utilizada para inmunoprecipitar con anticuerpos contra los principales factores de transcripción que median la regulación del promotor SREBP1c, SREBP y LXR.

La misma técnica se utilizó para estudiar la activación mediada por WY14643 demostrada mediante los ensayos de

luciferasa y expresión de mRNA. Con el fin de eliminar las posibles variaciones de estado metabólico entre células, los hepatocitos de rata se trataron durante 2 hs previo al inicio de los tratamientos con α -amanitina, un inhibidor reversible de la transcripción, sincronizando las células antes de la estimulación. Para este análisis realizamos experimentos de CHIP-PCR cuantitativa estudiando la unión de los distintos factores en cada una de las zonas regulables del promotor. Para realizar la cuantificación se diseñaron oligonucleótidos que nos permitieran detectar la unión de los distintos factores a cada una de las regiones de interés del promotor como se muestra en el esquema de la **figura 46**. Todos los oligonucleótidos utilizados presentaron un único pico de disociación y una curva standard lineal en el rango de concentraciones utilizado.

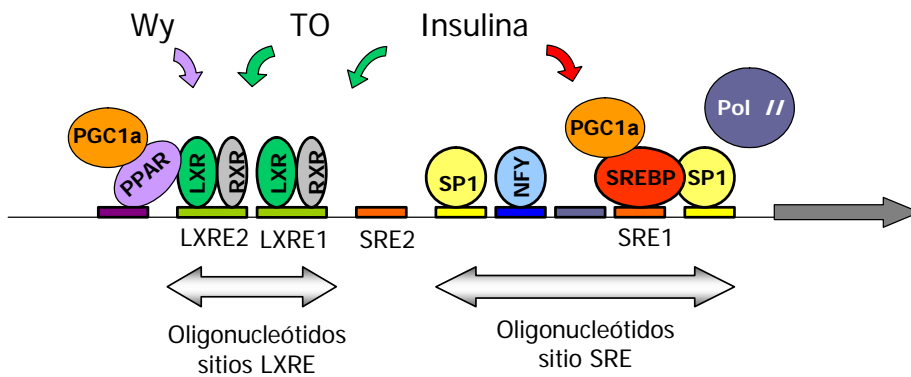


Figura 46: Esquema para el análisis de la regulación del promotor y controles para la PCR cuantitativa. Se diseñaron oligonucleótidos con el fin de diferenciar la unión de los factores y cofactores en las distintas zonas activas del promotor.

Uno de los anticuerpos utilizados en la inmunoprecipitación fue el que reconoce a la RNA Polimerasa II. El análisis de este anticuerpo nos permite comprobar la activación del promotor en cada una de las condiciones estudiadas. Además, dado que la unión de la RNA Polimerasa también es dependiente de la distancia al ATG, nos sirve para evaluar la capacidad que tenemos de detección de los

distintos sitios del promotor con los oligonucleótidos utilizados. Como se puede ver en la **figura 47**, la polimerasa, que fue positiva en todas las condiciones, dio valores más altos cuando se analizaron con los oligonucleótidos que amplifican la región que contiene a los sitios SRE, más cercanos al ATG, que cuando se utilizaron los que reconocen a la región que contiene a los sitios LXRE. El análisis de los resultados obtenidos con los factores SREBP1c y LXR nos mostró que SREBP era mayormente inmunoprecipitada en condiciones de tratamiento con insulina asociada con la secuencia que contiene al sitio SRE1 y por el contrario LXR era inmunoprecipitada en mayor proporción en condiciones de TO901317 y asociada a la secuencia correspondiente a los sitios LXRE. Estos resultados nos demuestran que en esta distancia podemos distinguir proteínas que se unen a uno y otro sitio.

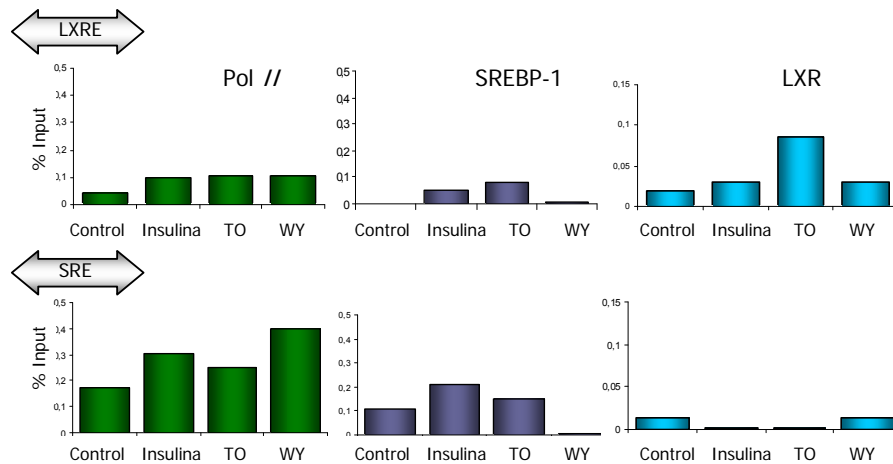


Figura 47: Análisis cuantitativo de unión de las proteínas PolIII, SREBP y LXR al promotor rSREBP1c. La cromatina de los hepatocitos de rata fue sometida a un análisis de inmunoprecipitación de cromatina. Las muestras inmunoprecipitadas con los distintos anticuerpos se analizaron por PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos que reconocen distintas zonas del promotor rSREBP1c. La cuantificación se realizó mediante interpolación a partir de la curva de calibración y los valores se expresan como % del Input considerando al "input" como 100% y al "no anticuerpo" como 0%. En la figura se muestran los resultados de un experimento representativo.

Una vez corroborados los datos de activación por insulina y TO901317, nos propusimos estudiar la unión de PPAR en el tratamiento con WY14643. Al mismo tiempo evaluamos la posible unión a este promotor de PGC1, un cofactor de PPAR altamente involucrado en la regulación del metabolismo energético. Además, esta proteína tiene un interés especial en el estudio de la regulación de SREBP1c ya que anteriormente se ha propuesto que este cofactor es el responsable de la falta de activación por insulina en células en cultivo (Oberkofler et al., 2004). Como se ve en la **figura 48**, la unión de PPAR α al promotor rSREBP1c se incrementó tras el tratamiento con WY14643 sólo cuando se analizó con los oligonucleótidos de la zona de unión de los LXRs. En cuanto al cofactor PGC1 los resultados demuestran que esta proteína fue reclutada al promotor en condiciones de tratamiento con insulina, probablemente como cofactor de SREBP en su función de autoactivación. Este cofactor fue también reclutado en presencia de WY14643 probablemente actuando en este caso como cofactor de PPAR.

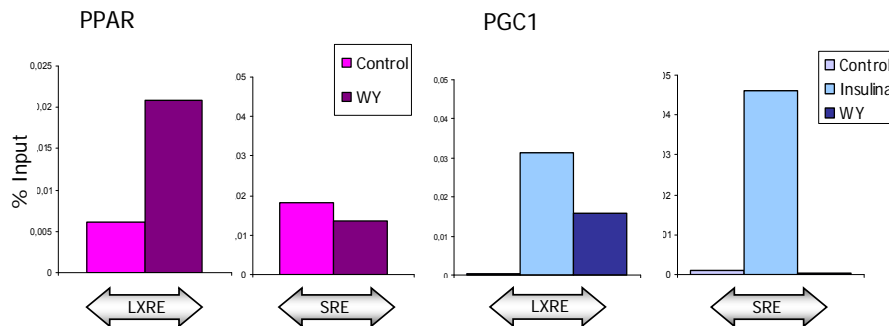


Figura 48: Análisis cuantitativo de la unión de PPAR y PGC1 al promotor rSREBP1c. La cromatina de los hepatocitos de rata fue sometida a un análisis de inmunoprecipitación de cromatina. Las muestras inmunoprecipitadas con los distintos anticuerpos se analizaron por PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos que reconocen distintas zonas del promotor rSREBP1c. La cuantificación se realizó mediante interpolación a partir de la curva de calibración y los valores se expresan como % del Input considerando al "input" como 100% y al "no anticuerpo" como 0%. En la figura se muestran los resultados de un experimento representativo.

3 – Promotor INSIG2

Aunque las proteínas INSIG1 y 2 se definieron en un principio como mutuamente intercambiables, posteriormente se han descrito algunas diferencias especialmente en cuanto a su regulación. En células en cultivo la expresión de INSIG1 está regulada por la abundancia de SREBP madura mientras que INSIG2 se encuentra constitutivamente expresada. En hígado de ratón existen 2 transcritos INSIG2 que se denominaron INSIG2a e INSIG2b, que difieren en su primer exón no codificante. La variante 2a es la forma predominante en este órgano y está regulada por los niveles de insulina. Interesados en la implicaciones metabólicas de la vía SREBP, ampliamos nuestro estudio de regulación transcripcional al gen INSIG2 en humanos.

3.1 - Identificación de las isoformas de INSIG2 en el genoma humano

En primer lugar se determinó la posible presencia de un exón 1a en el gen INSIG2 humano. Para ello se realizó un alineamiento de las secuencias genómicas de ambas especies teniendo en cuenta que el exón 2 es común a ambas isoformas. El alineamiento de las secuencias correspondientes a cada uno de los exones 2b obtenidas de la base de datos del Ensembl mostró que ambos exones presentan una alta homología. En esta base de datos, el exón 2b humano consta de 68 pares de bases y el correspondiente al ratón es de 96 pb, aunque en el alineamiento se observó que estas casi 30 pb de diferencia son homólogas en ambas especies (**Figura 49A**). Utilizando el exón de ratón como referencia se identificó un posible exón 2a en la secuencia humana con alta homología (55%) en especial en la región 5' (**Figura 49B**). Con los datos obtenidos de estos alineamientos se construyó un modelo de la organización genómica comparando ambas especies, evidenciando la alta similitud entre los genes de ambas especies (**Figura 49C**).

Resultados

A - Exón 1b

```

Ratón   -GGCTCAGGCGGAGCTGTGGGAGGGGAGTAGGT-CGGGGGCCGGTCCCTGAAGATGGCG 60
Humano  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ratón   GAGGCGGGGGTGAAGTGGGGTCTCCGGCAGAGCTCAG 96
Humano  GAGGCGGGGgtgagttgggggtctcccggaagcgcg 68 (98)
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

B - Exón 1a

```

Ratón   ATCTCAATGGGAGTTCTCTATTGCTTATGTCTGTTTATGTGAGCTGGACTAGCTTGC-- 58
Humano  ATCTCATTGAGAGTTCTCAGTTGACTTGCTTCTGTAGAGGTGGGCTGACCTAACTTCTGC 60
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ratón   -TTTCTGAC--ATCTCTGCTTCCTCAATGAATGACTGAAG 98
Humano  ATTTCCAGGCTGTGAATTTATTGATGGCAAGAGATCTGTCTTAT 104
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

C - Estructura

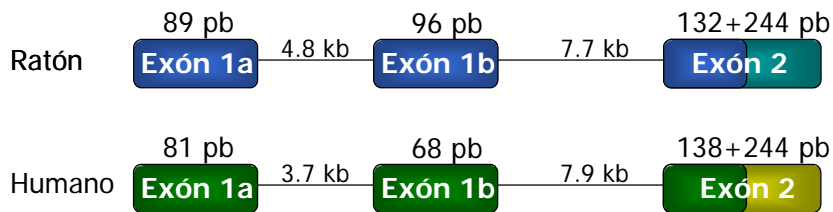


Figura 49: Comparación de las secuencias de los promotores INSIG2 de ratón y humano. A - Alineamiento de secuencia de los exones 1b de ratón y humano. B - Alineamiento de secuencia del exón 1a de ratón y la predicción del mismo exón en la secuencia humana. C - Esquema comparativo de la organización génica de INSIG2 en humano y ratón desde el exón 1a hasta el exón 2.

3.2 - Expresión de las isoformas INSIG2

Se diseñaron oligonucleótidos para analizar la expresión de las distintas isoformas de INSIG2 en tejido hepático de varias especies y células en cultivo. A partir de mRNA total se realizó un análisis por RT-PCR para determinar la presencia de cada una de las isoformas. En las muestras de ratón se detectaron las 2 isoformas de INSIG2, con una mayor expresión de la isoforma 2a. Por el contrario en el caso del hígado humano sólo se observó la expresión de la isoforma 2b, al menos considerando a la secuencia definida por homología como el exón correspondiente a esta isoforma.

Exactamente el mismo resultado se observó en el caso del tejido de rata (**Figura 50**). Con el mismo procedimiento se estudió la expresión de INSIG2a y 2b en distintas líneas celulares. Como se puede observar en la **figura 50**, en células de origen humano como son las líneas HEK293T y HepG2, de origen renal y hepático respectivamente, sólo se encontró expresada la isoforma INSIG2b. En cambio en la células CHO de ovario de hámster se observó una expresión exclusiva de la isoforma 2a. Hasta la fecha no existe en las bases de datos ninguna secuencia de hámster correspondiente a esta proteína por lo que para el análisis de estas células se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes al ratón.

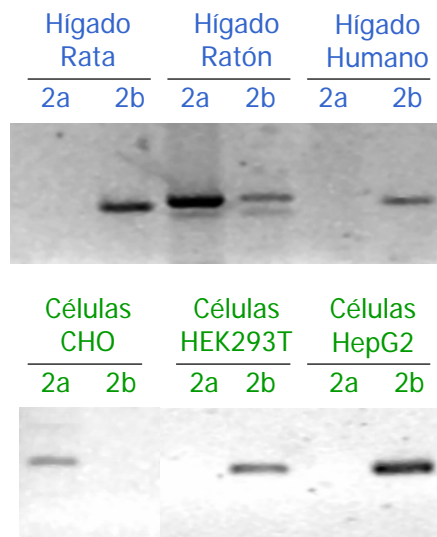


Figura 50: Expresión de las isoformas INSIG2 en distintas especies. Análisis del cDNA obtenido de cada una de las células indicadas mediante extracción de mRNA total y RT-PCR. Se utilizaron oligonucleótidos específicos de cada una de las isoformas para cada especie estudiada, excepto para el caso de las células CHO de hámster donde no se conoce la secuencia. La isoforma 2a sólo aparece en hepatocitos de ratón y en células CHO, siendo en estas últimas la única isoforma presente.

3.3 - Clonaje del promotor *INSIG2*

Se clonaron 3000pb del promotor humano *INSIG2* en posición 5' desde el sitio de inicio de la transcripción en el vector de expresión de luciferasa pGL3-basic. Esta construcción, que denominamos I2b-humano, se transfectó de forma transitoria en células HEK293T y HepG2, y su expresión se estudió mediante ensayo de luciferasa. Como se observa en la **figura 51**, este promotor se expresó intensamente en ambas líneas celulares, con una expresión entre 3 y 6 veces mayor al vector pGL3-promoter que contiene el promotor SV40. En el mismo vector se clonaron 600 pb de la secuencia correspondiente al promotor *INSIG2b* murino. Ambas construcciones se expresaron correctamente en hepatocitos de ratón siendo incluso el promotor humano aparentemente más fuerte que el de ratón (**Figura 51**).

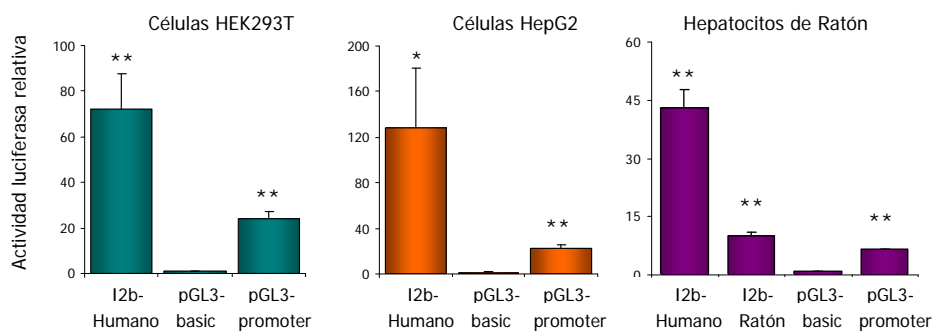


Figura 51: Expresión del promotor *INSIG2b* de ratón y humano. Las secuencias de ambos promotores se insertaron en el vector de expresión de luciferasa y se transfectaron en las distintas líneas celulares. La activación relativa al vector vacío para cada construcción se expresa normalizada con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$).

3.4 - Análisis funcional de la región promotora de *INSIG2* humano

Una vez identificada la región promotora responsable de la expresión de *INSIG2* humana se realizaron deleciones progresivas del promotor con el objetivo de definir el promotor proximal. Así se obtuvieron una serie de construcciones fusionadas al gen reportero

lucifera, que se transfectaron en células HEK293T y HepG2. El análisis de estas construcciones nos reveló que son necesarias aproximadamente 300pb para obtener la máxima actividad del promotor. Una construcción de 150 pb (-152/-11) mantuvo menos del 40% de la actividad máxima en condiciones basales (Figura 52)

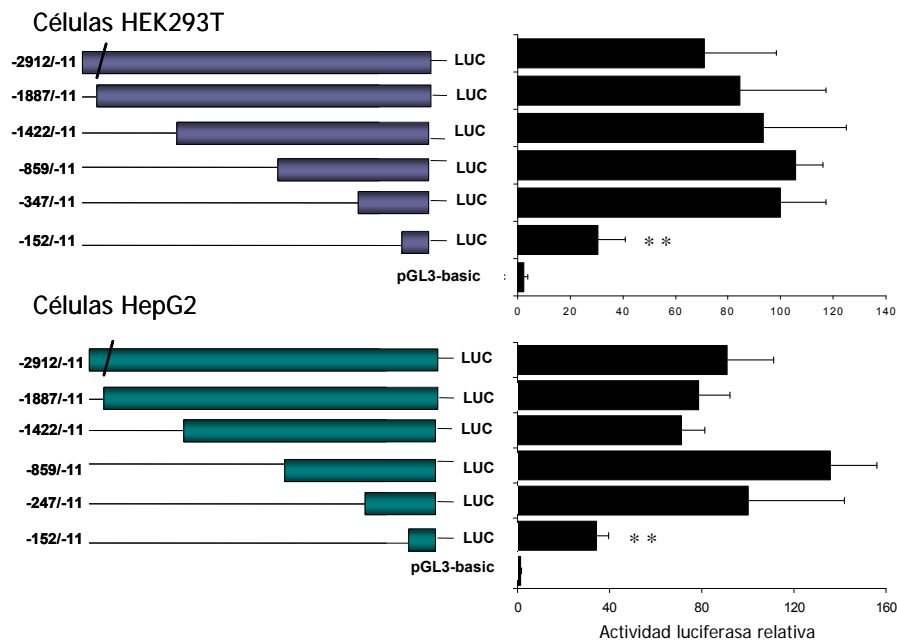


Figura 52: Análisis de la actividad transcripcional de la región promotora proximal de INSIG2 humano. La secuencias indicadas se transfectaron en las distintas líneas celulares. La activación relativa al vector vacío para cada construcción se expresa normalizada con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (** $p < 0,001$).

3.5 - Identificación de los elementos que actúan en cis

Dado que no existían en la bibliografía estudios de este promotor en ninguna especie, la primera aproximación realizada fue un estudio de alineamiento y análisis de aquellos elementos que aparecerían como posibles sitios de regulación tanto en la secuencia del promotor humano como en la de ratón. Aunque el comportamiento del gen en cuanto al *splicing* alternativo no parece

ser el mismo en ambas especies, generalmente se demuestra que los sitios fundamentales para la expresión basal de un promotor se conservan entre especies. Para este análisis se utilizó el programa CONSITE (Sandelin et al., 2004). De esta forma se determinaron 7 regiones conservadas correspondientes a los sitios de unión de 6 factores de transcripción distintos (**Figura 53**). Como primera aproximación para la identificación de los sitios se realizaron una serie de deleciones a partir de la construcción -347/-11 (denominada Insig2b-300) que nos permitieran analizar la funcionalidad de los sitios ausentes en la construcción -152/-11 (denominada Insig2b-150) y que podrían ser responsables de la menor actividad de esta última. Se eliminaron progresivamente los sitios V y IV pudiendo reducir la secuencia mínima a 285 pares de bases aunque esta metodología no nos permitió descartar ningún sitio como responsable de la actividad de este promotor. Sin embargo, estos resultados apuntaban a una posible función importante del sitio IV reconocido como posible sitio de unión a SOX5 o Myf.

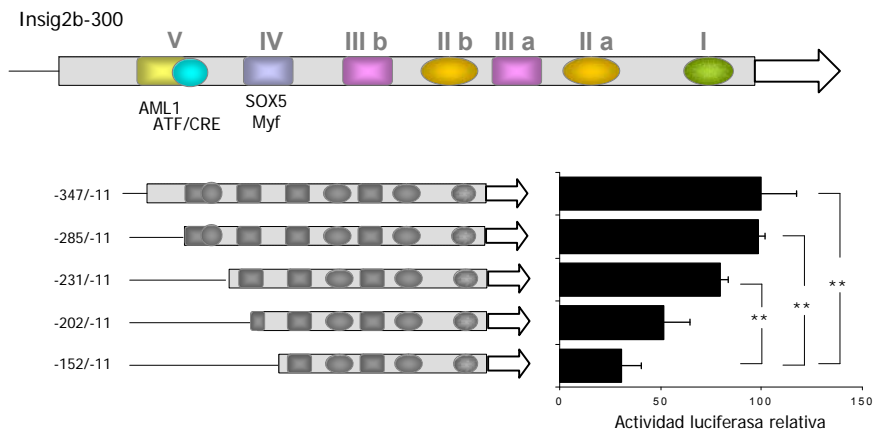


Figura 53: Análisis de deleciones secuenciales del promotor proximal INSIG2. En el esquema se muestran los sitios putativos de unión determinados por análisis *in silico*. La construcciones con deleciones seriadas se estudiaron por ensayo de luciferasa mostrando la activación medida como relación firefly/renilla. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (** $p < 0,001$).

Como segunda aproximación se realizaron mutantes específicos para cada una de las 7 regiones identificadas tomando como base la construcción Insig2b-300. Los resultados obtenidos de esta forma revelaron que los sitios AML1 y ATF/CRE eran irrelevantes. Al mismo tiempo se observa que los mutantes de los sitios putativos de unión de las proteínas SOX5/Myf, E2F y Snail no produjeron alteraciones significativas de la actividad del promotor hINSIG2 (Figura 54). Dado que los sitios V y IV son los únicos sitios reconocidos en la búsqueda que están ausentes en la construcción Insig2b-150, estos datos nos sugieren la presencia de un sitio de regulación no considerado que podría encontrarse en esta región.

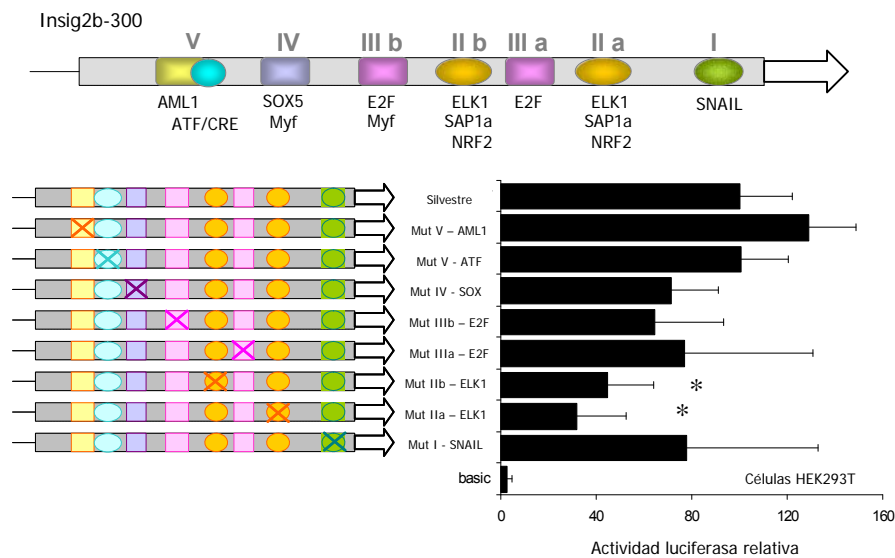


Figura 54: Análisis de la actividad transcripcional de mutantes puntuales de la región promotora proximal de INSIG2 humano. La secuencias indicadas se transflectaron en las distintas líneas celulares. La activación relativa al vector vacío para cada construcción se expresa normalizada con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

Además de esta forma pudimos comprobar que, como se puede observar en la figura 54, sólo la mutación de los sitios

correspondientes a las zonas IIa y IIb generaron construcciones con una actividad significativamente disminuída con respecto a la construcción silvestre. Estas zonas fueron reconocidas como sitios de unión a las proteínas ELK1, SAP1a y NRF2 que son factores transcripcionales pertenecientes a la familia Ets. Pero ninguna de las mutaciones realizadas produce una anulación completa de la actividad del promotor.

Se realizaron a continuación una serie de mutantes dobles de forma de esclarecer la participación de cada uno de estos sitios en la actividad de este promotor. Además, teniendo en cuenta que tanto el sitio II como el III están formados por dos secuencias de reconocimiento para el mismo factor de transcripción, es importante la eliminación de ambos sitios a la vez para inhibir por completo la activación por el factor de transcripción implicado. Para estudiar estos sitios se utilizaron mutantes en las construcciones -347/-11 y -152/-11. Del análisis de los dobles mutantes se pudo deducir que el doble mutante II presentó menor actividad que cada uno de los mutantes simples. Para el caso del doble mutante III, reconocido en la predicción como sitio de unión a la proteína E2F, la eliminación de ambos sitios no resultó en una mayor inhibición que la eliminación de cada uno de ellos por separado. En el caso de las células HEK293T es de destacar la baja actividad de la construcción doble mutante IIIa/IIa. Esta misma construcción en las células HepG2 tuvo una menor actividad aunque en el análisis estadístico esta diferencia no resultó significativa. Esto podría significar que ambos sitios constituyen una secuencia de unión de factores de transcripción que actúan en forma sinérgica (**Figura 55**).

Comparando los resultados de los mutantes con respecto a cada una de las construcciones silvestres es notable que, a pesar de que los dos sitios estudiados (II y III) se encuentran comprendidos en la construcción -152/-11, esta construcción tiene una actividad significativamente menor que la secuencia completa -347/-11. Esto confirma, tal como se deduce de los experimentos anteriores, la presencia de algún factor de acción fundamental para la activación de este promotor en posición más distal que actúa sinérgicamente, y que aparentemente no corresponde a ninguno de los sitios predichos por el análisis *in silico*.

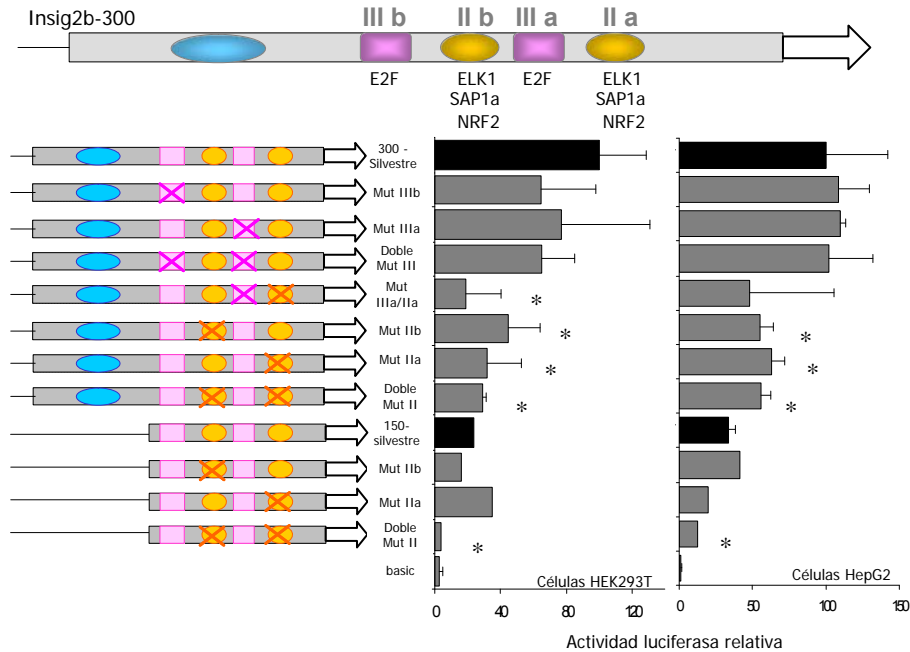


Figura 55: Análisis de la actividad transcripcional de dobles mutantes en la región promotora proximal de INSIG2 humano. Las secuencias indicadas se transfectaron en las distintas líneas celulares. La activación relativa al vector vacío para cada construcción se expresa normalizada con respecto a la activación del vector pRL-TK utilizado como control de transfección. Las barras indican la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

3.6 - Unión de los factores reguladores *in vitro*

Una vez determinada la presencia de dos posibles sitios Ets se analizó la unión *in vitro* de las secuencias correspondientes a las proteínas ELK1, SAP1a y NRF2, tres miembros de esta familia de factores transcripcionales, y a la proteína E2F, posible factor de unión al sitio III, utilizando la metodología EMSA. Para ello se sintetizaron 2 sondas que incluían a cada uno de los sitios denominados II y responsables en parte de la actividad de este promotor (**Figura 56A**). Dada la cercanía entre el sitio IIb y los sitios IIIa y IIIb, la sonda 2, que contiene al sitio IIb, incluía a los 3 sitios. Ambos oligonucleótidos se incubaron en presencia de cada una de las proteínas recombinantes sintetizadas *in vitro*. La sonda 1 se unió específicamente a las

proteínas ELK1 y Sap1a, siendo el complejo claramente retardado en presencia del anticuerpo específico para cada proteína y habiendo competencia con el oligonucleótido frío silvestre pero no con los oligonucleótidos mutantes. Esta sonda no presentó unión específica a la proteína NRF2. La sonda 2 no presentó unión específica con ninguna de las proteínas estudiadas (Figura 56B).

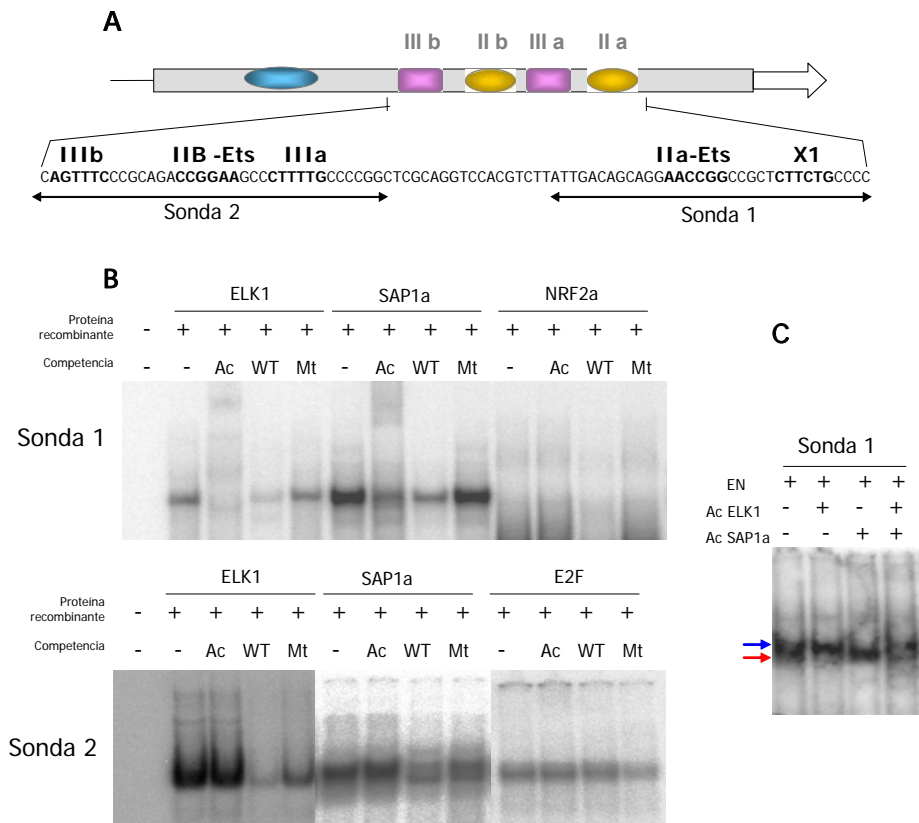


Figura 56: Las proteínas ELK1 y SAP1a se unen *in vitro* al sitio IIa del promotor INSIG2 humano. **A** - Esquema de los 2 oligonucleótidos utilizados como sondas en el ensayo de EMSA. **B** - El retardo de unión a cada proteína recombinante se muestra en la autorradiografía para ambos oligonucleótidos así como el retardo específico en presencia de los anticuerpos (Ac), y la competencia con oligonucleótido sin marcar silvestre (WT) o mutante (Mt). **C** - La sonda 1 se une simultáneamente a las proteínas ELK1 (flecha roja) y SAP1a (flecha azul), siendo cada banda específicamente retardada por cada uno de los anticuerpos.

En la **figura 56C** se muestra también una autoradiografía en la que se observa la presencia de dos bandas correspondientes a la unión de ELK1 y SAP1a simultáneamente cuando se incubó la sonda 1 en presencia de un extracto nuclear que expresaba ambas proteínas. En este caso se observó que los anticuerpos eliminan específicamente cada una de las bandas por separado.

Si analizamos la secuencia de ambas sondas, se puede distinguir que el sitio IIIa coincide con una secuencia corta de la sonda 1 de muy alta homología en posición 3' con respecto al sitio IIa que no es reconocida por los programas de predicción y que denominamos X1. Al mutar este sitio se observó que el oligonucleótido resultante era incapaz de competir por la unión a ELK1 y SAP1a por lo que parece que es la secuencia completa la responsable de la unión de estas proteínas.

3.7 - Regulación in vivo mediada por Ets

Para evaluar la unión de los factores estudiados *in vivo* se realizaron experimentos de inmunoprecipitación por cromatina a partir de células en cultivo. En la mayoría de los promotores activados por Ets, estas proteínas actúan formando trímeros asociados con la proteína SRF. Aunque según el análisis de secuencia del promotor INSIG2 no existe ningún sitio de unión consenso para este factor, se evaluó la presencia de esta proteína en el promotor activo. En estos experimentos se pudo observar que en el caso de las células HepG2 el factor activo era SAP1a mientras que en las células HEK293T parecía estar activado simultáneamente por SAP1a y ELK1 (**Figura 57**). Esta diferencia entre líneas celulares podría explicar los resultados observados en los experimentos de expresión de luciferasa con los mutantes, donde la alteración de la actividad del mutante IIIa/IIa es distinta en cada línea.

En estos experimentos se descartó también la participación del factor SRF en la activación de este promotor. Para este estudio se utilizó como control la activación del promotor de c-fos, un gen ampliamente estudiado en el que se ha demostrado que se encuentra activado principalmente por el complejo ELK1/SRF. En nuestras células se observó una clara unión *in vivo* de ambos factores en el

promotor de c-fos mientras que SRF no dio ninguna señal con el promotor INSIG2.

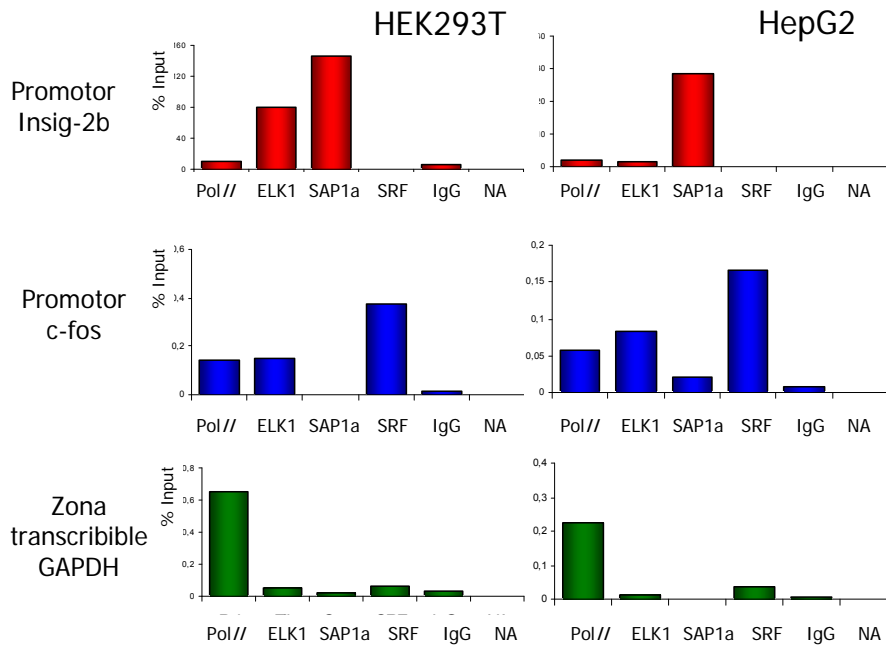


Figura 57: Las proteínas ELK1 y SAP1a se unen *in vivo* al promotor INSIG2 humano. Gráficos representativos de al menos 3 replicados de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina con células HepG2 y HEK293T. El promotor de c-fos se utilizó como control positivo para las proteínas ELK1 y SRF mientras que la zona transcribible de GAPDH se utilizó como control positivo de la RNA-PolII y negativo del resto de factores de transcripción. La cuantificación se realizó mediante interpolación a partir de la curva de calibración y los valores se expresan como % del Input considerando al "input" como 100% y al "no anticuerpo" como 0%.

Para corroborar los datos de activación de este promotor a través de las proteínas miembro de la familia de las Ets, se realizaron experimentos de RNA de interferencia transfectando células HepG2 con siRNA para *ELK1* y *SAP1a*. Como se puede ver en la **figura 58 A y B** el siRNA de *ELK1* redujo un 50 % la expresión tanto de este gen

como de *SAP1a* mientras que el siRNA de *SAP1a* redujo casi en un 80% su expresión sin efecto sobre la expresión de *ELK1*. En cuanto al efecto de esta inhibición sobre el gen diana, se observó claramente que sólo cuando se inhibió la expresión de *SAP1a*, se observó una disminución de la expresión de *INSIG2* en al menos un 70% que se vió acompañada de un aumento significativo de *SREBP1c* (Figura 58 C y D).

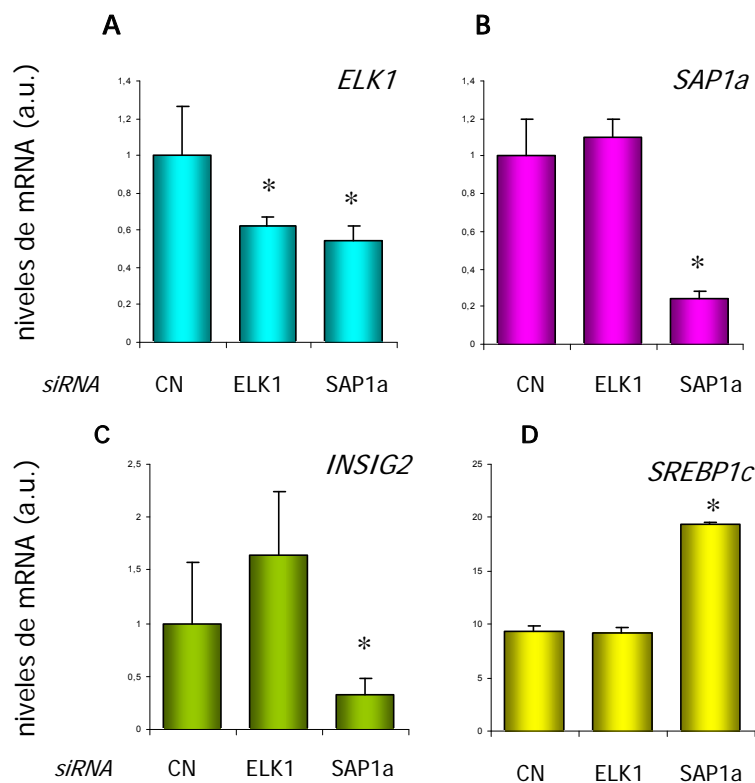


Figura 58: La expresión de *SAP1a* regula la expresión de *INSIG2* y *hSREBP1c*. Las células HepG2 se transfectaron con siRNA para *ELK1* o *SAP1a* y se extrajo el RNA total. La expresión de *ELK1* (A), *SAP1a* (B), *INSIG2* (C) y *SREBP1c* (D) se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Las barras indican la desviación estándar (* $p < 0,05$).

Por último se realizó un experimento de sobreexpresión de SAP1a y ELK1 en estas mismas células. Como se ha demostrado previamente, las proteínas ELK1 y SAP1a necesitan ser activadas por fosforilación para su actividad (Janknecht and Hunter, 1997). Por esto realizamos experimentos de luciferasa en los que se cotransfectó el vector de expresión de luciferasa bajo el control del promotor mínimo humano INSIG2 junto con el vector de expresión de las proteínas Ets y un vector que expresa una forma constitutivamente activa de la proteína Ras.

Como se puede ver en la **figura 59A** la activación del promotor ocurrió únicamente en las células transfectadas con el vector de expresión de SAP1a, sin observarse cambios en las células transfectadas con el vector de expresión de ELK1. Además esta activación era dependiente de la dosis de vector de expresión de Ras. Esto nos indica que al menos en HepG2 la activación del promotor hINSIG2 está mediada únicamente por la proteína SAP1a. Esta activación se verificó utilizando un vector de expresión que contenía el dominio de unión al DNA de SAP1a (pCA-SAP1aDBD) y que por lo tanto funciona como un dominante negativo para esta proteína. La sobreexpresión de Ras produjo una activación del promotor de un 60%. Cuando agregamos además el vector de expresión de la proteína completa SAP1a, observamos una activación de más del 200%, mientras que la expresión del dominio de unión a DNA sólo activaba al promotor un 40%. Por lo tanto podemos decir que el promotor hINSIG2 es regulado por la proteína SAP1a, y que la activación es dependiente de su estado de fosforilación por la vía de Ras (**Figura 59B**).

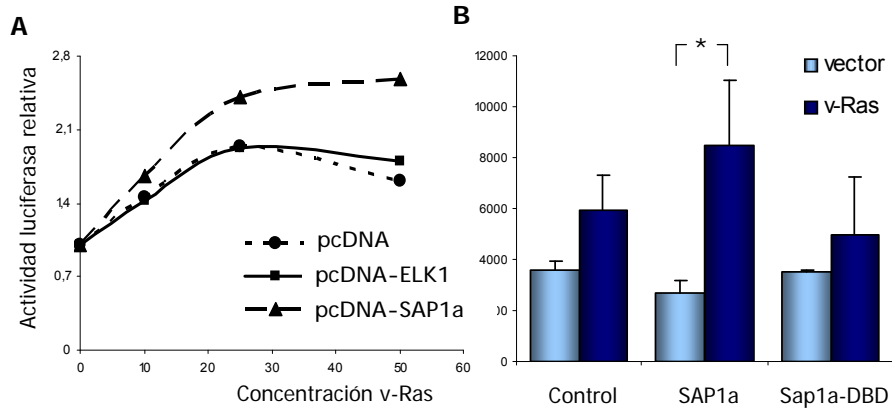


Figura 59: El promotor hINSIG2 es activado por SAP1a y esta activación es dependiente de Ras. Las células HepG2 se cotransfectaron con el plásmido de gen reportero luciferasa conteniendo 300 pb del promotor hINSIG2 junto con: **(A)** vectores de expresión para ELK1 y SAP1a o vector vacío (pcDNA3) y concentraciones crecientes del plásmido de expresión de Ras ó **(B)** vectores de expresión de SAP1a y SAP1a-DBD ó vector vacío (pCAGGS) y 25 ng del plásmido de expresión de Ras. 48 hs post-transfección, se lisaron las células y se midió la actividad luciferasa. Las actividades se expresan como la medida de la relación firefly/renilla. Las barras indican la desviación estándar (* $p < 0,05$).

Discusión

Como miembros del grupo de mamíferos los humanos compartimos muchas características fisiológicas, anatómicas y metabólicas con los ratones. La similitud existente entre los genomas humano y de ratón ha permitido a los investigadores en los últimos años generar modelos de un gran número de enfermedades. Sin embargo, cuantos más modelos se identifican más diferencias se encuentran entre los defectos que presenta un mutante murino con los que presenta la enfermedad en humanos (Erickson, 1989). Se han realizado numerosos esfuerzos con el objetivo de desarrollar modelos murinos para el estudio de las alteraciones del metabolismo lipoproteico y la aterosclerosis (Breslow, 1993). Una de las dificultades en el uso de este animal para la identificación de genes que controlan estas enfermedades es la existencia de cepas murinas resistentes al desarrollo de aterosclerosis y diabetes (Stein and Stein, 2007). Otra diferencia notable se encuentra en la progresión de la lesión de la placa de ateroma que en los ratones no avanza hasta el estadio de ruptura que normalmente se observa en humanos (Schwartz et al., 2007). Por lo tanto es importante tener en cuenta que existen diferencias sustanciales entre ratón y humano tanto en el metabolismo del colesterol como de los ácidos grasos.

La regulación diferencial de la expresión génica parece ser una posible explicación para muchas de las diferencias observadas entre el humano y el ratón (Suzuki et al., 2004; Tautz, 2000). Un ejemplo claro dentro del metabolismo lo encontramos en la regulación de la conversión de colesterol en ácidos biliares a nivel de la enzima CYP7A1 que cataliza el paso limitante de esta vía. Mientras que en rata y ratón existe una regulación positiva del promotor de CYP7A1, mediada por el receptor nuclear LXR, en humanos y hamster la respuesta es mínima y en conejo y mono se observa represión. Aunque en la secuencia humana existen 2 mutaciones simples del motivo DR4 de reconocimiento a este receptor nuclear que explicarían esta diferencia, la secuencia de hamster es idéntica a la de rata y ratón (Repa and Mangelsdorf, 2000).

También se ha demostrado que aunque existe una gran homología en las secuencias correspondientes a los sitios de unión a factores de transcripción, se observa una gran divergencia en los procesos involucrados en el mecanismo intrínseco de regulación transcripcional en distintas especies. Un estudio publicado en 2007

en *Nature Genetics* demostró que, en un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina realizado en hepatocitos humanos y de ratón y dependiendo del factor de transcripción estudiado, entre el 41% y el 89% de los promotores ortólogos que se unían a una proteína en una especie no lo hacían en la segunda especie (Odom et al., 2007). Esto demuestra que para el mapeo de elementos funcionales responsables de la expresión génica se requerirá una medida directa de la unión de los factores transcripcionales en distintas especies.

La **regulación transcripcional** es uno de los puntos cruciales en la determinación de cambios evolutivos en las relaciones fenotipo-genotipo. Distintas evidencias indican que las poblaciones guardan una extensa variación genética en las secuencias de promotores, que una fracción importante de estas variaciones tienen consecuencias bioquímicas en los fenotipos y que algunas de ellas son generadas por selección (Wray et al., 2003). Es importante tener en cuenta que las proteínas que funcionan como factores de transcripción se encuentran dentro de los grupos que mayor divergencia evolutiva presentan. Un estudio acerca de la divergencia funcional de un gran número de proteínas en la evolución humana demostró que las proteínas implicadas en procesos reguladores incluidos los factores de transcripción, presentaban un alto grado de plasticidad (Lopez-Bigas et al., 2008). En este trabajo se analizó el metabolismo de la glucosa incluyendo la insulina y el glucagon, así como también sus receptores, un gran número de las enzimas involucradas en esta vía, entre ellas distintas quinasas, y algunos reguladores transcripcionales incluyendo SREBP1. Los resultados obtenidos demostraron que las proteínas involucradas en la regulación presentaban un grado de conservación mucho menor comparado con las enzimas directamente involucradas en las reacciones de catálisis.

El metabolismo en los organismos complejos se encuentra regulado por tres tipos fundamentales de control, que normalmente funcionan de forma coordinada (Desvergne et al., 2006). El primero corresponde al clásico control alostérico de la actividad de las enzimas clave de la vía metabólica, efecto mediado por la unión de un activador. El segundo mecanismo involucra una serie de modificaciones postraduccionales que alteran el equilibrio entre la

cantidad de enzima activa e inactiva o afectan a su estabilidad. Por último, el tercer mecanismo afecta los niveles de expresión de las enzimas clave y es efectivo en una mayor escala de tiempo. La comprensión de este **control transcripcional del metabolismo** requiere de tres ramas de información complementarias: 1) eventos que ocurren por encima de la actividad transcripcional, que definen las señales involucradas y su ruta hacia el núcleo; 2) los mecanismos moleculares a través del cual operan los factores de transcripción; y 3) los eventos por debajo de la actividad transcripcional, que dependen de los grupos de genes diana y la amplitud de la señal generada para alcanzar el equilibrio de la homeostasis.

Centrándonos en la patología metabólica regulada por la vía SREBP nos propusimos analizar la regulación transcripcional, estudiando la primera de estas tres ramas, es decir, los eventos involucrados en la expresión de SREBP, que actúa a su vez como factor de transcripción, y de INSIG que regula su ruta hacia el núcleo. Los estudios previos realizados en rata y ratón fueron de fundamental importancia como guía para la búsqueda de elementos reguladores en los promotores humanos, como previamente hemos indicado, aunque las diferencias que existen entre ambos hacen necesario el estudio de los mecanismos de regulación metabólica en cada especie.

Existen dos isoformas de la proteína SREBP1, SREBP1a y SREBP1c, que se producen por *splicing* alternativo haciendo uso de dos promotores independientes. En primer lugar hemos estudiado el **promotor humano SREBP1a** identificando la región correspondiente al promotor proximal. Este promotor, al igual que el promotor murino, está comprendido en una pequeña zona del DNA de 75pb que se caracteriza por una región rica en GC, que presenta una homología del 42,3% con el promotor murino. Como hemos podido demostrar esta región contiene 3 sitios superpuestos SP1/EGR1 capaces de unir ambos factores de transcripción tanto *in vitro* como *in vivo*. Sitios superpuestos SP1/EGR1 se encuentran presentes en otros promotores, siendo la unión de ambos factores mutuamente excluyente en la mayoría de ellos (Huang et al., 1997). En el caso de nuestro promotor, hemos podido demostrar que cantidades elevadas de la proteína EGR1 son capaces de desplazar a la proteína SP1 previamente unida a estos sitios de unión (**Figura 27**). Sin embargo,

las tres cajas GC no tienen la misma capacidad de unión a EGR1. Esta proteína se une más eficientemente al sitio denominado C que a los sitios A y B, enfatizando el rol esencial de este sitio en la regulación de la expresión del transcrito SREBP1.

Adamson y colaboradores han propuesto 3 “niveles de seguridad” para la identificación de los genes diana de EGR1 (Adamson and Mercola, 2002): I) una correlación entre la expresión de *Egr1* y el gen en cuestión utilizando señales moleculares capaces de inducir a *Egr1* o vectores de expresión de *Egr1*; II) la identificación *in vitro* de la unión de EGR1 al promotor del gen en estudio y III) la verificación *in vivo* de la unión de EGR1 mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Nuestro estudio ha analizado el papel de EGR1 bajo estos tres niveles de seguridad, por lo que SREBP1a puede considerarse como gen diana para este factor de transcripción.

Existen ejemplos muy bien documentados de la función dual que tiene EGR1 tanto como activador o represor transcripcional (Davis et al., 2003). Nuestras evidencias sugieren que EGR1 funciona como un represor transcripcional para el promotor SREBP1a humano. Este rol inhibitorio es a su vez específico para el promotor SREBP1a ya que la sobreexpresión de *EGR1* aumenta levemente los niveles de actividad del promotor SREBP1c (**Figura 29**).

La proteína EGR1 tiene una amplia expresión y es inducida por diversos mitógenos y factores de diferenciación incluida la insulina (Mohn et al., 1991). A su vez, EGR1 regula la expresión de insulina a través de la regulación de los niveles de PDX1 en la célula β -pancreática (Eto et al., 2007). Por otro lado, SP1 se define como un factor basal de transcripción que media la interconexión entre las vías de señalización y la transcripción génica, incluida la expresión de insulina (Samson and Wong, 2002). Incluso, SP1 es un activador del gen *EGR1*, demostrando un mecanismo que facilita la inhibición mediada por la interacción de ambas proteínas actuando en el mismo sitio de unión al DNA combinada con la habilidad de SP1 de activar EGR1. Un modelo similar de expresión génica dependiente de EGR1/SP1 en sitios superpuestos se ha descrito para otros genes como la enzima málica (Barroso and Santisteban, 1999).

EGR1 está implicado en la regulación de un amplio rango de procesos celulares, que incluyen la proliferación, crecimiento y

apoptosis (Thiel and Cibelli, 2002). La implicación de EGR1 en el control del crecimiento celular se basa en la correlación entre las respuestas mitógenicas y la biosíntesis de EGR1. Sin embargo, el hecho de que la sobreexpresión de EGR1 no induce ni muerte celular ni proliferación sugiere que EGR1 por si misma no es suficiente para producir cambios en estos parámetros. Recientemente, Nakakuki y colaboradores mostraron que SREBP1a regula el crecimiento celular (Nakakuki et al., 2007). Estos autores resaltan los efectos bifásicos de SREBP1a que dependen de su abundancia nuclear; a bajos niveles esta proteína promueve la proliferación mientras que su sobreexpresión bloquea el crecimiento celular. La regulación de la expresión de SREBP1a que ejerce EGR1, como se ha demostrado en nuestros estudios, podría revelar nuevos aspectos a tener en cuenta en el control del ciclo celular y el crecimiento.

La relevancia de las funciones que tiene SREBP1c sobre el control del metabolismo así como su papel en patologías metabólicas ha hecho que su regulación sea un tema ampliamente estudiado en los últimos años. Hay que tener en cuenta que la regulación transcripcional de esta isoforma es compleja y está mediada por una amplia variedad de factores lo que dificulta su estudio especialmente en humanos. Existen diferencias significativas a nivel de secuencia entre el **promotor SREBP1c humano** y murino como se puede ver en la **figura 31**. Si observamos el promotor humano en dirección 3' a 5', podemos ver que se identifican *in silico* 8 sitios adicionales SP1, un sitio adicional SRE ya descrito previamente (Dif et al., 2006), un sitio DR1 y un sitio de unión para el factor PDX1. Además, el promotor humano carece de una caja E localizada entre los sitios SRE y NFY presente en el promotor murino.

La importancia de los sitios NFY, SRE y SP1 en la actividad del promotor SREBP1c se demostró claramente utilizando el promotor de ratón en células HEK293T (Amemiya-Kudo et al., 2000). Un estudio de actividad transcripcional de 30 mutantes seriados de este promotor demostró que los mutantes NFY y SRE mantenían sólo un 10% de su actividad basal y que disminuía además su inducción por insulina (Chen et al., 2004). En este mismo estudio la mutación del sitio SP1 redujo sólo levemente la actividad basal, manteniendo casi intacta su respuesta a insulina. En cambio, los estudios realizados con el promotor de rata en hepatocitos relacionan a estos sitios con

la regulación mediada por insulina, sin observar cambios significativos en la actividad basal cuando se eliminan tanto NFY como SRE (Cagen et al., 2005). En el promotor humano hemos observado que la eliminación del sitio NFY y SRE2 produce una disminución significativa de la actividad basal que se correlaciona también con una disminución en la respuesta a insulina (**Figuras 34 y 36**). Además, según nuestros resultados, la eliminación del sitio SRE más distal, cuya secuencia presenta mayor diversidad con respecto a la secuencia consenso que la correspondiente al sitio proximal SRE2, no produce cambios en la actividad basal del promotor hSREBP1c aunque sí parece participar en la respuesta a insulina.

Estudios realizados en cultivo primario de hepatocitos de rata mostraron que en el promotor de rata la respuesta a insulina es dependiente de la combinación de los sitios LXRE, SRE, NFY e incluso SP1 (Cagen et al., 2005). En cambio un estudio realizado en hepatocitos de rata con el promotor murino sugirió que son los sitios LXRE los responsables fundamentales de esta regulación (Chen et al., 2004). Nuestros resultados demuestran que la regulación por insulina del promotor hSREBP1c está mediada no sólo a través de los sitios SRE/NFY sino también a través de los sitios LXRE (**Figura 36**), confirmando resultados descritos previamente. (Dif et al., 2006). Un estudio realizado en adipocitos 3T3-L1 ha mostrado que la regulación por insulina del promotor SREBP1c involucra un proceso de remodelado de cromatina (Lee et al., 2007). En este estudio se demostró mediante ensayos de ChIP que en presencia de insulina el promotor interacciona con los factores del complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF en presencia de la propia proteína SREBP1c. Este complejo podría funcionar por tanto como un integrador de señales metabólicas mediada por distintos factores transcripcionales como LXR o PPAR, corroborando el control que ejercen varios factores en la respuesta a insulina del promotor hSREBP1c.

También hemos estudiado la respuesta del promotor humano a cAMP y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). En este aspecto es fundamental la presencia de los 2 sitios de respuesta a receptores nucleares LXR, responsables en gran medida de la regulación de este promotor. Los LXR actúan como heterodímeros obligados con RXR y se unen preferentemente a una secuencia de DNA que consiste en 2 hexanucleótidos conservados separados por 4 bases denominado

motivo DR4. Tanto cAMP como los PUFAs son represores de la actividad transcripcional del promotor humano SREBP1c, y en ambos casos, mediado por los sitios LXRE (**Figuras 37 y 39**) de la misma manera que ocurre en la rata y el ratón (Yoshikawa et al., 2002) (Deng et al., 2002). Se ha propuesto que la acción de cAMP sobre este promotor es mediada por la activación de PKA que fosforila LXR α inhibiendo su actividad transcripcional (Yamamoto et al., 2007). La inhibición mediada por los PUFA, especialmente por el ácido araquidónico que es el más activo, también ocurre a este nivel. Se ha propuesto que estos compuestos interaccionan con el sitio de unión a ligando (LBD) inhibiendo la formación del heterodímero LXR/RXR (Yoshikawa et al., 2002).

Los oxisteroles, derivados oxidados del colesterol (Janowski et al., 1996) son importantes intermediarios en varios procesos catabólicos hepáticos y extrahepáticos. En base a distintas evidencias y a pesar de sus bajas concentraciones *in vivo* (su vida media es menor que la del propio colesterol y como consecuencia están presentes en todos los sistemas mamíferos, casi invariablemente acompañados de un exceso entre 10^3 y 10^6 de colesterol), los oxisteroles son considerados mediadores fisiológicos importantes de los efectos inducidos por el colesterol. Quizás una de las mejores evidencias que apoyan esta consideración es la presencia de receptores nucleares que se unen a estos compuestos y el hecho de que estos compuestos son activadores potentes de genes regulados por esteroides *in vitro* (Bjorkhem, 2002).

Los oxisteroles son reguladores positivos de la expresión de SREBP1c en hígado a través de sus sitios LXRE en ratón (Repa et al., 2000; Yoshikawa et al., 2001) al igual que en humanos, tal como hemos podido demostrar (**Figura 38**). A su vez, son inhibidores del procesamiento de SREBP a través de la activación de INSIG. Además los oxisteroles parecen estar involucrados en la regulación de otros factores implicados en el metabolismo del colesterol como son por ejemplo CYP7A1, la enzima limitante en la conversión de colesterol a ácidos biliares, y donde fue identificado el motivo DR4, o los transportadores ABC encargados del transporte de colesterol a través de la membrana celular (Repa and Mangelsdorf, 2000). De la misma forma que ocurre con LXR, otros receptores nucleares, como FXR o LRH parecen ser de especial importancia en la regulación del

metabolismo del colesterol, con lo que su estudio podría ser fundamental como potenciales diana para el desarrollo de nuevos fármacos.

Virtualmente se puede decir que todas las familias de factores de transcripción están de una forma u otra relacionadas con la regulación metabólica. Sin embargo algunas de ellas parecen estar especialmente implicadas en esta regulación, como ocurre con los receptores nucleares. La superfamilia de los receptores nucleares está compuesta por 49 miembros, todos factores de transcripción regulados por ligando. A su vez, estos receptores se pueden dividir en 2 grupos basándose en su localización dentro de la célula. Un primer grupo se localiza en el citoplasma y es translocado al núcleo sólo cuando se unen a sus respectivos ligandos. El segundo grupo, dentro del cual se encuentran LXR y PPAR (Peroxisome proliferator—activated receptors), tienen una localización nuclear estando unidos a los elementos de respuesta en cis localizados en los promotores de sus genes diana, independientemente de la presencia de ligando.

Nuestro estudio del promotor humano demuestra la presencia de un sitio DR1 que tiene la capacidad de unirse al dímero PPAR/RXR (**Figura 43**). La subfamilia de receptores PPAR consiste en 3 isoformas denominadas PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ siendo la isoforma α la predominante en hígado y uno de los reguladores más importantes de la oxidación de ácidos grasos. Esta isoforma se expresa además en riñón y corazón y en forma especialmente abundante en tejido adiposo marrón. Los estudios realizados *in vivo* demostraron que PPAR es capaz de unirse al promotor en presencia de RXR y que tanto el promotor SREBP1c humano como el de rata son activados por un agonista de este receptor. Según nuestros resultados, esta activación ocurre no sólo a través de su unión al sitio DR1 sino también a través de los sitios LXRE. Esta unión explicaría la respuesta positiva en el promotor de rata que no contiene en su secuencia un sitio DR1. Estos resultados son opuestos a los experimentos realizados con el promotor de ratón que sugerían una inhibición de la expresión de SREBP1c mediada por PPAR, aunque este efecto se observaba sólo en presencia de agonistas LXR (Yoshikawa et al., 2003). En este trabajo se utilizaron células en cultivo HepG2 y HEK293 para demostrar que PPAR es un mediador negativo de la regulación del promotor SREBP1c a través de la inhibición de la acción del dímero LXR/RXR, ya que

PPAR compite con LXR por su unión a RXR. Como ya se ha expuesto previamente, la regulación de SREBP1c así como su expresión es distinta en líneas celulares que en células en cultivo primario. Nuestros resultados se han llevado a cabo en cultivos primario de hepatocitos de rata, lo que podría ser una de las razones que expliquen las diferencias encontradas. Sin embargo, y de acuerdo con nuestros datos, el estudio del ratón knock-out para PPAR α presenta una disminución de los niveles de expresión de SREBP1c que además pierde el patrón de periodicidad diurna que presenta un ratón normal (Knight et al., 2005). Además ratones normales alimentados con WY14643, un activador de PPAR α , presentan un aumento de la síntesis de ácidos grasos que no se observa en los animales knock-out, lo que sugiere una participación de PPAR α en la transducción de señales nutritivas que regulan el metabolismo lipídico en el hígado también en esta especie (Hebbachi et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que el uso de agonistas PPAR α en células de hepatoma de rata produce una disminución de la proteína activa nSREBP1c, aunque este efecto parecería ser mediado por un aumento en los niveles de expresión de INSIG1 (Konig et al., 2009). PPAR α se ha relacionado también con la resistencia a insulina aunque los resultados no son del todo concluyentes (Ferre, 2004).

Se ha demostrado que el heterodímero PPAR α /RXR se puede comportar como un regulador positivo o negativo en una misma célula dependiendo del gen implicado, de la estructura del promotor y del resto de proteínas con las que interacciona. Una de las formas de explicar las acciones tan variadas que tiene un mismo receptor nuclear actuando de forma antagónica sobre distintos puntos de una misma vía metabólica es gracias al reclutamiento diferencial de correpresores y coactivadores (Hu et al., 2003; Yu and Reddy, 2007). Wagner y colaboradores, en un estudio realizado en macrófagos derivados de ratones knock-out para LXR, demostraron la regulación diferencial de los promotores ABCA1 y SREBP1c por LXR mediada por el reclutamiento de cofactores (Wagner et al., 2003). Mientras que la activación de SREBP1c requiere la presencia de un agonista unido a LXR, el promotor ABCA1 es activado aún en ausencia de ligando. El promotor ABCA1 es activado por otros factores, como USF1 y 2 que reclutan los cofactores necesarios para la activación del promotor. Además, en ausencia de agonistas de los LXR, estos receptores

reclutan el correpresor NCoR que mantiene al promotor en un estado reprimido, activándose constitutivamente en las células LXR^{-/-}. En el promotor SREBP1c, en cambio, la delección de LXR no es suficiente para activar al promotor, manteniéndose inactivo aún en ausencia de NCoR. Se ha demostrado que PPAR α interacciona con factores constitutivos como AP1 o SP1 e incluso con coreguladores comunes a otros receptores nucleares como NCoR y SRC1 (Holden and Tugwood, 1999). La unión de estos dímeros podría explicar el estado inactivo de SREBP1c en ausencia de LXR, teniendo en cuenta que NCoR puede ser reclutado por PPAR. Esto nos demuestra la complejidad de la regulación transcripcional del metabolismo y la necesidad de un estudio que involucre no sólo a los factores que presentan unión directa al DNA sino de los cofactores involucrados.

La primera función de los los coactivadores una vez que son reclutados y ensamblados con un receptor nuclear unido a ligando, es remodelar la estructura de la cromatina a través bien de su actividad acetiltransferasa (HAT) o metil transferasa intrínseca como ocurre con los coactivadores universales CBP, p300 o la familia SRC1, o bien sirviendo como puentes moleculares para el anclaje de otras proteínas transfiriendo una señal específica al aparato de transcripción basal. Un ejemplo de este segundo tipo de coactivadores es PGC1 α y PGC1 β (PPAR coactivators 1 α y 1 β) (Roeder, 2005; Yu and Reddy, 2007). Estos cofactores responden a una gran variedad de estímulos ambientales, desde la temperatura hasta el estado nutricional, y regulan coordinadamente vías metabólicas y procesos biológicos de una forma tejido-específica. Es importante remarcar que los coactivadores PGC1 tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa, lipídica y energética y han sido relacionados con varias situaciones patológicas como la obesidad, o diabetes (Yoon et al., 2001; Patti et al., 2003; Yamamoto et al., 2004; Lin et al., 2005a).

Un aspecto importante de los coactivadores PGC1 es que son muy versátiles y tienen la capacidad de interactuar con factores de transcripción muy diversos, activando así distintas vías en diferentes tejidos. Entre los factores activados por PGC1 se encuentran una gran variedad de receptores nucleares incluidos PPAR y LXR (Lin et al., 2005a). La coactivación de PPAR está relacionada con la oxidación de ácidos grasos mientras que la interacción con LXR se ha relacionado

con la secreción de lipoproteínas. Por otro lado, se ha demostrado que PGC1 β es un coactivador de SREBP1c (Lin et al., 2005b), mientras que esta variante es incapaz de interactuar con otros coactivadores como p300 y CBP que interactúan con SREBP1a y SREBP2 (Bennett et al., 2004).

Teniendo en cuenta el papel fundamental que tienen estos correceptores en la homeostasis lipídica y de la glucosa, nos pareció relevante el estudio del papel de PGC1 en la regulación de la transcripción de SREBP1c. Para ello realizamos un estudio mediante inmunoprecipitación de cromatina (**Figuras 45 y 47**). Una de las dificultades para el estudio del promotor humano es la falta de líneas humanas que expresen la isoforma SREBP1c en condiciones fisiológicas. A pesar de eso y teniendo en cuenta que según nuestros resultados la regulación del promotor humano es igual a la del promotor de rata al menos en los aspectos de nuestro interés, utilizamos los hepatocitos de rata como modelo para el estudio de la activación *in vivo* del promotor SREBP1c. En primer lugar comprobamos que mediante esta técnica éramos capaces de diferenciar la posición en el promotor donde se une cada uno de los factores. Tanto SREBP como LXR se encuentran constitutivamente unidos al promotor, aumentando la unión de LXR a los sitios LXRE cuando se trata con un ligando específico. También aumenta la unión de SREBP al sitio SRE tras el tratamiento con insulina aunque dicho aumento es mucho más leve que el observado para LXR tras el tratamiento con su activador específico. En cuanto a PPAR, observamos que se inmunoprecipita en condiciones de tratamiento con ligando unido al sitio LXRE (**Figura 48**).

Una vez comprobado que las condiciones experimentales eran correctas, pasamos al estudio de la participación de PGC1 en la regulación del promotor SREBP1c. Teniendo en cuenta que PGC1 actúa como un coactivador de LXR, PPAR e incluso SREBP, y que estas 3 proteínas son capaces de interactuar con el promotor SREBP1c, analizamos la unión de este coactivador tanto en el sitio SRE como en el sitio LXRE. Así pudimos observar que PGC1 inmunoprecipita asociada a ambos sitios, habiendo un aumento significativo en la unión tras el tratamiento con insulina, y observándose un aumento de la unión de PGC1 al sitio LXRE en el tratamiento con WY14643, ligando de PPAR α . Estos resultados nos demuestran que PGC1 está

involucrado en la regulación del promotor mediada por insulina así como en la regulación mediada por LXR/PPAR. Además estos resultados concuerdan con los experimentos realizados en HepG2 donde demuestran que la expresión de PGC1 α , ausente en estas células, restituye la expresión de SREBP1c así como su capacidad de responder a insulina (Oberkofler et al., 2004). De esta forma PGC1 parece ser un elemento regulador donde confluyen la vía lipogénica a través de SREBP1c y la vía gluconeogénica.

Desde que se describió el papel clave que ejerce la vía SREBP en el metabolismo lipídico, numerosos investigadores han buscado polimorfismos que pudieran estar relacionados con patologías de origen multigénico, especialmente la diabetes tipo 2. Nuestro grupo identificó 10 nuevos polimorfismos tras el análisis del gen *SREBF1* en pacientes diabéticos tipo 2. Ninguna de las nuevas variantes encontradas pertenecía a regiones promotoras (Tesis doctoral realizada por Vernia Miralles, S; <http://hdl.handle.net/10261/4808>). Sin embargo cuatro SNPs descritos por otro grupos de investigación cumplen esta condición. Las variantes -688C>T (rs11869628) y -580/581delCA, descritas por el grupo de Fabienne Foufelle (Eberle et al., 2004a) se encuentran en una región distal del promotor SREBP1a, y por lo tanto no afectan a ninguno de los sitios que hemos mostrado responsables de su actividad. Los otros dos polimorfismos corresponden al promotor SREBP1c. La primera de ellas descrita por el mismo grupo corresponde al cambio -435T>C y se encuentra a 3 pares de bases en posición 3' con respecto al sitio DR1, por lo que la influencia de esta mutación en la actividad dependerá probablemente de factores de conformación de la cromatina *in vivo*. Por último, la variante rs12945414 (-451C>A) descrita en las base de datos se localiza dentro del sitio DR1, con lo que podría tener una relevancia funcional. Sin embargo, no existen casos de pacientes publicados con este SNP y en el screening realizado en nuestro laboratorio ningún paciente presentó esta variación.

Además de su regulación transcripcional, la expresión de las proteínas SREBP está regulada por un mecanismo de procesamiento proteolítico que libera la proteína madura. En este mecanismo están involucradas las proteínas SCAP e INSIG. La proteína INSIG se ha relacionado con el desarrollo de diversas patologías metabólicas y aunque existe bastante información acerca de esta proteína poco se

ha estudiado acerca de su regulación. En el año 2004 se publicó un estudio que demostraba que existe en ratones un transcrito específico de hígado, denominado INSIG2a, que se encuentra regulado negativamente por insulina (Yabe et al., 2003). Este transcrito, así como el transcrito ubicuo denominado INSIG2b, difieren en el uso de 2 promotores que dan origen a 2 exones iniciales no codificantes, por lo que los dos mensajeros transcriben la misma proteína. La presencia de un transcrito específico de hígado regulado por insulina sugirió la existencia de un mecanismo de regulación de SREBP1c específico de tejido mediado por INSIG2. Interesados en la regulación metabólica de la vía SREBP, nos propusimos analizar si la regulación transcripcional en humanos también estaba mediada a través del uso de distintos promotores de INSIG2. El análisis de la expresión de los posibles transcritos en distintas líneas celulares nos mostró que existe una diferencia sustancial entre especies (**figura 50**). Aunque tal como se había descrito previamente en el hígado de ratón existe una prevalencia del transcrito 2a, en el hígado humano así como en el de rata se observa expresión exclusiva del transcrito homólogo a la variante 2b. Además todas las líneas de origen humano expresan exclusivamente este transcrito. La presencia de un posible transcrito 2a en las células de hámster evidencia que la presencia de variantes de expresión de este gen no está reducida exclusivamente al ratón.

A raíz de estos resultados nos interesamos en caracterizar el promotor INSIG2 humano. Dado que en este caso no existía ningún dato previo sobre la estructura del promotor, iniciamos un análisis de unas 2500 pb de la región en posición 5' con respecto al sitio de inicio de transcripción descrito en las bases de datos. Este estudio nos permitió definir al promotor proximal comprendido en las primeras 300 pb (**Figura 52**). Dentro del promotor proximal hemos identificado posibles sitios de unión a factores de transcripción como SNAIL, SOX5 o AML1, aunque mutaciones en estos sitios no alteran la actividad del promotor. También identificamos, mediante delecciones controladas, una zona del promotor entre -285 y -202 pb que es esencial para conseguir una actividad máxima del promotor INSIG2. El análisis *in silico* de esta región identificaba al factor LRF1 como posible efector, aunque el análisis de mutantes para este sitio no parece alterar significativamente su actividad.

El análisis de los posibles sitios de regulación de esta secuencia nos permitió definir la presencia de al menos un sitio de unión activo para las proteínas SAP1a y ELK1, pertenecientes a la familia de factores de transcripción Ets (**Figura 55**). Las proteínas Ets comparten un dominio de unión al DNA de unos 85 aminoácidos denominado dominio Ets que se caracteriza por su interacción específica con secuencias que contienen un núcleo formado por el trinucleótido GGA, y que está involucrado en la interacción proteína-proteína fundamental para su actividad biológica (Wasylyk et al., 1993). Existen en mamíferos más de 25 proteínas de esta familia de factores de transcripción que controlan procesos biológicos fundamentales que incluyen la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo y activación linfocitaria, transformación celular y apoptosis (Li et al., 2000). La unión a DNA, su localización celular, la especificidad de genes diana y la actividad transcripcional de estas proteínas está regulada por interacciones proteína-proteína, que incluyen interacciones entre distintos miembros de la familia así como también otros factores transcripcionales como AP1, NFκB y miembros de la familia PAX. Estas interacciones coordinan procesos celulares en respuesta a diversas señales que incluyen citoquinas, factores de crecimiento, antígenos y señales de estrés.

Dentro de la familia de factores Ets se define la subfamilia de los TCF (ternary complex formation) dentro de la cual se encuentran ELK1, SAP1a y NRF2. De estas tres proteínas sólo ELK1 y SAP1a son capaces de unirse *in vitro* e *in vivo* al promotor INSIG2. Las proteínas de la subfamilia de TCF se caracterizan por la formación de un complejo trimérico o tetramérico que incluye la interacción con la proteína SRF y sin la cual, en la mayoría de los datos descritos es inactivo, como ocurre en el promotor c-fos que es el gen modelo para el estudio de esta subfamilia de factores. Sin embargo muy poco se sabe de la acción de estas proteínas en ausencia de esta interacción. Un ejemplo es el gen E74 en *Drosophila* que es activado por ELK1 y SAP1a en ausencia de SRF (Mo et al., 1998). De la misma forma, ELK1 y SAP1a regulan al promotor CCT (chaperon-containing t-complex polypeptide 1) de ratón de manera independiente a SRF (Yamazaki et al., 2003). El promotor humano INSIG2 se encontraría también dentro de la categoría de genes regulados por factores de la familia Ets de manera independiente de la proteína SRF.

Aunque históricamente se ha relacionado a los TCFs con la regulación de genes de respuesta inmediata, existen datos en la bibliografía que demuestran que algunos de estos factores se relacionan con la regulación mediada por factores nutricionales y hormonales. Un estudio en preadipocitos 3T3-F442A demostró que las proteínas ELK1 y SAP1a median la inducción de la transcripción de EGR1 producida por la hormona de crecimiento (GH) de forma dependiente de SRF (Clarkson et al., 1999; Watson et al., 1997). Se ha demostrado también que ELK1 junto con SRF se unen a 2 sitios activos en el promotor LXR β , y que estas proteínas regulan la respuesta a la glucosa de este promotor (Nilsson et al., 2007). Existen también datos en la literatura en los que ELK1 y SAP1a están implicados en la regulación hormonal sin depender de su unión a SRF. Por ejemplo, ELK1 y SAP1a se unen a sitios consenso que corresponden a elementos de respuesta a insulina en los promotores de prolactina, somatostatina y timidina quinasa de forma independiente de SRF (Jacob et al., 1995). El mismo grupo demostró que la expresión de ELK1 en células Rat2 que normalmente no expresan esta proteína, las convertía en células que responden a insulina, y su expresión en células CHO convierte a estas últimas en un fenotipo en el que la expresión del gen de la prolactina es activada por insulina (Jacob and Stanley, 2001). Estos datos nos sugieren que la regulación mediada por SAP1a del promotor INSIG2 podría involucrar no sólo su actividad basal sino también algún otro tipo de regulación metabólica. Aunque aparentemente INSIG2 es un gen expresado constitutivamente, existen evidencias de que el promotor INSIG2 se encuentra regulado a nivel transcripcional por factores como la Vitamina D o los receptores nucleares FXR, que son activados por ácidos biliares específicos como el ácido cólico (Lee et al., 2005; Hubbert et al., 2007). Sin embargo las secuencias responsables de estas respuestas se encuentran en regiones distales del promotor y alejadas de lo que hemos definido como promotor proximal.

Los factores de transcripción de la familia Ets son efectores de la cascada de señal de Ras-MAPK (Wasylyk et al., 1998). La fosforilación de estas proteínas por las MAPKs controla su actividad, sus interacciones con otras proteínas, su especificidad de acción y su transactivación. Se ha demostrado la convergencia de tres vías de

señalización mediadas por MAPK en la activación por fosforilación de SAP1a. Este factor de transcripción es sustrato de fosforilación específico de p38 MAPK que es sólo un activador débil de otros miembros de la familia Ets como ELK1. SAP1a es también activada por otras subclases de MAPKs que incluyen a JNK y ERK (Janknecht and Hunter, 1997). Este hecho resulta especialmente importante ya que la vía de las Ras-MAPK, especialmente ERK1/2, es una de las cascadas involucrada en la regulación de la respuesta metabólica a la insulina. Esta vía, cuyos genes diana incluyen diversos factores de transcripción, es clave para la determinación del destino celular mediada por insulina más que en las acciones que tiene esta hormona sobre la actividad de las enzimas responsables del metabolismo lipídico y de carbohidratos (Avruch, 1998). Otras vías que incluyen SAPK y p38 se han implicado también en señalización de la insulina, aunque sus efectores específicos no están del todo determinados. La participación de SAP1a en la activación de INSIG2 podría estar relacionada con la regulación del metabolismo mediada por insulina, aunque los componentes involucrados en esta vía de señalización así como su relevancia fisiológica aún quedan por determinar.

Es importante señalar que el efecto de SAP1a sobre la actividad del promotor INSIG2 depende de secuencias adyacentes cuya mutación anula la acción de SAP1a (**Figura 56**). Hemos intentado identificar sin éxito las proteínas que pudieran unirse a estas secuencias. Hemos analizado por ejemplo la participación del factor E2F que se predice como posible regulador actuando en cis, pero, al menos *in vitro* no hemos observado unión al promotor. Será necesario continuar la caracterización del promotor humano INSIG2 para analizar otros posibles factores de unión al promotor así como un *screening* que nos permita analizar proteínas capaces de interaccionar con SAP1a en el contexto de este promotor. Actualmente tenemos en curso el desarrollo de ratones transgénicos que expresan el promotor silvestre y el promotor mutante para el sitio ELK1/SAP1a controlando la expresión de la proteína GFP. El análisis de estos ratones nos permitirá descifrar la expresión fisiológica y tejido específica de nuestro promotor y la comparación con el mutante nos permitirá determinar la importancia de este sitio

de unión así como la relevancia que esta regulación tiene en los distintos tejidos.

En resumen, nuestro estudio funcional y estructural de los promotores humanos de SREBP1 y su regulador INSIG2 nos ha permitido delinear parte de la regulación transcripcional de esta vía así como las similitudes y diferencias entre humanos, rata y ratón. Esta información nos permitirá analizar la presencia de alteraciones que puedan tener relevancia fisiológica así como los mecanismos indispensables para la correcta funcionalidad de esta vías metabólicas.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

1 - El promotor mínimo humano SREBP1a se encuentra comprendido en una región de 75 pb en posición 5' con respecto al sitio de inicio de la transcripción y contiene 3 cajas GC que corresponden a sitios de unión a las proteínas SP1 y EGR1.

2- Los factores de transcripción SP1 y EGR1 compiten por sus sitios de unión en el promotor humano SREBP1a ejerciendo una función opuesta. Esta regulación dual del promotor SREBP1a humano es específica de esta isoforma ya que el promotor SREBP1c se activa por ambos factores de transcripción.

3- El promotor humano SREBP1c presenta una actividad basal que se encuentra regulada por la acción coordinada de los factores SP1, NFY y nSREBP. La participación de otros factores en la activación basal no puede descartarse.

4- La unión del factor NFY es fundamental tanto para la activación basal como para la activación por insulina del promotor humano SREBP1c.

5- La activación en respuesta a insulina del promotor humano SREBP1c está mediada por la presencia de dos sitios de respuesta a esteroides (SRE) y dos sitios de unión a los receptores nucleares LXR (LXRE), resultando ambos elementos necesarios para alcanzar la máxima respuesta.

6- El promotor humano SREBP1c es activado por los receptores nucleares PPAR. Esta acción está mediada a través de su unión tanto al sitio DR1 como a los sitios LXRE.

7- La expresión de un transcrito homólogo al transcrito hepatoespecífico INSIG2a de ratón no se observa en hígado humano.

8 - El promotor proximal INSIG2 humano está comprendido en 300 pb en posición 5' al sitio de inicio de la transcripción del gen. En esta región pueden identificarse 2 sitios de respuesta a las proteínas de la familia de las Ets. Al menos uno de estos sitios tiene la capacidad de unirse *in vitro* a las proteínas ELK1 y SAP1a de esta familia.

9- La actividad del promotor humano INSIG2 está mediada *in vivo* por la acción de la proteína SAP1a en estado fosforilado, dependiente de la vía Ras.

10- El estudio de los promotores humanos y su comparación con las características de promotores de otras especies permite comprender las diferencias y similitudes de regulación transcripcional existentes.

Bibliografía

Adams, C.M., Reitz, J., De Brabander, J.K., Feramisco, J.D., Li, L., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004). Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem* *279*, 52772-52780.

Adamson, E.D., and Mercola, D. (2002). Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. *Tumour Biol* *23*, 93-102.

Al-Sarraj, A., Day, R.M., and Thiel, G. (2005). Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *J Cell Biochem* *94*, 153-167.

Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A.H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., et al. (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res* *43*, 1220-1235.

Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Hasty, A.H., Okazaki, H., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., et al. (2000). Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J Biol Chem* *275*, 31078-31085.

Anderson, P.J., Critchley, J.A., Chan, J.C., Cockram, C.S., Lee, Z.S., Thomas, G.N., and Tomlinson, B. (2001). Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord* *25*, 1782-1788.

Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Molecular and cellular biochemistry* *182*, 31-48.

Azzout-Marniche, D., Becard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferre, P., and Foufelle, F. (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* *350 Pt 2*, 389-393.

Barroso, I., and Santisteban, P. (1999). Insulin-induced early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. *J Biol Chem* *274*, 17997-18004.

Bengochea-Alonso, M.T., and Ericsson, J. (2007). SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Current opinion in cell biology* *19*, 215-222.

Bennett, M.K., Lopez, J.M., Sanchez, H.B., and Osborne, T.F. (1995). Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. *Coordinate*

feedback regulation of two major lipid pathways. *J Biol Chem* 270, 25578-25583.

Bennett, M.K., and Osborne, T.F. (2000). Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6340-6344.

Bennett, M.K., Toth, J.I., and Osborne, T.F. (2004). Selective association of sterol regulatory element-binding protein isoforms with target promoters in vivo. *J Biol Chem* 279, 37360-37367.

Bjorkhem, I. (2002). Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest* 110, 725-730.

Breslow, J.L. (1993). Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8314-8318.

Briggs, M.R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 268, 14490-14496.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.

Cagen, L.M., Deng, X., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghov, R., and Elam, M.B. (2005). Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochem J* 385, 207-216.

Cervino, A.C., Li, G., Edwards, S., Zhu, J., Laurie, C., Tokiwa, G., Lum, P.Y., Wang, S., Castellini, L.W., Lusis, A.J., et al. (2005). Integrating QTL and high-density SNP analyses in mice to identify *Insig2* as a susceptibility gene for plasma cholesterol levels. *Genomics* 86, 505-517.

Clarkson, R.W., Shang, C.A., Levitt, L.K., Howard, T., and Waters, M.J. (1999). Ternary complex factors Elk-1 and Sap-1a mediate growth hormone-induced transcription of *egr-1* (early

growth response factor-1) in 3T3-F442A preadipocytes. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md *13*, 619-631.

Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 11245-11250.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* *162*, 156-159.

Davis, W., Jr., Chen, Z.J., Ile, K.E., and Tew, K.D. (2003). Reciprocal regulation of expression of the human adenosine 5'-triphosphate binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2) promoter by the early growth response-1 (EGR-1) and Sp-family transcription factors. *Nucleic Acids Res* *31*, 1097-1107.

DeBose-Boyd, R.A. (2008). Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell research* *18*, 609-621.

DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., Li, W.P., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Espenshade, P.J. (1999). Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* *99*, 703-712.

Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghow, R., and Elam, M.B. (2002). Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications* *290*, 256-262.

Deng, X., Yellaturu, C., Cagen, L., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghow, R., and Elam, M.B. (2007). Expression of the rat sterol regulatory element-binding protein-1c gene in response to insulin is mediated by increased transactivating capacity of specificity protein 1 (Sp1). *J Biol Chem* *282*, 17517-17529.

Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological reviews* *86*, 465-514.

Diamond, R.H., Du, K., Lee, V.M., Mohn, K.L., Haber, B.A., Tewari, D.S., and Taub, R. (1993). Novel delayed-early and highly insulin-induced growth response genes. Identification of HRS, a

potential regulator of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* *268*, 15185-15192.

Dif, N., Euthine, V., Gonnet, E., Laville, M., Vidal, H., and Lefai, E. (2006). Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem J* *400*, 179-188.

Dooley, K.A., Bennett, M.K., and Osborne, T.F. (1999). A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase promoter. *J Biol Chem* *274*, 5285-5291.

Duan, X., Zhu, W., Li, Y., Zhang, Z., Zhao, Y., Dao, J., and Xiao, Y. (2005). The effect of sterol regulatory element-binding protein 2 polymorphism on the serum lipid in northern Chinese subjects. *J Lipid Res* *46*, 252-257.

Ducluzeau, P.H., Perretti, N., Laville, M., Andreelli, F., Vega, N., Riou, J.P., and Vidal, H. (2001). Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* *50*, 1134-1142.

Eberle, D., Clement, K., Meyre, D., Sahbatou, M., Vaxillaire, M., Le Gall, A., Ferre, P., Basdevant, A., Froguel, P., and Foufelle, F. (2004a). SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. *Diabetes* *53*, 2153-2157.

Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Foufelle, F. (2004b). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* *86*, 839-848.

Edwards, P.A., Tabor, D., Kast, H.R., and Venkateswaran, A. (2000). Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimica et biophysica acta* *1529*, 103-113.

Engelking, L.J., Liang, G., Hammer, R.E., Takaishi, K., Kuriyama, H., Evers, B.M., Li, W.P., Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2005). Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest* *115*, 2489-2498.

Erickson, R.P. (1989). Why isn't a mouse more like a man? *Trends Genet* *5*, 1-3.

Ericsson, J., Jackson, S.M., Lee, B.C., and Edwards, P.A. (1996). Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 945-950.

Espenshade, P.J., and Hughes, A.L. (2007). Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual review of genetics* *41*, 401-427.

Eto, K., Kaur, V., and Thomas, M.K. (2007). Regulation of pancreas duodenum homeobox-1 expression by early growth response-1. *J Biol Chem* *282*, 5973-5983.

Feramisco, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2004). Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *J Biol Chem* *279*, 8487-8496.

Ferre, P. (2004). The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* *53 Suppl 1*, S43-50.

Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., and Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 12737-12742.

Giandomenico, V., Simonsson, M., Gronroos, E., and Ericsson, J. (2003). Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Molecular and cellular biology* *23*, 2587-2599.

Hall, D.H., Rahman, T., Avery, P.J., and Keavney, B. (2006). INSIG-2 promoter polymorphism and obesity related phenotypes: association study in 1428 members of 248 families. *BMC medical genetics* *7*, 83.

Hasty, A.H., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Perrey, S., Yoshikawa, T., Osuga, J., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., et al. (2000). Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *J Biol Chem* *275*, 31069-31077.

Hebbachi, A.M., Knight, B.L., Wiggins, D., Patel, D.D., and Gibbons, G.F. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency abolishes the response of lipogenic gene expression

to re-feeding: restoration of the normal response by activation of liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 283, 4866-4876.

Hegarty, B.D., Bobard, A., Hainault, I., Ferre, P., Bossard, P., and Foufelle, F. (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 791-796.

Heintzman, N.D., and Ren, B. (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci* 64, 386-400.

Herbert, A., Gerry, N.P., McQueen, M.B., Heid, I.M., Pfeufer, A., Illig, T., Wichmann, H.E., Meitinger, T., Hunter, D., Hu, F.B., et al. (2006). A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science (New York, N.Y)* 312, 279-283.

Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M., and Sato, R. (2003). Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J Biol Chem* 278, 16809-16819.

Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 276, 36431-36437.

Holden, P.R., and Tugwood, J.D. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences. *J Mol Endocrinol* 22, 1-8.

Horton, J.D., Bashmakov, Y., Shimomura, I., and Shimano, H. (1998a). Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5987-5992.

Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.

Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Shimano, H. (1998b). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* 101, 2331-2339.

Horton, J.D., Shimomura, I., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., and Hammer, R.E. (2003). Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. *J Biol Chem* *278*, 36652-36660.

Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., and Lala, D.S. (2003). Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md *17*, 1019-1026.

Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 11603-11607.

Huang, R.P., Fan, Y., Ni, Z., Mercola, D., and Adamson, E.D. (1997). Reciprocal modulation between Sp1 and Egr-1. *J Cell Biochem* *66*, 489-499.

Hubbert, M.L., Zhang, Y., Lee, F.Y., and Edwards, P.A. (2007). Regulation of hepatic Insig-2 by the farnesoid X receptor. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md *21*, 1359-1369.

Hue, L., Feliu, J.E., and Hers, H.G. (1978). Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. A parallel study of the effect of phenylephrine and of glucagon. *Biochem J* *176*, 791-797.

Jackson, S.M., Ericsson, J., Mantovani, R., and Edwards, P.A. (1998). Synergistic activation of transcription by nuclear factor Y and sterol regulatory element binding protein. *J Lipid Res* *39*, 767-776.

Jackson, S.M., Ericsson, J., Metherall, J.E., and Edwards, P.A. (1996). Role for sterol regulatory element binding protein in the regulation of farnesyl diphosphate synthase and in the control of cellular levels of cholesterol and triglyceride: evidence from sterol regulation-defective cells. *J Lipid Res* *37*, 1712-1721.

Jacob, K.K., Ouyang, L., and Stanley, F.M. (1995). A consensus insulin response element is activated by an Ets-related transcription factor. *J Biol Chem* *270*, 27773-27779.

Jacob, K.K., and Stanley, F.M. (2001). Elk-1, C/EBPalpha, and Pit-1 confer an insulin-responsive phenotype on prolactin promoter expression in Chinese hamster ovary cells and define the factors

required for insulin-increased transcription. *J Biol Chem* 276, 24931-24936.

Janknecht, R., and Hunter, T. (1997). Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *The EMBO journal* 16, 1620-1627.

Janknecht, R., and Nordheim, A. (1992). Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res* 20, 3317-3324.

Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728-731.

Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., and Nevins, J.R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365, 349-352.

Kato, T., Shimano, H., Yamamoto, T., Ishikawa, M., Kumadaki, S., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Yahagi, N., Nakakuki, M., Hasty, A.H., et al. (2008). Palmitate impairs and eicosapentaenoate restores insulin secretion through regulation of SREBP-1c in pancreatic islets. *Diabetes* 57, 2382-2392.

Kim, H.J., Takahashi, M., and Ezaki, O. (1999). Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J Biol Chem* 274, 25892-25898.

Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101, 1-9.

Kim, J.B., Spotts, G.D., Halvorsen, Y.D., Shih, H.M., Ellenberger, T., Towle, H.C., and Spiegelman, B.M. (1995). Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Molecular and cellular biology* 15, 2582-2588.

Knight, B.L., Hebbachi, A., Hauton, D., Brown, A.M., Wiggins, D., Patel, D.D., and Gibbons, G.F. (2005). A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem J* 389, 413-421.

Konig, B., Koch, A., Spielmann, J., Hilgenfeld, C., Hirche, F., Stangl, G.I., and Eder, K. (2009). Activation of PPARalpha and PPARgamma reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1. *European journal of pharmacology* *605*, 23-30.

Kotzka, J., Lehr, S., Roth, G., Avci, H., Knebel, B., and Muller-Wieland, D. (2004). Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem* *279*, 22404-22411.

Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Koponen, A., Njamen, D., Kremer, L., Roth, G., Munck, M., Knebel, B., and Krone, W. (1998). ADD1/SREBP-1c mediates insulin-induced gene expression linked to the MAP kinase pathway. *Biochemical and biophysical research communications* *249*, 375-379.

Krapivner, S., Chernogubova, E., Ericsson, M., Ahlbeck-Glader, C., Hamsten, A., and van 't Hooft, F.M. (2007). Human evidence for the involvement of insulin-induced gene 1 in the regulation of plasma glucose concentration. *Diabetologia* *50*, 94-102.

Laudes, M., Barroso, I., Luan, J., Soos, M.A., Yeo, G., Meirhaeghe, A., Logie, L., Vidal-Puig, A., Schafer, A.J., Wareham, N.J., and O'Rahilly, S. (2004). Genetic variants in human sterol regulatory element binding protein-1c in syndromes of severe insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* *53*, 842-846.

Lee, S., Lee, D.K., Choi, E., and Lee, J.W. (2005). Identification of a functional vitamin D response element in the murine Insig-2 promoter and its potential role in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* *19*, 399-408.

Lee, T.I., and Young, R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics* *34*, 77-137.

Lee, Y.S., Sohn, D.H., Han, D., Lee, H.W., Seong, R.H., and Kim, J.B. (2007). Chromatin remodeling complex interacts with ADD1/SREBP1c to mediate insulin-dependent regulation of gene expression. *Molecular and cellular biology* *27*, 438-452.

Lemoine, M., Barbu, V., Girard, P.M., Kim, M., Bastard, J.P., Wendum, D., Paye, F., Housset, C., Capeau, J., and Serfaty, L. (2006). Altered hepatic expression of SREBP-1 and PPARgamma is associated with liver injury in insulin-resistant lipodystrophic HIV-infected patients. *AIDS (London, England)* *20*, 387-395.

- Li, R., Pei, H., and Watson, D.K. (2000). Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene* *19*, 6514-6523.
- Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005a). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism* *1*, 361-370.
- Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T., Wu, P.H., Handschin, C., Li, S., Yang, W., Pei, L., Uldry, M., Tontonoz, P., *et al.* (2005b). Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* *120*, 261-273.
- Lopez-Bigas, N., De, S., and Teichmann, S.A. (2008). Functional protein divergence in the evolution of Homo sapiens. *Genome biology* *9*, R33.
- Miserez, A.R., Muller, P.Y., Barella, L., Barella, S., Staehelin, H.B., Leitersdorf, E., Kark, J.D., and Friedlander, Y. (2002). Sterol-regulatory element-binding protein (SREBP)-2 contributes to polygenic hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* *164*, 15-26.
- Mitro, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreuzsch, A., and Saez, E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* *445*, 219-223.
- Mo, Y., Vaessen, B., Johnston, K., and Marmorstein, R. (1998). Structures of SAP-1 bound to DNA targets from the E74 and c-fos promoters: insights into DNA sequence discrimination by Ets proteins. *Molecular cell* *2*, 201-212.
- Mohn, K.L., Laz, T.M., Hsu, J.C., Melby, A.E., Bravo, R., and Taub, R. (1991). The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes. *Molecular and cellular biology* *11*, 381-390.
- Murray, R.K.G., D. K.; Mayes, P.A.; Rodwell V. W. (1988). *Harper's Biochemistry*, twenty-fourth edn (Appleton & Lange).
- Naar, A.M., Beurang, P.A., Robinson, K.M., Oliner, J.D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J.T., and Tjian, R. (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes & development* *12*, 3020-3031.
- Nakakuki, M., Shimano, H., Inoue, N., Tamura, M., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Yahagi, N., Toyoshima, H., Sato, R., and Yamada, N. (2007). A transcription factor of lipid synthesis, sterol regulatory

element-binding protein (SREBP)-1a causes G(1) cell-cycle arrest after accumulation of cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitors. The FEBS journal *274*, 4440-4452.

Nilsson, M., Dahlman-Wright, K., Karelmo, C., Ebeling, M., Gustafsson, J.A., and Steffensen, K.R. (2007). Elk1 and SRF transcription factors convey basal transcription and mediate glucose response via their binding sites in the human LXR β gene promoter. *Nucleic Acids Res* *35*, 4858-4868.

Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Espenshade, P.J. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* *102*, 315-323.

Oberkofler, H., Fukushima, N., Esterbauer, H., Krempler, F., and Patsch, W. (2002). Sterol regulatory element binding proteins: relationship of adipose tissue gene expression with obesity in humans. *Biochimica et biophysica acta* *1575*, 75-81.

Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., and Patsch, W. (2004). Restoration of sterol-regulatory-element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha. *Biochem J* *381*, 357-363.

Odom, D.T., Dowell, R.D., Jacobsen, E.S., Gordon, W., Danford, T.W., MacIsaac, K.D., Rolfe, P.A., Conboy, C.M., Gifford, D.K., and Fraenkel, E. (2007). Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature genetics* *39*, 730-732.

Oki, K., Yamane, K., Kamei, N., Asao, T., Awaya, T., and Kohno, N. (2008). The single nucleotide polymorphism upstream of insulin-induced gene 2 (INSIG2) is associated with the prevalence of hypercholesterolaemia, but not with obesity, in Japanese American women. *The British journal of nutrition*, 1-6.

Osborne, T.F. (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* *275*, 32379-32382.

Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-

dependent activation of the LXR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 6027-6032.

Parraga, A., Bellolell, L., Ferre-D'Amare, A.R., and Burley, S.K. (1998). Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure* *6*, 661-672.

Patti, M.E., Butte, A.J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., et al. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 8466-8471.

Pawar, A., Botolin, D., Mangelsdorf, D.J., and Jump, D.B. (2003). The role of liver X receptor- α in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem* *278*, 40736-40743.

Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell* *93*, 693-704.

Peng, Y., Schwarz, E.J., Lazar, M.A., Genin, A., Spinner, N.B., and Taub, R. (1997). Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene. *Genomics* *43*, 278-284.

Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E.A., and Elam, M.B. (2008). SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *19*, 65-73.

Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* *37*, 1595-1607.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes & development* *14*, 2819-2830.

Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual review of cell and developmental biology* *16*, 459-481.

Robinet, P., Védie, B., Chironi, G., Gariépy, J., Simon, A., Moatti, N., and Paul, J.L. (2003). Characterization of polymorphic

structure of SREBP-2 gene: role in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 168, 381-387.

Roeder, R.G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* 579, 909-915.

Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y.K., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 272, 20213-20221.

Samson, S.L., and Wong, N.C. (2002). Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J Mol Endocrinol* 29, 265-279.

Sandelin, A., Wasserman, W.W., and Lenhard, B. (2004). ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res* 32, W249-252.

Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T., and Maeda, M. (1996). Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 271, 26461-26464.

Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & development* 14, 2831-2838.

Schwartz, S.M., Galis, Z.S., Rosenfeld, M.E., and Falk, E. (2007). Plaque rupture in humans and mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 705-713.

Sever, N., Yang, T., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and DeBose-Boyd, R.A. (2003). Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Molecular cell* 11, 25-33.

Sewter, C., Berger, D., Considine, R.V., Medina, G., Rochford, J., Ciaraldi, T., Henry, R., Dohm, L., Flier, J.S., O'Rahilly, S., and Vidal-Puig, A.J. (2002). Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor- α . *Diabetes* 51, 1035-1041.

Shimano, H. (2007). SREBP-1c and TFE3, energy transcription factors that regulate hepatic insulin signaling. *J Mol Med* 85, 437-444.

Shimano, H. (2009). SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *The FEBS journal* *276*, 616-621.

Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* *98*, 1575-1584.

Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997a). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* *99*, 846-854.

Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R.E., Herz, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Horton, J.D. (1997b). Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* *100*, 2115-2124.

Shimomura, I., Bashmakov, Y., and Horton, J.D. (1999a). Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* *274*, 30028-30032.

Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999b). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 13656-13661.

Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes & development* *12*, 3182-3194.

Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R.E., Bashmakov, Y., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular cell* *6*, 77-86.

Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* *99*, 838-845.

Smale, S.T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochimica et biophysica acta* *1351*, 73-88.

Stein, O., and Stein, Y. (2007). Resistance to obesity and resistance to atherosclerosis: is there a metabolic link? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* *17*, 554-559.

Stranger, B.E., Nica, A.C., Forrest, M.S., Dimas, A., Bird, C.P., Beazley, C., Ingle, C.E., Dunning, M., Flicek, P., Koller, D., et al. (2007). Population genomics of human gene expression. *Nature genetics* *39*, 1217-1224.

Sun, L.P., Li, L., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem* *280*, 26483-26490.

Sundqvist, A., and Ericsson, J. (2003). Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 13833-13838.

Suzuki, Y., Yamashita, R., Shirota, M., Sakakibara, Y., Chiba, J., Mizushima-Sugano, J., Nakai, K., and Sugano, S. (2004). Sequence comparison of human and mouse genes reveals a homologous block structure in the promoter regions. *Genome research* *14*, 1711-1718.

Takahashi, A., Motomura, K., Kato, T., Yoshikawa, T., Nakagawa, Y., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., Yamada, N., and Shimano, H. (2005). Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells. *Diabetes* *54*, 492-499.

Takaishi, K., Duplomb, L., Wang, M.Y., Li, J., and Unger, R.H. (2004). Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 7106-7111.

Tautz, D. (2000). Evolution of transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* *10*, 575-579.

Thiel, G., and Cibelli, G. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* *193*, 287-292.

Thomas, M.C., and Chiang, C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *41*, 105-178.

Tobe, K., Suzuki, R., Aoyama, M., Yamauchi, T., Kamon, J., Kubota, N., Terauchi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Kimura, S., *et al.* (2001). Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver. *J Biol Chem* 276, 38337-38340.

Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A., and Spiegelman, B.M. (1993). ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Molecular and cellular biology* 13, 4753-4759.

Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 17, 985-993.

Vallett, S.M., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M., and Osborne, T.F. (1996). A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J Biol Chem* 271, 12247-12253.

Vedie, B., Jeunemaitre, X., Megnien, J.L., Atger, V., Simon, A., and Moatti, N. (2001). A new DNA polymorphism in the 5' untranslated region of the human SREBP-1a is related to development of atherosclerosis in high cardiovascular risk population. *Atherosclerosis* 154, 589-597.

Vernia, S., Eberle, D., Hernandez Mijares, A., Foufelle, F., and Casado, M. (2006). A rare missense mutation in a type 2 diabetes patient decreases the transcriptional activity of human sterol regulatory element binding protein-1. *Human mutation* 27, 212.

Vernon, R.G., Barber, M.C., and Travers, M.T. (1999). Present and future studies on lipogenesis in animals and human subjects. *The Proceedings of the Nutrition Society* 58, 541-549.

Wagner, B.L., Valledor, A.F., Shao, G., Daige, C.L., Bischoff, E.D., Petrowski, M., Jepsen, K., Baek, S.H., Heyman, R.A., Rosenfeld, M.G., *et al.* (2003). Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Molecular and cellular biology* 23, 5780-5789.

Wang, X., Briggs, M.R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 268, 14497-14504.

Wasylyk, B., Hagman, J., and Gutierrez-Hartmann, A. (1998). Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends in biochemical sciences* *23*, 213-216.

Wasylyk, B., Hahn, S.L., and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *European journal of biochemistry / FEBS* *211*, 7-18.

Watson, D.K., Robinson, L., Hodge, D.R., Kola, I., Papas, T.S., and Seth, A. (1997). FLI1 and EWS-FLI1 function as ternary complex factors and ELK1 and SAP1a function as ternary and quaternary complex factors on the Egr1 promoter serum response elements. *Oncogene* *14*, 213-221.

Weber, L.W., Boll, M., and Stampfl, A. (2004). Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* *10*, 3081-3087.

Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., and Romano, L.A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Molecular biology and evolution* *20*, 1377-1419.

Xiong, S., Chirala, S.S., and Wakil, S.J. (2000). Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 3948-3953.

Xu, J., Nakamura, M.T., Cho, H.P., and Clarke, S.D. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem* *274*, 23577-23583.

Yabe, D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 12753-12758.

Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2003). Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 3155-3160.

Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N., Nakagawa, Y., Matsuzaka, T., Takahashi, A., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., and Yamada, N. (2007). Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem* 282, 11687-11695.

Yamamoto, T., Shimano, H., Nakagawa, Y., Ide, T., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., *et al.* (2004). SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem* 279, 12027-12035.

Yamazaki, Y., Kubota, H., Nozaki, M., and Nagata, K. (2003). Transcriptional regulation of the cytosolic chaperonin theta subunit gene, Cctq, by Ets domain transcription factors Elk-1, Sap-1a, and Net in the absence of serum response factor. *J Biol Chem* 278, 30642-30651.

Yang, F., Vought, B.W., Satterlee, J.S., Walker, A.K., Jim Sun, Z.Y., Watts, J.L., DeBeaumont, R., Saito, R.M., Hyberts, S.G., Yang, S., *et al.* (2006). An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature* 442, 700-704.

Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489-500.

Yellaturu, C.R., Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghov, R., and Elam, M.B. (2005). Posttranslational processing of SREBP-1 in rat hepatocytes is regulated by insulin and cAMP. *Biochemical and biophysical research communications* 332, 174-180.

Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., *et al.* (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138.

Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Yatoh, S., Kitamine, T., Okazaki, H., Tamura, Y., *et al.* (2003). Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress

sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) *17*, 1240-1254.

Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., et al. (2001). Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and cellular biology* *21*, 2991-3000.

Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., et al. (2002). Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* *277*, 1705-1711.

Yu, J., de Belle, I., Liang, H., and Adamson, E.D. (2004). Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses. *Molecular cell* *15*, 83-94.

Yu, S., and Reddy, J.K. (2007). Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et biophysica acta* *1771*, 936-951.

Zhang, C., Shin, D.J., and Osborne, T.F. (2005). A simple promoter containing two Sp1 sites controls the expression of sterol-regulatory-element-binding protein 1a (SREBP-1a). *Biochem J* *386*, 161-168.