

RESUM GLOBAL



## RESUM GLOBAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1. ELS ÀCIDS GRASSOS ACTIVEN L'EXPRESSIÓ DEL GEN *UCP3* MITJANÇANT PPAR $\alpha$  O PPAR $\delta$ . MYOD ÉS NECESSARI PER L'ACTIVACIÓ DEPENDENT DE PPAR.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.4. L'EXPRESSIÓ DE *PPAR $\delta$* A NIVELL D'MRNA AL MÚSCUL ESQUELÈTIC I AL COR NO MOSTRA UN COMPORTAMENT COMPENSATORI PER LA MANCA DE *PPAR $\alpha$* .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L'estudi de la regulació del gen *UCP3* en humans és particularment complex donat que en mioblasts humans en cultiu l'expressió d'*UCP3* és molt baixa. Per això, nosaltres hem determinat els efectes de T<sub>3</sub> sobre el gen humà *UCP3* en uns ratolins transgènics que expressen un clon P1 humà que conté el gen *UCP3* (obtinguts en el laboratori del Dr. Lowell). En aquests animals, el gen *UCP3* humà manté la regulació específica de teixit pròpia de l'espècie, és a dir, s'expressa preferencialment al múscul esquelètic i no s'expressa pràcticament al TAM ni al cor, on els nivells de l'mRNA d'*UCP3* són importants en rosegadors (Vidal-Puig, 1997a). L'expressió

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

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