

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL FACTOR  
DE TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL TFAM:  
REGULACIÓN POR RECEPTORES NUCLEARES Y  
FACTORES DE CRECIMIENTO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

John Patrick Kaninda Tshilumbu

Bajo la dirección de la Doctora:

Ana María Pérez Castillo

**Madrid, 2003**

**ISBN: 84-669-2051-X**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL FACTOR  
DE TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL TFAM.  
REGULACIÓN POR RECEPTORES NUCLEARES Y  
FACTORES DE CRECIMIENTO.”**

**TESIS DOCTORAL**

**J. P. KANINDA TSHILUMBU**

**Madrid 2003**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL TFAM.  
REGULACIÓN POR RECEPTORES NUCLEARES Y FACTORES  
DE CRECIMIENTO.”**

Memoria para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid  
que presenta

**John Patrick KANINDA TSHILUMBU**

Licenciado en Farmacia

Dirigida por **Dra ANA MARIA PEREZ CASTILLO**

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

CSIC-UAM

Madrid 2003

*A mi familia.*

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) gracias a la ayuda de una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), de una beca especial de la Universidad Autónoma de Madrid y de una beca especial del C.S.I.C. adscrita al proyecto BMC2001-2342 de la Dra Ana María Perez Castillo.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra Ana María Perez Castillo, directora de esta tesis, por acogerme en su laboratorio, por su orientación, por ayudarme y por sus enseñanzas; así como al Dr Angel Santos por sus críticas y sus aportaciones.

A mi tutor Dr. Fernando Escrivá Pons, por sus consejos y orientaciones.

A todos mis compañeros de laboratorio: Ana Menéndez, Arturo Perez-R., Jinny Sánchez, Maicha R. Luna, Marta Cortés, Miguel Pignatelli, Patricia Sainz; por su marca de simpatía, por su comprensión, por las horas de trabajo compartidas y por su disponibilidad en ayudarme a superar mis limitaciones. A Cristina Jodra, por sus primeras enseñanzas y sus consejos. A Cristina Nieto, recién llegada en el laboratorio.

A mis amigos y en especial a Paloma Cejas y Miguel A. Cabezas; Ana Cana; Merche Hospital; por los buenos momentos compartidos y sobre todo por interesarse por mí y por mi trabajo. También quiero dar las gracias a Blaise Kanga y Lucile Achi; Diary Rambao; Douglas Vuama; Fabian Nsudi; Hugues Toko; Martin Bodisa; Pepin Diur; Serge Kapinga; Sosthène Ndikuriyo ..., por el apoyo y los momentos “no científicos” y agradables que hemos compartidos en todo este tiempo de la tesis.

A todos los compatriotas que al igual que yo han estado realizando sus estudios en diversas universidades de España, por su apoyo moral durante los últimos momentos de finalización de la tesis.

## RESUMEN

Desde hace mucho tiempo se sabe que la hormona tiroidea (T3) juega un papel importante en la regulación del metabolismo general, crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares. También, uno de los efectos más conocidos de T3 es su regulación de la funcionalidad mitocondrial. Aunque este efecto sobre la mitocondria ha sido muy estudiado en tejidos como el hígado, se sabe mucho menos sobre su acción en las mitocondrias de cerebro, un órgano que precisamente es muy dependiente del estado tiroideo durante el desarrollo. Datos previos del laboratorio han mostrado que la T3 es un importante regulador tanto de la expresión del genoma mitocondrial como de la funcionalidad de la mitocondria en el cerebro en desarrollo. En este trabajo hemos analizado si el factor de transcripción mitocondrial Tfam, una proteína muy importante en la biogénesis de la mitocondria, podría estar regulado por T3 en cerebro y por tanto actuar de mediador de la acción de esta hormona sobre las mitocondrias de este órgano. Hemos demostrado que los niveles de mRNA y proteína Tfam están disminuidos en el cerebro de neonatos hipotiroideos y que estos niveles se recuperan después de un tratamiento con T3, lo que indica que esta hormona es la causante de esta regulación. Hemos demostrado también que la T3 induce la expresión del gen Tfam en células de neuroblastoma, estando las secuencias responsables de esta activación localizadas en un fragmento comprendido entre los nucleótidos -145/+1 y que también existe una secuencia localizada entre los nucleótidos -1239/-1212 que es capaz de mediar el efecto de esta hormona. El efecto de T3 sobre el promotor de Tfam es específico de la isoforma TR $\beta$ <sub>1</sub> del receptor de T3. También, otros ligandos de receptores nucleares como vitamina D3 (VD3) y ácido todo-trans retinoico (AR) son capaces de activar la expresión de Tfam, mientras que 15 deoxy- $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), ligando del receptor nuclear PPAR $\gamma$ , inhibe significativamente la actividad de este promotor. Finalmente hemos observado una interacción entre las rutas activadas por los receptores nucleares de T3, AR y VD3 y rutas de señalización extracelulares. En concreto mostramos que todas las rutas de señalización analizadas (PKA, PKC, MAPKs y PI-3K) activan al heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta$ <sub>1</sub> vacío, mientras que todas ellas, menos PI-3K bloquean el efecto de T3 sobre el promotor de Tfam. Estas rutas de señalización interfieren también de diversas maneras sobre el efecto de VD3 y AR sobre dicho promotor mientras que no modifican el efecto de 15 deoxy- $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandina J<sub>2</sub>.

## SUMMARY

Thyroid hormone (T3) plays a very important role on the regulation of vertebrate metabolism, growth, and differentiation. One of the most known effects of T3 is the regulation of mitochondrial functionality. Although this is one of the most established effects of T3 in tissues such as liver, very little is known regarding the role of T3 on brain mitochondria, a tissue which is very dependent on thyroid state specially during development. Previous data from the laboratory have shown that T3 is an important regulator of the expression of the mitochondrial genome as well as mitochondrial functionality during brain development. In this work we have analyzed if the mitochondrial transcription factor Tfam could be a mediator of the observed effects of T3 on brain mitochondria. We have demonstrated that hypothyroidism significantly reduces the mRNA and protein levels of Tfam in the brain of neonatal rats, and that these levels return to basal values after T3 treatment of the pups, suggesting that, indeed, T3 is the responsible of the observed effect. We also show that T3 induces the expression of the Tfam gene in a neuroblastoma cell line. The DNA sequence responsible for the T3-mediated activation comprises a region between nt -145/+1, and another T3-responsive element is present in the region -1239/-1212. The effect of T3 on Tfam promoter activity is mediated only through the TR $\beta$ <sub>1</sub> isoform of the receptor. Another ligands of nuclear hormone receptors, such as vitamin D3 (VD3) and all-trans retinoic acid (RA) are also able to induce Tfam promoter expression, whereas 15 deoxy- $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), a ligand of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ , inhibits very potently the activity of this promoter. Finally, we have observed an interaction between the action of T3, VD3, and RA and extracellular signaling pathways. We show that the activation of the signaling pathways by PKA, PKC, MAPKs, and PI-3K induces the heterodimers RXR $\alpha$ /TR $\beta$ <sub>1</sub> in the absence of ligand, whereas activation of PKA, PKC, and MAPKs completely block the effect of T3 upon Tfam promoter. The action of two other members of the nuclear receptor superfamily, RA and VD3, are also affected by the activation of these signaling pathways. However the effects of 15 deoxy- $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> are not altered by the activation of these kinases.

## ABREVIATURAS

15d-PGJ<sub>2</sub>: 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandina J<sub>2</sub>

AMPc: Adenosina 5' monofosfato cíclico

AR: Ácido todo-trans retinoico

Bisindol: Bisindolylmaleimide I Hydrochloride

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

H89: N-[2-(p-Bromocinnamyl) amino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, 2HCl

HRE: Elemento de respuesta a hormona

HT: Hormona tiroidea

IGF-I: Factor de crecimiento-1 para insulina

kDa: KiloDalton

LY: 2-(4-Morpholnyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one

MAPK: Proteína kinasa activada por mitogenos

MoMLV: Moloney murine leukaemia virus

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

pb: pares de bases

PD98: 2-Amino-3'-methoxyflavone

PDBu: Phorbol 12,13- Dibutirate

PI3K: Fosfatidilinositol 3' kinasa

PKA: proteína kinasa dependiente de AMP cíclico

PKC: proteína serina/treonina kinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

Pr-Tfam: Promotor del factor de transcripción mitocondrial A

RAR: Receptor del ácido todo-trans retinoico

RXR: Receptor del ácido 9 cis-retinoico

T3: Hormona tiroidea

Tfam: Factor de transcripción mitocondrial A

TR: Receptor de la hormona tiroidea

TRE: Elemento de respuesta a hormona tiroidea

VDR: Receptor de vitamina D3

## **INDICE**

## **INTRODUCCIÓN**

<b>1. Receptores Nucleares.</b>	2
1.1. Introducción.	2
1.2. Estructura.	4
1.3. Elementos de Respuesta a Hormonas.	8
1.4. Receptores de Hormona Tiroidea.	9
1.5. Receptores de Retinoides y de la Vitamina D3.	12
1.6. Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas.	13
<b>2. Mecanismos de Regulación de la Transcripción por Receptores Nucleares.</b>	14
2.1. Represión Basal - Correpresores.	15
2.2. Activación Transcripcional - Coactivadores.	16
<b>3. La Mitocondria.</b>	21
3.1. Introducción.	21
3.2. El Genoma Mitocondrial.	23
3.3. Transcripción del Genoma Mitocondrial.	24
<b>4. Hormona Tiroidea y Desarrollo Cerebral.</b>	27
4.1. Expresión de las Diferentes Isoformas del Receptor de T3 Durante el Desarrollo del Encéfalo.	27
4.2. Efectos de la Hormona Tiroidea Sobre el Desarrollo del Sistema Nervioso Central.	28
<b>5. Efectos de la Hormona Tiroidea Sobre la Mitocondria.</b>	31
5.1. Efectos de la Hormona Tiroidea Sobre la Actividad Mitocondrial.	31
5.1.1. Efectos Tempranos (a Corto Plazo).	31
5.1.2. Efectos a Largo Plazo.	33
5.2. Efectos de la Hormona Tiroidea sobre la Expresión del Genoma Mitocondrial.	34
5.3. La Hormona Tiroidea Estimula la Mitocondriogénesis.	35
<b>OBJETIVOS</b>	38
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	40
<b>1. Tratamiento de los Animales.</b>	40
<b>2. Cultivo Celular.</b>	40
2.1. Ensayos de Transfección.	40
2.2. Extractos Proteicos Celulares.	42
<b>3. Estudio de la Expresión del Factor de Transcripción Mitocondrial A (Tfam)</b>	

en Cerebro de Animales Controles e Hipotiroideos.	43
3.1. Extracción de RNA Total.	43
3.2. Obtención de mRNA.	43
3.3. Análisis de la Expresión de mRNA por Northern Blot.	43
3.3.1. Electroforesis y Transferencia.	43
3.3.2. Marcaje de las Sondas.	44
3.3.3. Hibridación.	45
<b>4. Inmunodetección de Proteínas (Western Blot).</b>	<b>45</b>
4.1. Obtención de los Extractos Proteicos.	45
4.1.1. Extractos Proteicos de Animales Controles e Hipotiroideos.	45
4.1.2. Extractos Mitocondriales.	46
4.1.2.1. Obtención de Mitocondrias.	46
4.1.2.2. Obtención de Proteínas Mitocondriales.	46
4.2. Electroforesis e Inmunodetección.	47
<b>5. Mecanismo de Regulación de la Expresión del Gen Tfam por Hormona Tiroidea.</b>	<b>47</b>
5.1. Obtención de las Proteínas Recombinantes TR $\alpha_1$ , TR $\beta_1$ , RXR $\alpha$ y RAR $\alpha$ .	47
5.2. Ensayos de Retardo en Gel.	48
<b>6. Construcción de Plásmidos.</b>	<b>49</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>1. Regulación por Hormona Tiroidea de la Expresión del Factor de Transcripción Mitocondrial A (Tfam).</b>	<b>54</b>
1.1. Efecto de la Hormona Tiroidea Sobre la Expresión Endógena del Gen Tfam en Distintas Zonas del Cerebro.	54
1.1.1. Regulación de los Niveles de mRNA de Tfam en Cerebro de Rata.	54
1.1.2. Regulación de los Niveles de Proteína Tfam en Cerebro de Rata.	55
1.2. Ensayos de Transfección Transitoria con el Promotor de Tfam Humano.	56
1.2.1. Análisis de la Secuencia del Promotor de Tfam.	56
1.2.2. Actividad Basal.	57
1.2.3. Regulación por T3 de la Actividad del Promotor de Tfam en Células de Neuroblastoma (TR).	61
1.2.3.1. Especificidad del Receptor de T3 Sobre la Expresión de Tfam.	61

1.2.3.2. Localización y Caracterización de Secuencias Implicadas en la Respuesta Inducida por T3 Sobre la Región Promotora del Gen Tfam Humano.	63
1.3. Identificación de las Secuencias de Reconocimiento para el Receptor de T3 en el Promotor de Tfam.	70
1.4. Efecto de T3 Sobre los Niveles Endógenos de mRNA de Tfam de Células de Grasa Marrón MB492.	73
<b>2. Regulación del Promotor de Tfam por Otros Miembros de la Familia de Receptores Nucleares.</b>	74
2.1. Regulación por Vitamina D3 (VD3).	74
2.2. Regulación por 15-deoxy- $\delta$ - <sup>12,14</sup> -Prostaglandina J <sub>2</sub> (15d-PGJ <sub>2</sub> ).	77
2.3. Regulación por Ácido Todo-Trans-Retinoico (AR).	80
2.4. Efectos de VD3, AR y 15d-PGJ <sub>2</sub> Sobre la Expresión Endógena de Tfam en Células HT22.	84
<b>3. Regulación del Promotor de Tfam Humano por Rutas de Señalización Extracelulares. Interacción con los Efectos de los Receptores Nucleares.</b>	85
3.1. Regulación por Proteína Kinasa A (PKA).	85
3.2. Regulación por Proteína Kinasa C (PKC).	86
3.3. Regulación por la Vía de las MAPKs.	87
3.4. Regulación por la Vía de PI-3K.	88
3.5. Efectos de Activadores de Kinasas Sobre la Regulación de Tfam por VD3, AR y 15d-PGJ <sub>2</sub> .	89
<b>DISCUSIÓN</b>	94
<b>CONCLUSIONES</b>	110
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	112

# **INTRODUCCIÓN**

---

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. RECEPTORES NUCLEARES.**

#### **1.1. Introducción.**

La superfamilia de “receptores nucleares” engloba a más de 200 proteínas clonadas hasta el momento, que han evolucionado de un antecesor común. Son factores de transcripción dependientes de ligando que controlan una gran variedad de procesos biológicos como crecimiento, diferenciación, metabolismo, reproducción, inflamación y morfogénesis en organismos superiores y humanos. Una forma de clasificarlos muy utilizada y de gran interés es la que los divide en tres tipos: receptores de tipo I (fundamentalmente los receptores de hormonas esteroideas) que están inactivos en el citosol y se translocan al núcleo tras su activación por el ligando y se unen como homodímeros al DNA a los elementos de respuesta a hormona (HREs); receptores de tipo II, entre los cuales se encuentran los receptores de hormona tiroidea (TR), ácido retinoico (RAR), vitamina D<sub>3</sub> (VDR) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), tienen una localización nuclear aún en ausencia del ligando y se unen generalmente como heterodímeros con el receptor del ácido 9 cis-retinoico (RXR) a elementos HREs; y receptores de tipo III que incluyen los receptores huérfanos, es decir sin ligandos conocidos (por ejemplo ERRs) (McKenna, N. J. and B. W. O'Malley 2002), que en muchos casos interaccionan con el DNA como monómeros. Estos receptores activan la transcripción de un modo constitutivo.

Los elementos de respuesta a hormona son secuencias específicas del DNA presentes en los promotores de los genes regulados por estos factores de transcripción. Generalmente, estas secuencias están formadas por una o varias copias del motivo hexamérico: AGGTCA o AGAACA. Los receptores nucleares ejercen sus efectos interaccionando directamente como monómeros, homodímeros o heterodímeros con los elementos de respuesta a hormonas presentes en los genes diana regulando su transcripción. También pueden interaccionar con otros factores de transcripción y regular la transcripción de otros genes sin que ellos requirieran unirse al DNA de los mismos. Los receptores nucleares pueden activar o reprimir la transcripción de forma dependiente o independiente de ligando.

La hormona tiroidea (3,5,5' triiodo-L-tironina ó T3) es sintetizada y secretada por la glándula tiroides fundamentalmente como un precursor, la tiroxina ó 3,5,3',5' tetraiodo-L-tironina (T4). La hormona tiroidea actúa sobre el metabolismo general de las células pero también tiene un papel relevante sobre el crecimiento y la diferenciación, por ejemplo durante los fenómenos de metamorfosis en los anfibios o para la maduración del sistema nervioso central en humano y en rata. El cerebro, durante el desarrollo, es uno de los órganos diana más importante de la acción de la T3 y la deficiencia de esta hormona durante el periodo perinatal provoca daños que pueden llegar a ser irreversibles (Síndrome del cretinismo en humanos).

En los animales la vitamina D<sub>3</sub> ó colecalciferol (forma inactiva), es sintetizada en la piel a partir de una molécula precursora, el 7-dehidrocolesterol. Esta molécula en presencia de rayos U.V, sufre una rotura en el anillo B entre los carbonos 9 y 10 y da lugar al colecalciferol. En el hígado la vitamina D<sub>3</sub> se convierte en 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, que es la principal forma circulante de dicha hormona. A su vez, los riñones convierten esta forma intermedia de la vitamina, a 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (forma activa). La vitamina D<sub>3</sub> regula la homeostasis del calcio y del fósforo y es muy importante para el desarrollo y mineralización de los huesos. Su carencia genera alteraciones óseas (como el raquitismo), trastornos dentales y alteraciones metabólicas.

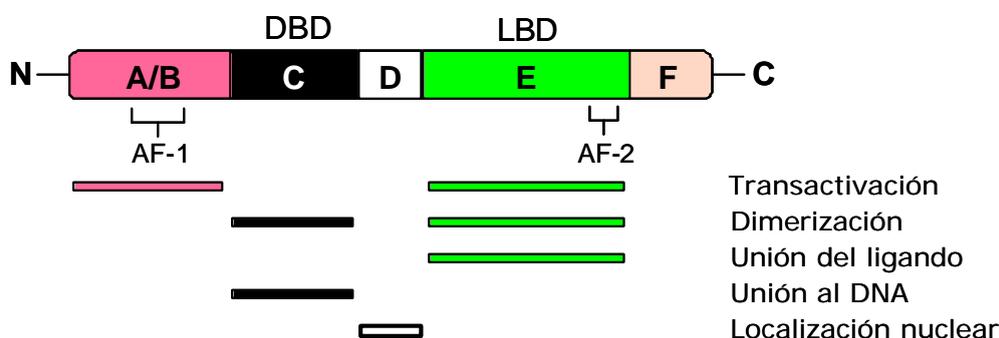
Las prostaglandinas son moléculas estructuralmente relacionadas, que son producidas en las células en respuesta a una variedad de estímulos extrínsecos. Están sintetizadas a partir de precursores a través de la vía de la ciclooxigenasa; fundamentalmente a partir del ácido araquidónico, que es liberado de la membrana celular por la acción de fosfolipasas. Las prostaglandinas son identificadas por las letras A, B, C, D, E, F e I. En muchos tejidos la prostaglandina PGD<sub>2</sub> es el principal producto de la ciclooxigenasa. PGD<sub>2</sub> la cual se deshidrata rápidamente dando lugar a prostaglandinas J, entre las cuales se encuentra 15d-PGJ<sub>2</sub>, que une con mayor afinidad al receptor PPAR $\gamma$ . Las prostaglandinas J controlan una variedad de acciones biológicas, incluyendo la inflamación, osteogénesis y progresión del ciclo celular.

El ácido retinoico se sintetiza a partir de la vitamina A ó retinol; en vertebrados es esencial en los procesos de diferenciación y organogénesis del embrión, proliferación celular, diferenciación y apoptosis, y homeostasis. Los niveles del ácido retinoico están

regulados por las enzimas retinaldehído deshidrogenasas (RALDH1, RALDH2 y RALDH3) que catalizan la última etapa en su síntesis y por la enzima de metabolización del ácido retinoico, el citocromo P450 (CYP26).

## 1.2. Estructura.

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares son proteínas que presentan una organización modular, con un dominio central de unión a DNA que se denomina DBD o dominio C, que está muy conservado y que les caracteriza. Además de este dominio de unión al DNA, suelen diferenciarse: una región N-terminal (ó dominios A/B), que es una región no conservada, de tamaño e importancia funcional muy variable; y una región C-terminal que engloba una región bisagra (ó dominio D) y el dominio de unión a ligando (LBD o dominio E), que es un dominio también conservado en esta superfamilia aunque menos que el DBD. En algunos receptores se considera también una región C-terminal (dominio F) de función desconocida (Hollenberg y cols., 1985, Kumar y cols., 1987) (Fig. 1).



**Figura 1:** Estructura general de los receptores nucleares y localización de sus principales funciones. En el esquema aparecen indicadas las regiones mencionadas, así como las funciones en que se han implicado.

- Región N-terminal.

Esta región es la más variable, tanto en tamaño como en secuencia y función. En algunos receptores como por ejemplo los receptores de hormonas esteroideas, juega un papel importante en la inducción de la transcripción ya que se ha descrito en esta región un dominio AF-1 que está implicado en la transactivación independiente de ligando. En otros casos como por ejemplo el receptor de hormona tiroidea esta región es muy corta y no se requiere para la transactivación. En el caso de receptores con múltiples isoformas, esta región N-terminal es la más divergente de todas. Frecuentemente esta región es la diana de

fosforilación para varias rutas de señalización, pudiendo afectar, significativamente, esta modificación a su actividad transcripcional (Shao y Lazar, 1999). Los receptores de ácido retinoico RARs (alpha, beta y gamma) pueden ser fosforilados por quinasas dependientes de ciclinas y esta fosforilación es importante en la activación transcripcional, dependiente e independiente de ligando (Rochette-Egly y cols., 1997; Rochette-Egly y cols., 1992; Taneja y cols., 1997). En concreto, los residuos de serina en el dominio B, S74 y S77 para RAR $\alpha_1$  o S66 y S68 para RAR $\gamma_2$  son fosforilados por la CDK7 de TFIID y estos residuos son importantes para la actividad AF-1 y la transcripción de genes inducibles por ácido retinoico. Los receptores de estrógenos pueden ser fosforilados por MAPK, en los residuos de serina S118 para ER $\alpha$ , S85 y S105 para ER $\beta$ , lo que aumenta su actividad transcripcional (Kato y cols., 1995; Rochette-Egly, C. 2003). El dominio AF-1 del PPAR $\alpha$  también es fosforilado en los residuos de serina S12 y S21 por MAPK, lo que aumenta su actividad transcripcional (Juge-Aubry y cols., 1999); sin embargo, la fosforilación por MAPK de la región N-terminal de PPAR $\gamma_2$ , en el residuo S112, reduce su actividad transcripcional (Shao y cols., 1998). La fosforilación dependiente de MAPK de RXR también altera las acciones biológicas de este receptor (Solomon y cols., 1999).

- Dominio de unión a DNA (DBD).

Es el dominio más conservado en los receptores nucleares y les confiere la habilidad de reconocer secuencias específicas en el DNA. Está formado por una secuencia de 66 a 68 aminoácidos, en la que varios aminoácidos, incluyendo 9 cisteínas, están conservados en toda ella (Fig 2). Las 4 primeras cisteínas y 4 de las 5 últimas se coordinan con un átomo de zinc, formando lo que se denominan "dedos de zinc". Estos dedos de zinc contienen 4 Cys y son diferentes de los dedos de zinc clásicos (2 His y 2 Cys), inicialmente descritos en el dominio de unión al DNA del factor de transcripción TFIIIA de *Xenopus Laevis*. Los dos dedos de zinc de esta superfamilia forman una unidad funcional. Estudios de mutación han permitido localizar dos secuencias en el DBD que juegan un papel muy importante en el reconocimiento del DNA y que se denominan cajas P (Proximal) y D (Distal) (Fig. 3). La caja P la forman 5 aminoácidos y está implicada en la formación de contactos directos proteína/DNA. En función de la secuencia de estos cinco aminoácidos, los receptores nucleares se dividen en dos grupos: los de tipo I, al que pertenecen los receptores de esteroides (menos el de estrógenos) cuya secuencia es

GSKKV y que reconocen la secuencia AGAACA y los de tipo II, al que pertenece todo el resto, cuya secuencia es EGCKG/A y que reconocen la secuencia AGGTCA. La caja D contiene también cinco aminoácidos poco conservados, pero esenciales para la dimerización del receptor. En el caso de los receptores TR, RAR, VDR y PPAR, la unión más estable al DNA es en forma de heterodímeros con RXR (Yu y cols., 1991; Williams y Brent, 1992).

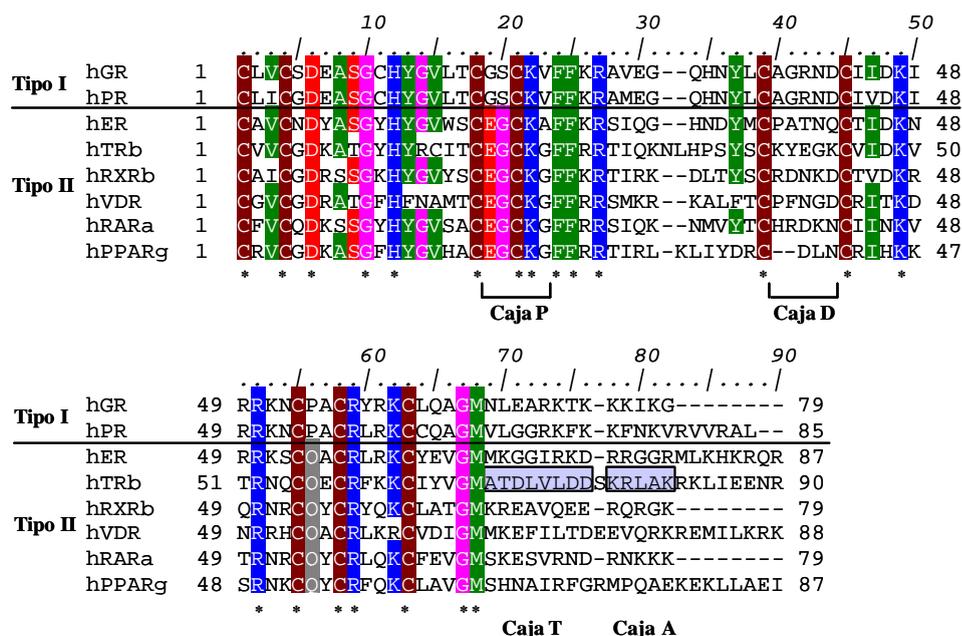
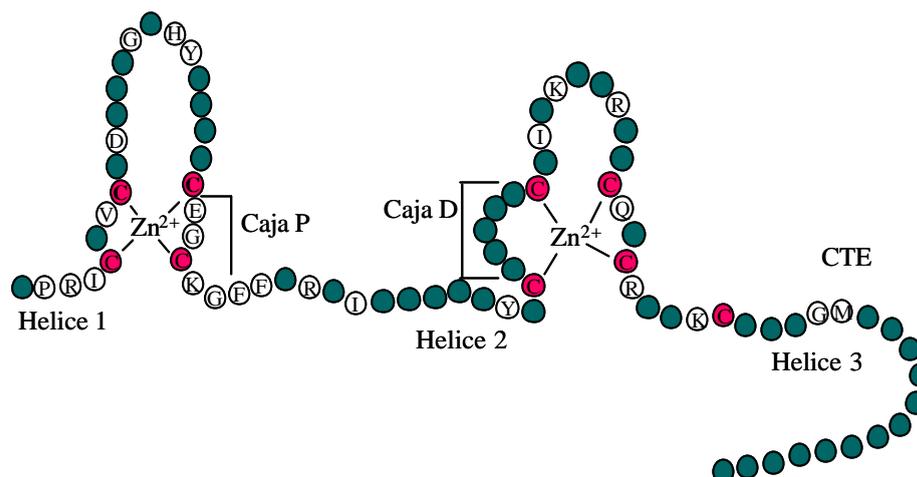


Figura 2: Comparación de los DBD de receptores nucleares de tipo I y II. El dominio de unión a DNA o DBD es el dominio más conservado entre los miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Varios aminoácidos (marcados con un asterisco), incluyendo 9 cisteínas son conservados entre ellos. En función de la secuencia de la caja P se distinguen dos tipos de receptores nucleares: los receptores de tipo I que contienen la secuencia GSKKV y que reconocen la secuencia AGAACA y los receptores de tipo II que contienen la secuencia EGCKG/A y que reconocen la secuencia AGGTCA. En esta figura se ven también representadas las cajas T y A correspondientes a la extensión C-terminal (CTE) del receptor de hormona tiroidea, TR $\beta_1$  (Yen, P. M. 2001). La caja T permite el contacto con el DBD de RXR y estos contactos por dimerización estabilizan la unión del receptor al DNA. La caja A, descrita por primera vez en el receptor huérfano NGFI-B, estabiliza la unión del DBD al DNA y confiere a los TRs la habilidad de unirse como monómeros a elementos octaméricos: TAAGGTCA (Katz, R. W. and R. J. Koenig 1994).

A continuación de los dos dedos de zinc se sitúa la denominada extensión C-terminal (CTE) que contiene las llamadas cajas T y A que son importantes para la unión al DNA (Fig. 2). La caja T permite el contacto con el DBD de RXR. La heterodimerización con RXR es crucial para la unión de los receptores nucleares a elementos HREs asimétricos, dado que los contactos por dimerización estabilizan la unión al DNA y determinan el número de nucleótidos que separan los motivos hexaméricos de un elemento HRE. La caja A, descrita por primera vez en el receptor huérfano NGFI-B, estabiliza la unión del DBD al DNA.



**Figura 3: Estructura de los dedos de Zinc de receptores nucleares de tipo II.** En cada uno de los dedos de zinc, cuatro residuos de cisteína se coordinan con un átomo de zinc. Aparte de las 9 cisteínas conservadas, se muestran también varios aminoácidos representados por sus letras correspondientes y que también son conservados. La caja P está implicada en el reconocimiento del elemento de respuesta y participa a la formación de contactos directos proteína/DNA. Los residuos de la caja D forman una interfase esencial para la homo o heterodimerización del receptor.

- Región C-terminal.

Engloba un dominio de unión a ligando (LBD ó dominio E) y una región bisagra intermedia (dominio D) que actúa como bisagra entre el DBD y el LBD, permitiendo la rotación del primero. En muchos casos el dominio D posee señales de localización nuclear y contiene residuos cuya mutación impide la interacción con correpresores. El LBD está formado por aproximadamente 210 aminoácidos y es muy complejo ya que lleva a cabo múltiples funciones: unión del ligando, dimerización y transactivación. En el reconocimiento del ligando participa la mayor parte del LBD que es necesario para el plegamiento y la formación del sitio de unión. Dos regiones son críticas para la dimerización: el subdominio Ti (inhibidor de la transcripción), situado en una región central y cuya mutación impide la formación de homo y heterodímeros; y una región de unos 100 aminoácidos que se encuentra en su mitad C-terminal y en la que se localizan nueve repeticiones de un heptapéptido de aminoácidos hidrofóbicos y que presenta cierta similitud con la *cremallera de Leucina* y el motivo *hélice-vuelta-hélice* de otros factores de transcripción capaces de dimerizar. En el caso de los receptores TR, en las regiones N y C-terminales del LBD se encuentran además otros dos subdominios 1 y 2, que participan más directamente en la unión del ligando. Por último el LBD contiene también una zona capaz de activar la transcripción dependiente de ligando (AF-2). Se piensa que este

---

dominio, AF-2, interacciona con otros factores (coactivadores) necesarios para dicha transcripción (Lee y cols., 1995; Oñate y cols., 1995).

### **1.3. Elementos de respuesta a hormonas.**

Los receptores nucleares regulan la transcripción de aquellos genes que tienen en su promotor secuencias específicas de DNA, que se denominan elementos de respuesta a hormonas (HREs), y a las cuales se unen (Tabla 1). Los HREs están constituidos por repeticiones de un motivo hexamérico (secuencia núcleo) cuya disposición varía de unos factores de transcripción a otros. Las secuencias núcleo fundamentales son: 5'-AGAACA-3', que es reconocida por los receptores de hormonas esteroideas, excepto el receptor de estrógenos, en forma de repetición invertida separada por tres nucleótidos, y 5'-AGGTCA-3', reconocida por los restantes miembros de la superfamilia. Esta última puede presentarse en los HREs como una secuencia sencilla, como una repetición directa o inversa (Palíndromo) y separadas o adyacentes. En el caso de los elementos de respuesta a T3 (TRE) las disposiciones encontradas con más frecuencia son:

- Hexámeros en repetición directa separados por cuatro pares de bases: DR4 (AGGTCANNNNAGGTCA)
- Palíndromos sin ningún nucleótido de separación: IR0 (AGGTCATGACCT)
- Palíndromos invertidos con seis o cuatro nucleótidos de separación: IP6 (TGACCTNNNNNAGGTCA) o IP4 (TGACCTNNNNAGGTCA).

Para los elementos de respuesta a AR (RAREs) se han encontrado disposiciones de hexámeros en repetición directa separados por dos o cinco pares de bases, (DR2, DR5), elementos palíndromicos (IR0 e IP9) y también son capaces de unirse a TREs. En el caso de los PPARs, sus elementos de respuesta (PPREs) son repeticiones directas pero del tipo DR1 (Aranda, A y Pascual A., 2001). Los elementos de respuesta a VD3 se conocen con el nombre de VDREs y son repeticiones directas (DR3) o inversa (IP9) del motivo hexamérico AGGTCA.

GH de rata	$\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xleftarrow{\hspace{1.5cm}}$	-190 AAGGTAAGATCAGGGACGTGACCGC-166
ME de rata	$\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	-287 AGGACGTTGGGGTTAGGGGAGGACAGTG-260
TSH $\alpha$ de rata	$\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	-74 TGGGCTTAGGTGCACGTGGGAGCA-38
TSH $\beta$ de rata	$\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	-22 TGAACAGAGTCTGGGTCATCACAGCATTAAC+9
Pcp-2 de ratón	$\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	-295 AGGCCTTCTCAGGTCAGAGACCAGGAGA-268
MBP	$\xleftarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	-186 AGACCTCGGCTGAGGACACGGCGG-163
S14 de rata	$\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	-2582 GCCTAGGGCATTCTGGGTGAGGTTA-2558
MHC $\alpha$ de rata	$\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	-160 CTGGAGGTGACAGGAGGACAGCAGCCCTGA-131
C/EBP $\alpha$ de rata	$\xleftarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$	- 607 TGGGGTCGCCTGGAGTTCAGAGATAA-582

**Tabla 1: Elementos de respuesta a la hormona tiroidea** GH: hormona de crecimiento; ME: enzima málica; TSH: tiotropina; Pcp-2: gen específico de las células de *purkinje*; MBP: proteína básica de mielina, S14 (Spot 14): gen hepático implicado en la lipogénesis; MHC: cadena pesada de la miosina; C/EBP: CCAAT/*Enhancer Binding Protein*.

#### 1.4. Receptores de hormona tiroidea (TRs).

Las primeras indicaciones de que la hormona tiroidea podría actuar a través del núcleo las obtuvieron Tata y colaboradores, los cuales observaron que la administración de T3 aumentaba la tasa de síntesis de RNA en hígado de rata (Tata, J. R., L. Ernster, et al. 1963; Tata, J. R. and C. C. Widnell, 1966). En 1972, Oppenheimer y cols. demostraron la existencia de receptores específicos de T3 en núcleos de hígado y riñón y más tarde en núcleos de cerebro, corazón e hipófisis anterior (Oppenheimer y cols. 1974). Pero no fue hasta 1986 cuando, de forma paralela, en los laboratorios de Vennström (Sap y cols., 1986) y Evans (Weinberger y cols., 1986) se clonaron los receptores nucleares específicos de T3.

Como todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, los receptores de hormona tiroidea presentan una organización modular, con el dominio central de unión a DNA ó DBD, que les caracteriza. La caja A confiere a los TRs la habilidad de unirse como monómeros a elementos octaméricos (Katz, R. W. and R. J. Koenig 1994). La secuencia en la región bisagra ó dominio D (que separa el DBD del LBD) se encuentra muy conservada entre las distintas isoformas del receptor de la hormona tiroidea y es importante en la interacción con correpressores transcripcionales. El LBD no sólo es necesario para la unión de la hormona tiroidea sino que también juega un papel importante

en los procesos de dimerización, transactivación y represión basal por TR libre (sin ligando). Los receptores de T3 actúan como factores de transcripción dependientes de ligando, y son capaces de unirse a los elementos de respuesta presentes en los promotores de los genes diana como monómeros, homodímeros o heterodímeros con el receptor del ácido 9 *cis*-retinoico (RXR).

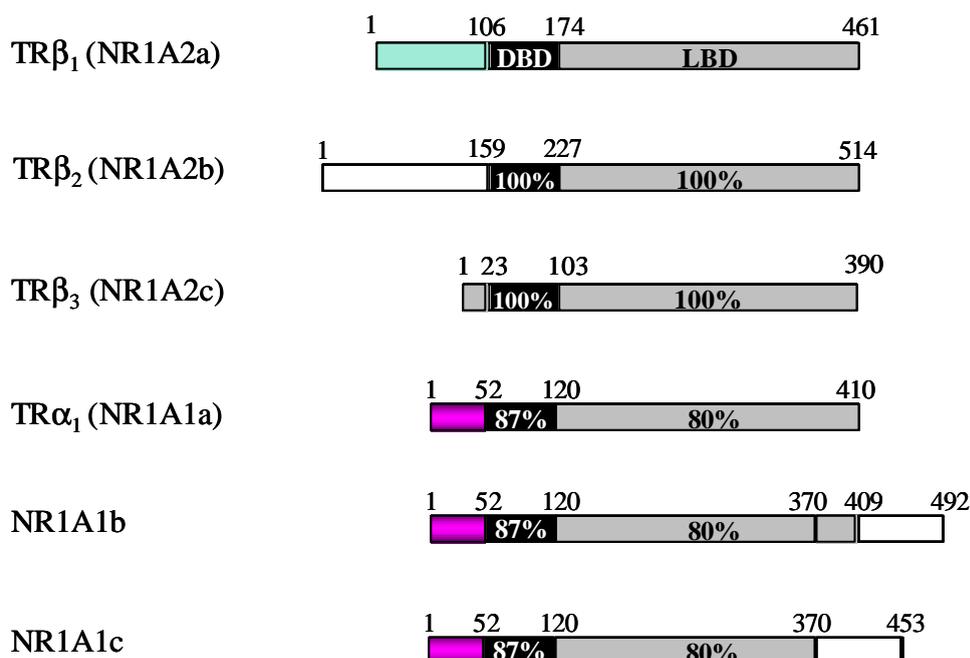
Se han caracterizado dos genes que codifican los receptores de T3, el TR $\alpha$  (NR1A1) y el TR $\beta$  (NR1A2) (Weinberger, C. y cols. 1986; Sap, J. y cols., 1986; Lazar, M.A. 1993; Nuclear receptors committee, 1999) situados respectivamente en los cromosomas 17 y 3 en el hombre. De cada uno de ellos se origina más de una proteína (Fig. 4) (Mitsubishi y cols., 1988; Izumo y cols., 1988).

- Isoformas TR $\alpha$ .

En mamíferos, se origina a partir del gen NR1A1 un único transcrito inicial que por procesamiento alternativo da lugar a tres mRNAs que codifican tres proteínas NR1A1 a, b y c; de los cuales sólo NR1A1a (TR $\alpha_1$ ) une T3 y estimula la transcripción en respuesta a la hormona. NR1A1b y c difieren de NR1A1a por su extremo C-terminal. TR $\alpha_1$  de pollo es el homólogo celular del oncogén viral *verbA*, que coopera con *verbB* a la hora de transformar el precursor de eritroblastos e inducir la eritroblastosis aguda en pollos (Goldberg y cols., 1989). La proteína NR1A1b (TR $\alpha_2$ ) carece de los últimos 40 aminoácidos de TR $\alpha_1$  que son sustituidos por otra secuencia muy conservada de 120 aminoácidos en humanos y 122 en rata y ratón. Estas modificaciones hacen que esta proteína sea incapaz de unir T3, aunque es capaz de unirse específicamente a TREs, pero con baja afinidad. NR1A1b funciona en experimentos de transfección como un antagonista de los receptores de T3, tanto de TR $\alpha_1$ , como de TR $\beta_1$  (Koenig y cols., 1989, Lazar y cols., 1989). Esta inhibición no parece sólo debida a la competición por el sitio de unión en el DNA sino que también es consecuencia de la formación de heterodímeros inactivos con TRs activos o con otros factores capaces de formar heterodímeros, como son el RAR, RXR o COUP-TF (Berrodin y cols., 1992). Formas cortas de receptores  $\alpha$  (p28 y p43) han sido caracterizadas en ratones (Fig. 12) (Chassande y cols., 1997). En el apartado 5.1 hablamos de cómo se originan, de sus estructuras y de sus posibles funciones en la mitocondria.

- Isoformas TR $\beta$ .

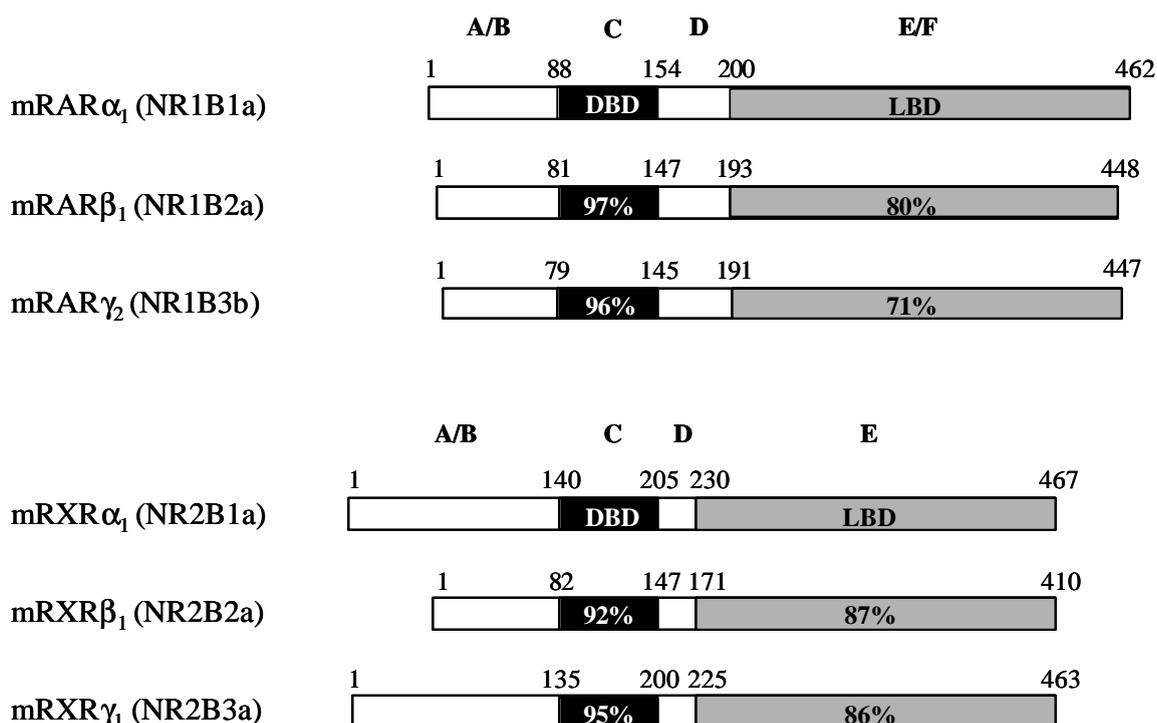
A partir del gen TR $\beta$  (NR1A2), se originan por uso alternativo de tres promotores diferentes y posterior corte y empalme, tres isoformas TR $\beta_1$ , TR $\beta_2$  y TR $\beta_3$  (NR1A2a, b y c) que unen T3 y divergen entre ellas en la región N-terminal (Williams, G. R. 2000; Yen, P. M., 2001). Además estas isoformas difieren claramente en su patrón de expresión. NR1A2a (TR $\beta_1$ ) y NR1A2c (TR $\beta_3$ ) se expresan en una amplia gama de tejidos; NR1A2a presenta altos niveles en el cerebro, hígado y riñón y NR1A2c en el hígado, riñón y pulmón. La expresión de NR1A2b (TR $\beta_2$ ) está limitada a la hipófisis anterior y a áreas específicas del hipotálamo, donde media la autorregulación del eje hipotálamo- hipófisis-tiroides. NR1A2b inhibe la transcripción de los genes de TSH $\alpha$  (Hormona  $\alpha$  estimuladora de la tiroides) y de la subunidad  $\beta$  (Abel, E. D. et al. 1999) mediante su unión a elementos de respuesta negativos presentes en sus genes (Burnside y cols., 1989).



**Figura 4: Estructura de los diferentes productos codificados por los dos loci del receptor de hormona tiroidea en rata.** Los porcentajes se refieren a la homología de secuencia de esa región con respecto a la correspondiente del TR $\beta_1$ . A partir del gen NR1A2 (TR $\beta$ ), se originan por uso alternativo de tres promotores diferentes tres isoformas TR $\beta_1$ , TR $\beta_2$  y TR $\beta_3$  que divergen entre ellas en la región N-terminal. Por el contrario, a partir del gen NR1A1 se origina un único transcrito inicial que procesamiento alternativo da lugar a tres proteínas NR1A2 a, b y c; de los cuales sólo NR1A2a (TR $\alpha_1$ ) es capaz de unir T3. Las proteínas NR1A1b y c carecen de los 40 últimos aminoácidos de TR $\alpha_1$  y son sustituidas por otras secuencias muy conservadas, por lo que son incapaces de unir T3.

### 1.5. Receptores de retinoides y de la vitamina D<sub>3</sub>.

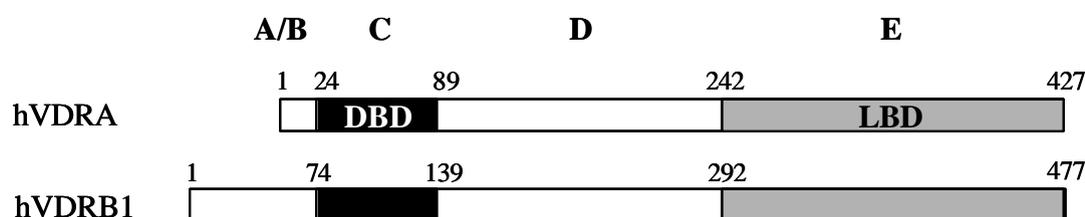
En el caso de los retinoides, existen dos tipos de receptores nucleares encargados de transducir la señal, los receptores del ácido todo-trans retinoico (RAR) y los receptores del ácido 9 cis-retinoico (RXR). Ambos están codificados en tres genes diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), cada uno de los cuales mediante procesamiento alternativo o el uso de distintos promotores generan diferentes isoformas, con un patrón de expresión diferencial durante el desarrollo y la diferenciación (Fig 5). Como los otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, los RARs y RXRs tienen una organización modular; los RARs están compuestos de seis dominios (A-F) y los RXRs de cinco dominios (A-E). Se han caracterizado en ratón siete isoformas del RAR $\alpha$ , cuatro del RAR $\beta$  y siete del RAR $\gamma$  (Giguere, V. et al. 1990; Kastner, P. et al. 1990; Leroy, P. et al. 1991; Zelent, A. et al. 1991; Nagpal, S., A. et al. 1992).



**Figura 5:** Esquema ilustrativo de la estructura general de los receptores RARs y RXRs en ratón. Los receptores RARs y RXRs están codificados en tres genes diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) que mediante procesamiento alternativo y/o el uso de distintos promotores generan diferentes isoformas. Los porcentajes se refieren a la homología de secuencia de esa región con respecto a la correspondiente de RAR $\alpha_1$  o RXR $\alpha_1$ .

Muy recientemente, en humano, se ha identificado una forma truncada del  $\text{RAR}\alpha_1$  ( $\text{RAR}\alpha_1\Delta\text{BC}$ ) que carece de los dominios AF-1 de transactivación independiente del ligando y DBD de unión a DNA (Parrado, A. et al. 2001). El ácido todo-trans o 9-cis retinoico ejerce sus efectos fisiológicos activando su receptor, el cual a su vez activa la transcripción de ciertos genes uniéndose a sus elementos de respuestas, RAREs o RXREs.

Por el contrario, hasta la actualidad sólo se conoce un único gen para el receptor de la vitamina  $\text{D}_3$ ; que en el humano está situado en el cromosoma 12. Por uso alternativo de distintos promotores, este gen codifica dos receptores de vitamina  $\text{D}_3$ : VDRA y VDRB<sub>1</sub> (Crofts, L. A. et al. 1998; Sunn, K. L. al. 2001), los cuales divergen entre ellos en la región N-terminal (Fig 6). VDRB<sub>1</sub> tiene 50 aa más que de VDRA.

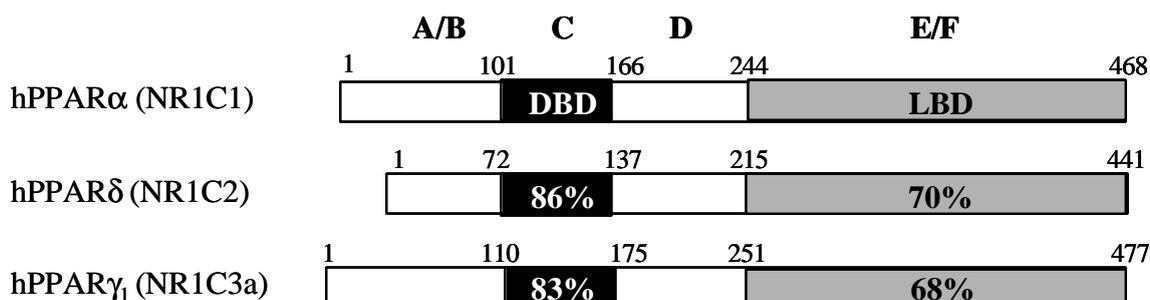


**Figura 6: Estructura general de los receptores VDRs en humano.** Un único gen, por uso alternativo de distintos promotores da lugar a dos isoformas del receptor de vitamina  $\text{D}_3$ , VDRA (NR1H1a) y VDRB<sub>1</sub> (NR1H1b). Estas isoformas divergen entre ellas en la región N-terminal; VDRB<sub>1</sub> contiene 50 aa más que corresponden a la región 5' no traducida de VDRA.

## 1.6. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) fueron inicialmente clonados como receptores nucleares que median los efectos de una serie de compuestos sintéticos denominados proliferadores peroxisomales ya que inducen la formación de estas estructuras subcelulares. Posteriormente se puso de manifiesto que estos receptores tenían otros ligandos naturales como ácidos grasos y eicosanoides que son derivados del ácido arachidónico fundamentalmente, y que se sintetizan bien a través de la vía de la lipooxigenasa que da lugar a leukotrienos o vía la ciclooxigenasa que produce prostaglandinas. Como otros receptores nucleares, los PPARs actúan uniéndose a sus elementos de respuesta (PPREs) en sus genes diana, formando heterodímeros con el RXR. Hasta la fecha se han clonado tres genes diferentes;  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  (Fig 7) (Tontonoz, P. et al. 1994; Dreyer, C. et al. 1992; Kliewer, S. et al. 1994). Existen distintos ligandos para las diferentes isoformas de los PPARs.  $\text{PPAR}\alpha$  es activado por ácidos grasos insaturados de

cadena larga, leucotrieno B4 y ácido 8-hidroxi-eicosatetranoico (8-HETE) y drogas de la familia de los fibratos. PPAR $\gamma$  es activado específicamente por compuestos sintéticos con capacidad antidiabética de la clase de los tiazolidinedionas (TZDs), y por compuestos naturales como los ácidos 9 y 13 octadecadienoicos (Nagy, L. et al. 1998) y la prostaglandina 15d-PDJ<sub>2</sub>, su ligando más potente caracterizado hasta la fecha. La isoforma  $\delta$  es activada por ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados y 15d-PDJ<sub>2</sub>.

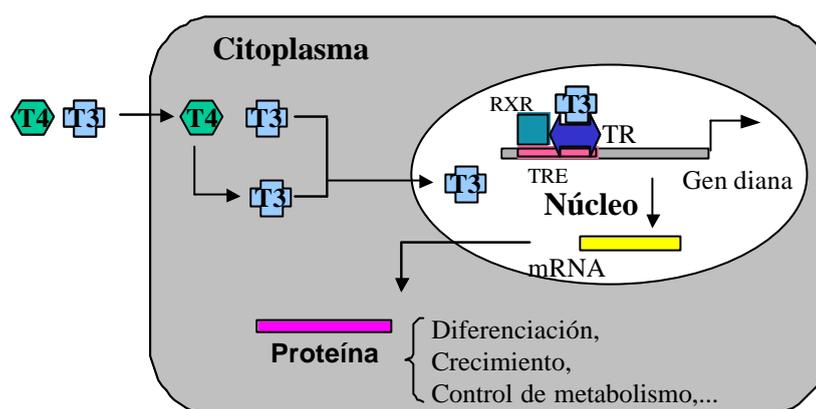


**Figura 7.** Esquema ilustrativo de la estructura general de los receptores PPARs de humano. Los porcentajes se refieren a la homología de secuencia de esa región con respecto a la correspondiente del PPAR $\alpha$ . Tres genes diferentes codifican para PPAR $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ; PPAR $\gamma$  (NR1C3) tiene dos isoformas  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$ .

## 2. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR RECEPTORES NUCLEARES.

La RNA polimerasa II requiere para una acción eficaz del concurso de dos tipos de factores de transcripción: los factores de transcripción basales o generales (GTFs) y los factores de transcripción específicos. Estos últimos, entre los cuales se incluyen los receptores nucleares, dependen para su acción de secuencias específicas del DNA y que generalmente están localizadas 5' del lugar donde se une la RNA polimerasa II. La formación eficiente del complejo de preiniciación de la transcripción, requiere de ambos tipos de factores de transcripción e implica no solamente una interacción directa entre los factores de transcripción y la RNA pol II sino también una acción indirecta a través de la modificación de la estructura de la cromatina. Al contrario que los receptores de esteroides que se localizan en el citoplasma unidos a proteínas de choque térmico (Dalman y cols., 1990); los receptores de hormona tiroidea, retinoides, vitamina D<sub>3</sub> y proliferadores peroxisomales (TR, RAR, RXR, VDR y PPAR) se encuentran constitutivamente localizados en el núcleo unidos a sus secuencias diana, aun en ausencia de hormona (Lazar y cols., 1991; Ribeiro y cols., 1992). En ausencia de ligando, estos receptores se unen a factores correpresores y reprimen activamente la expresión de los genes diana inducidos

por el ligando. En presencia del ligando, el receptor experimenta un cambio conformacional, lo que le permite separarse de los correpresores y reclutar múltiples complejos coactivadores, resultando en una activación de la transcripción (Aranda A y Pascual A, 2001). Además de este control positivo, estos receptores son capaces de reprimir determinados genes en respuesta al ligando (genes regulados negativamente), y cuyo mecanismo es mucho menos conocido que en el caso de los genes inducidos.



**Figura 8: Mecanismo de acción de la hormona tiroidea.** La hormona tiroidea y su precursor (3,5,3',5' tetraiodotironina, T4) viajan por el torrente sanguíneo asociadas a proteínas transportadoras. La T4 es convertida a T3 en la célula mediante actividades desiodasas, y es esta última la que se une a su receptor nuclear (TR). El complejo hormona-receptor es capaz de unirse a su vez al elemento de respuesta a T3 (TRE), generalmente en forma de heterodímeros con RXR. Este proceso origina una respuesta a nivel de transcripción, produciendo los diversos efectos biológicos.

## 2.1. Represión basal - Correpresores.

Los correpresores son proteínas que interactúan con los receptores nucleares sin ligando, aporeceptores, mediando la represión de la transcripción de genes con HREs positivos. Por ensayos de interacción de doble híbrido en levaduras se han identificado dos proteínas correpresoras principales: SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor*) y N-CoR (*nuclear receptor corepressor*), que interactúan con los receptores nucleares en ausencia del ligando, es decir se unen a los aporeceptores (Chen y Evans, 1995, Horlein y col, 1995). Ambas proteínas contienen dominios de represión y funcionan favoreciendo el reclutamiento de un complejo que contiene SIN3, desacetilasas de histonas (HDACs) y muchas otras proteínas (Figura 9). La desacetilación de histonas se piensa que favorece un mayor empaquetamiento de nucleosomas generando una estructura menos accesible a la maquinaria de la transcripción y cuyo resultado es un potente

mecanismo de inhibición de la expresión génica. Cuando se une el ligando se provoca un cambio conformacional en el receptor. Las proteínas correpresoras son liberadas permitiendo así el reclutamiento de los coactivadores y la activación de dicha transcripción. El dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2) juega un papel crucial en la disociación de estos cofactores (Barettino y cols., 1994; Danielian y cols., 1992; Durand y cols., 1994; Webster y cols., 1988).

## **2.2. Activación transcripcional - Coactivadores.**

Los coactivadores son proteínas capaces de potenciar la actividad de los receptores nucleares remodelando la estructura de la cromatina así como reclutando la maquinaria basal de transcripción. Al contrario de los correpresores, la interacción de los coactivadores con los receptores nucleares requiere la unión del ligando, es decir se unen a los holoreceptores. Existen varios tipos de coactivadores: complejos remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP (SWI/SNF, BRG/hBrm), coactivadores con actividad acetiltransferasa de histonas (p/CAF, CBP/p300, p160/SRC y TAF<sub>II</sub>250), y los complejos tipo TRAP/DRIP/ARC que son reclutados de modo dependiente de ligando por los receptores nucleares a través de la subunidad TRAP220/DRIP205.

- **Complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.**

Una de las primeras funciones de los receptores nucleares sería de facilitar el acceso de la maquinaria basal de transcripción al promotor para iniciar la transcripción. Ya que las unidades transcripcionales incluidas en la cromatina están reprimidas comparando con el DNA desnudo, se piensa que moléculas cuyo papel sería de vencer los impedimentos estéricos que impone la estructura de cromatina se reclutarían en etapas tempranas del mecanismo de acción de receptores nucleares. Dos tipos de moléculas están implicadas en la remodelación de la cromatina: los complejos remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP y los complejos con actividad acetiltransferasa de histonas. Los complejos con actividad remodeladora de cromatina interaccionan con los receptores nucleares y son reclutados de un modo dependiente de ligando. Estos complejos utilizan la energía proveniente de ATP y alteran la estructura de la cromatina; y permiten por lo tanto el mayor acceso de la maquinaria de transcripción a la región promotora de los genes diana. Al menos dos complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP

han sido identificados en levaduras: RSC (*remodeling the structure of chromatin*) y el complejo SWI/SNF. El complejo SWI/SNF facilita la unión al DNA nucleosomal de factores de transcripción específicos y puede provocar cambios en la estructura de la cromatina de manera dependiente de ATP (Owen-Hughes, T. et al. 1996). De este complejo SWI/SNF forma parte el producto del gen SWI2/SNF2 que es homólogo de ATPasas dependientes de hélices DNA/DNA. Homólogos de SWI2/SNF2 también se encontraron en *D. Melanogaster* (Brahma) y mamíferos (BRG1, hBrm) en los que forman parte de diversos complejos multiméricos. Además, complejos remodeladores similares al complejo SWI/SNF han sido caracterizados en *D. Melanogaster*, incluyendo NURF (*nucleosome remodeling factor*), ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*) y CHRAC (*chromatin accessibility complex*). Todos estos complejos contienen ISWI (*imitation SWI*) que es un miembro de la familia SWI2/SNF2 (Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld 2000) e interaccionan con los receptores nucleares y son también reclutados de un modo dependiente de ligando.

- **Complejos con actividad acetiltransferasa de histonas.**

Otras proteínas capaces de interaccionar directa ó indirectamente con los holoreceptores y potenciar su transactivación son SRC-1/N-CoA (*Steroid receptor coactivator 1, Nuclear receptor coactivator*) (Oñate y cols., 1995), CBP (*CREB binding protein*), p300 (proteína que se une al factor E1A de adenovirus) y pCAF (*p300/CBP associated factor*). Todas estas proteínas tienen en común que poseen actividad acetiltransferasa de histonas y además son capaces de reclutar otras histona acetiltransferasas (HAT). La mayoría de los coactivadores de receptores nucleares identificados por ensayos de interacción de doble híbrido en levaduras, pueden ser clasificados en dos grandes grupos: la familia de p160/SRC (SRC-1/NcoA-1, TIF-2/GRIP-1/NCoA-2/SRC-2 y AIB1/pCIP/ACTR/RAC3/ TRAM-1/SRC-3) y la familia de CBP/p300. Coactivadores que no forman parte de estos dos grupos incluyen PGC-1, ARA70, pCAF y NRIF3. Las histonas mantienen el promotor en un estado transcripcional reprimido a través de contactos electrostáticos entre las cadenas laterales de lisina cargadas positivamente y los grupos fosfato del DNA cargados negativamente. Mientras, la acción de los complejos con actividad ATPasa afecta en gran parte a grandes dominios de cromatina, la acción de los complejos con actividad acetiltransferasa acetila las histonas,

que modulan la accesibilidad de los factores de transcripción al promotor (Wolfe, 1994 y 1996, Felsenfeld y cols., 1996 y Pruss, 1996).

- **complejo TRAP/DRIP/ARC**

Recientemente, se han aislado complejos multiproteicos denominados TRAP (*thyroid receptor associated proteins*), DRIP (*vitamin D receptor interacting proteins*) y ARC (*activator recruited cofactor*) que interactúan con el dominio AF-2 de los holoreceptores nucleares (Fondell y cols., 1996; Rachez, C. et al. 1998). Se ha visto que el complejo DRIP/TRAP es capaz de aumentar la activación dependiente de ligando del receptor de T3 en un sistema celular sobre moldes de cromatina, lo cual sólo se había demostrado que ocurría con SRC-1 (Liu y cols., 1999). También se ha demostrado que este complejo es capaz de potenciar la acción de otros receptores nucleares y esto ha sido interpretado como una regla general en la señalización mediada por receptores nucleares. Los componentes del complejo DRIP también se han visto que son casi idénticos a los del complejo ARC que es esencial para muchos factores de transcripción como p.ej SREBP, NFkB y VP16 (Naar, A. M. et al. 1999; Rachez, C. et al. 1999). Estos complejos favorecen el reclutamiento de componentes de la maquinaria basal de transcripción, incluida la RNA polimerasa y de esta manera favorecerían la inducción de la transcripción por los correspondientes receptores nucleares.

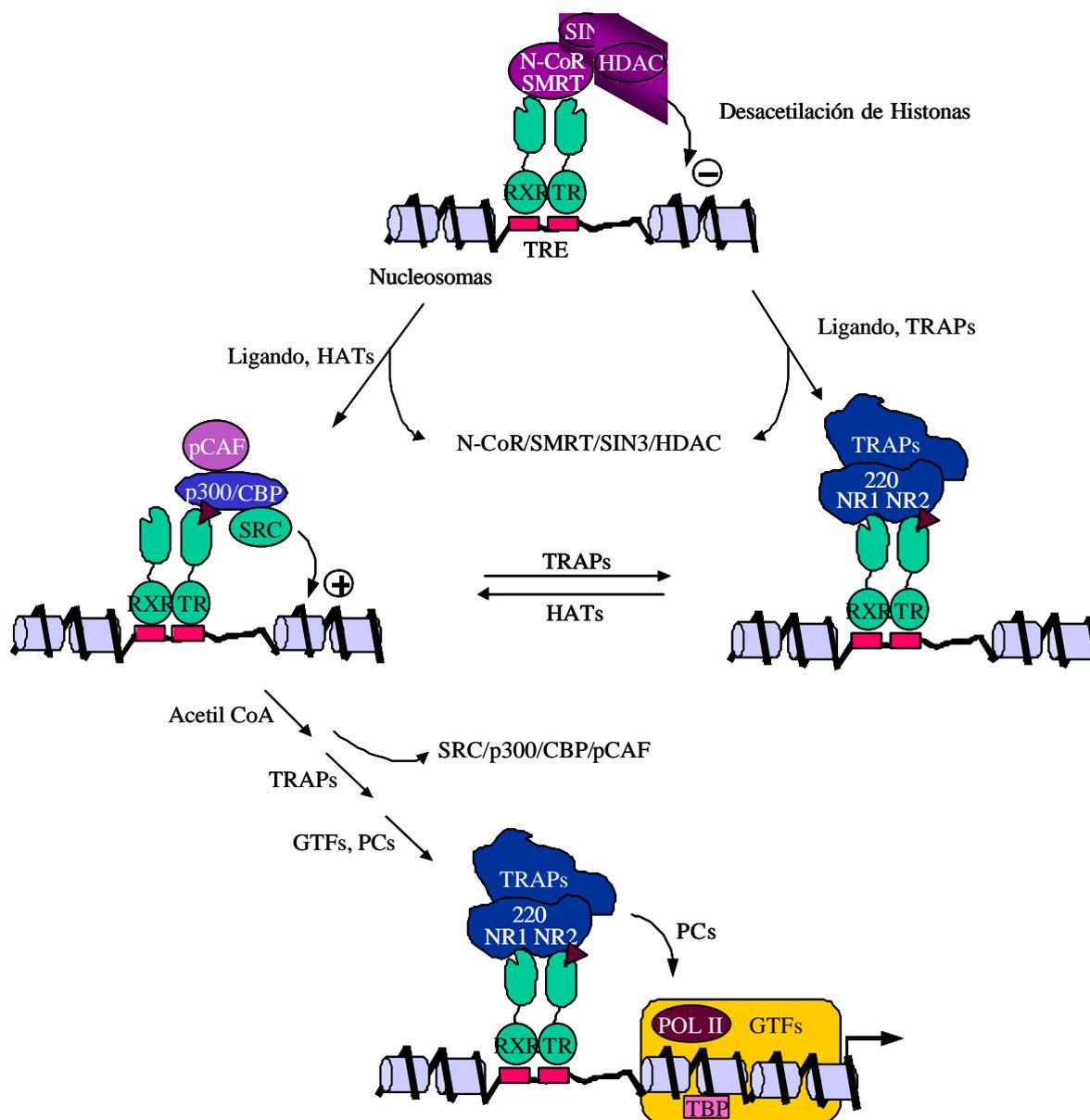
Recientemente se ha observado que algunos coactivadores también interactúan con el dominio AF-1, como es el caso del coactivador p160 con TR $\beta$ 2 (Oberste-Berghaus y cols., 2000). Esta interacción parece estar implicada en la cooperatividad observada entre los dominios AF-1 y AF-2. Por otro lado, los dominios AF-1 pueden ser regulados por rutas de señalización de quinasas. De hecho, la fosforilación en dos residuos de serina en el dominio AF-1 de ER $\beta$  por MAPK contribuye al reclutamiento de SRC-1 (Tremblay y cols., 1999).

Todo esto ha llevado a la propuesta de un modelo en tres etapas para la regulación por TR y que podría extenderse a otros receptores nucleares (Fig. 9).

1. Cuando el elemento de respuesta a T3 aparece expuesto en la superficie de un determinado nucleosoma en la cromatina, el TR será capaz de unirse a él. (Wong y

- cols., 1995). El receptor, una vez unido y en ausencia de hormona, se une a determinados correpresores (SMRT/NcoR) que reclutan desacetilasas de histonas (HDAC) bien directamente, o a través de su interacción con SIN3 (Nagy y cols., 1997; Huang y cols., 2000; Kao y cols., 2000; Guenther y cols., 2000). La desacetilación de histonas conlleva una compactación de la cromatina y una represión transcripcional (Heinzel y cols., 1997; Alland y cols., 1997).
2. Al unirse la hormona, el receptor reclutaría coactivadores con actividad acetiltransferasa (coactivadores p160, como pCIP o SRC-1; CBP/p300 y pCAF) que relajan localmente la estructura de la cromatina y liberan la represión transcripcional, facilitando la actividad de la maquinaria de transcripción basal. (Mizzen y cols., 1996; Wong y cols., 1997). Existen muchas interacciones proteína-proteína entre estos componentes: CBP/p300 interacciona con el receptor, los coactivadores p160 y pCAF a través de dominios independientes. De igual manera, el receptor se une a CBP/p300, coactivador p160 y a pCAF. pCAF también se une directamente a CBP/p300, coactivador p160 y al receptor.
  3. Una última etapa involucra el desplazamiento de los complejos con actividad acetiltransferasa y el reclutamiento de los complejos tipo TRAP/DRIP/ARC que a su vez interactúan con los componentes de la maquinaria basal de transcripción, incluida la RNA polimerasa II.

Además de su interacción con coactivadores y correpresores, los receptores de T3 son capaces también de interactuar con elementos de la maquinaria básica de transcripción como TBP, TFIIB y alguno de los factores asociados a TBP (TAFs) (Tone y cols., 1994; Petty y cols., 1996), de forma que facilitarían el reclutamiento de dicha maquinaria en los sitios de inicio de la transcripción.



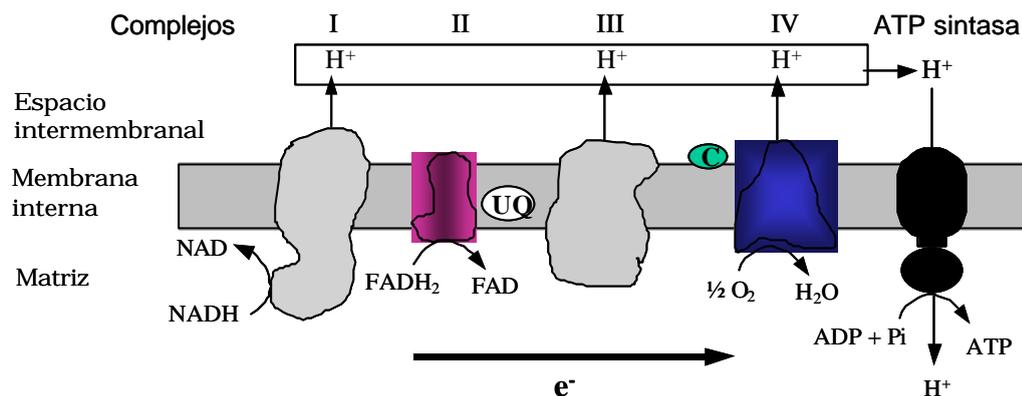
**Figura 9: Modelo de regulación transcripcional por el receptor de hormona tiroidea.** La estructura de la cromatina determina la accesibilidad del elemento de respuesta a T3 (TRE) en la superficie de un octámero de histonas. Tras unirse, el heterodímero RXR/TR sin hormona, recluta el complejo de correpresores (SMRT, N-CoR, SIN3) y desacetilasas (HDAC) lo que aumenta la represión. La unión del ligando (T3) induce un cambio conformacional, lo que permite la captación de proteínas con actividad acetiltransferasa (p300/CBP, pCAF, SRC-1) que acaban con las interacciones que en las histonas mantienen reprimido al DNA. Una última etapa involucra el desplazamiento de los coactivadores y la unión de los TRAPs, y por consiguiente la interacción del complejo receptor-TRAPs con el complejo de preiniciación.

### 3. LA MITOCONDRIA.

#### 3.1. Introducción.

Las mitocondrias son los orgánulos subcelulares en el que ocurre la etapa final de la oxidación de los nutrientes. Es el lugar donde se producen el ciclo del ácido cítrico, la oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa, procesos que generan la mayor parte de la energía celular en condiciones aeróbicas. El número de mitocondrias de las células varía mucho, así como su tamaño. Una mitocondria típica de mamífero tiene un diámetro de 0.2 a 0.8  $\mu\text{m}$  y una longitud de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$ . Este orgánulo se encuentra limitado por dos membranas concéntricas que tienen propiedades y funciones biológicas marcadamente diferentes. Las enzimas responsables del ciclo del ácido cítrico y de la oxidación de los ácidos grasos están localizadas en la matriz, a cual contiene además varias moléculas de DNA circular, ribosomas y las enzimas necesarias para la biosíntesis de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial. La mitocondria no es, sin embargo, genéticamente autónoma, y los genes que codifican la mayoría de las proteínas mitocondriales se encuentran en el DNA nuclear. La mitocondria está especializada en oxidar el NADH y el  $\text{FADH}_2$  producidos en las reacciones de la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico y la oxidación de los ácidos grasos a través de una cadena transportadora de electrones cuyo aceptor final es el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ). Los complejos proteicos que integran esta cadena de transporte se encuentran localizados en la membrana mitocondrial interna, igual que la enzima que sintetiza el ATP, la ATP sintasa.

Los complejos proteicos que integran la cadena transportadora de electrones se denominan *NADH-ubiquinona oxidoreductasa o Complejo I*, *succinato-ubiquinona oxidoreductasa o Complejo II*, *ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa o Complejo III* y *citocromo c oxidasa o Complejo IV*. Estos complejos son los encargados de transferir los electrones de compuestos de bajo potencial redox (NADH) hasta el oxígeno, que posee un alto potencial redox, a través de una serie de centros redox que contienen metales de transición, particularmente hierro, ó grupos orgánicos prostéticos. Este proceso libera una enorme cantidad de energía libre que la cadena respiratoria convierte en un gradiente de protones y que el complejo de la ATP sintasa utiliza para mantener niveles apropiados de ATP en la célula. De esta manera las mitocondrias, en condiciones aeróbicas, proporcionan la mayoría de los requerimientos energéticos de las células (Fig. 10).



**Figura 10.** Esquema de la cadena de transporte situada en la membrana interna mitocondrial. En él se muestran los complejos constituyentes de dicha cadena, a través de los cuales tiene lugar el flujo de electrones. UQ, Ubiquinona; c, citocromo c.

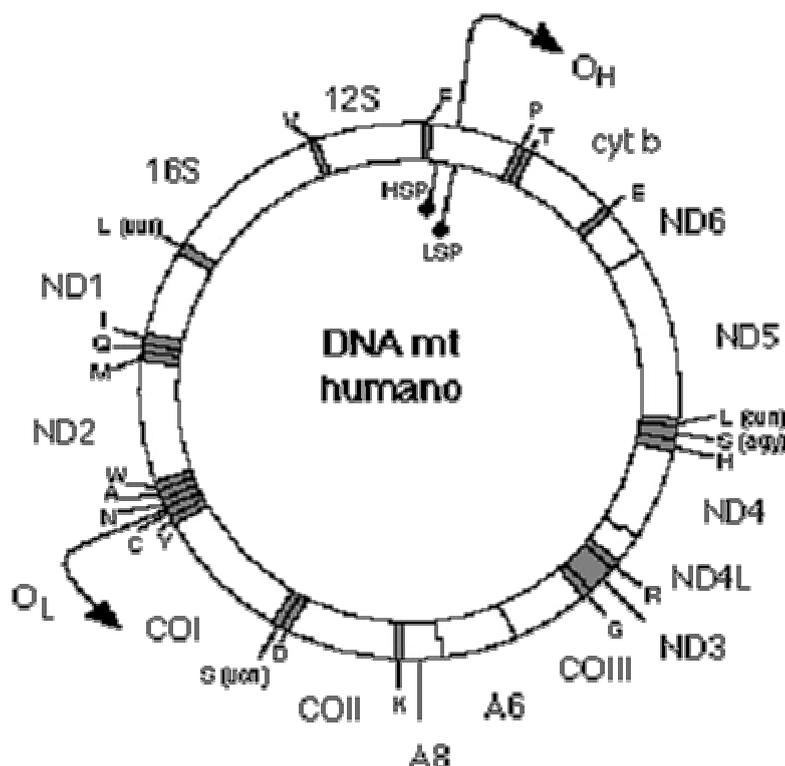
La *NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I)* cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona (UQ), pequeña molécula liposoluble que al reducirse se transforma en ubiquinol ( $UQH_2$ ). El complejo consta, al menos, de 16 cadenas polipeptídicas (aunque en la enzima bovina se han descubierto 41 polipéptidos diferentes), 7 de las cuales están codificadas en la mitocondria (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) (Fig. 11), una molécula de mononucleótido de flavina (FMN) y de 16 a 24 átomos de hierro no hémico que forman parte de numerosos centros Fe-S. Los electrones son transferidos después desde la  $UQH_2$ , un portador móvil, hasta la ubiquinona-citocromo c reductasa. La *succinato-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II)* también cataliza la reducción de la UQ a la  $UQH_2$ . En este caso el donador de electrones es el succinato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, y el flujo de estos electrones tiene lugar vía el  $FADH_2$ . Este complejo contiene 4 polipéptidos codificados en el núcleo, varios centros Fe-S y un citocromo. Los citocromos son un grupo de proteínas que contienen un grupo hemo con un átomo de hierro y que actúan como portadores de un electrón en las cadenas de transporte. Existen tres clases principales de citocromos (a, b y c) que se diferencian en sus espectros de absorción de luz. La *ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa (Complejo III)* cataliza la transferencia de electrones desde la  $UQH_2$  al citocromo c. Consta de al menos 8 proteínas diferentes, una de las cuales está codificada en el genoma mitocondrial. Incluye varios tipos de citocromos (uno de los cuales, el citocromo b, es la proteína codificada en el genoma mitocondrial) (Fig. 11) y una proteína con un centro Fe-S. El citocromo c, una pequeña proteína periférica de membrana, después de aceptar los electrones, difunde

lateralmente por la superficie de la membrana y los transfiere a la *citocromo c oxidasa* (*Complejo IV o COX*). Este complejo proteico es el componente final de la cadena respiratoria y cataliza la reducción, por 4 electrones, del O<sub>2</sub> al agua. En mamíferos consta de 13 subunidades, I a III codificadas en la mitocondria (COI, COII y COIII) (Fig. 11), y IV a XIII en el núcleo. La COX contiene dos iones Cu<sup>2+</sup> y los citocromos a y a<sub>3</sub>. Casi el 90% del consumo celular de oxígeno se debe a la acción de la citocromo c oxidasa. Los complejos de la cadena transportadora de electrones translocan protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. La membrana mitocondrial interna es impermeable a los protones, que por tanto generan un gradiente electroquímico. Estos protones fluyen de nuevo a favor de dicho gradiente hacia la matriz, a través de un canal formado por la *ATP sintasa*, la cual utiliza la fuerza protomotriz debida al gradiente de protones para llevar a cabo la fosforilación del ADP a ATP. Al proceso de transporte de electrones y síntesis de ATP se le conoce globalmente como fosforilación oxidativa. La ATP sintasa consta de dos componentes, F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub>. F<sub>1</sub> contiene las subunidades catalíticas y puede ser aislado como una ATPasa muy activa; F<sub>0</sub> es un canal de protones que atraviesa la membrana. Este complejo en mamíferos consta de al menos 9 cadenas polipeptídicas diferentes, dos de las cuales se codifican en la mitocondria (A6 y A8) (Fig. 11).

### 3.2. El genoma mitocondrial.

La mitocondria posee su propio genoma, un código específico propio y un aparato específico involucrado en la replicación del DNA, expresión y síntesis de proteínas. Una típica célula de mamíferos contiene cientos de mitocondrias y cada una de ellas de 2 a 10 copias de una única molécula de DNA. El DNA mitocondrial es circular, pequeño y enormemente compacto ya que carece de intrones y apenas tiene DNA no codificante. El humano consta de 16.569 pares de nucleótidos, y fue el primero en secuenciarse. Codifica, al igual que el resto de los DNA mitocondriales de mamíferos, los 13 polipéptidos ya señalados (componentes todos de la cadena transportadora de electrones y de la ATP sintasa), los 2 RNAs ribosómicos (12S y 16S) y los 22 tRNAs necesarios para traducir dichos polipéptidos (Fig. 11). A pesar de esto, la mayor parte de las proteínas mitocondriales, incluyendo los componentes de la cadena respiratoria, ATP sintasa, enzimas, factores de transcripción, DNA y RNA polimerasas o las proteínas involucradas en la traducción del RNA, están codificados por genes nucleares; se sintetizan en el citosol

y son finalmente importados por la mitocondria. Aunque la contribución del genoma mitocondrial en la síntesis de proteínas mitocondriales es cuantitativamente escasa, es un requisito mayor para la vida ya que son imprescindibles para la biogénesis mitocondrial. La hormona tiroidea T3 es uno de los mayores reguladores de la biogénesis mitocondrial (Mutvei y cols., 1989), y actúa sobre la expresión de ambos genes nucleares y mitocondriales.



**Figura 11. DNA mitocondrial humano.** La región no codificante incluye el origen de replicación de la hebra H ( $O_H$ ) y los promotores para la transcripción de las dos hebras (HSP y LSP). Los genes que codifican los dos rRNAs se indican como 12S y 16S. ND, NADH deshidrogenasa; CO, citocromo oxidasa; A, ATP sintasa; cyt b, citocromo b;  $O_L$ , origen de replicación de la hebra L. Los genes que codifican los tRNAs aparecen indicados de acuerdo con el código de una letra para los aminoácidos correspondientes.

### 3.3. Transcripción del genoma mitocondrial.

Las mitocondrias, a pesar de tener su propio genoma, no son autónomas. El proceso de transcripción del DNA mitocondrial está mediado exclusivamente por factores codificados en el núcleo. La naturaleza de la maquinaria transcripcional y la estructura de los promotores mitocondriales es variable entre los diferentes organismos. En humanos, el DNA mitocondrial se transcribe simétricamente a partir de dos promotores unidireccionales, HSP y LSP, para las hebras pesada y ligera respectivamente, localizados

---

en el lazo-D (Fig. 11). Ambos promotores están separados por un fragmento de aproximadamente 150 pares de bases. A diferencia de lo que ocurre en humanos, en levaduras hay múltiples promotores que se distribuyen a lo largo del genoma mitocondrial con la peculiaridad de que todos ellos transcriben la misma cadena del DNA.

Gran parte de las secuencias reguladoras implicadas en los procesos de replicación y transcripción del mtDNA están localizadas en la región del lazo-D, una corta región de aproximadamente 1122 pares de bases, que contiene los promotores HSP y LSP. A partir del promotor HSP se transcriben la mayoría de los genes formando una molécula policistónica. El transcrito de la hebra H se procesa posteriormente dando lugar a 12 mRNAs, los dos rRNAs y 14 tRNAs. Gelfand y Attardi (1981) han demostrado que la tasa de síntesis de los rRNAs es de 10 a 30 veces mayor que la de los mRNAs. Por lo tanto se ha sugerido que la mayor parte de los transcritos de la hebra H se terminan prematuramente en la región 3' del gen del rRNA 16S. Montoya y cols. (1983) han identificado dos sitios diferentes de inicio de la transcripción en la hebra H, uno de los cuales daba lugar a transcritos terminados prematuramente, correspondientes a los precursores de los rRNAs. Se ha observado también que el extremo 3' del rRNA 16S se puede plegar en una estructura similar a la horquilla de atenuación de la transcripción en bacterias. Christianson y Clayton (1986) obtuvieron evidencias adicionales de la existencia de elementos cis de atenuación en el extremo 3' del RNA 16 S. El atenuador se caracterizó de una manera mas precisa como una secuencia tridecamérica en el gen del tRNA<sup>leu</sup>. Incluso se ha purificado parcialmente una proteína de 34 kDa que se une a esta secuencia y facilita la terminación de la transcripción *in vitro*. El transcrito L origina sólo 1 mRNA, 8 tRNAs y RNAs iniciadores para la replicación.

En cuanto a los factores implicados en la transcripción, se requiere una RNA polimerasa específica de mitocondria, la cual está compuesta por un único polipéptido de 140 kDa. Hasta el momento, se han identificado tres componentes proteicos susceptibles de regular la transcripción mitocondrial en mamíferos. El primero de ellos, el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam), también conocido como TCF6, es una proteína de 25 kDa necesaria para conferir especificidad al proceso de transcripción (Fisher y Clayton, 1985 y Fisher y cols., 1987). Los factores de transcripción B1 (TFBM1) y B2 (TFBM2) son respectivamente el segundo y tercer componentes implicados en la transcripción del genoma mitocondrial. Estos factores, al igual que Tfam, son necesarios para la iniciación

de la transcripción; ambos factores interactúan directamente con la RNA polimerasa mitocondrial, con la que heterodimerizan y se unen específicamente al mtDNA (Falkenberg, M. et al. 2002; Shoubridge, E. A. 2002). Además de su función como activador transcripcional, las proteínas TFAM poseen una actividad RNA metiltransferasa (McCulloch, V. et al. 2002; Seidel-Rogol, B L. et al. 2003). Sin embargo, el principal regulador de la biogénesis mitocondrial en mamíferos es Tfam (Fisher, R. P. and D. A. Clayton 1988); proteína que está codificada en el genoma nuclear e importada por la mitocondria. Tfam reconoce y se une específicamente a secuencias del mtDNA localizadas 19-39 pb corriente arriba de cada uno de los puntos de inicio de la transcripción. El gen h-Tfam fue descrito por primera vez por Fisher y Clayton (1985); este gen codifica una proteína (forma precursora) de 246 amino ácidos de los cuales los 42 amino ácidos N-terminales funcionan como señal de localización mitocondrial. Durante la translocación mitocondrial, se llevan a cabo los procesos proteolíticos que producen la forma madura de Tfam (~ 25 kDa), la cual carece de los 42 amino ácidos N-terminales. El factor de transcripción mitocondrial A posee una similitud con otras proteínas de unión a DNA, conocidas como HMGs (*high mobility group*), en dos dominios de unión a DNA (cajas HMG). Diversos ensayos de protección con DNasa y transcripción *in vitro* con mutantes indican que Tfam se une a la región inmediatamente 5' de los promotores LSP y HSP, incluso en ausencia de RNA polimerasa; también se ha visto que es capaz de unirse a más zonas dentro del lazo D (Ghivizzani y cols., 1994). *In vitro*, Tfam muestra mayor afinidad por el LSP que por el HSP. Se ha sugerido que la variación en los niveles de dicho factor en la mitocondria puede servir para regular dichos promotores, de tal modo que a concentraciones limitantes, predominará la síntesis de RNA a partir del promotor LSP dando comienzo a la replicación del DNA. Por el contrario, a altos niveles de Tfam, la transcripción tendrá lugar a partir del promotor HSP (Fisher y Clayton, 1988; Falkenberg, M. et al. 2002). Diversos análisis genéticos en levaduras han confirmado que existe un homólogo en este organismo de Tfam (ABF2) que se requiere para una eficiente transcripción en la mitocondria *in vitro* y para mantener la integridad del DNA mitocondrial *in vivo*, aunque en levadura no es necesario para asegurar la especificidad de la transcripción *in vitro* (Diffley y Stillman, 1991). En levaduras se ha purificado también un factor de aproximadamente 40 kDa que se asocia con la RNA polimerasa y que es el que confiere especificidad al proceso de iniciación.

Silva, J. P. and N.-G. Larsson (2002) utilizando la técnica de recombinación cre-loxP inactivaron el gen Tfam con el fin de manipular la función de la cadena respiratoria en tejidos específicos de ratones. Los resultados obtenidos por estos autores muestran que la disrupción del gen Tfam o la disrupción específica de tejido de este gen provoca graves deficiencias en el funcionamiento de la cadena respiratoria y aumenta considerablemente el porcentaje de apoptosis en los embriones (Tfam<sup>-</sup>/Tfam<sup>-</sup>). La pérdida de Tfam es letal entre los días de edad embrionaria (E) E8.5 y E10.5. Los embriones homocigotos (Tfam<sup>-</sup>/Tfam<sup>-</sup>) inactivados tienen un fenotipo mutante caracterizado por un retraso en el desarrollo neuronal y la ausencia de estructuras cardíacas en el día E8.5. Estos embriones Tfam<sup>-</sup>/Tfam<sup>-</sup> carecen completamente de la proteína Tfam y contienen niveles muy bajos o carecen de mtDNA. Por lo tanto, Tfam es esencial para el mantenimiento de mtDNA *in vivo* y la pérdida de Tfam es incompatible con el desarrollo normal del embrión. La disrupción específica de tejido del gen Tfam en cardiomiocitos resulta en una miocardiopatía severa bloqueándose la conducción auriculoventricular del corazón. En las células  $\beta$  del páncreas, la inactivación de Tfam resulta en un deterioro en la capacidad de acoplar el estímulo a la secreción, es decir, en una incapacidad de estas células de liberar la insulina en una cantidad proporcional al cambio en la concentración de glucosa; además de una muerte temprana de estas células  $\beta$  en los ratones maduros. La disrupción de Tfam en las neuronas corticales resulta en un aumento en la sensibilidad a agentes nocivos y en una degeneración neuronal masiva.

Por último, Virbasius y Scarpulla (1991, 1993 y 1994) identificaron en humanos dos factores nucleares de transcripción, NRF-I y NRF-II, que regulan la función mitocondrial mediante el control de la transcripción de varios genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales entre los se incluyen el propio Tfam.

#### **4. HORMONA TIROIDEA Y DESARROLLO CEREBRAL.**

##### **4.1. Expresión de las diferentes isoformas del receptor de T3 durante el desarrollo del encéfalo.**

Estudios iniciales, mediante análisis de Scatchard, indicaron que el receptor de hormona tiroidea aparece en el encéfalo hacia el día 14 de vida fetal y sus niveles aumentan hasta el día 17, permaneciendo constantes hasta el nacimiento (Pérez-Castillo y cols, 1985). Tras éste, la concentración del receptor aumenta tres veces, alcanzando su máximo hacia el

día 6 de vida postnatal. Posteriormente, una vez clonado el receptor, se observó que los mRNA de las dos isoformas  $\alpha$  son las más abundantes en el encéfalo antes del nacimiento, sus niveles sufren un pequeño incremento hacia el día 6 de vida postnatal para luego disminuir hasta alcanzar los valores del adulto. Sin embargo, los niveles del mRNA TR $\beta$ <sub>1</sub> son muy escasos en el feto y sufren un incremento de hasta 30 veces alrededor del día 15 de vida postnatal.

Mediante experimentos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se ha podido determinar la distribución de las distintas isoformas del receptor en las diferentes regiones encefálicas de la rata (Mellström y cols., 1991). El día 14 de vida fetal ya se detecta la expresión de la isoforma  $\alpha$ <sub>1</sub> en diversas regiones del encéfalo, y en el día 19 de edad fetal puede apreciarse expresión de dicha isoforma en las capas externas de la corteza cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio, corteza piriforme, tálamo, hipotálamo y cerebelo. El máximo de expresión de esta isoforma se alcanza en todas las regiones hacia el día 6 de edad postnatal. Posteriormente la concentración de su mRNA disminuye hasta los niveles del adulto. El mRNA de la isoforma  $\beta$  presenta un patrón de expresión diferente; durante el período fetal se observan señales muy débiles y restringidas en su mayor parte a determinadas zonas del hipocampo y en el estriado. Con el nacimiento la expresión de TR $\beta$ <sub>1</sub> experimenta un notable incremento, el cual continúa a lo largo del desarrollo postnatal hasta alcanzar los niveles del adulto.

En general, los niveles de mRNA de TR $\alpha$ <sub>1</sub> son mayores que los del TR $\beta$ <sub>1</sub> a lo largo del desarrollo fetal y neonatal temprano en el encéfalo, con la excepción del estriado, donde el mRNA del TR $\beta$ <sub>1</sub> predomina en el nacimiento. Finalmente, en el adulto los niveles de expresión de ambos en el encéfalo son similares, aunque su distribución es diferente.

#### **4.2. Efectos de la hormona tiroidea sobre el desarrollo del sistema nervioso central.**

El cerebro en desarrollo constituye un órgano blanco muy importante de la acción de T3. La ausencia de esta hormona durante el desarrollo provoca daños irreversibles en el cerebro y cuanto más tarde se empieza el tratamiento con esta hormona más profundos son los daños cerebrales observados. Esta hormona es necesaria para una correcta mielinización y neurogénesis y su falta provoca alteraciones en el contenido de DNA y proteína. La rata neonatal es un excelente modelo para estudiar procesos de desarrollo que

tienen lugar *in utero* en humanos. El cerebro de rata a los 19 días de edad se encuentra en un estado de desarrollo equivalente al cerebro humano en el momento del nacimiento. Por tanto, acontecimientos que ocurren en el último trimestre del desarrollo humano tienen lugar postnatalmente en la rata (Porterfield y Hendrich, 1993). Alrededor del tiempo del nacimiento la neurogénesis en el cerebro de rata está prácticamente terminada y el gran pico de esta neurogénesis tiene lugar entre el día 12 de edad embrionaria y el momento del nacimiento (Berry, 1974). En la rata, más del 50% de incremento en el número de células que ocurre postnatalmente se debe a un aumento en las células de glía. Esta gliogénesis empieza esencialmente después del nacimiento y tiene lugar hasta la vida adulta. Sin embargo en el humano, en el que el desarrollo neurológico es anterior al nacimiento, la proliferación neuronal está casi completa hacia el séptimo mes de embarazo y la gliogénesis empieza "*in utero*" (Dobbing y Sands, 1973). El cerebelo se desarrolla más tarde que el resto del cerebro y el 77% de la neurogénesis en la corteza cerebelar de rata tiene lugar después del nacimiento. El período postnatal en la rata es un período importante de diferenciación y maduración neuronal. Es un período de rápida mielinización e intenso desarrollo de los procesos neurales que termina alrededor del día 30 postnatal. El crecimiento de las células de glía y la mielinización neuronal ocurre predominantemente entre los días 10-45. En humanos, donde el pico de mielinización comienza antes del parto, esta está esencialmente completa hacia el final del segundo año.

En humanos, el hipotiroidismo congénito está caracterizado por un profundo retraso mental asociado con otras deficiencias neurológicas como sordera, pobre coordinación motora, problemas en el habla y problemas con los movimientos motores finos. Se han observado también numerosas alteraciones metabólicas en el encéfalo de neonatos de rata tiroidectomizados. Existe una disminución en la tasa de síntesis de RNA y proteínas. De hecho, varios autores (Valcane y Eberhardt, 1977; Earys y Taylor, 1951) propusieron hace tiempo que el mecanismo por el cual la deficiencia de hormona tiroidea impide el correcto desarrollo del sistema nervioso central podría ser a través de su papel esencial como regulador de la síntesis de proteínas. La hormona tiroidea también regula la gliogénesis y mielogénesis. El hipotiroidismo retrasa la deposición de la mielina y la biosíntesis de cerebrósidos, sulfátidos, esfingomielina y proteínas estructurales componentes de la mielina (Farsetti y cols., 1991). La sinaptogénesis está también regulada por T3. La incapacidad de los neonatos hipotiroideos para desarrollar sinapsis normales se piensa que es debida a irregularidades en el desarrollo del citoesqueleto neuronal, que impedirían el

correcto crecimiento y ramificación de los procesos neuronales. Se ha demostrado que T<sub>3</sub> regula la síntesis de varios tipos de tubulinas, así como de algunas MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos) en el encéfalo (Hargreaves y cols., 1988). A su vez interviene en el transporte axonal de estas proteínas, así como en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos.

El período crítico de dependencia de hormona tiroidea en humanos se considera que empieza al final de la gestación y que se extiende durante los dos primeros años de edad (Oklund y Timiras, 1977). La falta de tratamiento con T<sub>3</sub> tiene efectos muy graves en el desarrollo neurológico y la severidad de estos efectos se correlaciona con la magnitud de la deficiencia, el tiempo en el que esta deficiencia aparece y la edad en que comienza la terapia de sustitución. En la rata, el período equivalente sería alrededor de los días 10-15 de edad postnatal, una etapa asociada con proliferación de axones y dendritas, formación de sinapsis, gliogénesis y mielinización (Hamburgh y cols., 1971). Deficiencias de hormona tiroidea durante este período tienen, al igual que en humanos, unas consecuencias muy serias en el desarrollo estructural y la organización del cerebro, de tal manera que si una terapia sustitutiva se empieza más tarde de este período no se puede corregir nunca enteramente el daño cerebral causado. Estos datos concuerdan con el hecho de que en cerebro se produce un aumento considerable de los receptores para T<sub>3</sub> después del nacimiento alcanzándose un pico hacia el día 6 de edad postnatal. Este aumento en la concentración se mantiene durante las primeras semanas críticas del desarrollo.

En los últimos años se ha avanzado mucho con respecto al conocimiento de las bases moleculares que subyacen al mecanismo de acción de la T<sub>3</sub> en el desarrollo del cerebro. Se han identificado numerosos genes regulados por esta hormona y que incluyen factores de transcripción, moléculas de adhesión, neurotrofinas, genes de mielina, etc. Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que la T<sub>3</sub> regula también la expresión del genoma mitocondrial durante el desarrollo del cerebro (Pipaón y cols., 1992; Muñoz y cols., 1991; Rodríguez-Peña y cols., 1993; Strait y cols., 1992; Farsetti y cols., 1991; Lindholm y cols., 1993; Rodríguez, G.M y cols., 1995; Vega-Núñez, E y cols., 1997; Palomino, T y cols., 1998; Koenig, R.J, 1998; Pombo, P.M y cols., 2000; Weitzel, J.M y cols., 2001). También hemos observado que T<sub>3</sub> regula la funcionalidad mitocondrial en el cerebro en desarrollo (Martinez, B. y cols. 2001).

---

## **5. EFECTOS DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE LA MITOCONDRIA.**

### **5.1. Efectos de la hormona tiroidea sobre la actividad mitocondrial.**

La triiodotironina (T3) es considerada como el mayor regulador de la actividad mitocondrial. Se sabe desde hace mucho tiempo que la administración de la T3 aumenta el consumo de oxígeno y la producción de energía; y por el contrario, el hipotiroidismo tiene efectos opuestos (Brand y Murphy 1987, Hoch 1988). Actualmente se conocen dos rutas de estimulación por T3 de la actividad mitocondrial: Ruta de estimulación a corto plazo (no muy bien establecida) y a largo plazo. El efecto a corto plazo ocurre a los pocos minutos del tratamiento con la HT, y el efecto a largo plazo se desarrolla después de algunas horas. La detección de sitios de unión específicos de T3, que corresponden a una proteína NR1A1a de 28 kDa, en la membrana interna, sugiere que T3 podría ejercer una acción directa sobre la actividad mitocondrial. El efecto a largo plazo de la T3 sobre la actividad mitocondrial, resulta probablemente de mecanismos iniciados a nivel nuclear.

#### **5.1.1. Efectos tempranos (a corto plazo)**

Sterling y Brenner (1995) observaron que la adición de T3 al medio de cultivo de mitocondrias aisladas de animales hipotiroideos, inducía una estimulación del translocador de nucleótidos de adenina (ANT) a los dos minutos. La rapidez del efecto de T3 llevó a pensar que podría existir una ruta de activación por T3 no dependiente de sus receptores nucleares.

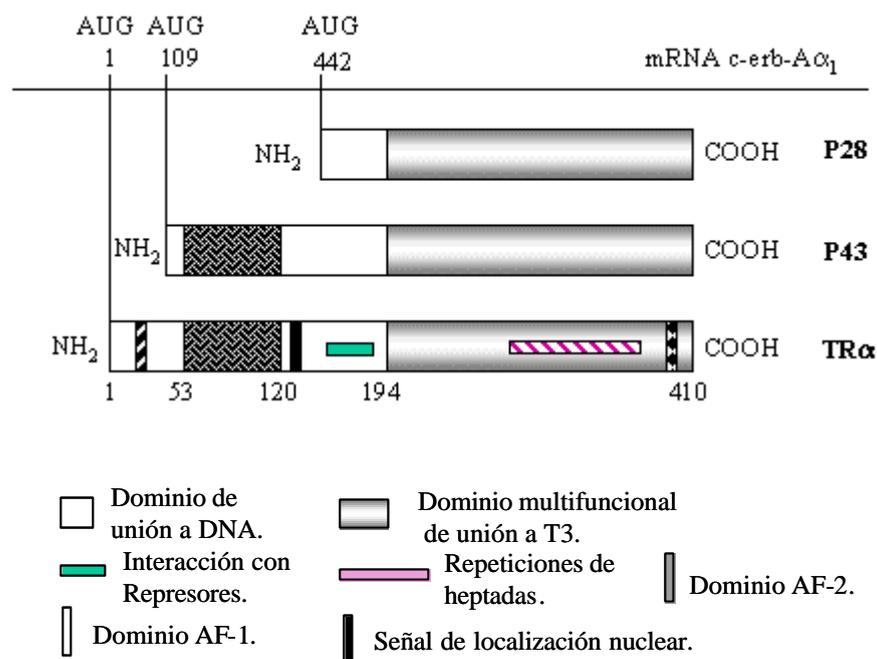
Con respecto a esto, Enriquez y cols., (1999) demostraron que la adición de pequeñas cantidades de T3 a las mitocondrias aisladas, influenciaba la transcripción mitocondrial y en particular el cociente mRNA/rRNA, en relación con los cambios en el modo de unión de proteínas al genoma mitocondrial. Este resultado demuestra que la acción de la T3 sobre la transcripción mitocondrial implica una acción directa sobre la maquinaria de transcripción del orgánulo.

Sin embargo, la posibilidad de que la T3 por si sola induzca una respuesta temprana, sigue siendo muy controvertida. Horst y cols. (1989) tras inhibir las diiodinaciones con propiltiouracilo mostraron que las diiodotironinas (T2s), no T3, inducen este efecto a corto plazo en mitocondria. Además, de acuerdo con la detección de sitios de unión para 3',5-T2 en el orgánulo (Lanni y cols., 1994; Leary y cols., 1996),

---

Goglia y cols. (1994) descubrieron que 3',5-T<sub>2</sub> se unía a una subunidad de la citocromo c oxidasa, conduciendo a un cambio conformacional de la enzima y una activación de la cadena respiratoria. O'Reilly y Murphy (1992) mostraron que la administración de inhibidores de síntesis de proteínas no alteraba tampoco el efecto de 3',5-T<sub>2</sub> sobre el orgánulo.

La detección de sitios de unión específicos a T<sub>3</sub> en la mitocondria (Sterling y Milch, 1975; Goglia y cols., 1981; Hashizume e Ichikawa, 1982) impide descartar la posibilidad de una inducción directa de T<sub>3</sub>. Sterling y cols. (1984a) descubrieron una proteína de 28 kDa que une T<sub>3</sub> y localizada en la membrana interna de las mitocondrias. De acuerdo con este dato, Wrutniak y cols. (1995) identificaron en la matriz de mitocondrias de hígado de rata, una segunda forma truncada del receptor NR1A1a con una masa molecular de 43 kDa (p43), que también se origina por traducción alternativa a partir de otro AUG interno del mensajero que codifica para el receptor nuclear completo (fig. 12). Esta proteína, al igual que p28, que no se detecta en el núcleo (Wrutniak y cols., 1995), une T<sub>3</sub> con una afinidad, como había de esperar, similar a la de NR1A1a (Casas y cols., 1999). Además, al contrario de p28, esta proteína contiene el dominio de unión a DNA del receptor nuclear de T<sub>3</sub>. Recientemente se ha demostrado que p43 aumenta fuertemente la transcripción del genoma mitocondrial y por consiguiente, la síntesis de proteínas mitocondriales (Casas y cols., 1999). Bigler y cols (1992) postularon que la p28 se origina por traducción alternativa a partir de un AUG interno del mRNA que codifica para el receptor nuclear completo. Aunque su función exacta queda por determinar, p28 podría actuar como un receptor y estar involucrada en el efecto a corto plazo de T<sub>3</sub> sobre la mitocondria, tomando en cuenta su co-localización con los componentes de la cadena respiratoria, proteínas no acopladas (UCPs) o el translocador de nucleótidos de adenina (ANT).



**Figura 12: Dos isoformas cortas de la proteína NR1A1a (p28 y p43)** se originan por traducción alternativa a partir de distintos AUG internos del mensajero que codifica para el receptor completo de la hormona tiroidea. Mientras p28 se detecta en la membrana mitocondrial interna, p43 se encuentra localizada en la matriz del orgánulo donde estimula la transcripción del genoma mitocondrial en presencia de T3. TRα: Receptor nuclear de T3 NR1A1a (47 kDa); 1,109 y 442: números de nucleótidos en el transcrito (1=A del primer AUG); 1,53,120, 194 y 410: números de amino ácidos en el receptor NR1A1a.

### 5.1.2. Efectos a largo plazo

Harper y cols. (1993) observaron que en mitocondrias aisladas o en hepatocitos, el flujo de protones a través de la membrana interna es una diana importante para la acción de la hormona tiroidea sobre el consumo de oxígeno; y muchos datos muestran su subida tras la administración de T3. En primer lugar, la T3 aumenta la área de la membrana interna y altera su composición de fosfolípidos (Brand y cols., 1992; Bangur y cols. 1995) conduciendo a un incremento de la permeabilidad a protones 9-12 horas después la administración de T3 (Horrum y cols., 1992). Recientemente, el descubrimiento de una familia de UCPs mitocondriales (Ricquier y Bouillaud, 2000) proporcionó una nueva explicación del efecto. Al contrario de los primeros resultados, según los cuales, la expresión de UCP1 está restringida al tejido adiposo marrón, parece que casi todos los tejidos expresan al menos un miembro de la familia UCP (UCP2, 3 y Proteína transportadora mitocondrial- 1 de cerebro). Sorprendentemente, ahora se piensa que la expresión de los genes UCP1 (Cassard-Doulcier y cols., 1994; Guerra y cols., 1996;

Rabelo y cols., 1996), UCP2 (Lanni y cols., 1997) y UCP3 (Gong y cols., 1997; Larkin y cols., 1997) se estimula tras la administración de T3. De eso, Lanni y cols. (1999) establecieron una correlación substancial entre los niveles de mRNA de UCP3, fosforilación oxidativa y el estado tiroideo, lo que sugiere que el control de la expresión de UCP3 está involucrado en la regulación por T3 del flujo de protones.

Otro descubrimiento de estos estudios, es que estos cambios en la composición de fosfolípidos de la membrana interna, incluyen una estimulación de la actividad cardiolipina sintasa debido a un incremento del cúmulo de fosfatidilglicerol en la mitocondria (Hostetler, 1991; Cao y cols., 1995), aumentando la cantidad de cardiolipina (Paradies y Ruggiero, 1989,1990). La cardiolipina, que estimula varios transportadores mitocondriales y actividades enzimáticas (Paradies y Ruggiero, 1989,1990), podría contribuir al efecto a largo plazo de la T3 sobre la respiración mitocondrial. Además del flujo de protones, la influencia de la T3 sobre los procesos involucrados en la disipación de la fuerza “protomotriz”, ya mencionado, está en acuerdo con la observación que la subunidad  $\beta$ F1-ATPasa del complejo mitocondrial que sintetiza ATP (Izquierdo y Cuezva, 1993) y ANT (Dummler y cols., 1996; Schonfeld y cols., 1997), está codificada por genes cuya expresión está regulada por T3. Como las actividades ATPasa y ANT contribuyen a disminuir la fuerza protomotriz, estos datos sugieren que una inducción directa o indirecta de la transcripción de genes está implicada en el efecto a largo plazo de T3.

El efecto a largo plazo de la hormona tiroidea sobre el consumo mitocondrial de oxígeno, con alteraciones en la síntesis de fosfolípidos, parece ser claramente iniciado a nivel nuclear. Queda por establecer cual es la contribución del mecanismo directo que implica el receptor nuclear NR1A1, y el indirecto mediado por inducción de factores de transcripción que responden a T3, como el factor de respiración nuclear-1 (NRF-1), del que se ha identificado elemento de respuesta (RE), en muchos genes respiratorios nucleares. (Pillar y Seitz, 1997).

## **5.2. Efecto de la hormona tiroidea sobre la expresión del genoma mitocondrial**

Aunque el mecanismo por el cual la T3 regula la funcionalidad mitocondrial aún no está del todo elucidado, se piensa que tiene lugar mediante la regulación de la transcripción y traducción tanto de proteínas mitocondriales codificadas en la propia mitocondria, como

de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo. En términos generales, la T3 incrementaría la capacidad de las proteínas mitocondriales que intervienen en la cadena de transporte mitocondrial.

La mayoría de los estudios del efecto de la T3 sobre la expresión de los diferentes mensajeros mitocondriales se han llevado a cabo en el hígado. Además de su efecto sobre la respiración mitocondrial, muchos otros estudios confirman la influencia de la T3 sobre la expresión del genoma mitocondrial. Mutvei y cols., (1989) vieron que la administración de T3 a ratas hipotiroideas, inducía un incremento de 2-8 veces en los niveles de mRNA mitocondriales. Datos similares se observaron también en el músculo esquelético con cierta especificidad de tejidos (Wiesner y cols., 1992). La expresión de la mayoría de los genes mitocondriales, está regulada por T3; como es el caso de la subunidad  $\beta$ -F1 ATPasa, ANT, citocromo c1, UCPs y de otras muchas subunidades de la cadena respiratoria (Pillar y Seitz, 1997). Además, se ha observado una mejoría en la importación mitocondrial de proteínas codificadas en el núcleo, en células del músculo cardíaco (Craig y cols., 1998), de acuerdo con los estudios de Scheneider y Hood (2000) que indican que la expresión de la proteína de choque térmico, una chaperona involucrada en la importación, está estimulada por la T3.

A pesar de los efectos directos de T3 sobre la mitocondria, comentados anteriormente, actualmente se piensa que la mayoría de los efectos de esta hormona sobre la transcripción y funcionalidad mitocondriales se llevan a cabo a través de su receptor nuclear. Con respecto a esto, son interesantes los resultados de Garstka y cols mostrando un aumento en los niveles de mRNA del factor de transcripción mitocondrial (Tfam) en hígado de rata in vivo (Garstka y cols., 1994). Como ya se ha comentado este factor estimula la replicación y la expresión del DNA mitocondrial (Clayton, 1991).

### **5.3. La hormona tiroidea estimula la mitocondriogenesis.**

Otro efecto bien conocido de la T3 es la estimulación de la mitocondriogenesis, considerado como un efecto a largo plazo, detectado después de un periodo de latencia de más 24 horas (Gross, 1971). La mitocondriogenesis es el resultado de numerosos eventos que conducen a la síntesis y al reagrupamiento de los fosfolípidos de membranas, replicación de DNA y a la estimulación de la expresión del genoma mitocondrial y de

genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. Por lo tanto, la hormona tiroidea regula el volumen de la membrana interna, la composición lipídica de la membrana (con la consiguiente alteración en las propiedades de las proteínas transportadoras mitocondriales), la capacidad de la cadena respiratoria, el contenido en citocromo de la membrana interna y el ritmo de síntesis de proteínas mitocondriales. Esto se refleja fundamentalmente en un aumento del ritmo de respiración sobre todo en hígado, corazón, riñón y músculo esquelético (Satav y Katyare, 1982; Stevens y cols., 1995) en animales hipertiroideos. La estimulación del consumo de oxígeno se observa no sólo en el órgano intacto sino también en células y mitocondrias aisladas. Esta estimulación de la respiración se debe a un aumento en la síntesis y transporte de ATP mitocondrial como consecuencia de la estimulación de la actividad ATP sintasa.

Es probable que la regulación por T3 de la mitocondriogénesis implique ambos receptores nucleares y mitocondriales. Como ya sabemos, la síntesis de “*novo*” de lípidos y la movilización en membranas, resulta probablemente del efecto general de la T3 sobre el recambio lipídico. Por otra parte, la estimulación de la expresión de Tfam (Garstka y cols., 1994) es probablemente el mecanismo más importante implicado en la mitocondriogénesis, dado que este factor estimula la expresión y la replicación del genoma mitocondrial.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el desarrollo de esta tesis son los siguientes:

- 1) Regulación de la expresión del factor de transcripción mitocondrial Tfam por hormonas tiroideas. Estudios *in vivo* en el cerebro en desarrollo e *in vitro* en células de neuroblastoma.
- 2) Estudio de la interacción entre las rutas de señalización de los receptores de hormonas tiroideas y vías de señalización extracelulares en la regulación del promotor de Tfam.
- 3) Regulación de la expresión del factor de transcripción Tfam por vitamina D3, ácido retinoico y 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandina J<sub>2</sub> en células de neuroblastoma.
- 4) Estudio de la interacción entre las rutas de señalización de vitamina D3, ácido retinoico y 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandina J<sub>2</sub> y vías de señalización extracelulares en la regulación del promotor de Tfam.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.**

Se utilizaron ratas hembras de la raza Wistar con un peso corporal inicial de 180-230g. Las ratas fueron criadas bajo unas condiciones ambientales controladas y se las mantuvo con un ciclo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y a una temperatura de 22 +/- 2°C. La alimentación y la bebida les fue administrada *ad libitum* durante el periodo experimental. Las ratas fueron cruzadas con machos normales, considerándose como día cero de gestación cuando se observó el tapón vaginal. El periodo de gestación fue de 22 días y se señaló como día cero de la vida postnatal el día del nacimiento.

El hipotiroidismo congénito fue inducido, en fetos y neonatos, mediante la administración de metilmercaptoimidazol (MMI), diluido al 0,02% en H<sub>2</sub>O, a ratas preñadas en el noveno día de gestación. Este tratamiento fue mantenido durante la lactancia de las crías. Con el fin de eliminar posibles restos de tejido tiroideo, se inyectó en el día 5 de edad postnatal una dosis de <sup>131</sup>I (150 µCi/100g de peso corporal). El hipotiroidismo en adultos se indujo con la administración de MMI durante tres semanas. Los tratamientos con hormona tiroidea (T3) se realizaron por inyección intraperitoneal a neonatos hipotiroideos de las edades objeto de estudio. Se les administró una dosis saturante de T3 de 200 µg/100g de peso corporal, y se sacrificaron a los 48 horas. Los animales se sacrificaron por decapitación a distintos tiempos según el experimento, y los tejidos fueron extraídos y congelados inmediatamente en nieve carbónica y luego conservados a - 70°C hasta el momento de su uso.

### **2. CULTIVO CELULAR.**

#### **2.1. Ensayos de transfección.**

Los experimentos de transfección se realizaron con distintos tipos de células:

- Células TR: células inmortalizadas procedentes de neuroblastos corticales de rata (Chun, J. and R. Jaenisch 1996).

- Células HT22: línea celular establecida de hipocampo de ratón (Maher, P. and J. B. Davis 1996).
- Células OM5: células inmortalizadas procedentes de oligodendrocitos corticales (cedidas por G. Sutcliffe, UCSD, San Diego, CA, USA).
- Células MB492: Células de adipocitos marrones inmortalizadas, cedidas por el Dr. M. Benito del departamento de bioquímica y biología molecular de la facultad de farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Estas células se cultivaron a 37°C en un atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>, en medio DMEN (Dubelcco's Modified Eagle's Médium) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2 mM Glutamina. Las células se sembraron para mantener una misma densidad celular y los experimentos fueron realizados cuando las células llegaban a una confluencia de 70-80%. Las células se transfectaron por el método clásico de precipitación de DNA con fosfato cálcico (Chen, C. y Okayama, H., 1987). Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (falcon) en las condiciones normales de cultivo en un medio DMEN con suero. Se transfectaron 0,5 µg de la construcción que contenía el promotor (entero o deleccionado).

Para los experimentos de cotransfección con los receptores de hormona tiroidea, se añadieron además 0,5 µg de cada uno de los vectores de expresión correspondientes a los receptores TR $\alpha_1$  y TR $\beta_1$  junto con 0,1 µg del vector de expresión correspondiente al receptor hRXR $\alpha$ . Al día siguiente de la transfección, se lavaron los precipitados de DNA con una solución salina, TD 1X, y se sustituyó el medio de las placas por medio "hipotiroideo" (Medio DMEN sin suero). Tras 6 horas de incubación las células se trataron directamente con T3 (1 µM).

Para analizar el efecto del ácido retinoico (AR), vitamina D<sub>3</sub> (VD3) y prostaglandina (15d-PGJ<sub>2</sub>), las células se incubaron con los diferentes tratamientos (1 µM VD3, 1 µM 15d-PGJ<sub>2</sub> o 1 µM AR).

Para estudiar la interacción de la activación de diversas rutas de kinasas con el efecto observado de los distintos ligandos de receptores nucleares comentados anteriormente, células TR fueron tratadas con activadores de kinasas (1 mM Dibutiril

AMPc, 0,05  $\mu\text{g/ml}$  PDBu, 0,1 mM IGF-I o 0,1 mM EGF) y una hora después se añadieron los diferentes ligandos (1  $\mu\text{M}$  T3; 1  $\mu\text{M}$  VD3, 1  $\mu\text{M}$  15d-PGJ<sub>2</sub> o 1  $\mu\text{M}$  AR).

Para los experimentos de cotransfección con el mutante activo de la PI3 kinasa, K227E/p110 $\alpha$ , además de los 0,5  $\mu\text{g}$  de la construcción que contenía el promotor de Tfam, se añadieron 1  $\mu\text{g}$  de la construcción correspondiendo al mutante.

Después de incubar las células con los distintos tratamientos durante el tiempo requerido para cada uno de los experimentos, estas se lavaron con TD 1X y se lisaron en el *Reporter Lysis buffer* de Promega. Se prepararon los extractos y se valoró la actividad luciferasa usando el reactivo *luciferase assay system* de Promega según las instrucciones de la casa comercial, en un luminómetro modelo *Lumat LB 9507* (Berthold). Para efectuar las correcciones en base a la eficacia de la transfección se procedió a la medición de la actividad beta-galactosidasa, utilizando 30-50  $\mu\text{l}$  de extractos y siguiendo el método de Maniatis y cols. Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicados y cada experimento se repitió 3-5 veces.

## **2.2. Extractos proteicos celulares.**

Las células TR o HT22, procedentes respectivamente de neuroblastos corticales de ratón (Chun, J. and R. Jaenisch 1996) y de una línea celular de hipocampo de ratón (Maher, P. and J. B. Davis 1996), se crecieron en medio DMEN suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 2 mM Glutamina, 0,04 mg/ml gentamicina y 0,625X Fungizona. Tras incubar las células (TR y HT22) con los distintos tratamientos durante el tiempo requerido para cada uno de los experimentos de transfección, estas fueron lavadas con una solución salina, TD 1X e incubadas en tampón RIPA conteniendo un inhibidor de proteasas (1 mM PMSF) 40 minutos a 4°C. Se centrifugaron a 13.000 g a 4°C durante 20 minutos, recuperandose el sobrenadante. La concentración de las proteínas se determinó según el método Bradford y se conservaron a -70°C.

### **3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL A (Tfam) EN CEREBRO DE ANIMALES CONTROLES E HIPOTIROIDEOS.**

#### **3.1. Extracción de RNA total.**

El RNA total se aisló de los distintos grupos de cerebro mediante la homogeneización de estos tejidos en isotiocianato de guanidina y posterior extracción orgánica con fenol-cloroformo, según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1986). El precipitado final de RNA fue resuspendido en agua tratada con dietilpircarbonato al 0,1 % (H<sub>2</sub>O DEPC) como inhibidor de RNAsas. La integridad del RNA obtenido se comprobó mediante la resolución de una alícuota en un gel de agarosa y se cuantificó por la lectura de su absorbancia a 260 nm (*GeneQuantpro*, 80-2109-98 *RNA/DNA calculator*, 78773 de Amersham Pharmacia Biotech).

#### **3.2. Obtención de mRNA.**

La fracción poly (A)<sup>+</sup> o de RNA mensajero se obtuvo por cromatografía de afinidad utilizando columnas de oligo (dT), según el método descrito por Dynal y M. Plomann (1992).

#### **3.3. Análisis de la expresión de mRNA por Northern blot.**

##### **3.3.1. Electroforesis y transferencia.**

Las muestras de RNA total (25 µg) obtenidas de animales controles, hipotiroideos o animales tratados con T3 48 h de 15 días de edad, fueron desecadas, resuspendidas en un buffer de carga que contenía MOPS 1X/ formamida 50%/ formaldehído 6%, desnaturalizadas durante 5 minutos a 65°C y sometidas a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa al 1% conteniendo 2,2 M de formaldehído en el tampón MOPS 1X (MOPS 20 mM, EDTA 1 mM, acetato sódico 50 mM, NaOH 90 mM) a 120 V durante 3-4 horas. Tras lavar el gel en SSC 20X, el RNA se transfirió a membranas de nylon (*Biodyne A*, 0,45 mm, 60106, Gelman laboratory) por capilaridad en SSC 20X durante toda la noche, según describen Maniatis

y cols. (1982). Tras la transferencia, el RNA se fijó a la membrana por radiación ultravioleta (*Stratalinker 2400*, STRATAGENE) y estas fueron posteriormente teñidas con azul de metileno (0,02 % azul de metileno / 0,03 M acetato sódico, pH 5), según la técnica de Herrín (1988), como control de carga y de transferencia.

### 3.3.2. Marcaje de las sondas.

La sonda con la que se hibridaron los filtros se generó marcando radiactivamente el fragmento correspondiendo a los 900 primeros pares de bases del cDNA del gen *Tfam* que previamente obtuvimos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

La amplificación por PCR del fragmento correspondiendo a los 900 primeros pares de bases del *Tfam* se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos que reconocen los extremos 5' y 3' del dicho fragmento. El diseño de los oligonucleótidos se realizó en el ordenador a partir de la secuencia conocida del cDNA de *Tfam* mediante el programa "Gene Jockey". Estos fueron sintetizados en un sintetizador automático de oligonucleótido (Applied Biosíntesis). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: Oligonucleótido directo: 5'-GGC ACG AGC CCT GGA GTA CC- 3' y Oligonucleótido inverso: 5'-AGG CTT TGA GAC TTA ACC AG- 3'. La reacción de amplificación se hizo en un volumen final de 50  $\mu$ l, usando la *AmpliTaq DNA polimerasa* de Roche, en un termociclador modelo Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer). El producto de PCR se clonó en un plásmido de tipo pGEM-T con el que se transformaron bacterias DH5 $\alpha$ . Mediante la digestión con enzimas Pst1 y Sph 1 se liberó el fragmento y se procedió a su marcaje.

El inserto de 900 pares de bases se marcó radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP (3.000 Ci/mmol, Amersham) mediante la técnica de elongación al azar o *random priming*, utilizando el kit *Oligolabelling Reaction* de Pharmacia que utiliza como enzima el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de E. Coli. Con este método se obtiene una actividad específica aproximada de  $1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g DNA. La sonda marcada se purificó por cromatografía a través de una columna de sephadex G-50 Medium equilibrada con STE 1X (100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA).

### **3.3.3. Hibridación.**

Las membranas se prehibridaron durante, aproximadamente, 24 horas a 42°C con un mezcla que contenía formamida 50%, Denhardt 5X (Ficoll 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1%, BSA 0,1%), SSC 6X, SDS 0,2% y 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón. Tras la prehibridación, la solución de hibridación se renueva y se añade la sonda previamente desnaturalizada. La hibridación tuvo lugar durante 18-24 horas, tras la cual se realizaron diversos lavados con el fin de eliminar la radiactividad inespecífica. Las condiciones de lavados fueron: un lavado con SSC 2X / SDS 0,5% durante 40 minutos a 65°C, seguido por dos lavados con SSC 0,2X / SDS 0,5% durante 20 minutos a 65°C. Los filtros hibridados fueron expuestos con placas autoradiográficas *Konica* a -70°C durante un tiempo variable (12-24 horas). Las radiografías se cuantificaron por densitometría en un escáner *Epson perfection 1200 U*.

## **4. INMUNODETECCION DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT).**

### **4.1. Obtención de los extractos proteicos.**

#### **4.1.1. Extractos proteicos de animales controles e hipotiroideos.**

Los tejidos de distintas áreas del cerebro (Corteza, Estriado, hipocampo, cerebelo, tálamo, mesencéfalo y tallo cerebral) se homogeneizaron en tampón RIPA (PBS, 1% NP40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS) que contenía inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF, 1 mM Iodoacetamida y 1 mM Benzamidina, en una proporción de 1g de tejido en 1,5 ml de tampón. Los homogenados se incubaron 90 minutos a 4°C y se centrifugaron a 13.000 g a 4°C durante 20 minutos, recuperándose el sobrenadante. La concentración de proteínas totales se determinó según el método Bradford, utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein assay* de Biorad y el lisado final se alicuotó y se conservó a -70°C.

#### **4.1.2. Extractos mitocondriales.**

##### **4.1.2.1. Obtención de mitocondrias.**

La obtención y purificación de las mitocondrias del cerebro se realizó según el método descrito por Lai JC y cols (1977). Los tejidos fueron lavados y homogeneizados manualmente en una solución 0,32 M sucrosa, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), y 0,1% BSA. El homogenado se centrifugó a 2.000 g durante 3 minutos y se recuperó el sobrenadante al que se le sometió a una segunda centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos. El precipitado correspondiendo a la fracción cruda de las mitocondrias se resuspendió en un medio de baja osmolaridad: 0,03 M sucrosa, 0,12 M manitol, 0,025 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), y 3% (p/v) ficoll. La suspensión se colocó sobre un gradiente discontinuo de ficoll (3 ml de ficoll 400 DL al 7,5% sobre 4 ml de ficoll 400 DL al 13%) y se centrifugó a 99.000 g durante 30 minutos. Se lavó dos veces el sedimento correspondiente a las mitocondrias libres y sinaptosomales centrifugando a 12.500 g, y se resuspendió en una solución de homogeneización.

##### **4.1.2.2. Obtención de proteínas mitocondriales.**

Los extractos mitocondriales de distintos grupos se obtuvieron a partir de cerebros de animales controles e hipotiroideos, de 15 días de edad. El precipitado mitocondrial obtenido como se indica en el apartado anterior, se resuspendió en un buffer de lisis [20 mM Tris-HCl (pH 8), 0,2 mM EDTA, 10% glicerol, 0,35 M NaCl, 1% Tritón X-100, y 1 mM ditiotreitól] conteniendo 1 mM PMSF. Se sometió la suspensión a una agitación vigorosa en vortex y manteniéndola en hielo durante 15 minutos. El lisado mitocondrial se centrifugó a 45.000 g durante 1 hora. La concentración de proteínas mitocondriales totales se determinó según el método Bradford, utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein assay* de Biorad y el lisado final se alicuotó y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 4.2. Electroforesis e inmunodetección.

Diez o veinte microgramos de las muestras de extractos proteicos se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% según el método de Laemmli (1970) y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) durante 45 minutos a 2 mA / cm<sup>2</sup> usando el sistema *Mini Trans Blot Cell* de Bio-Rad. Para comprobar la calidad de la transferencia los filtros se tiñeron con Rojo Ponceau S. Las membranas fueron sometidas a una solución de bloqueo conteniendo 5% de leche desnatada en TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 130 mM NaCl, 0,1% Tween 20) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-Tfam (cedido por Hidetoshi Inagaki del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japón) en TBST conteniendo 5% de leche desnatada. Después del lavado, los filtros se incubaron con el segundo anticuerpo unido a la peroxidasa a una dilución 1:5000 (*goat anti-rabbit IgG* de Santa Cruz) durante una hora. Tras nuevos lavados las bandas inmunoreactivas se visualizaron usando el kit de detección *ECL<sup>TM</sup>* de Amersham. Las membranas fueron expuestas con películas autorradiográficas *Konica* y la señal obtenida se cuantificó por densitometría.

## 5. MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN TFAM POR HORMONA TIROIDEA.

### 5.1. obtención de las proteínas recombinantes TR $\alpha_1$ , TR $\beta_1$ , RXR $\alpha$ y RAR $\alpha$ .

Para la obtención de los receptores de la hormona tiroidea (TR $\alpha_1$  y TR $\beta_1$ ) y del receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR $\alpha$ ), los cDNA completos se amplificaron por la “reacción en cadena de la polimerasa” o PCR con oligonucleótidos diseñados con los sitios de restricción adecuados para su posterior clonación en trama en los vectores de expresión bacteriano, pQE16 (QIAexpress-System, QIAGEN) y pGEX (Amersham Pharmacia Biotech). TR $\alpha_1$  y RXR $\alpha$  fueron clonados en pGEX y TR $\beta_1$  en pQE16. Las proteínas fueron sobreexpresadas en cepas de E.Coli con bajo nivel de proteasas tras la inducción con 2 mM de isopropil- $\beta$ -D-thiogalactosido (IPTG). Los extractos proteicos correspondiendo al TR $\beta_1$  se obtuvieron mediante un protocolo standard suministrado por la casa QIAGEN. Para la producción de la proteína recombinante GST-hRAR $\alpha$

empleada en los experimentos de retardo en gel, se utilizó el vector: pGEX-hRAR $\alpha$ , vector de expresión en bacterias para el receptor de ácido retinoico todo trans (AR) unido a la proteína glutatión S-transferasa; contiene el cDNA (1318 pb) que codifica para el receptor humano del ácido retinoico todo trans (hRAR $\alpha$ ) (Cedido por Dra. Ana Aranda, IIB-Alberto Sols-CSIC.-UAM).

Las proteínas recombinantes GST-TR $\alpha_1$ , GST-RAR $\alpha$  y GST-RXR $\alpha$  se purificaron según el protocolo de expresión y purificación de proteínas de fusión a Glutathione-S-Transferase (GST) de la casa Amersham.

## **5.2. Ensayos de retardo en gel.**

Para estudiar la interacción de los receptores de la hormona tiroidea con el promotor del gen Tfam, distintos oligonucleótidos fueron diseñados:

- TRE1: 5' AGG TTT GAA CAG GAT GAC TTG GAA GGT CC 3' (-1239/-1212)
- TRE2: 5' AGG TAA TAG ACT GTC A 3' (-1106/-1091)
- TRE3: 5' AAG TCA AGA CGT TAA TGT TA 3' (-748/-737)
- PAR1: 5' GAT ACC GGC CAA CGC CGG GTT GGG GTG AGG CCG CCG CCG CGG TCC CTC 3' (-295/-248)
- PAR2: 5' GCC GCG GTC CCT CCA TCA CCC TCC TGG CCC GGC AGA GGA ACC CAC 3' (-260/-216)
- PAR3: 5' TGC TCC GGG CGG CGG CCG GGG ACA GAG GTG GCT CAA CAG AGC CGC 3' (-215/-174)
- PAR4: 5' CAG AGC CGC CTC GAA GCC AGA GCC CTC CGC AGG CTA GAG GAT 3' (-182/-141)

Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por Amersham Pharmacia Biotech.

El oligonucleótido de cadena sencilla (50 ng) fue marcado radiactivamente en el extremo 5' con la enzima T<sub>4</sub> polinucleotido kinasa (10 U) y [ $\gamma$  <sup>32</sup>P] ATP (25  $\mu$ Ci) (3.000 Ci/mmol, Amersham) durante 1 hora a 37°C. El posterior anillamiento de cada oligonucleótido con su complementario se realizó en presencia de 6,7 mM ATP y en un volumen final de 30  $\mu$ l. Los nucleótidos marcados se purificaron en columnas de sephadex G50 Medium y posteriormente se determinó su actividad específica. Los

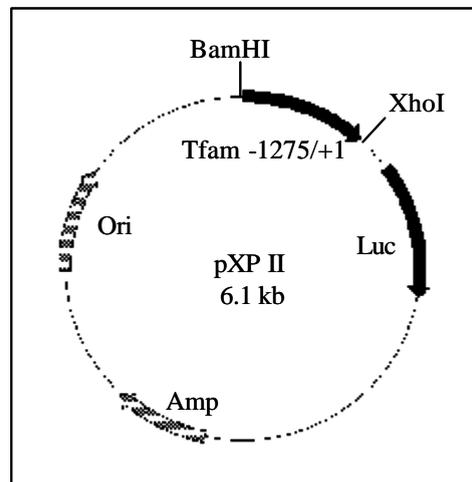
oligonucleótidos de cadena doble marcados se incubaron con 20  $\mu\text{g}$  de extractos correspondiendo a  $\text{TR}\beta_1$  o con 100 ng de la proteína recombinante GST- $\text{TR}\alpha_1$ , junto con 75 ng de la proteína recombinante GST-RXR $\alpha$ , en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  en el tampón de unión (12% glicerol, 12 mM HEPES, 4 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 60 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1 mM DTT) conteniendo 0,5  $\mu\text{g}$  de poly dI-dC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los extractos proteicos se incubaron con el tampón de unión 10 minutos antes de la adición del oligonucleótido marcado. El competidor (oligonucleótido de cadena doble no marcado) se añadió a la mezcla en un exceso molar de 200 veces y se incubó 15 minutos antes de la adición de la sonda marcada. Tras la media hora, las reacciones se mezclaron con glicerol al 50% en azul de bromofenol y xylene cyanol, y los complejos proteínas-DNA se resolvieron en geles de poliácridamida al 4 % en TAE 1 X. Finalizada la electroforesis, los geles se secaron durante 2 horas en un secador de geles (*GelAir Dryer, 272 BR 01877* de Bio-Rad) y se expusieron a películas autorradiográficas *Konica* a  $-70^\circ\text{C}$ .

## 6. CONSTRUCCIÓN DE PLASMIDOS.

Para los ensayos de expresión transitoria se utilizó el vector de expresión pX/Tfam-1275+1, que contiene la región (-1275/+1) del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano, obtenida por PCR a partir del DNA genómico y clonado en el vector pXP2, el cual carece de promotor mínimo y lleva introducido el gen de la luciferasa como testigo (Fig. 13) (S.K. Nordeen 1988).

Utilizamos también diferentes construcciones del promotor del gen Tfam humano; Estas fueron obtenidas por amplificación por PCR. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , en un termociclador modelo Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer), utilizando la Taq polimerasa de Perkin Elmer. La amplificación transcurrió en 25 ciclos de tres etapas: Una etapa de desnaturalización de 1 minuto a  $94^\circ\text{C}$ , una etapa de unión de los oligonucleótidos al DNA de 1 minuto a  $55^\circ\text{C}$  y una última etapa de extensión de 1 minuto a  $72^\circ\text{C}$ . Tras los veinticinco ciclos se realizó un ciclo final de extensión de 10 minutos a  $72^\circ\text{C}$ . El fragmento así amplificado fue introducido en el vector pXP1, pXP2 o pT109 luc y

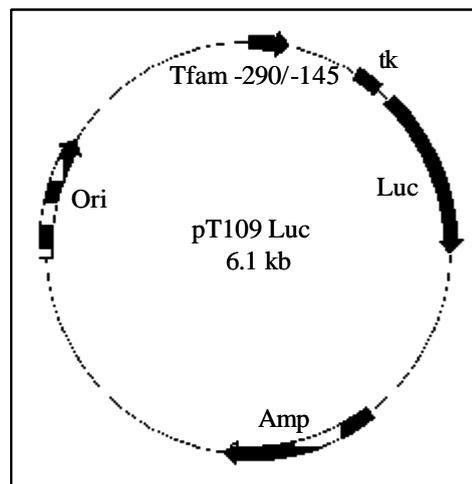
posteriormente secuenciado para asegurarnos que no se había producido ninguna mutación durante el proceso de amplificación.



**Figura 13: Esquema ilustrativo de la construcción pX/Tfam-1275+1.** Construcción correspondiente al promotor del gen del factor de transcripción mitocondrial A humano (nucleótido -1275 al +1) clonado en el vector pXP2, utilizada en los experimentos de transfección.

- pX/Tfam-1155+1, contiene la región  $-1155/+1$  del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano clonado en el vector pXP1, el cual carece de promotor mínimo y lleva introducido el gen de la luciferasa como testigo (S.K. Nordeen 1988).
- pX/Tfam-796+1, contiene la región  $-796/+1$  del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano clonado en el vector pXP1.
- pX/Tfam-295+1, contiene la región  $-295/+1$  del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano clonado en el vector pXP2.
- pX/Tfam-147+1, contiene la región  $-147/+1$  del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano en el vector pXP2.
- pT/Tfam-1275-1110, contiene la región  $-1275/-1110$  del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano clonado en el vector pT109 Luc, el cual contiene el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor mínimo timidina kinasa con la caja TATA perteneciente al virus del herpes simple.

- pT/Tfam-1275-757, contiene la región -1275/-757 del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano clonado en el vector pT109 Luc.
- pT/Tfam-1275-425, contiene la región -1275/-425 del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano clonado en el vector pT109 Luc.
- pT/Tfam-290-145, contiene la región -290/-145 del promotor del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) humano clonado en el vector pT109 Luc.



**Figura 14:** Esquema ilustrativo de la construcción pT/Tfam-290-145 correspondiente a la secuencia -290/-145 del promotor del gen del factor de transcripción mitocondrial A humano, utilizada en los experimentos de transfección.

Para los experimentos de cotransfección se utilizaron los siguientes vectores de expresión:

- pSG5, vector vacío que contiene el promotor temprano de SV40 (Sap, J. et al. 1986). Empleado para igualar cantidades de DNA en los ensayos de expresión transitoria.
- CMV/ $\beta$ -Gal, contiene el cDNA de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa bajo el control del promotor temprano de SV40, se utilizó para comprobar la eficiencia de la transfección.

- pTRE MoMLV, contiene 1 copia del TRE del virus Moloney de la leucemia murina (MoMLV) clonado en el sitio Sal I del vector pXP(1,2) el cual contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor timidina kinasa (109 nt) (Vicano R y cols., 1991); está constituido por dos repeticiones directas del motivo GGTCAC separados por cuatro nucleótidos.
- pSG5-TR $\alpha_1$ , contiene el cDNA del gen que codifica para el receptor TR $\alpha_1$  de rata subclonado en el plásmido pSG5 bajo el control del promotor temprano de SV40. Mediante PCR se amplificó el cDNA de TR $\alpha_1$ , empleando los oligonucleótidos Directo: 5'-TAT ATT GAA TTC GAT GGA ACA GAA GCC C-3' e Inverso: 5'-TTC TTA GAG ATC TTT AGA CTT CCT GAT C-3'. El fragmento de DNA generado contiene sitios de restricción para enzimas EcoR I y Bgl II. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-T-easy de Promega y tras la digestión con las enzimas arriba mencionadas, se subclonó en el plásmido pSG5.
- pSG5-TR $\beta_1$ , contiene el cDNA del gen que codifica por el receptor TR $\beta_1$  de rata subclonado en el plásmido pSG5 bajo el control del promotor temprano de SV40. Mediante PCR se amplificó el cDNA de TR $\beta_1$ , empleando los oligonucleótidos Directo: 5'-TAT ATT GAA TTC GAT GAC TCC TAA CAG T-3' e Inverso: 5'-TTC TTA GAG ATC TTC AGT CCT CAA AGA C-3'. El fragmento de DNA generado contiene sitios de restricción para enzimas EcoR I y Bgl II. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-T-easy de Promega y tras la digestión con las enzimas arriba mencionadas, se subclonó en el plásmido pSG5.
- K227E/p110 $\alpha$ , construcción que contiene el mutante activo de la PI3 kinasa (subunidad catalítica p110 $\alpha$ ) clonado en el vector de expresión pSG5 (Ahtiok, S. et al. 1999).

## **RESULTADOS**

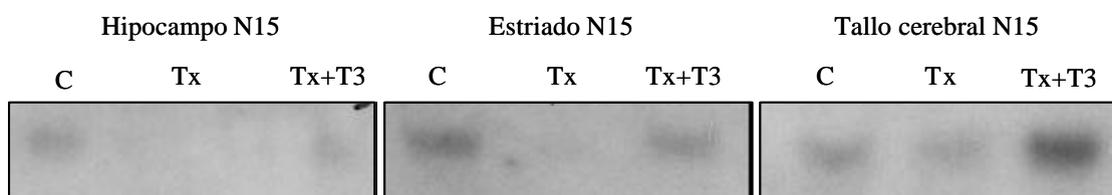
## 1. REGULACIÓN POR HORMONA TIROIDEA DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL A (Tfam).

### 1.1. Efecto de la hormona tiroidea sobre la expresión endógena del gen Tfam en distintas zonas del cerebro.

Para averiguar si Tfam podría ser el mediador del efecto de las hormonas tiroideas sobre la función mitocondrial en el cerebro en desarrollo, lo primero que analizamos fue si *"in vivo"* la expresión de este gen era modificada por el estado tiroideo. Para ello analizamos los niveles de mensajero y de proteína en diferentes áreas del cerebro de ratas controles, hipotiroideas y/o hipotiroideas tratadas con T3, de 15 días de edad postnatal mediante análisis de *Northern blot* y *Western blot*.

#### 1.1.1. Regulación de los niveles de mRNA de Tfam en cerebro de rata.

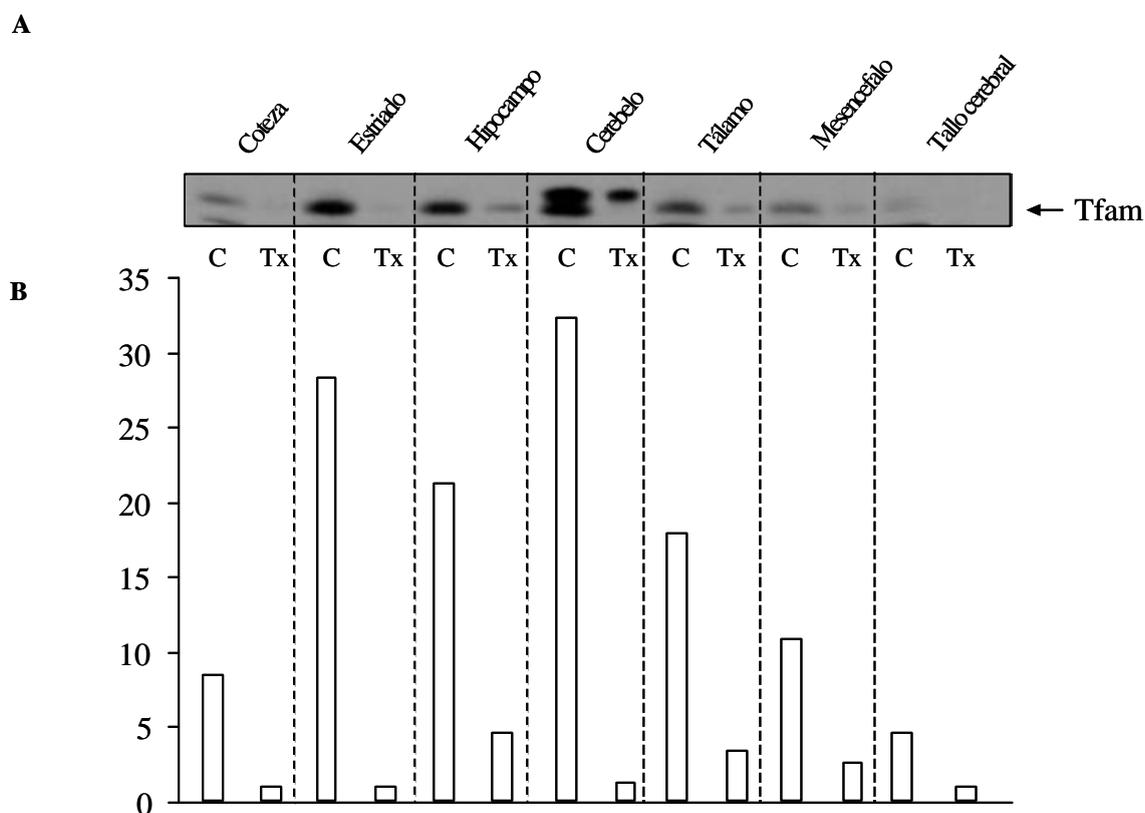
Para una primera aproximación en el estudio de la regulación por hormona tiroidea de la expresión del genoma mitocondrial, se procedió mediante transferencia de *Northern blot* al estudio de su efecto sobre los niveles de los transcritos de Tfam. Para ello, se hibridó la membrana que contenía los mRNA de diferentes áreas del cerebro de rata (hipocampo, estriado, y tallo cerebral) con una sonda específica para Tfam (apartado 3.3 de materiales y métodos). En la figura 16, podemos observar que el hipotiroidismo disminuye los niveles del mensajero de Tfam en ratas de 15 días de edad postnatal y que este efecto se revierte al someter las ratas hipotiroideas a un tratamiento con hormona tiroidea (200  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de peso corporal).



**Figura 16: Regulación por hormona tiroidea del gen Tfam en cerebro.** N15, Neonatos de 15 días; C, Controles; Tx, Hipotiroideos; Tx+T3, Hipotiroideos tratados con una dosis diaria de T3 (200  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de peso corporal). El análisis de *Northern blot* se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.3 de materiales y métodos.

### 1.1.2. Regulación de los niveles de proteína Tfam en cerebro de rata.

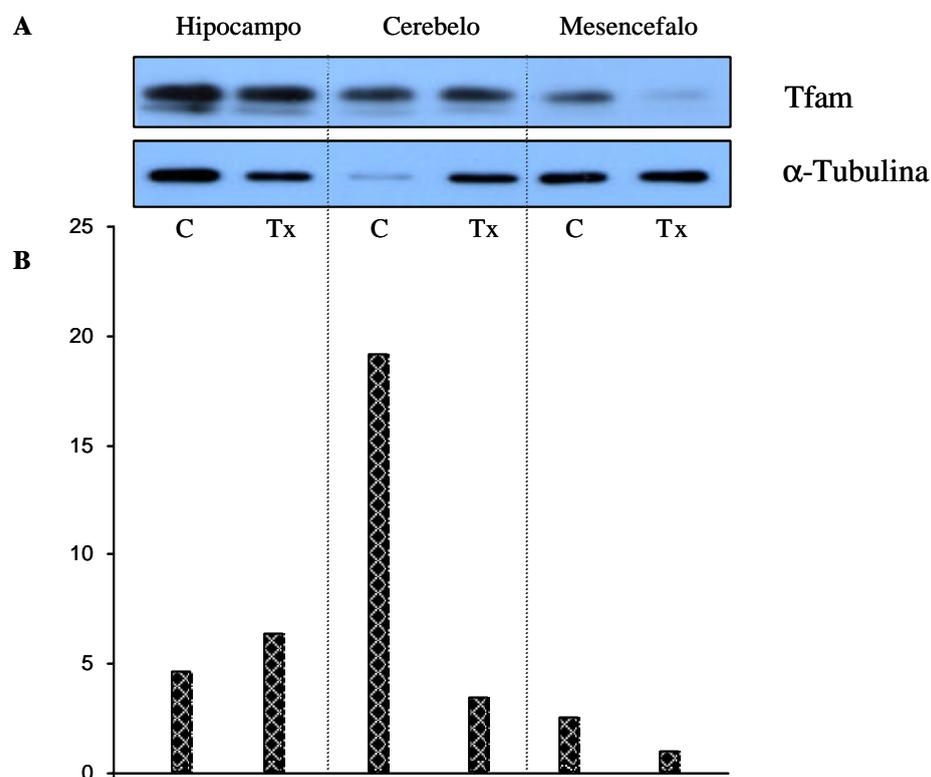
En estudios paralelos, se analizaron por *Western blot* el efecto del hipotiroidismo sobre el contenido de la proteína Tfam en diferentes áreas del cerebro de ratas de 15 días de edad postnatal; utilizando extractos proteicos totales (fig. 17) o proteínas mitocondriales (fig. 18). Como se puede ver en la figura 17, el hipotiroidismo disminuye de forma significativa los niveles de la proteína Tfam en cerebro de ratas de 15 días de edad. Además, en cerebelo, se puede observar también una banda de mayor peso molecular que, probablemente, corresponda a la forma citoplásmica de Tfam que aún conserva el péptido de señalización mitocondrial.



**Figura 17: Efecto de T3 sobre el contenido de la proteína Tfam en distintas áreas del cerebro.** (A) Western blot representativo: se extrajeron extractos proteicos de distintas áreas del cerebro de ratas N15 controles (C) o hipotiroideos (Tx) (Aparados 4.1.1 de materiales y métodos). Se realizó el análisis por *Western Blot* tal y como se describe en el apartado 4.2 de materiales y métodos. (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína Tfam en el cerebro de ratas de 15 días de edad postnatal. Los datos corresponden al análisis de 3 Western blot diferentes y están referidos al valor más bajo que se representa como 1.

Cuando analizamos los niveles de proteína Tfam en mitocondrias aisladas de cerebro de neonatos de 15 días observamos (Figura 18) que, en cerebelo y mesencéfalo,

los niveles de Tfam en mitocondria están también significativamente disminuidos en el cerebro de animales hipotiroideos. En el hipocampo, sin embargo, se observa un ligero incremento en los niveles de Tfam hasta 1,4 veces más respecto al valor en ratas controles.



**Figura 18: Efecto de T3 sobre el contenido mitocondrial de la proteína Tfam en cerebro.** (A) Western blot representativo de los niveles de proteína Tfam en mitocondrias aisladas de distintas regiones del cerebro de ratas N15 controles (C) o hipotiroideos (TX) (apartado 4.1.2.2 de materiales y métodos). (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína Tfam en mitocondrias del cerebro de ratas de 15 días de edad postnatal. Los datos corresponden al análisis de 3 Western blot diferentes y están referidos al valor más bajo que se representa como 1.

## 1.2. Ensayos de transfección transitoria con el promotor de Tfam humano.

### 1.2.1. Análisis de la secuencia del promotor de Tfam.

Para los estudios de regulación del promotor del gen del factor de transcripción mitocondrial A humano, utilizamos un fragmento de 1276 pb obtenido mediante PCR y correspondiendo a la zona promotora (nucleótido -1275 al +1) de Tfam (Fig. 19), según se describe en Materiales y Métodos. También, utilizamos delecciones del mismo, que al igual que el promotor entero, fueron obtenidas por PCR. El promotor entero así como las distintas delecciones de la parte 5' fueron clonados en los vectores de expresión

pXP1 o pXP2, frente al gen de la luciferasa como testigo. Las deleciones correspondientes a la parte 3' fueron clonadas en el vector pT109 Luc que contiene el promotor mínimo de la timidina kinasa. Todas las construcciones se secuenciaron para confirmar que la secuencia era la correcta.

Por comparación de secuencias, detectamos en el promotor de Tfam diferentes posibles sitios de unión para diversos receptores nucleares y para varios factores de transcripción. Encontramos tres posibles elementos de respuesta a hormona tiroidea con similitud al TRE consenso: **TRE1** (-1239/-1212) que es un elemento que contiene un IP3, DR4 y DR6 que solapan entre sí; **TRE2** (-1106/-1091) un elemento constituido por un DR4 y **TRE3** (-748/-737) un elemento que contiene un DR0 y un IR0 que solapan entre sí. Localizamos también otros posibles TREs, organizados como IR0 (-1180/-1169; -942/-931), DR0 (-873/-862), IP3 (-424/-410), IP2 (-358/-345) o DR6 (-268/-251). Este promotor posee también posibles sitios de respuesta para otros receptores nucleares:

Ácido retinoico (RARE), organizados como IR0 (-1180/-1169; -942/-931), DR2 (-1091/-1078; -1021/-1008; -586/-573), IR0/DR2 (-748/-735), o DR5 (-200/-184).

Vitamina D3 (VDRE), organizados como IP9 (-1267/-1247) o DR3 (-990/-976; -860/-846).

Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPRE) organizados como DR1 (-1187/-1175; -1083/-1071; -867/-855; -494/-482; -200/-188) o DR1 invertido (-578/-566; -571/-559; -424/-412).

Entre los elementos de respuesta a conocidos factores de transcripción se encuentran posibles elementos de respuesta a NFκB (-1222/-1209; -984/-975; -454/-445); sitios C/EBP (-1116/-1103; -892/-879; -667/-654; -492/-479); Egr-1 (-264/-256; -107/-99); NRF-I (-74/-56); NRF-II (-1188/-1179; -34/-16) y SP1 (-450/-438; -98/-86; -59/-47; -54/-42; -49/-37).

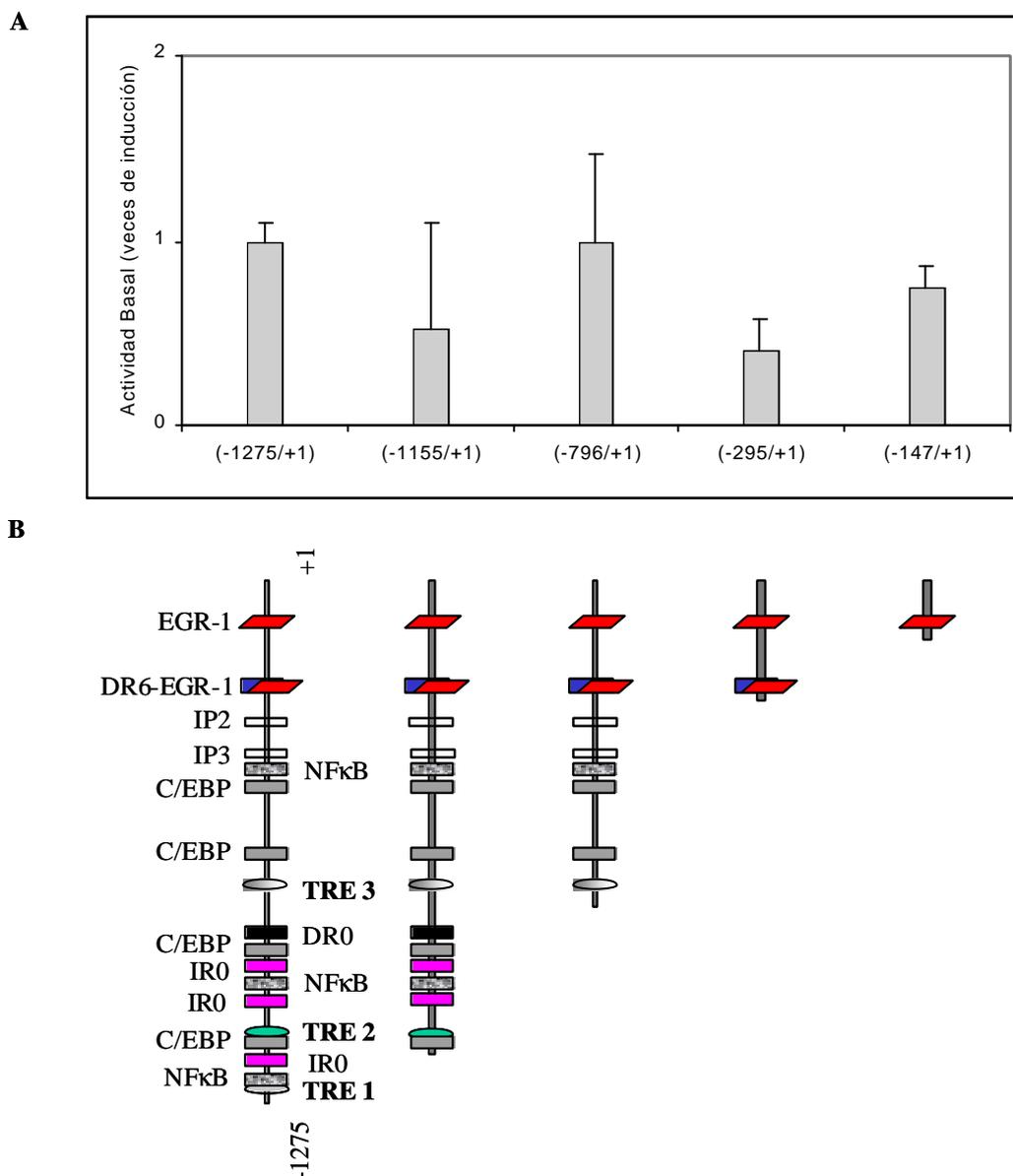
### 1.2.2. Actividad basal.

En primer lugar estudiamos la actividad basal de las construcciones correspondientes a diversos fragmentos de la zona 5' con respecto al punto de inicio de

la transcripción. Por actividad basal, entendemos la actividad del promotor en ausencia de cualquier estímulo. Células de neuroblastoma (TR) cultivadas según describimos en Materiales y Métodos, fueron transfectadas con 0,5  $\mu\text{g}$  de la construcción que contenía el promotor (entero o deleciónado) e incubadas durante 24 horas. Al día siguiente de la transfección, se lavaron las células, se sustituyó el medio por DMEM sin suero y se incubaron durante otras 24 horas. En la figura 20, podemos observar que la actividad transcripcional (medida como actividad luciferasa) del fragmento comprendido entre los nucleótidos  $-295$  y  $+1$  del Tfam, es menor que la del resto de las construcciones, lo que sugiere la pérdida de algún elemento activador en el fragmento comprendido entre  $-796/-295$ . Cuando delecionamos la región entre  $-295$  y  $-147$ , se produce una recuperación, aunque no total, de la actividad basal; lo que podría sugerir la existencia en esta región de algún elemento negativo para la actividad basal del fragmento que abarca del nucleótido  $-295$  al  $+1$ .

**DR4-DR6 (TRE1)**  
 -1275 CAGGAAAAAA ACCTGTTTAT TCCATGCCAG AATGGGAGGT TTGAACAGAT  
**NFκB** **NRF-II**  
 -1225 GACTTGGGAAG GTCCCTTTCA ACCCTGGGAG TCTATAAAG GGAAGTGGTT  
**IR0**  
 -1175 ATTACCGCTT AAAAGAAGAA GTAGGCTTAG TCCTACTTCC AGAGAGCCAA  
**C/EBP**  
 -1125 TGTTTTCATA GTTACAGAAA GCTAATAGAC TGTCAGCTCA ATATGACACT  
**DR4 (TRE2)**  
 -1075 GGTAAGAATT TTCTAACAAAT TACGGCTATC CAACAGAAGA AAGGCTGTCT  
**NFκB**  
 -1025 CAGAAGGTGG TTAGCTCTGA AACAACTGGT ATTTAAGGGC TGGAAGGACC  
**IR0**  
 -975 CTTAGATATC TTTAGGTCTT CCTAATCTTT TTCATGCCAT TGCCTATACA  
**C/EBP**  
 -925 GAAAATGGTA TTTCTATAAC ACAAATAAAA AAAATATACA GCAATTTPTTG  
 -875 ACACATCAAT GTCTCAAGGC ATACTTGTCA CACGTTCTCA GGGCTTTGGC  
**DR0**  
 -825 TGGGAAAAC TATTAGTCT AACATCCTCG TTTGCAGAGG GGGAAACTGA  
 -775 ATCTTAACGA GGGAATGCAA TATTCCCAAG TCAAGACGTT AATGTTAATA  
**IR0 (TRE3)**  
 -725 CTGGAAGTAG AAGAATTGAG ACTAGCGACT GTGGACAACT AGCCAGTTTC  
**C/EBP**  
 -675 CTCTGCTCAA ATTAAGCAAG CTGGAGGCCA GACTGAAAGA CTGCAGTAGA  
 -625 TGGTAGAATA AACAGTCTAA AGCTATATTG CTTTAAATGT GGTCTCAAGA  
 -575 CCACCGACAT TAGAACTTGT TAAATTCTGG GGAAGTCTGCT AAAATGAAGA  
**C/EBP**  
 -525 TTAATGGGCC CCACATAGAC ACACGGAATT AAGCTCTGCG GTAAGGCCTT  
**NFκB**  
 -475 GGAATCTGCA TTTTATAGTT TGCGAATCCC CGCCTCTCC GTTACTATTT  
**SP1**  
 -425 CTGAACTCCG AGCTCCAGCC CTGGCTTGAA CTGAGACGCT CCGCTGGGCG  
**IP3**  
 -375 CGCAGCAGCC GCCGATCGGA CCTCGGGGTC CTGGATGCAG GACTGTCTGT  
**IP2**  
 -325 TACGTACAGC CTTTGTGACC GTCACGGGCG GATACCGGCC AACGCCGGT  
**EGR-1**  
 -275 TGGGGTGAGG CCGCCGCGC GGTCCCTCCA TCACCCTCCT GGCCCGGCAG  
**DR6**  
 -225 AGGAACCCAC TGCTCCGGGC GGCCGGGGAC AGAGGTGGCT CAACAGAGCC  
 -175 GCCTCGAAGC CAGAGCCCTC CGCAGGCTAG AGGATTGCGG TTTCCCTTCA  
**EGR-1** **SP1**  
 -125 TCTCCGCGGC TCTTATTCCT CCCCCGCGAG GCCGCCACC GGGGTACGCT  
**NRF-I** **NRF-II**  
 -75 CTCCCGCGCC TGCGCCAATT CCGCCCCGCC CCGCCCCCAT CTACCGACCG  
**SP1-SP1-SP1**  
 -25 GATGTTAGCA GATTTCCCAT AGTGCC

**Figura 19: Secuencia de la región promotora del gen *h-Tfam*, desde el nucleótido -1275 hasta el +1.** En ella, aparecen indicados los posibles elementos de respuesta a hormona tiroidea localizados en esta secuencia; también aparecen indicados sitios para conocidos factores de transcripción como C/EBP, NFκB, EGR-1, NRF-I, NRF-II y SP1.

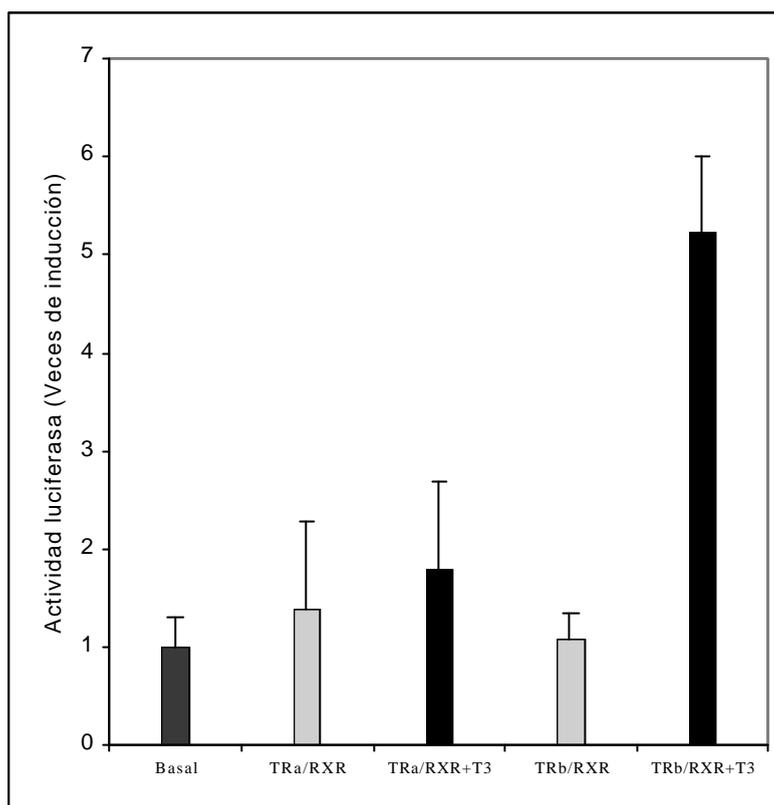


**Figura 20: Actividad basal de las distintas construcciones del promotor del gen *h-Tfam*.** (A): Células TR fueron transfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con las deleciones 5' con respecto al punto de inicio de la transcripción, pX/Tfam-1275+1, pX/Tfam-1155+1, pX/Tfam-796+1, pX/Tfam-295+1 y pX/Tfam-147+1. La actividad luciferasa se evalúa como veces de inducción con respecto a la actividad basal de la construcción pX/Tfam-1275+1 arbitrariamente fijada en 1. Los datos presentados corresponden a la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes. (B): Esquema de las distintas deleciones del promotor, en las que aparecen indicados los posibles elementos de respuesta a T3; y también los sitios C/EBP, NFκB y EGR-1.

### 1.2.3. Regulación por T3 de la actividad del promotor de Tfam en células de neuroblastoma (TR).

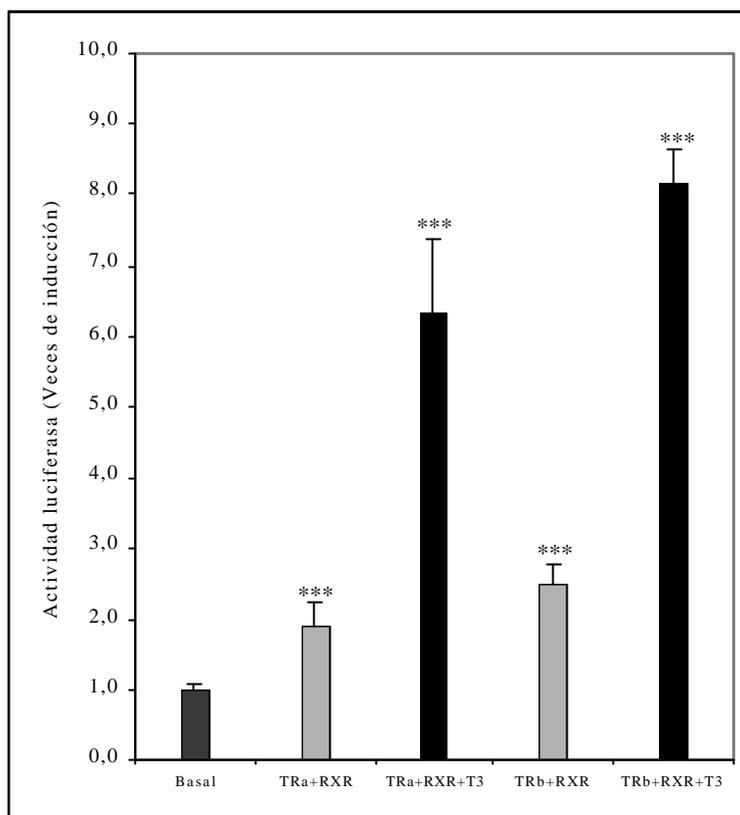
#### 1.2.3.1. Especificidad del receptor de T3 sobre la expresión de Tfam.

En los vertebrados los receptores de T3 son codificados por dos loci  $\alpha$  y  $\beta$  (localizados en los cromosomas 17 y 3, respectivamente, en la especie humana). A su vez, por procesamiento alternativo de los mensajeros de ambos genes surgen diferentes isoformas de estos receptores:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Como ya he comentado en la introducción, de las isoformas  $\alpha$ , sólo TR $\alpha_1$  (NR1A1a) es capaz de unir T3 y mediar la acción de la hormona tiroidea; NR1A1b (conocido inicialmente como *c-erb A $\alpha_2$* ) es capaz de unirse específicamente a TREs, aunque con baja afinidad, y funciona como un antagonista de los receptores de T3, tanto de TR $\alpha_1$  como de TR $\beta_1$ . Las tres isoformas TR $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  sí son capaces de unir T3. En general ambas isoformas ( $\alpha_1$  y  $\beta_1$ ) regulan la expresión de los mismos genes de manera similar. Sin embargo se han descrito casos en los que la regulación por las diferentes isoformas  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  son diferentes. Nosotros hemos analizado primero si ambas isoformas del receptor de T3 eran capaces de regular la expresión del promotor de Tfam. Para ello cotransfectamos células TR con ambas isoformas del receptor junto a la construcción -1275/+1 del promotor de Tfam y al receptor del retinoide X (RXR $\alpha$ ), tal y como describimos en materiales y métodos. La figura 21 muestra que el tratamiento con 100 nM de T3 durante 24 horas produce un aumento de la actividad del promotor de Tfam de 5,2 veces más respecto al valor basal. Curiosamente, este aumento solo se observó cuando la isoforma cotransfectada era TR $\beta_1$  y no detectamos ningún efecto de T3 sobre el promotor cuando la isoforma cotransfectada era TR $\alpha_1$ . De todo esto se deduce que el efecto estimulador de la T3 presenta especificidad de isoforma de manera que está mediado únicamente por la isoforma TR $\beta_1$ .



**Figura 21: Efecto de T3 sobre la actividad transcripcional de la construcción pX/Tfam-1275+1.** Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos), con la construcción pX/Tfam-1275+1, la isoforma  $\alpha_1$  o  $\beta_1$  del receptor de la hormona tiroidea, junto con el receptor del retinoide X (RXR $\alpha$ ). Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1.

Para comprobar que esta especificidad de isoforma en células TR no es debido a una ineficacia de la isoforma TR $\alpha_1$  en cuanto a la activación transcripcional, o bien a que esta isoforma no se expresara bien en células TR, repetimos estos estudios, pero utilizando la construcción pXP2 TRE MoMLV (Vivanco Ruiz, M. et al. 1991) en lugar del promotor de Tfam; esta construcción contiene el TRE canónico del virus Moloney de la leucemia murina, el cual está constituido por dos repeticiones directas del motivo GGTCA/C separados por cuatro nucleótidos. En la figura 22 se puede observar que, al contrario de lo que ocurriría con la construcción conteniendo el promotor de Tfam, la actividad del TRE MoMLV se induce en presencia de T3 tanto si el receptor cotransfectado es el TR $\alpha_1$  como el TR $\beta_1$ . Estos resultados indican que la isoforma TR $\alpha_1$  que estamos cotransfectando se expresa normalmente en las células TR que estamos utilizando y que es funcional en ellas.



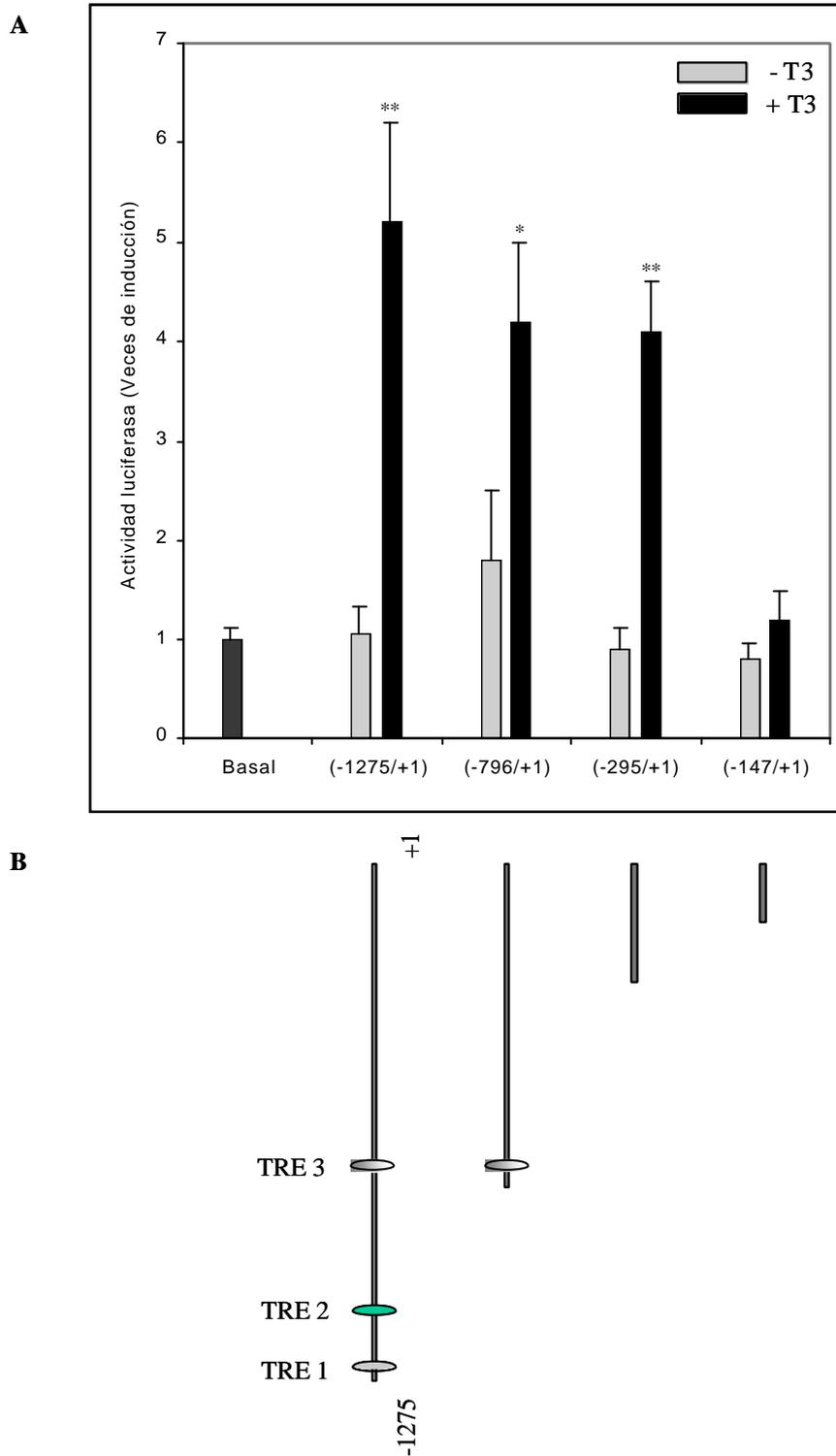
**Figura 22: Efecto de T3 sobre la actividad transcripcional de la construcción pXP2 TRE MOMLV.** Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos), con la construcción pXP2 TRE MOMLV, la isoforma  $\alpha_1$  o  $\beta_1$  del receptor de la hormona tiroidea, junto con el receptor del retinoide X (RXR $\alpha$ ). Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*\*\*,  $P \leq 0,001$ .

### 1.2.3.2. Localización y caracterización de secuencias implicadas en la respuesta inducida por T3 sobre la región promotora del gen Tfam humano.

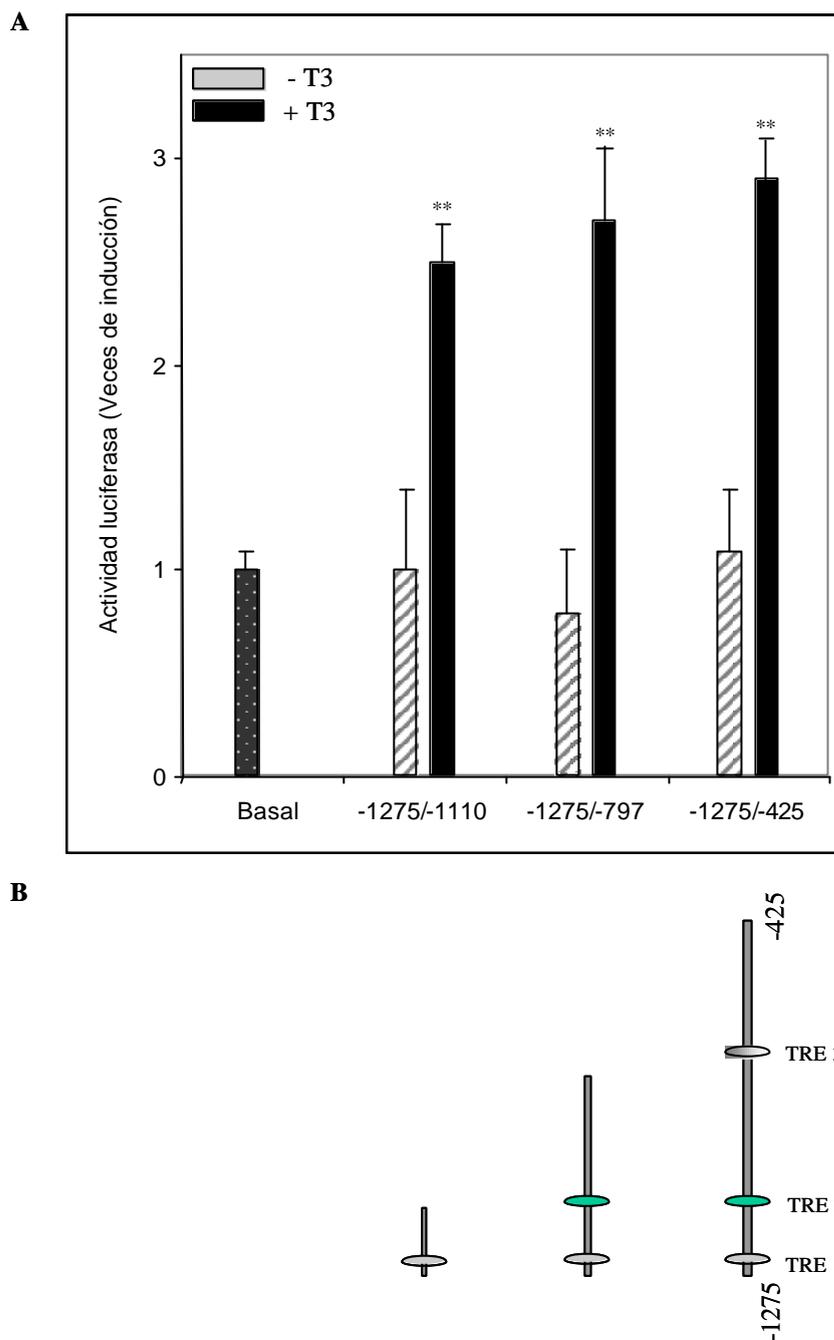
Para analizar cuales son las secuencias responsables del efecto de la hormona tiroidea sobre el promotor de Tfam realizamos experimentos de transfección utilizando las construcciones descritas en el apartado 6 de materiales y métodos, y esquematizados en los paneles B de las leyendas de las figuras 23, 24 y 25. Células TR se cotransfectaron con las construcciones correspondientes al promotor entero o a las distintas deleciones, junto con las construcciones correspondientes a la isoforma TR $\beta_1$  del receptor de T3 y a la isoforma  $\alpha$  del receptor del retinoide X, tal y como describimos en materiales y métodos. En la figura 23 se puede observar que la regulación por T3 del promotor de Tfam desaparece con la construcción -147 y +1,

mientras que se mantiene con las demás construcciones, incluso con el fragmento que abarca desde -295 a +1, a pesar de que, al principio no observamos en este fragmento un posible TRE canónico. Sin embargo, al analizar con más detalle esta zona del promotor detectamos la existencia de dos sitios cuya secuencia podría estar relacionada con un TRE y que estaban organizados como un DR6 (-268/-251) y un DR5 (-200/-184). Estos resultados sugieren la existencia de un elemento de respuesta a hormonas tiroideas, y por lo tanto un sitio de unión al receptor, en la región -295/-147 del gen. Con la construcción -1275/-1110 de Tfam (figura 24) que sólo conserva el elemento TRE1, vemos que este elemento no sólo es funcional sino también que es suficiente para mediar la acción de T3 sobre la expresión del promotor de Tfam.

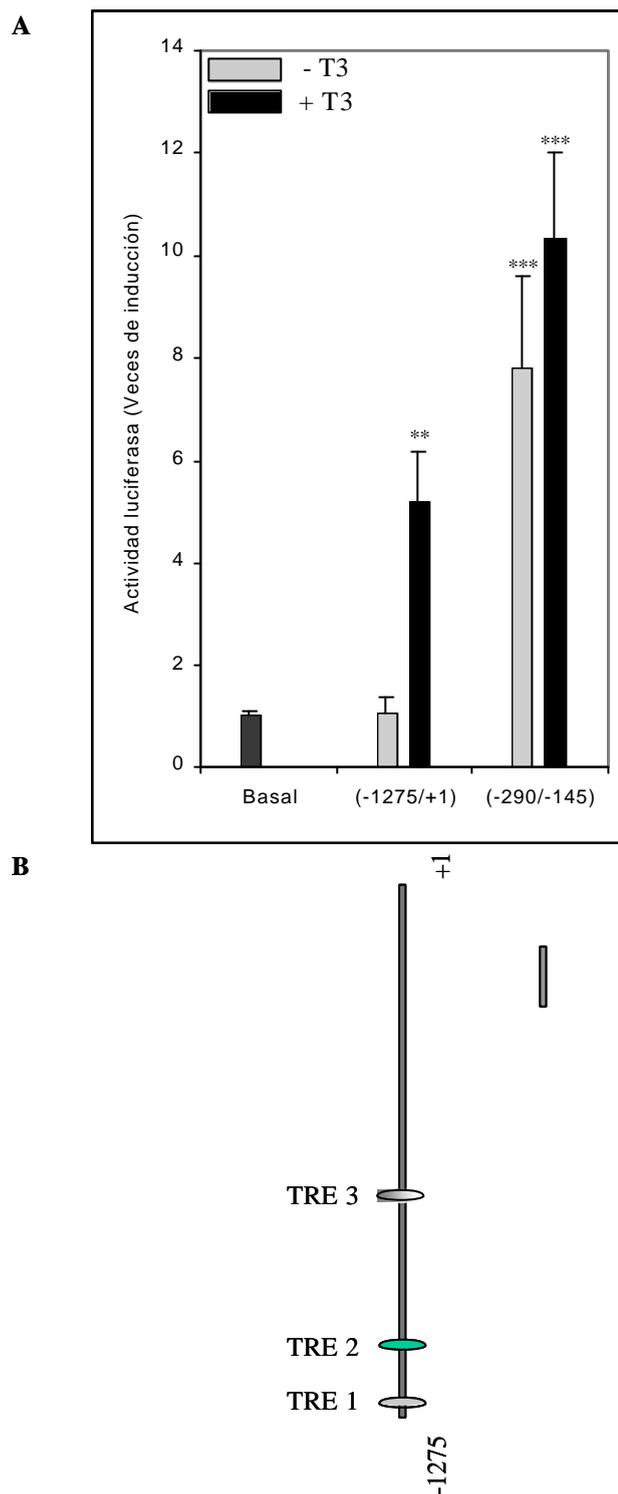
Para confirmar la funcionalidad de los potenciales TREs presentes en el fragmento -295/-145, estudiamos si este elemento es capaz de conferir respuesta a T3 a un promotor heterólogo. Con este propósito realizamos transfecciones transitorias en células TR en las que transfectamos una construcción quimera de este fragmento en el vector pT109 luc que contiene el promotor mínimo de la timidina kinasa. En la figura 25 se puede observar que, curiosamente, el heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta$ <sub>1</sub> vacío es capaz de provocar un incremento de la actividad luciferasa, respecto al basal, de más de 7,8 veces. La adición de T3 al medio de incubación indujo un aumento de 10,3 veces con respecto al basal, superior al producido por el heterodímero vacío.



**Figura 23:** Efecto de T3 sobre la actividad transcripcional de las construcciones pX/Tfam-1275+1, pX/Tfam-796+1, pX/Tfam-296+1 o pX/Tfam-147+1. (A): Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con estas construcciones, junto con las construcciones correspondientes a TR $\beta_1$  y RXR $\alpha$ . Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ . (B): Esquema de las distintas deleciones del promotor, en las que aparecen indicados los elementos de respuesta a la hormona tiroidea.



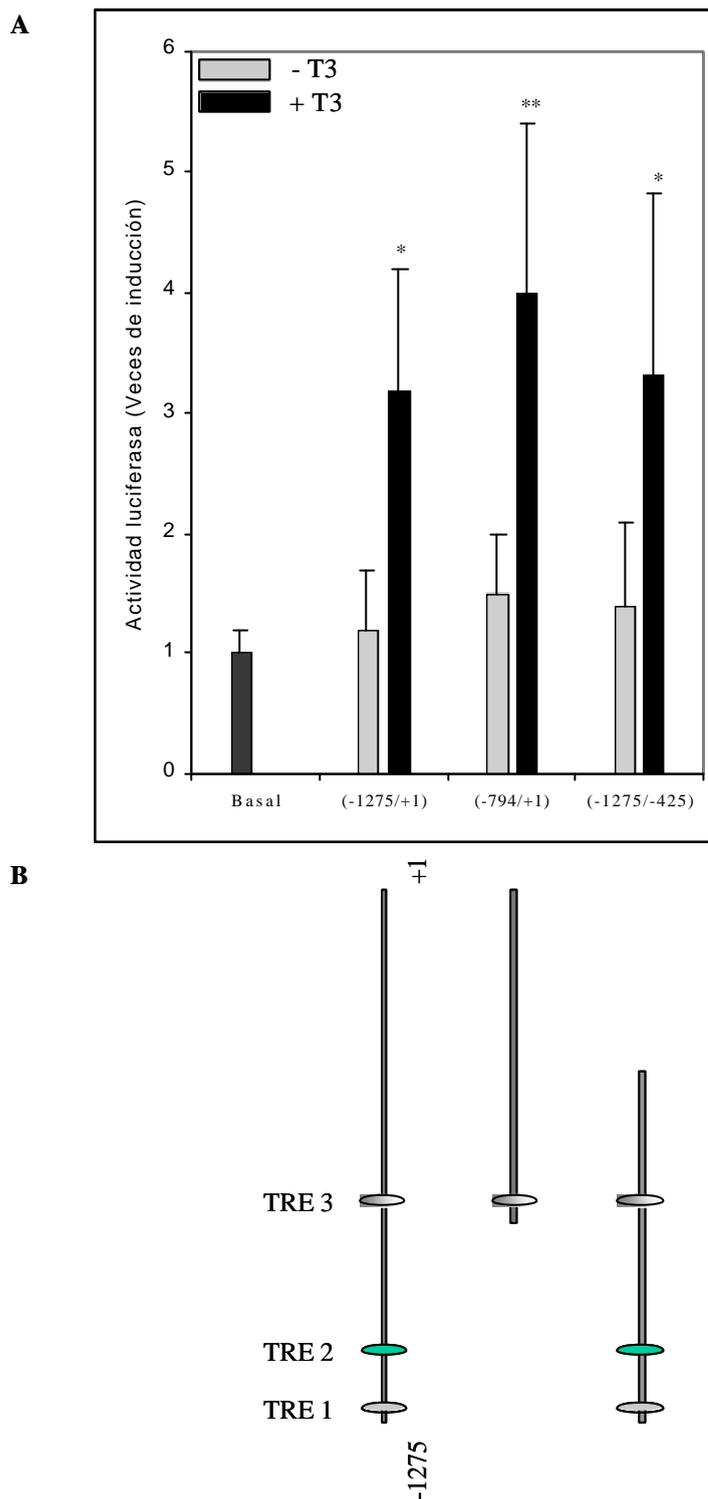
**Figura 24:** Efecto de T3 sobre la actividad transcripcional de las construcciones pX/Tfam-1275+1, pT/Tfam-1275-1110, pT/Tfam-1275-797 o pT/Tfam-1275-425. Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con estas construcciones, junto con las construcciones correspondientes a TR $\beta_1$  y RXR $\alpha$ . Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*\*, P $\leq$ 0,01. (B): Esquema de las distintas deleciones del promotor, en las que aparecen indicados los elementos de respuesta a la hormona tiroidea.



**Figura 25: Efecto de T3 sobre la actividad transcripcional de la construcción pT/Tfam-290-145.** (A): Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con esta construcción, junto con las construcciones correspondientes a TR $\beta$ <sub>1</sub> y RXR $\alpha$ . Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*\*, P $\leq$ 0,01; \*\*\*, P $\leq$ 0,001. (B): Esquema de las distintas deleciones del promotor, en las que aparecen indicados los elementos de respuesta a la hormona tiroidea.

Los resultados obtenidos utilizando las diferentes deleciones, tanto 5' como 3', del promotor de Tfam sugieren que la región comprendida entre los nucleótidos -290 y -145, posee elementos de respuesta al receptor de T3 que son capaces de responder al heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta_1$  vacío, y que la adición de hormona tiroidea provoca un aumento aún mayor sobre la actividad basal.

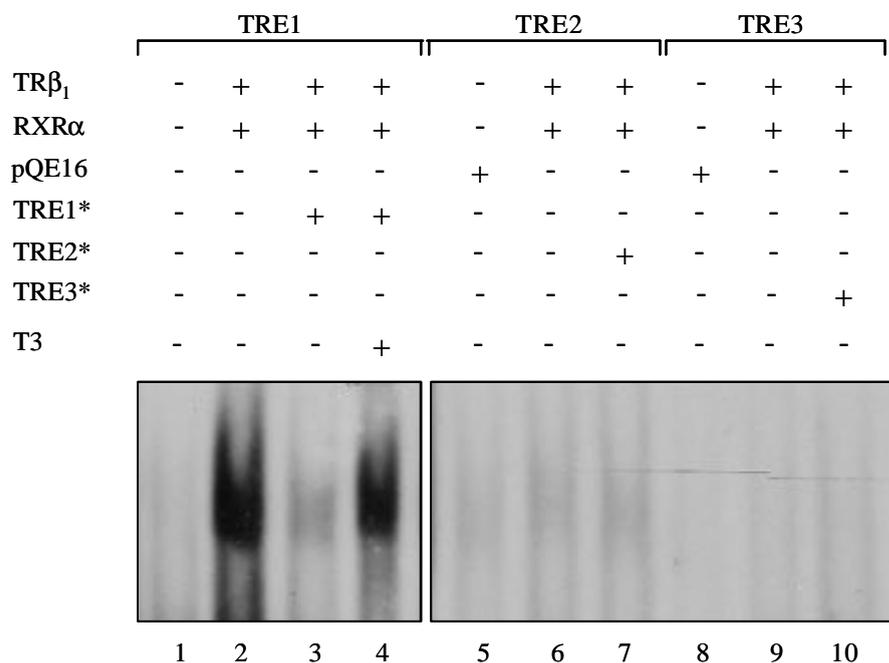
Para examinar si los efectos de la hormona tiroidea y de su receptor sobre la actividad transcripcional del promotor de Tfam no son dependientes del contexto celular, realizamos también ensayos de transfección transitoria en otra línea celular: las células de origen glial OM5 (ver apartado 2.1 de materiales y métodos). Estas células se cotransfectaron, de manera similar a las células TR, con las construcciones correspondientes al promotor entero o a las distintas deleciones (-794/+1 o -1275/-425), junto con las construcciones correspondientes a la isoforma  $\beta_1$  del receptor de T3 y a la isoforma  $\alpha$  del receptor del retinoide X, tal y como describimos en materiales y métodos. En la figura 26 se puede observar que también en estas células la hormona tiroidea es capaz de inducir la expresión del promotor de Tfam.



**Figura 26: Efecto de T3 sobre la actividad transcripcional de las construcciones pX/Tfam-1275+1, pX/Tfam-794/+1 o pT/Tfam-1275-425 en la línea celular OM5.** (A): Células OM5 fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con estas construcciones, junto con las construcciones correspondientes a  $TR\beta_1$  y  $RXR\alpha$ . Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ . (B): Esquema de las distintas deleciones del promotor, en las que aparecen indicados los elementos de respuesta a la hormona tiroidea.

### 1.3. Identificación de las secuencias de reconocimiento para el receptor de T3 en el promotor de Tfam.

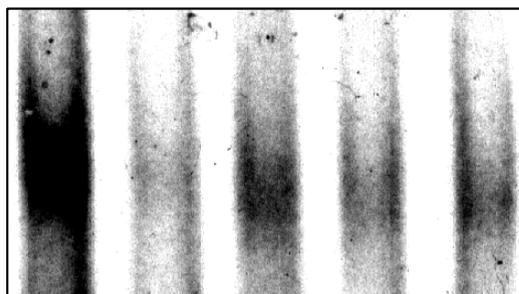
Lo siguiente que estudiamos fue determinar cual de los potenciales sitios de unión de T3 encontrados en el promotor de Tfam era realmente capaz de unir el receptor. Para ello realizamos estudios de retardo en gel (tal y como se describe en materiales y métodos) con oligonucleótidos conteniendo las secuencias de TRE1, TRE2, TRE3 y diversos oligonucleótidos que cubrían la secuencia  $-295/-145$ . Se pudo observar que  $TR\beta_1$  sólo se unía con alta afinidad al oligonucleótido que hemos denominado TRE1 (fig. 27), el cual como ya comentado, es un elemento compuesto de respuesta a T3 que contiene un IP3, DR4 y DR6 que solapan entre sí. La unión de la isoforma  $TR\beta_1$  al oligonucleótido TRE1 es específica, ya que un exceso molar de 200 veces del oligonucleótido TRE1 sin marcar (carril 3) impide la formación de la banda de retardo. La adición de T3 al medio de incubación afecta un poco la afinidad de unión del  $TR\beta_1$  al TRE1.



**Figura 27: Unión a los oligonucleótidos TRE1, 2 y 3 de extractos proteicos de bacterias sobreexpresando  $TR\beta_1$ .** Los ensayos de retardo en gel se realizaron según describimos en el apartado 5.2 de materiales y métodos. El oligonucleótido TRE adecuado previamente marcado se incubó con los extractos proteicos correspondientes (Extractos  $TR\beta_1$  20  $\mu$ g, pQE16 20  $\mu$ g, RXR $\alpha$  75 ng y/o hormona T3 2  $\mu$ M). \*: Oligonucleótido sin marcar en exceso molar de 200 veces. pQE16: Extractos proteicos de bacterias sobreexpresando el vector pQE16 vacío, empleado como control negativo.

Tras confirmar la unión de TR $\beta_1$  al elemento TRE1, el siguiente paso que nos planteamos fue estudiar su unión al fragmento -290/-145 y determinar si efectivamente en este fragmento se encontraba una secuencia de unión al receptor de T3. Para ello, lo primero que hicimos fue analizar si los diferentes oligonucleótidos que denominamos PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4, correspondientes a la zona -290/-145 del promotor eran capaces de actuar como competidores específicos para el TRE1. Según se observa en la figura 28, los oligos PAR1 y PAR3 son los más eficaces a la hora de competir con el oligonucleótido TRE1, sugiriéndonos que estos oligonucleótidos contienen secuencias capaces de reconocer la isoforma  $\beta_1$  del receptor de la hormona tiroidea.

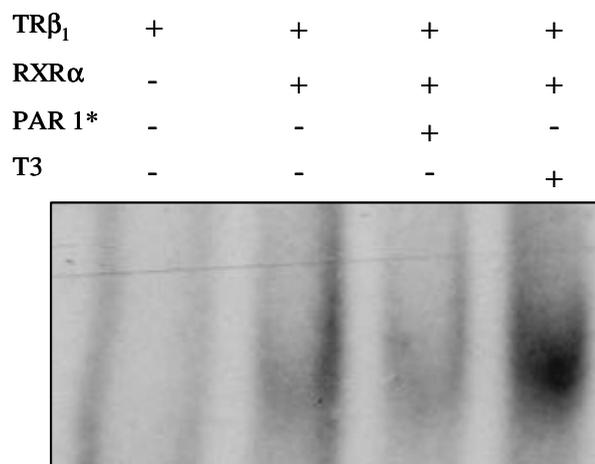
TR $\beta_1$	+	+	+	+	+
RXR $\alpha$	+	+	+	+	+
PAR1	-	+	-	-	-
PAR2	-	-	+	-	-
PAR3	-	-	-	+	-
PAR4	-	-	-	-	+



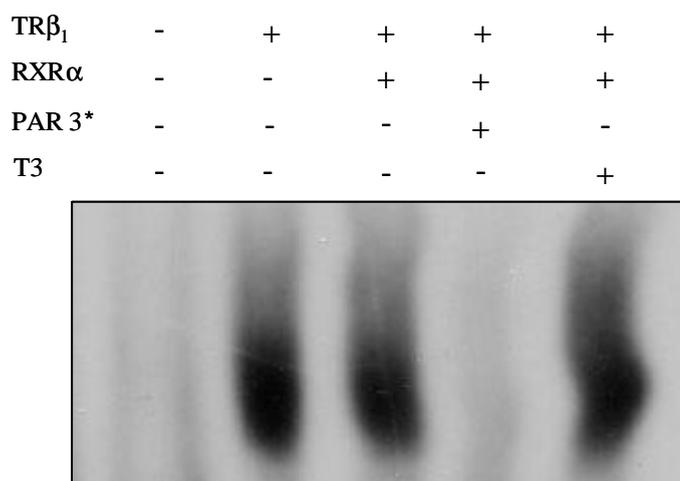
**Figura 28: Unión de la isoforma TR $\beta_1$  a TRE1 y competición con los PARs;** unión de extractos de la proteína TR $\beta_1$  sobreexpresada en bacterias al elemento TRE1 y competición con los oligonucleótidos PARs. Los ensayos de retardo en gel se realizaron según describimos en el apartado 5.2 de materiales y metodos. El oligonucleótido TRE1 marcado se incubó con las proteínas correspondientes (Extractos TR $\beta_1$  20  $\mu$ g y RXR $\alpha$  75 ng) junto o no con un exceso molar de 200 veces del PAR adecuado.

A la vista de estos resultados decidimos realizar análisis de retardo en gel utilizando los oligonucleótidos PAR1 y PAR3 como sondas. Como se puede observar en la figura 29, PAR1 unía, aunque con baja afinidad, el heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta_1$  y esta unión aumentaba significativamente al añadir T3. Sin embargo, cuando el oligonucleótido utilizado en el retardo era el PAR3 pudimos observar que, TR $\beta_1$  se unía a este fragmento con alta afinidad. Estos resultados muestran que, efectivamente, en el fragmento -290/-145 se encuentra una secuencia entre los nucleótidos -295/-248

(PAR1) capaz de unir heterodímeros RXR/TR $\beta_1$  con baja afinidad, la cual aumenta tremendamente en presencia de T3. También existe otra secuencia de reconocimiento, PAR3, entre los nucleótidos -215/-174 que une con alta especificidad el heterodímero RXR/TR $\beta_1$ , tanto en ausencia como en presencia de T3 (figura 30).



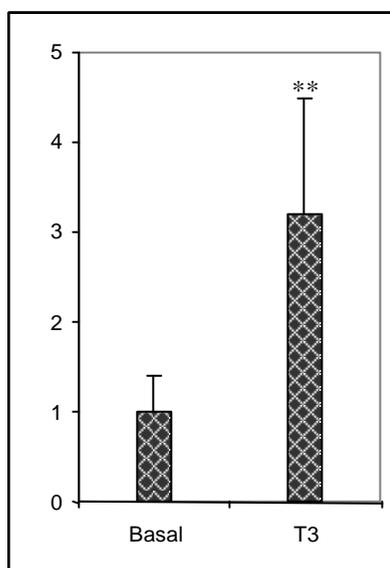
**Figura 29: Unión de la isoforma TR $\beta_1$  a PAR1:** Unión de extractos de la proteína TR $\beta_1$  sobreexpresada en bacterias al oligonucleótido PAR1. Los ensayos de retardo en gel se realizaron según describimos en el apartado 5.2 de materiales y metodos. El oligonucleótido PAR1 previamente marcado se incubó con las proteínas correspondientes (Extractos TR $\beta_1$  20  $\mu$ g, RXR $\alpha$  75 ng y/o la hormona T3 2  $\mu$ M).  
\*: Oligonucleótido sin marcar en exceso molar de 200 veces.



**Figura 30: Unión de la isoforma TR $\beta_1$  a PAR3:** Unión de extractos de la proteína TR $\beta_1$  sobreexpresada en bacterias al oligonucleótido PAR3. Los ensayos de retardo en gel se realizaron según describimos en el apartado 5.2 de materiales y metodos. El oligonucleótido PAR3 previamente marcado se incubó con las proteínas correspondientes (Extractos TR $\beta_1$  20  $\mu$ g, RXR $\alpha$  75 ng y/o la hormona T3 2  $\mu$ M).  
\*: Oligonucleótido sin marcar en exceso molar de 200 veces.

#### 1.4. Efecto de T3 sobre los niveles endógenos de mRNA de Tfam en células de grasa marrón MB492.

A continuación estudiamos si, además de regular la actividad del promotor de Tfam, T3 era capaz de aumentar los niveles de Tfam endógeno en una línea celular. La mayoría de las líneas celulares establecidas no tienen, o tienen muy pocos, receptores para hormonas tiroideas. Por ello para analizar el efecto de esta hormona sobre los niveles endógenos de mRNA de Tfam, utilizamos la línea celular MB492, derivada de grasa marrón, y que posee un número significativo de receptores de T3. Las células MB492 fueron cultivadas según describimos en materiales y métodos, y tratadas o no con T3 durante 24 horas. El RNA total se aisló de las células según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1986). Como se puede observar en la figura 31, la administración de T3 provoca un aumento significativo de la cantidad de mRNA-Tfam respecto a los valores basales (3,2 veces). Estos resultados indican que T3 es capaz, no sólo de inducir la actividad del promotor de Tfam, sino que también es capaz de inducir la expresión endógena de este gen en células que poseen receptores para esta hormona.



**Figura 31: Regulación por T3 de la expresión endógena del gen Tfam en células MB492.** Células MB492 fueron cultivadas en placas p100 tal y como se describe en el apartado 2.1 de materiales y métodos, y tratadas con T3 (100 nM) durante 24H00. Se extrajo RNA total y se realizó el análisis por *Northern Blot* (Apartado 3.3 de materiales y métodos). Se presenta el resultado de las densitometrías de tres Northernblots diferentes, como media  $\pm$  desviación estándar. \*\*,  $P \leq 0,01$ .

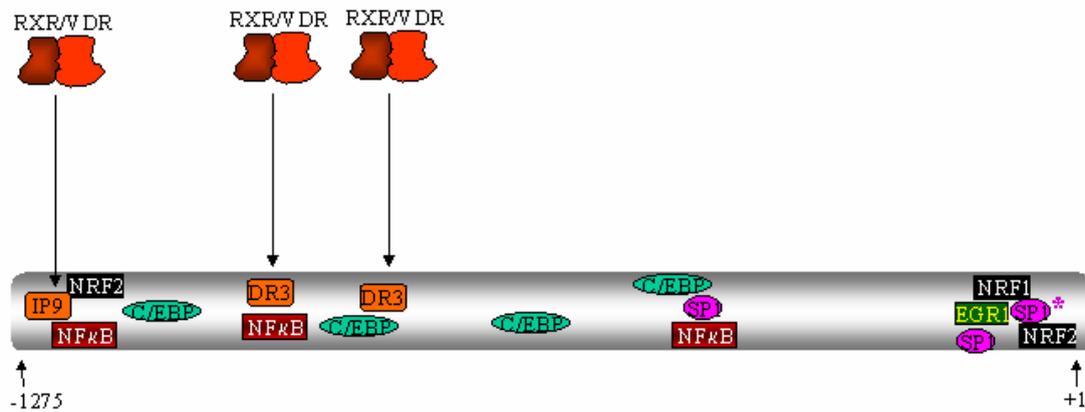
## 2. REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE TFAM POR OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES.

### 2.1. Regulación por vitamina D3 (VD3).

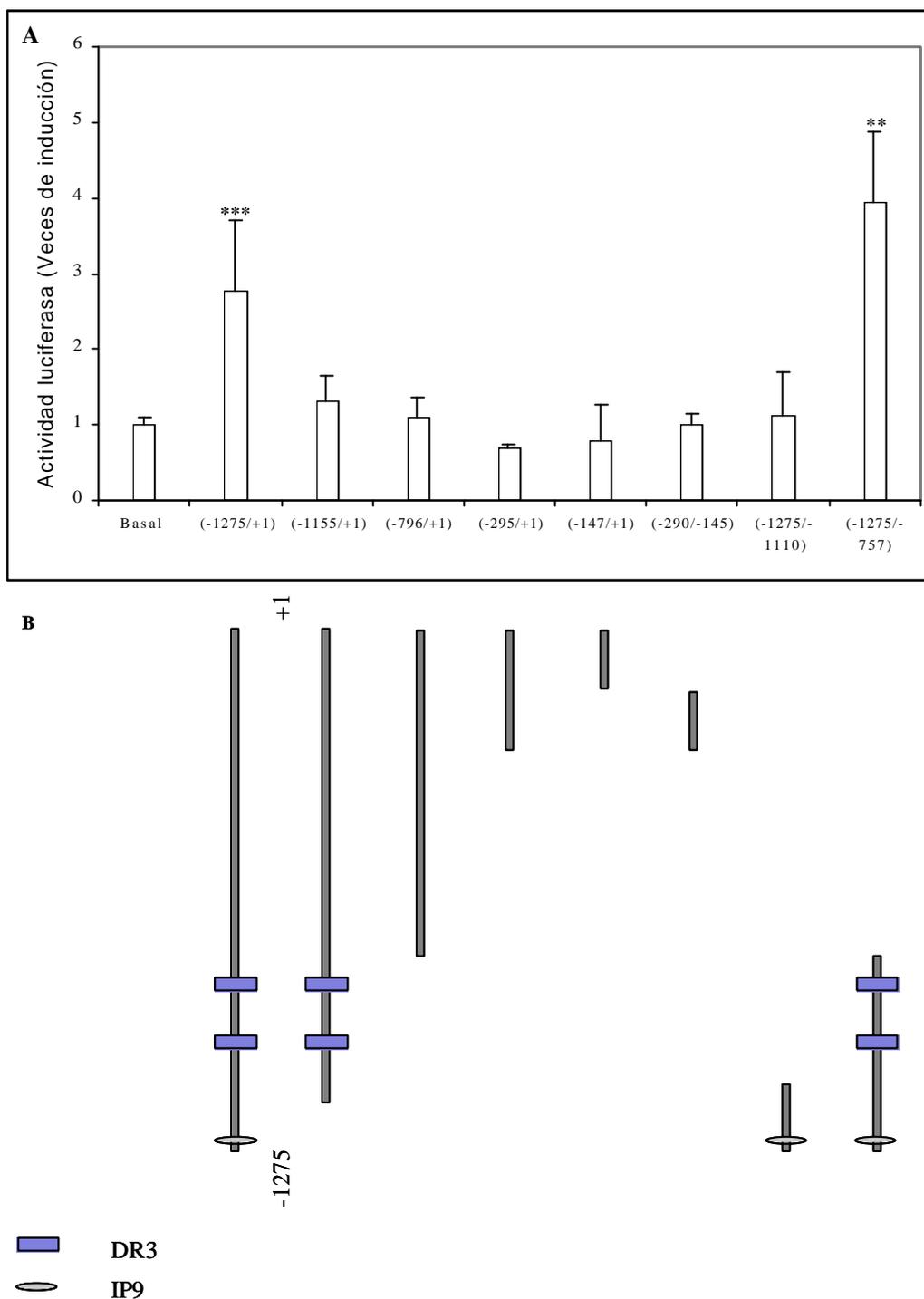
La 1,25-dehidroxyvitamina D3 [1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], forma biológicamente activa de la vitamina D, ejerce su efecto sobre la transcripción a través de su receptor (VDR), que al igual que el receptor de la hormona tiroidea, pertenece también a la superfamilia de receptores nucleares. Los elementos de respuesta a los heterodímeros RXR/VDR se denominan VDRE y, los más comunes constan de la secuencia AGGTCANNAGGTCA (DR3) aunque también se han descrito elementos de respuesta organizados como un IP9 (Malloy, P. J. et al. 1999). La vitamina D, así como la hormona tiroidea, regula una gran cantidad de procesos, uno de los más conocidos es el control de la homeostasis del calcio y del fosforo, pero juega también un papel muy importante en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de numerosos tipos celulares (Haussler, M. et al. 1998).

Con el fin de ampliar el estudio de la regulación del factor de transcripción Tfam, procedimos al análisis de la contribución de los posibles elementos de respuesta a VD3 encontrados por comparación de secuencia (Fig. 32), sobre la actividad transcripcional del promotor de Tfam; para ello utilizamos las construcciones descritas en el apartado 6 de materiales y métodos, y esquematizados en el panel B de la figura 33. Células TR cultivadas según describimos en materiales y métodos, fueron transfectadas con 0,5 µg de la construcción que contenía el promotor (entero o deleccionado) e incubadas durante 24 horas. Al día siguiente de la transfección, se lavaron los precipitados de DNA con una solución salina, TD 1X, y se sustituyó el medio de las placas por medio DMEN sin suero y se incubaron durante 24 horas con tratamiento o no de VD3 (1 µM). La figura 33 muestra una inducción de la actividad del promotor de Tfam por VD3 sólo con las construcciones correspondientes al promotor entero y al fragmento -1275/-757 de Tfam, los cuales mantienen los 3 elementos de respuesta localizados. Por lo que pensamos que la región del promotor comprendida entre los nucleótidos -1275 y -757 estaría implicada en la regulación mediada por la vitamina D3. Con las construcciones -1155/+1 y -1275/-1110 que respectivamente

conservan dos motivos DR3 y un motivo IP9, se deduce que al menos uno de los dos motivos DR3 y el motivo IP9 son esenciales para mediar la acción de VD3 sobre la expresión del promotor, pero no son suficientes por sí solos, ya que su delección afecta la actividad transcripcional del promotor de Tfam.



**Figura 32: Esquema de la región promotora del gen h-Tfam**, desde el nucleótido -1275 hasta el +1. En él, aparecen indicados los posibles elementos de respuesta a la vitamina D3 localizados en esta región; también aparecen indicados sitios para conocidos factores de transcripción como C/EBP, NFκB, EGR-1, NRF-I, NRF-II y SP1. \*: 3 Sitios SP1 solapan entre si.



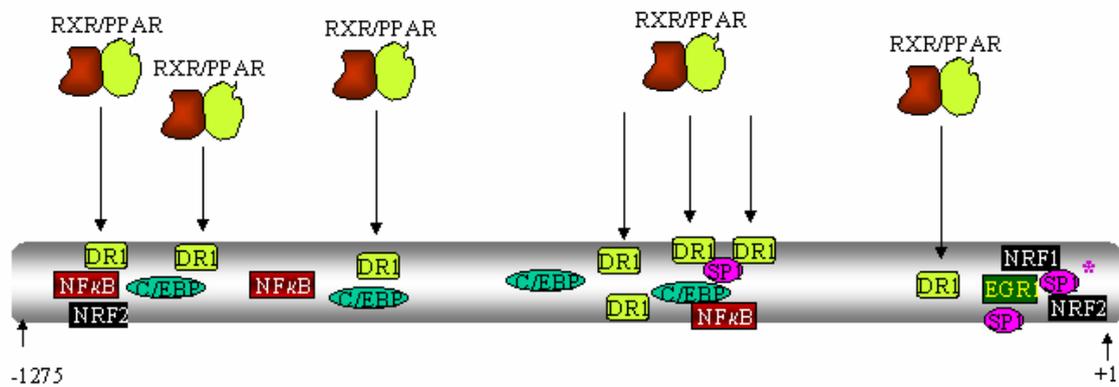
**Figura 33: Efecto de VD3 sobre la actividad transcripcional del promotor de Tfam y de sus distintas deleciones.** (A): Células TR fueron transfectadas con construcciones correspondientes al promotor entero de Tfam y a diferentes deleciones (apartados 2.1 y 6 de materiales y métodos). Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$ . (B): Esquema de las distintas deleciones del promotor, en las que aparecen indicados los elementos de respuesta a la vitamina D3.

## 2.2. Regulación por 15-deoxy- $\Delta$ <sup>12,14</sup>-prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>).

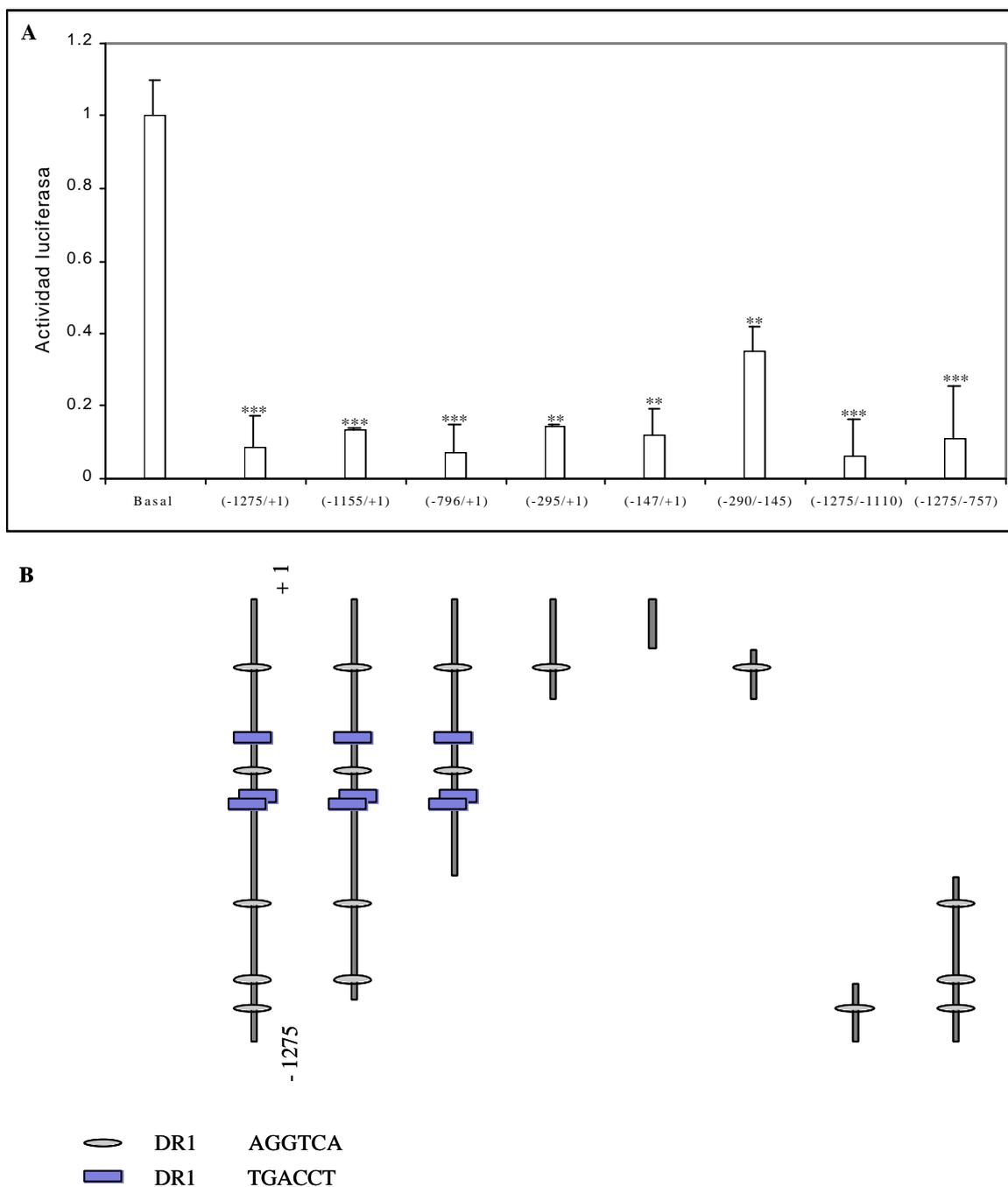
Los PPARs fueron inicialmente clonados como receptores nucleares que median los efectos de compuestos sintéticos denominados proliferadores peroxisomales sobre la expresión génica. Poco después se puso de manifiesto que estos receptores tenían otros ligandos como eicosanoides y ácidos grasos. Los PPARs actúan, como otros receptores nucleares, uniéndose a sus elementos de respuesta en sus genes diana formando heterodímeros con el RXR. Hasta la fecha se han identificado tres tipos diferentes;  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . PPAR $\alpha$  se expresa fundamentalmente en tejido marrón e hígado, también en riñón, corazón y músculo esquelético. PPAR $\gamma$  se expresa fundamentalmente en tejido adiposo y también en el sistema inmune. PPAR $\delta$  es muy ubicuo y su expresión más alta es en riñón, intestino y corazón. Algunos de los ligandos de estos receptores son compartidos por las tres isoformas como los ácidos grasos poliinsaturados y otros son más específicos de isoforma. PPAR $\alpha$  une con alta afinidad ácidos grasos no saturados de cadena larga como el ácido linoleico y eicosanoides como el leucotrieno LT B<sub>4</sub>. Los ligandos con alta afinidad para PPAR $\gamma$  son la 15-deoxy- $\Delta$ <sup>12,14</sup>-prostaglandina J<sub>2</sub>, eicosanoides y agentes hipolipidémicos como los fibratos. También drogas antidiabéticas como las tiazolidinediones: pioglitazona, troglitazona, rosiglitazona.

Ya que la activación de PPAR $\gamma$  se ha asociado con la regulación de procesos apoptóticos, en los que está implicada la mitocondria en numerosos tipos celulares, decidimos centrarnos en el estudio de la regulación de Tfam por un ligando muy potente de este receptor: 15d-PGJ<sub>2</sub>. Los posibles elementos de respuesta a PPAR $\gamma$  se encuentran esquematizados en la figura 34. Las construcciones empleadas se describen en el apartado 6 de materiales y métodos, y están esquematizados en el panel B de la figura 35. Células TR cultivadas según describimos en materiales y métodos, fueron transfectadas con 0,5  $\mu$ g de la construcción que contenía el promotor (entero o delecionado) e incubadas durante 24 horas. Al día siguiente de la transfección, se lavaron los precipitados de DNA con una solución salina, TD 1X, y se sustituyó el medio de las placas por medio DMEN sin suero y se incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de prostaglandina (1  $\mu$ M). La figura 35 muestra una disminución de la actividad transcripcional en respuesta a 15d-PGJ<sub>2</sub> de todas las construcciones empleadas, incluso con el fragmento que abarca desde el nucleótido -147 al +1 que, en

principio, no conserva ningún elemento de respuesta más o menos consenso a 15d-PGJ<sub>2</sub>. Estos datos sugieren que 15d-PGJ<sub>2</sub> podría regular el promotor de Tfam bien a través de su activación de PPAR $\gamma$  que se uniría a una secuencia, no descrita como PPRE, entre los nucleótidos -147/+1, o bien a través de un mecanismo indirecto por su cooperación con algún factor de transcripción presente en esa secuencia. Cabe resaltar que las células no eran apoptóticas y que presentaban una morfología similar a la que presentaban las células control.



**Figura 34: Esquema de la región promotora del gen h-Tfam**, desde el nucleótido -1275 hasta el +1. En él, aparecen indicados los posibles elementos de respuesta a receptores activados por proliferadores peroxisomales localizados en esta secuencia; también aparecen indicados sitios para conocidos factores de transcripción como C/EBP, NF $\kappa$ B, EGR-1, NRF-I, NRF-II y SP1. \*: 3 Sitios SP1 solapan entre si.



**Figura 35: Efecto de 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la actividad transcripcional del promotor de h-Tfam y de sus distintas deleciones.** (A): Células TR fueron transfectadas con construcciones correspondientes al promotor entero de Tfam y a diferentes deleciones (apartados 2.1 y 6 de materiales y métodos). Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*\*, P≤0,01; \*\*\*, P≤0,001. (B): Esquema de las distintas deleciones del promotor, en las que aparecen indicados los elementos de respuesta a la prostaglandina.

### 2.3. Regulación por ácido todo-trans-retinoico (AR).

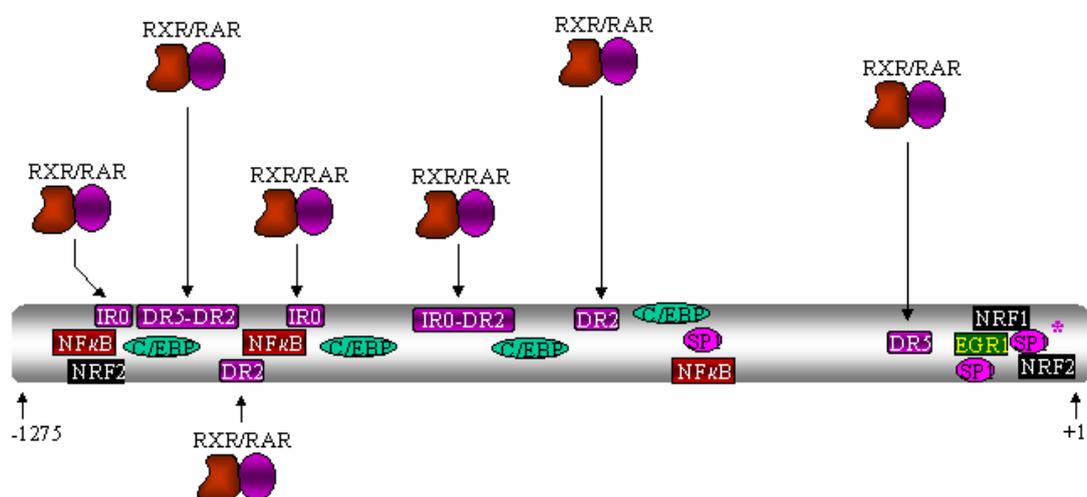
Otro miembro de la familia de receptores nucleares al cual se ha implicado en procesos de muerte celular es el receptor del ácido retinoico (RAR), cuyo ligando es el ácido todo-trans retinoico. Como todos los miembros de esta subfamilia de receptores, RAR se une a sus elementos de respuesta formando heterodímeros con RXR. Estos elementos de respuesta están generalmente organizados como DR5 o DR2, aunque también se pueden unir a elementos de respuesta a hormona tiroidea como IR0 ó DR4.

A continuación, completamos los estudios sobre los efectos de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares sobre la expresión del factor de transcripción Tfam, estudiando la contribución de los posibles elementos de respuesta a AR encontrados por comparación de secuencia (Fig. 36); utilizamos las construcciones descritas en el apartado 6 de materiales y métodos, y esquematizados en el panel B de la figura 37. Células TR cultivadas según describimos en materiales y métodos, fueron transfectadas con 0,5  $\mu$ g de la construcción que contenía el promotor (entero o deleccionado) e incubadas durante 24 horas. Al día siguiente de la transfección, se lavaron los precipitados de DNA con una solución salina, TD 1X, y se sustituyó el medio de las placas por medio DMEN sin suero y las células se incubaron durante 24 horas en presencia o no de ácido retinoico (1  $\mu$ M). En la figura 37 se puede observar un aumento de la actividad de este promotor en todas las construcciones estudiadas, menos en las construcciones: -295/+1; -147/+1 y -290/-145. Estas construcciones tienen en común que, aunque dos de ellas contienen un DR5, les faltan los elementos de respuesta a T3 como IR0 y el elemento de respuesta DR2, lo cual sugiere que, en este promotor, el heterodímero RXR/RAR no se está uniendo a una de las secuencias más canónicas para AR: DR5. Por el estudio con la construcción -1275/-1110, que contiene los elementos TRE1 y IR0, parece que este fragmento sería suficiente para conferir capacidad de respuesta del promotor de Tfam a AR.

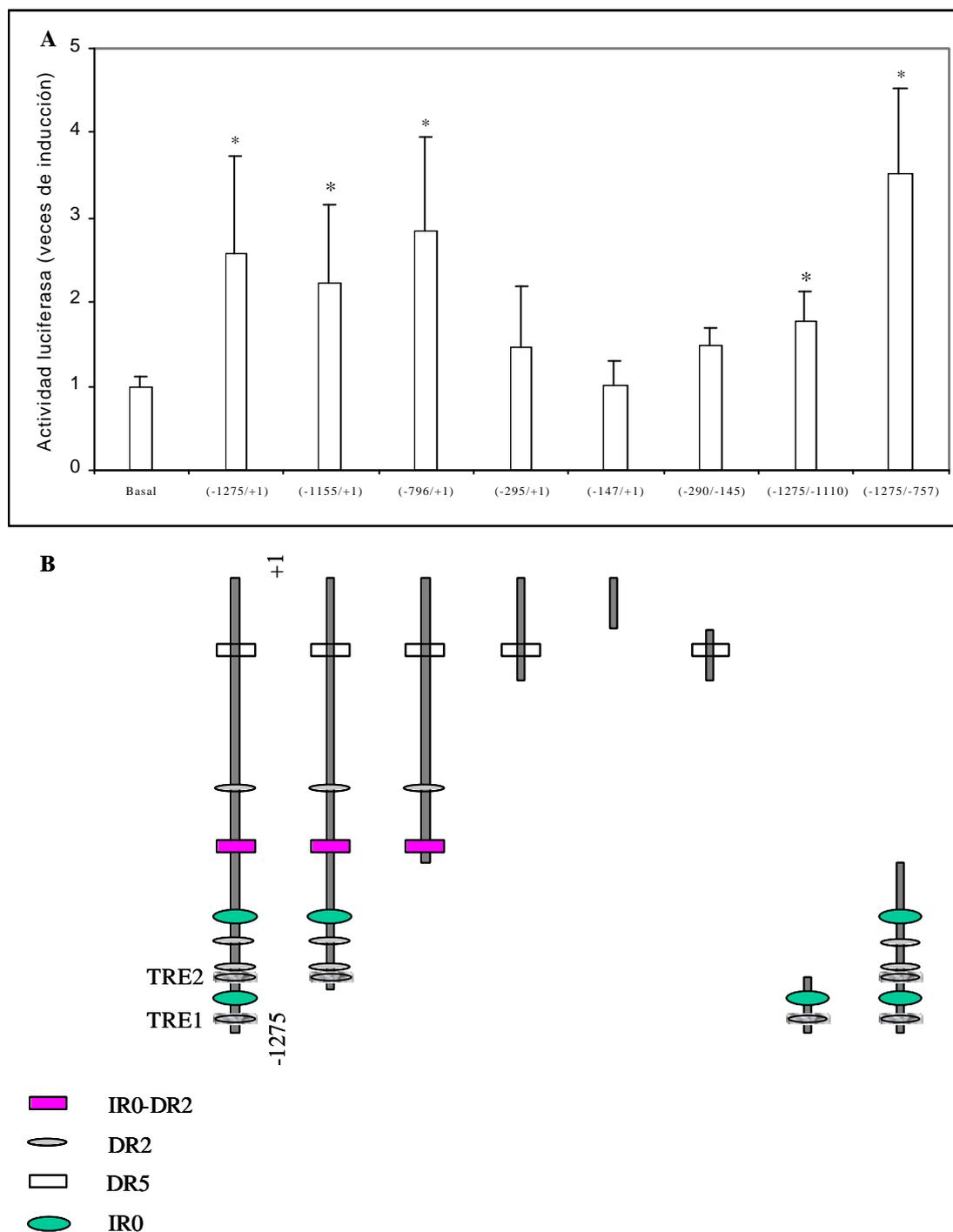
Hay datos descritos en la literatura que indican que, en determinados promotores, los efectos de T3 y ácido retinoico pueden ser aditivos o bien que un mismo elemento de respuesta puede mediar las acciones de ambos factores. Por tanto, lo siguiente que nos planteamos es el estudio del efecto de T3 y AR sobre los niveles de mRNA endógeno de Tfam. Para ello hemos empleado células MB492 ya que, como

comentábamos en el apartado 1.4, estas células poseen un número significativo de receptores de T3. El RNA total se aisló de las células según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1986). Como se puede observar en las figuras 38, la incubación de células MB492 con T3, AR o AR+T3 aumenta los niveles de mRNA-Tfam 3,2; 8,75 y 8,05, respectivamente, con respecto al basal. Estos resultados, junto con los datos obtenidos con las transfecciones en las que estudiamos el efecto de ambos factores, sugieren que el elemento TRE1 puede mediar, al menos en parte, los efectos de T3 y ácido retinoico y que el efecto de AR, mediado por este elemento, sería más potente que el de T3.

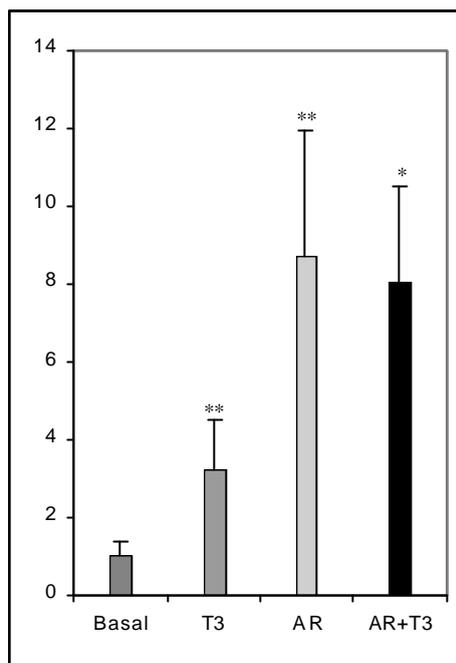
A la vista de los resultados obtenidos en los experimentos de regulación del promotor por AR, posteriormente analizamos la unión de la proteína recombinante RAR a los elementos de respuesta TRE1 y TRE2, localizados en la zona del promotor de Tfam que responde a AR. En la Figura 39 se puede observar una unión de alta afinidad del RAR al oligonucleótido TRE1 (formando heterodímeros con RXR). Esta unión es específica ya que un exceso molar de 200 veces del oligonucleótido TRE1 sin marcar (competidor) impide la formación de la banda de retardo. No se observó, sin embargo ninguna unión del RAR al elemento de respuesta TRE2. Estos datos parecen confirmar el hecho de que RAR estaría aumentando la expresión del promotor de Tfam a través de un elemento de respuesta organizado como un IP3-DR4-DR6 (TRE1) y que se encuentra entre los nucleótidos -1293 y -1212.



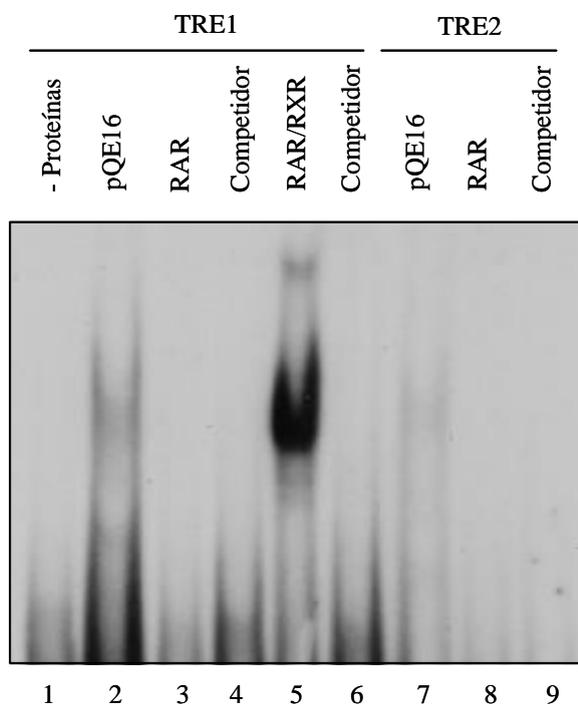
**Figura 36: Esquema de la región promotora del gen h-Tfam, desde el nucleótido -1275 hasta el +1.** En él, aparecen indicados los posibles elementos de respuesta a ácido retinoico localizados en esta secuencia; también aparecen indicados sitios para conocidos factores de transcripción como C/EBP, NFκB, EGR-1, NRF-I, NRF-II y SP1. \*: 3 Sitios SP1 solapan entre si.



**Figura 37: Efecto del ácido retinoico sobre la actividad transcripcional del promotor de h-Tfam y de las distintas delecciones.** (A): Células TR fueron transfectadas con construcciones correspondientes al promotor entero de Tfam y a diferentes delecciones (apartados 2.1 y 6 de materiales y métodos). Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por triplicado en tres experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal de pX/Tfam-1275+1. \*,  $P \leq 0,05$ . (B): Esquema de las distintas delecciones del promotor, en las que aparecen indicados los elementos de respuesta a ácido retinoico y también los elementos de respuesta a T3, TRE1 y TRE2.



**Figura 38: Regulación por T3 y AR de la expresión endógena del gen *Tfam* en células MB492.** Células MB492 fueron cultivadas en placas p100 tal y como se describe en el apartado 2.1 de materiales y métodos, y tratadas con T3 (100 nM) y/o AR (1 $\mu$ M) durante 24H00. Se extrajeron RNA totales y se realizó el análisis por *Northern Blot* (Apartados 3.3 de materiales y métodos). Se presenta el resultado de las densitometrías de tres Northern diferentes, como media  $\pm$  desviación estándar. \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ .

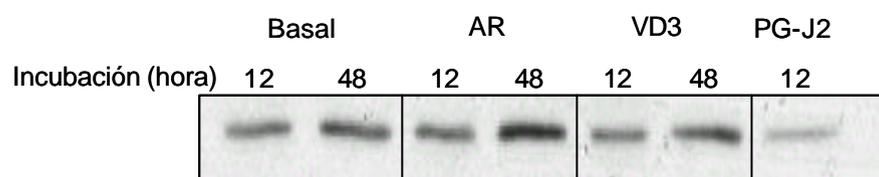


**Figura 39: Unión de la proteína recombinante RAR a los oligonucleótidos TRE1 y TRE2.** Los ensayos de retardo en gel se realizaron según describimos en el apartado 5.2 de materiales y métodos. los oligonucleótidos TRE1 y TRE2 previamente marcados se incubaron con las proteínas correspondientes (pQE16 20  $\mu$ g, RAR 75 ng, RXR 75 ng). pQE16: Extractos proteicos de bacterias sobreexpresando el vector pQE16 vacío, empleado como control negativo.

#### 2.4. Efectos de VD3, AR y 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la expresión endógena de Tfam en células HT22.

Finalmente, analizamos también si, al igual que en el caso de la hormona tiroidea y del ácido retinoico, los otros ligandos de receptores nucleares analizados (VD3 y 15d-PGJ<sub>2</sub>) eran capaces de regular los niveles endógenos de Tfam. Para ello realizamos análisis de *Western blot* con proteínas aisladas de la línea celular HT22 derivada de hipocampo. Utilizamos esta línea celular ya que posee niveles elevados de receptores para VD3, AR y 15d-PGJ<sub>2</sub> (datos no mostrados).

Para ello, células HT22 (apartado 2.1 de materiales y métodos) fueron tratadas con los ligandos VD3, 15d-PGJ<sub>2</sub> o AR; se extrajeron las proteínas y se analizaron por *Western blot*. La figura 40 muestra un efecto claro del AR y de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre los niveles de proteína Tfam. Como se puede observar en esta figura el AR aumenta estos niveles a las 48 horas de incubación y la 15d-PGJ<sub>2</sub> los disminuye a las 12 horas. No pudimos detectar sin embargo ningún efecto de la vitamina D3. Datos similares los obtuvimos con las células TR (datos no mostrados).



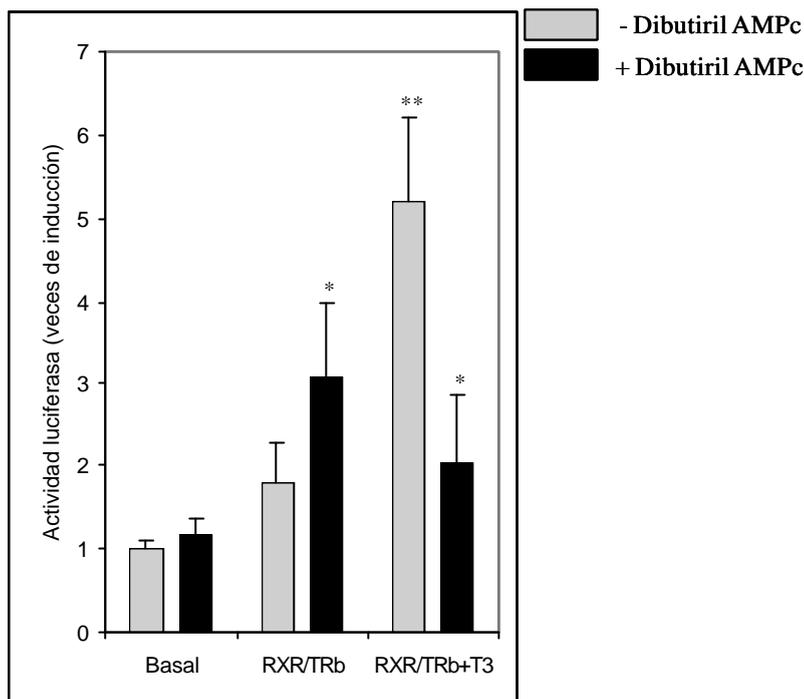
**Figura 40: Efectos de los ligandos AR, VD3 y 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la expresión de Tfam en células HT22.** Células HT22 fueron cultivadas según describimos en el apartado 2.1 de materiales y métodos. Tras alcanzar una confluencia de 70-80%, se trataron con los ligandos AR (1  $\mu$ M), VD3 (1  $\mu$ M) o 15d-PGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) durante 12 o 48 horas; y se procedió al *Western Blot* tal y como se describe en el apartado 4.2 de materiales y métodos.

### **3. REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE TFAM HUMANO POR RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EXTRACELULARES. INTERACCIÓN CON LOS EFECTOS DE LOS RECEPTORES NUCLEARES.**

Como hemos comentado ya en la Introducción, los receptores nucleares pueden ser también dianas de numerosas kinasas implicadas en rutas de señalización extracelular y esta fosforilación se ha demostrado que es capaz de modular su actividad. Esta fosforilación proporciona por tanto un importante mecanismo para el enlace entre diferentes rutas de señalización. Entre las diferentes rutas de kinasas capaces de modular la actividad de los receptores nucleares se encuentran la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), caseína quinasa, PKC, PI-3 quinasa y MAPKs. Por todo ello, a continuación analizamos el posible efecto de varias rutas de señalización extracelular sobre la regulación del promotor de Tfam por los diferentes miembros de la familia de receptores nucleares analizados en este trabajo. Para ello, células TR fueron cultivadas y tratadas con estimuladores de diversas rutas de señalización según describimos en el apartado 2.1 de materiales y métodos. En el caso del receptor de T3, este efecto se estudió tanto sobre los heterodímeros vacíos (sin ligando) como sobre células transfectadas con el heterodímero RXR/TR $\beta$ <sub>1</sub> e incubadas posteriormente con T3.

#### **3.1. Regulación por proteína quinasa A (PKA).**

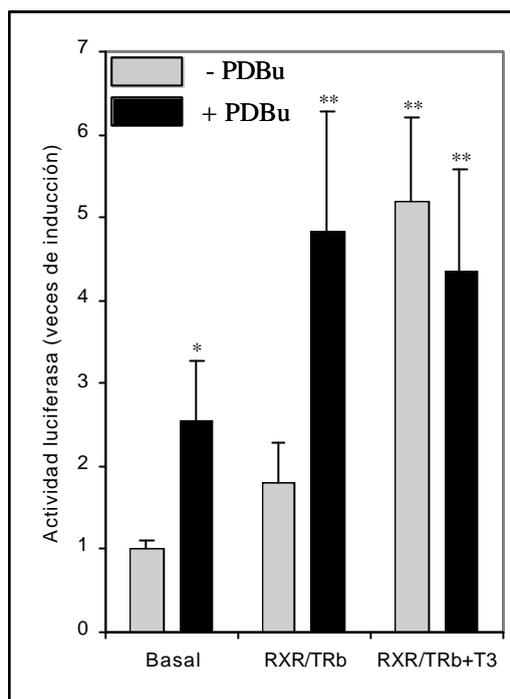
En una primera serie de estudios para determinar la contribución de los procesos de fosforilación, examinamos los efectos de dibutilil AMPc (activador de la proteína quinasa A) sobre la regulación por T3 de la expresión del promotor de Tfam. Como se puede observar en la figura 41, la adición al medio de incubación de dibutilil AMPc (1mM) provocó un aumento en la transactivación del promotor de Tfam mediada por el heterodímero vacío. Sin embargo, la incubación con dibutilil AMPc produjo un bloqueo en la activación de la expresión del promotor de Tfam por T3. Estos datos indican que la activación de la vía de la PKA convierte al heterodímero RXR/TR $\beta$ <sub>1</sub> vacío en un regulador (en este caso inductor) de la expresión del promotor de Tfam y que, por el contrario, esta activación anula el efecto inductor de T3. La actividad basal del promotor no se ve afectada por la adición de dibutilil AMPc.



**Figura 41: Efecto de dibutiril AMPc (estimulador de PKA) sobre la regulación por T3 de la actividad del promotor de Tfam.** Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con la construcción pX/Tfam-1275/+1, junto con las construcciones correspondientes a TR $\beta_1$  y RXR $\alpha$ . Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 3 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*, P $\leq$ 0,01; \*, P $\leq$ 0,05.

### 3.2. Regulación por proteína kinasa C (PKC).

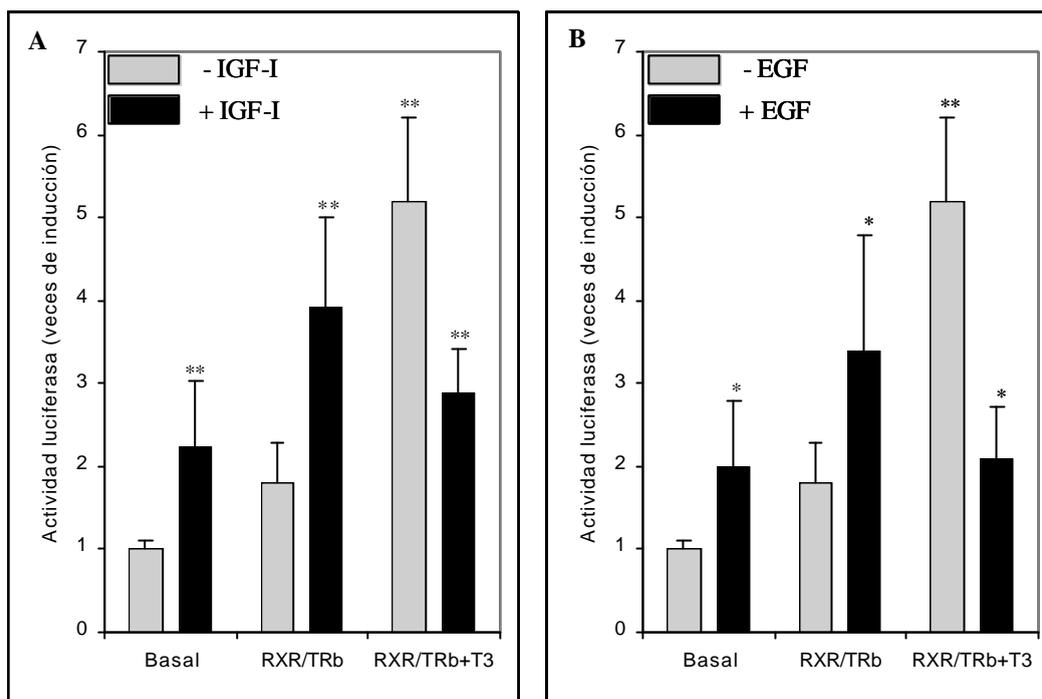
A continuación estudiamos el efecto de activadores de la PKC sobre el efecto de T3 en el promotor de Tfam. Cuando las células TR eran incubadas en presencia del éster de forbol PDBu observamos que, a diferencia de lo que ocurría con la activación de la ruta de la PKA, la activación de PKC (fig. 42) ya tenía un efecto sobre la actividad basal de este promotor (2,5 veces). La adición de PDBu aumentó significativamente el efecto del heterodímero RXR/TR sobre el promotor de Tfam y de nuevo anulaba el efecto de T3. Estos resultados sugieren la presencia en el promotor de Tfam de secuencias consenso para determinados factores de transcripción que son dianas finales de la ruta de señalización de la proteína kinasa C y que ejercen un efecto activador sobre la expresión de Tfam. También, y al igual que ocurría con el dibutiril AMPc, PDBu fue capaz de convertir al heterodímero RXR/TR $\beta_1$  sin ligando en un regulador positivo de la transcripción.



**Figura 42: Efecto del éster de forbol PDBu (estimulador de PKC) sobre la regulación por T3 de la actividad del promotor de Tfam.** Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con la construcción pX/Tfam-1275/+1, junto con las construcciones correspondientes a TR $\beta_1$  y RXR $\alpha$ . Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 3 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*, P $\leq$ 0,01; \*, P $\leq$ 0,05.

### 3.3. Regulación por la vía de las MAPKs.

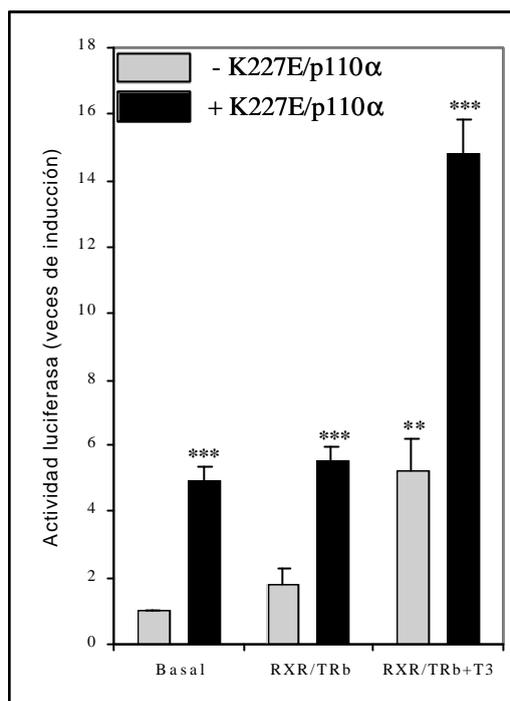
Para estudiar el efecto de la ruta de señalización de las MAPKs, utilizamos dos conocidos activadores de esta ruta: IGF-I y EGF (figura 43). Ambos factores, además de actuar a través de vías de señalización como la PI-3K o p38 son también potentes activadores de las MAPKs en numerosos tipos celulares. IGF-I o EGF, fueron capaces de inducir de manera significativa la transcripción basal del promotor de Tfam; y ambos factores, al igual que dibutilil AMPc y PDBu, fueron capaces de hacer que el heterodímero RXR/TR $\beta_1$  vacío indujera la expresión del promotor de Tfam. De nuevo, el tratamiento de las células con IGF-I o EGF en presencia de T3 anuló el efecto activador de esta hormona sobre el promotor de Tfam.



**Figura 43: Efecto de IGF-I o EGF (activadores de la ruta de las MAPKs) sobre la regulación por T3 de la actividad del promotor de Tfam.** Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con la construcción pX/Tfam-1275/+1, junto con las construcciones correspondientes a TR $\beta_1$  y RXR $\alpha$ . Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 3 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*, P $\leq$ 0,01; \*, P $\leq$ 0,05.

### 3.4. Regulación por la vía de PI-3K.

Por último para analizar el posible efecto de la activación de PI-3K cotransfectamos células TR con un mutante constitutivamente activo de PI-3K denominado K227E/p110 $\alpha$  (apartados 2.1 y 6 de Materiales y Métodos). En la figura 44 se puede observar que, la activación de la ruta de PI-3K induce fuertemente la transcripción basal del promotor de Tfam. La activación de PI-3K produce también un aumento en la regulación del promotor de Tfam en células transfectadas con el heterodímero RXR/TR $\beta_1$  en ausencia de T3. A diferencia de lo que ocurría con la activación de las otras vías de señalización analizadas, la sobreexpresión de K227E/p110 $\alpha$  potenciaba de manera significativa la inducción de la transcripción del promotor de Tfam mediada por T3.

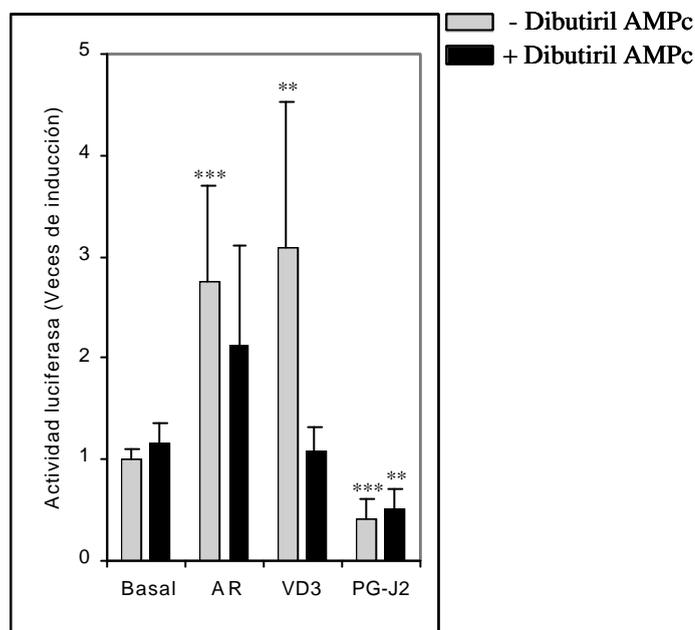


**Figura 44: Efecto de la activación de la ruta de PI-3K sobre la regulación por T3 de la actividad del promotor de Tfam.** Células TR fueron cotransfectadas por el método de precipitación con fosfato cálcico (apartado 2.1 de materiales y métodos) con la construcción pX/Tfam-1275/+1, junto con las construcciones correspondientes a TR $\beta_1$ , RXR $\alpha$  y al mutante activo de la PI-3K (K227E/p110 $\alpha$ ). Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 2 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*\*, P $\leq$ 0,001;\*\* , P $\leq$ 0,01.

### 3.5. Efectos de activadores de kinasas sobre la regulación de Tfam por VD3, AR y 15d-PGJ<sub>2</sub>.

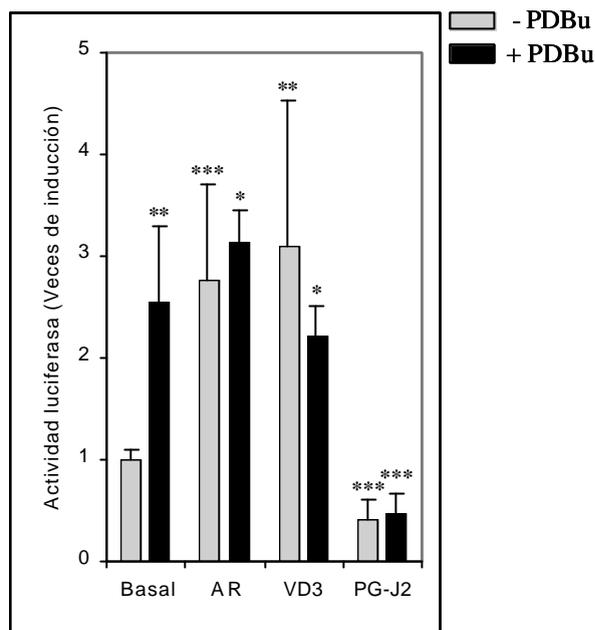
Lo siguiente que nos planteamos fue estudiar el efecto de la interacción entre activadores de rutas de kinasas y otros miembros de la familia de receptores nucleares. Para ello, realizamos transfecciones transitorias en células TR en las que transfectamos una construcción correspondiente al promotor entero del gen h-Tfam. Al día siguiente de la transfección, se lavaron los precipitados de DNA con una solución salina de TD1X, y se substituyó el medio de las placas por medio DMEN sin suero y se incubaron durante 24 horas con tratamiento o no de VD3 (1  $\mu$ M), AR (1  $\mu$ M) o 15d-PGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) junto o no con el factor indicado (1mM Dibutilil AMPc; 0,05  $\mu$ g/ml PDBu; 0,1 mM EGF; 0,1 mM IGF-I) (apartado 2.1 de Materiales y Métodos). Como se puede observar en la figura 45, la activación de PKA tuvo diversos efectos sobre la transactivación del promotor de Tfam por otros miembros de la familia de receptores nucleares. La adición de dibutilil AMPc al medio de cultivo no parece tener ningún efecto sobre la regulación

mediada por la prostaglandina. Sin embargo, observamos que dibutilil AMPc era capaz de bloquear por completo la inducción transcripcional mediada por VD3 mientras que la regulación de la expresión del promotor de Tfam mediada por AR no se ve tampoco afectada en presencia del activador de la PKA.



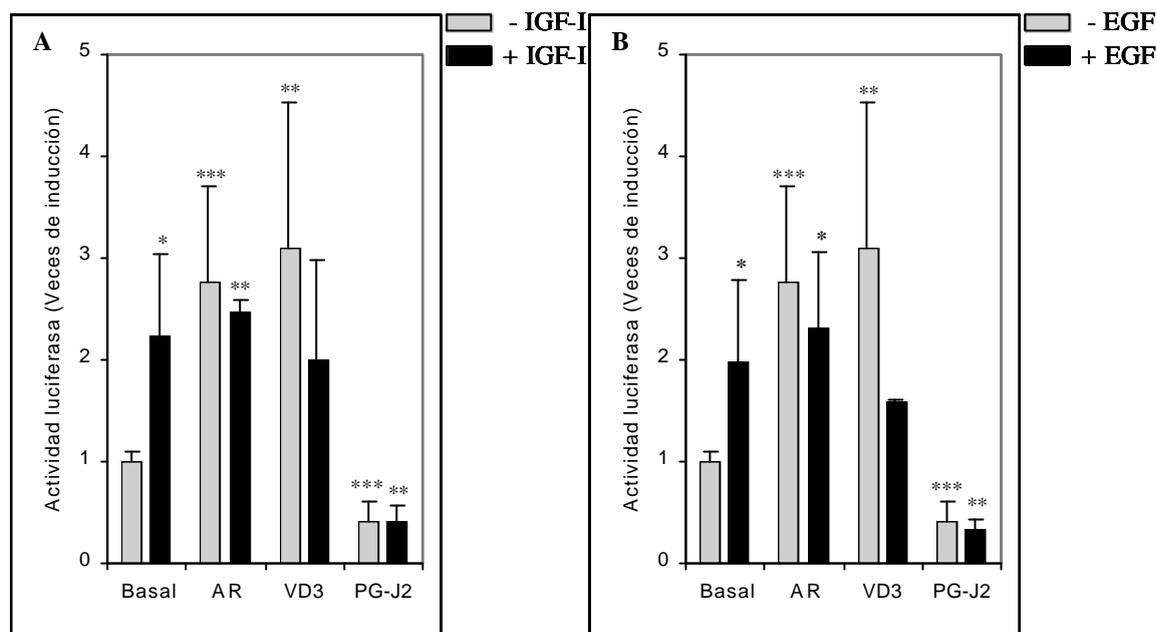
**Figura 45: Efecto de dibutilil AMPc (estimulador de PKA) sobre la regulación por AR, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub> de la actividad del promotor de Tfam.** Células TR fueron transfectadas con 0,5 µg de la construcción correspondiente al promotor de Tfam (apartados 2.1 y 6 de materiales y métodos) y tratadas con los ligandos AR, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub>, junto o no con 1 mM dibutilil AMPc. Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 2 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*\*, P≤0,001; \*\*, P≤0,01.

Cuando las células eran tratadas con el éster de forbol PDBu (figura 46), pudimos observar que, al igual que en el caso de la activación de la ruta de PKA, la activación de PKC seguía sin tener ningún efecto sobre la regulación mediada por prostaglandina J<sub>2</sub>; mientras que se observaba un efecto negativo sobre el efecto activador de VD3 y AR sobre la actividad transcripcional del promotor. Estos resultados, como en el caso de la regulación de Tfam por T3 (apartado 3.2 de resultados), sugieren una vez más, la presencia en el promotor de Tfam de sitios consenso para determinados factores de transcripción, los cuales serian dianas finales de la vía de señalización de PKC.



**Figura 46: Efecto de PDBu (estimulador de PKC) sobre la regulación por AR, VD3 o 15dPGJ<sub>2</sub> de la actividad del promotor de Tfam.** Células TR fueron transfectadas con 0,5  $\mu\text{g}$  de la construcción correspondiente al promotor de h-Tfam (apartado 2.1 de materiales y métodos) y tratadas con los ligandos AR, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub>, junto o no con 0,05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PDBu. Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 2 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ .

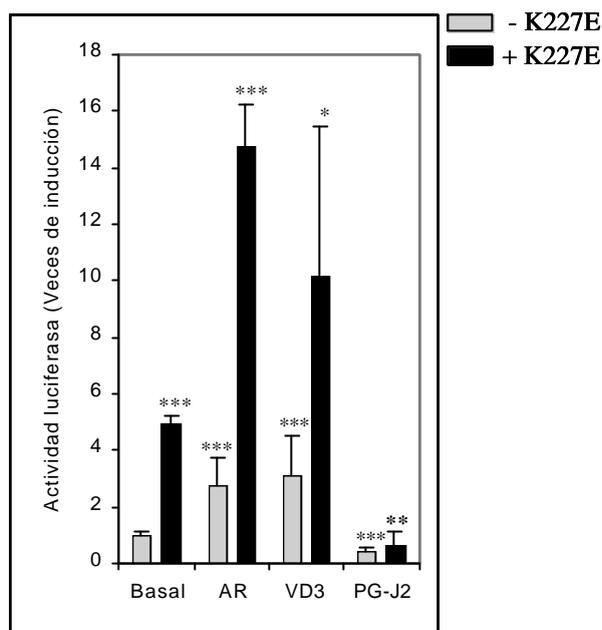
La estimulación de la vía de las MAPKs por IGF-I o EGF (fig. 47), presentó un patrón de acción similar al que observamos con la activación de la vía de PKC. Los efectos de la prostaglandina sobre la actividad del promotor de Tfam no sufrieron cambios significativos en presencia del estimulador. Sin embargo, observamos que tanto IGF-I como EGF eran capaces de anular el efecto inductor de VD3 y AR sobre la expresión del promotor de Tfam.



**Figura 47: Efecto de IGF-I o EGF (estimulador de MAPKs) sobre la regulación por AR, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub> de la actividad del promotor de Tfam.** Células TR fueron transfectadas con 0,5  $\mu$ g de la construcción correspondiente al promotor de h-Tfam (apartado 2.1 de materiales y métodos) y tratadas con los ligandos AR, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub>, junto o no con 0,1 mM IGF-I o 0,1 mM EGF. Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 2 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ .

Por último, completamos el estudio del efecto de la interacción de kinasas con receptores nucleares (RAR, VDR o PPAR) sobre la actividad transcripcional del promotor de Tfam, analizando el efecto de la activación de la vía de PI-3K. En la figura 48 se puede observar que la activación de PI-3K no sólo era capaz de inducir fuertemente la transcripción basal del promotor sino también y al contrario de lo que ocurría con otras vías de señalización, potencia los efectos activadores del ácido retinoico y de la vitamina D3 sobre la actividad transcripcional. El efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, de nuevo, no se ve afectado por la sobreexpresión del mutante constitutivamente activo de PI-3K, K227E/p110 $\alpha$ .

Estos resultados en conjunto, sugieren una interacción entre las vías de señalización de los receptores nucleares TR $\beta$ <sub>1</sub>, VDR y RAR y diferentes rutas de señalización extracelular sobre el promotor de Tfam.



**Figura 48:** Efecto de la activación de la ruta de PI-3K sobre la regulación por AR, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub> de la actividad del promotor de h-Tfam. Células TR fueron cotransfectadas (apartado 2.1 de materiales y métodos) con las construcciones correspondientes al promotor de h-Tfam y al mutante activo de la PI-3K (K227E/p110 $\alpha$ ) y tratadas con los ligandos RA, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub>. Los datos presentados son la media del valor de la actividad luciferasa determinada por duplicado en 2 experimentos diferentes, con respecto a la actividad basal. \*\*\*, P $\leq$ 0,001; \*\*, P $\leq$ 0,01; \*, P $\leq$ 0,05.

## **DISCUSIÓN**

---

## DISCUSIÓN

La hormona tiroidea ( $T_3$ , 3,5,3'-L-triiodotironina), juega un papel muy importante en la diferenciación, desarrollo y metabolismo de la mayoría de los tejidos de los vertebrados. Actúa sobre las células diana de su acción a través de receptores nucleares, que son factores de transcripción dependientes de ligando y que pertenecen a la superfamilia de los "receptores nucleares". A ella también pertenecen, entre otros, los receptores de hormonas esteroideas, retinoides y vitamina  $D_3$ . Por tanto,  $T_3$  regula de forma directa la expresión de un número limitado de genes específicos, aquellos que poseen en su promotor un sitio de unión del receptor, lo que finalmente se traduce en cambios en la función celular y las alteraciones fisiológicas propias de dicha hormona. También se ha sugerido que estos receptores pueden alterar la expresión génica a través de su interacción con otros factores de transcripción.

El cerebro es un órgano donde los receptores de  $T_3$  son abundantes y esta hormona ejerce importantes acciones, particularmente al final de la vida fetal y en el periodo perinatal. La ausencia o niveles muy bajos de  $T_3$  durante este periodo crítico puede tener consecuencias muy graves para el cerebro. Así, en humanos, el hipotiroidismo congénito se caracteriza por un profundo retraso mental asociado a otras deficiencias neurológicas, y si no es tratado adecuadamente deja secuelas irreversibles. En la rata, el hipotiroidismo experimental durante el periodo perinatal impide una correcta mielinización y neurogénesis, y provoca alteraciones en el contenido de ADN y proteína (Farsetti, A. et al. 1991).

Uno de los efectos clásicos de la hormona tiroidea es su regulación de la actividad mitocondrial en mamíferos (Brand, M. D. and M. P. Murphy 1987; Hoch, F. L. 1988). La  $T_3$  regula la superficie de la membrana interna, su composición lipídica (con la consiguiente alteración en las propiedades de las proteínas transportadoras mitocondriales), la actividad de la cadena respiratoria, el contenido en citocromos y la síntesis de proteínas mitocondriales. Consecuentemente esto produce un aumento del ritmo de respiración y un incremento en la síntesis y transporte de ATP mitocondrial en animales hipotiroideos tratados con  $T_3$ . Sin embargo, cada tejido responde de una manera diferente y no siempre estos efectos se observan en todos los tejidos. Por

ejemplo estos efectos son muy marcados en tejidos tales como corazón, riñón y músculo esquelético pero no hay descritos efectos claros en cerebro. Aunque el mecanismo por el cual tiene lugar esta regulación aún no está claro, actualmente se piensa que el control de la biogénesis mitocondrial por T3 se lleva a cabo mediante la regulación de la transcripción y traducción tanto de proteínas mitocondriales codificadas en la propia mitocondria como de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo. En términos generales la T3 incrementaría la disponibilidad de las proteínas mitocondriales que intervienen en la cadena de transporte de electrones.

Como acabo de comentar, tradicionalmente se ha pensado que este efecto de T3 sobre la actividad mitocondrial no tenía lugar en el cerebro. Esta idea se ha basado fundamentalmente en experimentos de Schwartz y Oppenheimer (1978) en los cuales no observaron cambios, tras la administración de T3, en el consumo de oxígeno en este tejido, ni en el animal adulto ni durante el desarrollo. Este estudio es limitado ya que solo se comparan animales eutiroides y eutiroides inyectados con T3 y no muestran datos referentes a animales hipotiroideos. Nosotros hemos demostrado recientemente que la expresión del genoma mitocondrial está profundamente alterada en el cerebro de animales hipotiroideos durante el desarrollo y que la administración de hormona tiroidea corrige adecuadamente esta deficiencia. Más recientemente nuestro trabajo indica una deficiencia funcional de la mitocondria y sugiere que son las neuronas, al menos en la corteza cerebral, hipocampo y estriado, el tipo celular blanco de la acción de la T3 (Martinez, B. et al. 2001). Además, las diferencias observadas son siempre entre animales controles e hipotiroideos, y no observamos diferencias significativas entre eutiroides e hipertiroideos, lo cual podría explicar los resultados obtenidos por Schwartz y Oppenheimer. Por tanto la mitocondria podría jugar un papel muy importante en la acción que la hormona tiroidea tiene en el desarrollo del sistema nervioso central. Dado que la expresión génica mitocondrial tarda en normalizarse después del tratamiento con T3 a animales hipotiroideos, y que la mayoría de los efectos de T3 conocidos están mediados por receptores nucleares, es lógico pensar que los mencionados efectos se deben a una regulación por T3 de algún factor necesario para la funcionalidad mitocondrial y que esté codificado en el núcleo. En este trabajo mostramos que la hormona tiroidea regula de una forma directa el factor de transcripción mitocondrial Tfam en el cerebro en desarrollo.

Los estudios para intentar comprender como tienen lugar las interacciones entre núcleo y la mitocondria, han dado lugar al clonaje de varios productos nucleares necesarios para la replicación y transcripción del DNA mitocondrial. Entre estos se encuentran el gen de la subunidad de RNA de la endonucleasa MRP, (Chang y Clayton, 1989) los factores nucleares respiratorios o NRFs (NRF1 y NRF2) (Evans y Scarpulla, 1989; Virvasius y Scarpulla, 1991), y los factores de transcripción mitocondrial TFBM1, TFBM2 y Tfam (Falkenberg, M. et al. 2002; Shoubridge, E. A. 2002). Tfam fue el primer factor de transcripción mitocondrial identificado (Fisher, R. P. and D. A. Clayton 1985) y se ha demostrado que es necesario para una transcripción fiel y eficiente del mtDNA de mamíferos (Fisher, R. P. et al. 1987). Además se ha demostrado que la disrupción del gen Tfam o la disrupción específica de tejido de este gen provoca graves deficiencias en el funcionamiento de la cadena respiratoria y aumenta considerablemente el porcentaje de apoptosis de los embriones que tienen anulado el gen Tfam (Silva, J. P. and N.-G. Larsson 2002; Wang, J. et al. 2001).

El objetivo principal de esta tesis ha sido el estudio del posible papel del factor de transcripción mitocondrial Tfam en la acción de la hormona tiroidea sobre la expresión génica mitocondrial en el cerebro en desarrollo. Para ello hemos analizado la regulación de su expresión (mRNA y proteína) “*in vivo*” en diferentes áreas del cerebro de ratas de 15 días de edad postnatal. Hemos analizado también la regulación de su promotor por T3 en células de neuroblastoma, y hemos ampliado este estudio a la regulación por otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, como 15d-PGJ<sub>2</sub>, vitamina D3 y ácido retinoico. Por último hemos estudiado la regulación del promotor de Tfam por diversas rutas de señalización intracelular.

Hemos demostrado que la T3 regula *in vivo* la expresión de Tfam en el cerebro de ratas de 15 días de edad postnatal. Los niveles, tanto de mRNA como de proteína, están significativamente disminuidos en el cerebro de animales hipotiroideos. En concreto, hemos encontrado que los niveles de expresión de mRNA están alterados en el hipocampo, estriado y tallo cerebral. Estos niveles se recuperan después de 48 horas de tratamiento con T3, sugiriendo por tanto que es esta hormona la responsable de la bajada en los niveles de mensajero de Tfam observada en las ratas hipotiroideas. Los niveles de la proteína Tfam están también disminuidos en todas las zonas estudiadas:

corteza, estriado, hipocampo, cerebelo, tálamo, mesencéfalo y tallo cerebral. Presentamos también evidencias de que esta regulación es directa, ya que el promotor de dicho factor de transcripción se regula por esta hormona. Esta regulación parece ser específica de la isoforma del receptor TR $\beta$ <sub>1</sub>, ya que dicho promotor no responde a TR $\alpha$ <sub>1</sub>. Aunque la mayoría de los resultados los hemos obtenido con células de neuroblastoma TR, la regulación del promotor de Tfam no parece específica del tipo celular, ya que también hemos observado esta regulación en células de origen glial OM5. Los resultados expuestos en esta memoria proporcionan por tanto una base molecular importante para el entendimiento del mecanismo de acción de T3 sobre el cerebro en desarrollo.

En vista de lo comentado anteriormente, nuestros resultados de una regulación del gen Tfam en el cerebro de ratas neonatales sugieren 1) que esta hormona es un regulador muy importante de la biogénesis mitocondrial en el cerebro en desarrollo al regular uno de los factores más importantes para un correcto funcionamiento de dicho orgánulo y 2) que esta regulación podría ser uno de los mecanismos por los cuales T3 regula la funcionalidad del cerebro en desarrollo. Los resultados mostrados en esta tesis de una disminución de los niveles de proteína Tfam en corteza y estriado están de acuerdo con trabajos previos del laboratorio en los cuales mostramos una bajada en la expresión génica y en el funcionamiento de la cadena respiratoria en corteza cerebral y estriado (Martinez, B. et al. 2001) de ratas neonatales de 15 días de edad. Estudiando el efecto del hipotiroidismo sobre la fosforilación oxidativa se vio que en animales hipotiroideos, la tasa de síntesis de ATP en presencia de sustratos que generan NADH como p. ej glutamato/malato, disminuía sólo en la corteza cerebral y en el estriado. Las actividades de los complejos respiratorios I y III estaban también alteradas en estas mismas regiones del cerebro. Esta disminución en la síntesis de ATP y en las actividades de los complejos I y III se correlaciona con una bajada en los niveles generales de los transcritos mitocondriales; en particular ND4, 12S rRNA, 16 S rRNA y Cox III.

Garstka, H. et al. (1994) han mostrado también que en mitocondrias de hígado de vertebrados, la concentración relativa de Tfam juega un papel determinante en la regulación de la expresión del genoma mitocondrial por T3; por lo que postularon que

*in vivo* Tfam sería un factor importante en la acción de dicha hormona en mitocondrias de hígado. En efecto, el nivel de expresión del mRNA de Tfam en hígado aumenta tras el tratamiento de los animales con hormonas tiroideas alcanzando un máximo a las 24 horas de tratamiento. Estos resultados de una inducción en la expresión de Tfam en ratas hipertiroideas apoyan nuestros datos, en los que también hemos visto altos niveles de expresión de Tfam en el cerebro (hipocampo, estriado y tallo cerebral) de ratas hipertiroideas.

Al analizar los niveles de proteína Tfam en ratas hipotiroideas de la misma edad, encontramos que, igual que ocurría con el mRNA los niveles de proteína Tfam estaban significativamente disminuidos en todas las áreas del cerebro estudiadas (estriado, hipocampo, cerebelo, corteza, tálamo, mesencéfalo y tallo cerebral). Curiosamente, en cerebelo encontramos dos bandas con dos tamaños diferentes. Estas dos bandas ya han sido descritas por otros autores (Gensler, S. et al. 2001) y probablemente corresponden a la proforma de Tfam (forma que se encuentra en el citoplasma y que aún conserva el péptido señal de localización mitocondrial) y la banda más pequeña a la proteína mitocondrial que ha perdido dicho péptido. En el caso del cerebelo, es interesante el hecho de encontrar unos niveles elevados de la forma de alto peso molecular, ya que normalmente esta proteína tiene una vida media corta ya que una vez sintetizada pasa inmediatamente a la mitocondria (Clayton, D. A. 1991). Ya que Tfam es un factor de transcripción mitocondrial, obviamente su papel en la regulación de la expresión génica mitocondrial depende en gran medida de su presencia dentro de la mitocondria. Nuestros resultados muestran que, al menos en dos áreas del cerebro: cerebelo y mesencéfalo, los niveles mitocondriales de Tfam están también disminuidos en animales hipotiroideos. Estos datos refuerzan la idea de que en ciertas áreas del cerebro de neonatos, la hormona tiroidea regula la expresión génica mitocondrial a través de su efecto sobre el factor de transcripción Tfam.

Para analizar con más detalle el mecanismo por el cual T3 regula la expresión de Tfam, a continuación realizamos experimentos de transfección transitoria con el promotor de dicho factor de transcripción. Estos estudios se llevaron a cabo fundamentalmente en células de neuroblastoma TR, descritas en Materiales y Métodos. El análisis de la secuencia del promotor de Tfam reveló la existencia de varios

potenciales sitios consensos de unión a T3: TRE1 (-1239/-1212) que es un elemento que contiene un IP3, DR4 y DR6 que solapan entre sí; TRE2 (-1106/-1091) un elemento constituido por un DR4 y TRE3 (-748/-737) un elemento que contiene un DR0 y un IR0 que solapan entre sí. Localizamos también otros posibles TREs, organizados como IR0 (-1180/-1169; -942/-931), DR0 (-873/-862), IP3 (-424/-410), IP2 (-358/-345) o DR6 (-268/-251).

Los estudios de transfección transitoria mostrados en este trabajo demuestran que la T3 estimula la actividad del promotor de Tfam. Esta regulación parece ser ejercida solo a través de la isoforma TR $\beta$ <sub>1</sub>. No podemos descartar sin embargo que, en otros tipos celulares, esta regulación esté también mediada por la otra isoforma del receptor, TR $\alpha$ <sub>1</sub>. Esta regulación diferencial no parece deberse a una baja expresión del receptor TR $\alpha$ <sub>1</sub> al transfectarlo en células TR, ya que una construcción (pXP2 TRE MOMLV) conteniendo un motivo consenso para la unión de los receptores de T3 es capaz de responder a ambas isoformas cuando se transfecta en estas células. A la vista de estos resultados parece también poco probable que la falta de capacidad de TR $\alpha$ <sub>1</sub> para activar el promotor de Tfam en presencia de T3 se deba a la necesidad de determinados coactivadores necesarios para su acción y que se encuentren ausentes en las células TR. Parece ser por tanto que la causa de esta falta de funcionalidad se encuentra en el propio promotor. Experimentos posteriores serán necesarios para elucidar las causas de este fenómeno.

Con respecto a esta regulación diferencial de un promotor por una isoforma específica de receptor de T3, existen muy pocos datos en la literatura. Guissouma, H. et al. (1998) estudiando, los efectos de diferentes isoformas del receptor de T3 ( $\alpha$ <sub>1</sub>,  $\beta$ <sub>1</sub> y  $\beta$ <sub>2</sub>) sobre la actividad del promotor de TRH en el hipotálamo, vieron que su regulación por T3 presenta, como en nuestro caso, una especificidad de isoforma. La inhibición de la transcripción a partir del promotor de TRH estaba mediada sólo por las isoformas  $\beta$ . Igual que lo observado por nosotros, la isoforma TR $\alpha$ <sub>1</sub> no mediaba la respuesta a T3 del promotor de este gen.

El elemento de respuesta a hormona tiroidea parece encontrarse en el fragmento -295/-147, ya que la respuesta transcripcional a T3 se pierde al deleccionar esta zona.

Inicialmente en este fragmento no encontramos ningún elemento “canónico” de respuesta a T3, sin embargo al analizarlo con más detalle encontramos dos secuencias que podrían parecerse a un TRE: DR6 (-268/-251) y DR5 (-200/-184). Curiosamente, el receptor de T3 vacío es capaz también de estimular la actividad de este fragmento cuando se une a un promotor heterólogo. La activación de promotores por receptores vacíos de T3, y también de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, se ha descrito como consecuencia fundamentalmente de fosforilaciones de estos receptores por diferentes rutas de señalización celular (Gaub, M. et al. 1990). Por otro lado, los receptores nucleares también pueden regular la expresión génica a través de mecanismos independientes de su unión a elementos de respuesta a hormona ó HREs, y por lo tanto alterar la expresión de genes que no contienen en su promotor dichos elementos. Muy a menudo estos mecanismos implican una interacción con otros factores de transcripción como por ejemplo AP-1, NFκB, CREB, etc. con los que cooperan positiva o negativamente. Así, mediante interacciones de tipo proteína-proteína, los receptores de estrógenos, ERs, pueden activar la transcripción de genes que contienen sitios AP-1 (Gaub, M. et al. 1990; Petz, et al. 2002).

Nuestros datos parecen indicar que el efecto de T3 está mediado a través de la unión directa de sus receptores a una zona del DNA en el fragmento -295/-147. En concreto a la secuencia: AGGCCGCCGCCGCGGTCC (DR6) o GGGACAGAGGTGGCTCA (DR5). Los experimentos de retardo en gel muestran que TRβ<sub>1</sub> se une al elemento consenso TRE1 y también a los elementos PAR1 (conteniendo el DR6 comentado anteriormente) y PAR3 (conteniendo el DR5 comentado anteriormente), localizados en el fragmento -295/-147. Estos resultados, junto con los experimentos de transfección, sugieren que estas secuencias son las responsables de la respuesta de este fragmento a TRβ<sub>1</sub>. Elementos de respuesta a T3 con muy poca similitud con un elemento consenso se han encontrado en promotores de numerosos genes diana de esta hormona; p.ej en el promotor de la hormona de crecimiento, GH, existe un elemento de respuesta a T3 que está descrito como una superposición de elementos consenso de tipo DR4-IR1 ó DR5-IR1 (Koenig, R. et al. 1987; Brent, G. et al. 1989; Glass, C. et al. 1987). En el caso del gen S14, un gen fuertemente regulado por T3 en tejidos como hígado y tejido adiposo, los elementos de respuesta a T3 presentes en su promotor consisten en las secuencias -2718/-2694; -2632/-2595 y -2582/-2558,

respectivamente denominados FUR10, FUR11 y FUR12. Dichas secuencias tienen muy poca similitud con elementos de respuesta consenso a T3. También, cosa poco común en las secuencias responsables de la respuesta a T3, estos se encuentran muy lejos del sitio de iniciación de la transcripción (Liu, H. C. and H. C. Towle 1994). También se han descrito elementos muy divergentes del consenso para otros receptores nucleares. Por ejemplo en el gen del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (fgf8) Brondani y cols (2002) han caracterizado un elemento de respuesta a ácido retinoico en el que los dos hemisitios están separados por 87 nucleótidos.

Finalmente, aunque el fragmento -295/+1 parece ser el responsable de la regulación por T3 del promotor de Tfam, hay que resaltar también el hecho de que el elemento TRE1 por sí solo es capaz de conferir regulación a esta hormona.

En este trabajo hemos estudiado también el efecto de vitamina D3, prostaglandina J<sub>2</sub> y ácido retinoico, todos ellos ligandos específicos de receptores nucleares, sobre la expresión de Tfam. Como ya se ha mencionado en la Introducción, se detectaron en el promotor de Tfam tres posibles sitios de respuesta a vitamina D3 (VDREs) organizados como IP9 o DR3; siete posibles sitios de respuesta a receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPREs), organizados como DR1 o DR1 invertido y siete posibles sitios de respuesta a ácido todo-trans retinoico (RAREs) organizados como DR2, DR5 o IR0 del motivo hexamérico AGGTCA; además de sitios de respuesta a T3 a los cuales se ha descrito que también se puede unir el RAR (Umesono, K. et al. 1988). Al igual que en el caso de la hormona tiroidea y empleando las mismas construcciones, estudiamos aunque en menor detalle, la respuesta transcripcional de las células TR a los ligandos VD3, 15d-PGJ<sub>2</sub> o AR.

Los resultados obtenidos con los ensayos de transfección transitoria muestran que la vitamina D3 y el ácido retinoico son capaces de inducir la actividad del promotor de Tfam. Los elementos de respuesta a VD3 parecen encontrarse en secuencias localizadas entre los nucleótidos -1275/-757 siendo esencial la existencia simultánea de al menos uno de los dos motivos DR3 junto con el motivo IP9 localizados en ella. Este mecanismo de regulación por VD3 es novedoso ya que es la primera vez que se muestra

---

que VD3 necesita de un elemento adicional IP9, además de su elemento de respuesta consenso DR3, para regular la expresión de sus genes diana.

TRE1, el elemento de respuesta a T3, compuesto por una superposición de elementos consenso: IP3/DR4/DR6, es necesario para conferir regulación por ácido retinoico. Estos resultados se confirman por los obtenidos en los ensayos de retardo en gel en los cuales se muestra que RAR es capaz de unirse a TRE1 con alta afinidad. Por otro lado, entre los nucleótidos -796 y -295 se encontraría otro elemento de respuesta necesario para la acción de ácido retinoico ya que, al deleccionar esta zona se pierde la respuesta a este factor. Como hemos comentados antes, hay muchos datos en la literatura que sugieren que la acción del ácido retinoico puede estar mediada también por la unión de su receptor a elementos de respuesta a T3. En efecto Umesono, K. et al. (1988), estudiando si el receptor de ácido retinoico podía activar la expresión génica a través de un elemento de respuesta a hormona tiroidea, encontraron que el receptor de ácido retinoico no sólo se unía con alta afinidad a elementos de respuesta a T3 (tanto naturales como sintéticos), sino también que era capaz, al igual que el receptor de hormona tiroidea, de inducir la expresión de un promotor quimérico de MTV-LTR (*mouse mammary tumour virus-long terminal repeat*) en el que se ha reemplazado el elemento de respuesta a glucocorticoides por un TRE palíndromo sintético o por el TRE de la hormona de crecimiento de rata.

En el caso de la prostaglandina, hemos observado una disminución de la actividad transcripcional con todas las construcciones del promotor de Tfam, incluso con el fragmento -147/+1 que no conserva ningún potencial PPRE; lo que podría sugerir que la prostaglandina estuviera actuando bien a través de un mecanismo indirecto por su cooperación con algún factor de transcripción o bien a través de su activación de PPAR $\gamma$  que se uniría a una secuencia no descrita como PPRE, entre los nucleótidos -147/+1. En esta zona, se encuentran dos elementos de respuesta a SP1 y un elemento de respuesta al gen temprano Egr-1. Existen datos en la literatura que demuestran que 15d-PGJ<sub>2</sub> suprime la inducción en la expresión de Egr-1 en respuesta a la isquemia en un modelo de fagocitos mononucleares. También el tratamiento *in vivo* con troglitazona, otro ligando de PPAR $\gamma$ , previene la inducción en la expresión de Egr-1 en respuesta a la isquemia (Okada, M. et al. 2002). Además, por datos del laboratorio

sabemos que Egr-1 induce de manera significativa la expresión del promotor de Tfam. Es posible por tanto que, si también en células TR, 15d-PGJ<sub>2</sub> suprimiera los niveles endógenos de Egr-1 y este factor fuera necesario para la actividad de este promotor, dicha prostaglandina pudiera estar reprimiendo en parte la actividad de Tfam de una manera indirecta mediante su regulación de los niveles endógenos de Egr-1. Por supuesto esto es solo una hipótesis que hay que demostrar con posteriores experimentos. Existen también varios datos en la literatura que demuestran una interacción entre el receptor PPAR $\gamma$  y Sp1 en la regulación de varios promotores como el del receptor de membrana del tromboxano, una proteína muy importante en el control de la contracción y proliferación de células de la musculatura lisa vascular, y de PDGF-A y PDGF-B (Sugawara, A. et al. 2002; Zhang, J. et al. 2002). Esta interacción se ha demostrado que es directa. Dado que en algunos casos se ha demostrado que los receptores nucleares no necesitan de su unión al DNA para ejercer sus acciones sino que pueden hacerlo a través de su interacción física con otros factores de transcripción (Delerive, P. et al. 2002), sería también posible que, en la regulación del promotor de Tfam por 15d-PGJ<sub>2</sub> tuviera lugar un mecanismo similar.

Nuestros resultados muestran también que 15d-PGJ<sub>2</sub> disminuye significativamente los niveles de proteína Tfam en células de neuroblastoma HT22. Esta regulación negativa del factor de transcripción mitocondrial Tfam podría tener una importante repercusión en el funcionamiento celular. Recientemente se ha demostrado que embriones de ratones que tienen anulado el gen Tfam, tienen unos niveles de apoptosis superiores a los ratones controles, fenómeno asociado a una grave disfunción en la actividad de la cadena respiratoria y por tanto en la funcionalidad mitocondrial. Estos datos están de acuerdo con la disminución en los niveles de Tfam por 15d-PGJ<sub>2</sub> que se muestra en esta tesis, ya que esta prostaglandina está implicada en la inducción de muerte celular programada en numerosos tipos celulares (Lee, J.-H. et al. 1995; Bishop-Bailey, D. and T. Hla 1999).

La expresión génica está fuertemente regulada en respuesta tanto a señales extracelulares como intracelulares, y la interacción entre ambos es un hecho muy importante en el control de la funcionalidad celular. Al contrario de las pequeñas moléculas lipofílicas que ejercen sus efectos vía receptores nucleares, factores como las

hormonas peptídicas y citoquinas comunican con sus dianas intracelulares a través de los receptores de superficie celular, que activan rutas de transducción de señales que en última instancia conducen a la regulación de la expresión de múltiples factores de transcripción como fos, jun, CREB y muchos otros. Esta regulación está mediada por la fosforilación de dichos factores de transcripción por una kinasa que se activa como resultado de la interacción ligando-receptor en la superficie de la célula. Se ha demostrado que los receptores nucleares también, pueden ser dianas de determinadas rutas de señalización y que su fosforilación es capaz de modular su actividad.

Los receptores nucleares, como ya hemos comentado anteriormente, son factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos en respuesta a la unión de sus ligandos respectivos. Sin embargo, los receptores nucleares pueden también ser mediadores de varias rutas de señalización a través de diversos mecanismos de fosforilación. Esta fosforilación puede tener lugar en cualquiera de los tres dominios de los receptores nucleares: el dominio de activación N-terminal (AF-1), los dominios de unión al ligando y a DNA. A menudo la fosforilación de receptores nucleares por diversas kinasas como cdk7, MAPKs, Akt, PKA, PKC, etc., provoca el reclutamiento de coactivadores o componentes de la maquinaria de transcripción y por consiguiente coopera con el ligando en la activación de la transcripción. Pero también, la fosforilación puede disminuir ó anular la respuesta al ligando bien induciendo la disociación del DNA o la degradación del receptor nuclear o bien disminuyendo la afinidad de unión del ligando, etc. Juge-Aubry, C. E. et al. (1999) describieron que la región 1-92 de hPPAR $\alpha$  contiene un dominio de activación AF-1 susceptible de ser activada por la insulina a través de vías de señalización que involucran las MAP kinasas p42 y 44. Esta inducción por insulina se vio que ocurría tras la fosforilación de dos residuos localizados en las posiciones 12 y 21, los cuales están muy conservados entre distintas especies. Los datos obtenidos por estos autores demuestran que la activación transcripcional de PPAR $\alpha$  por la insulina es mediante la disociación de las proteínas correpressoras N-CoR y SMRT. La fosforilación de receptores de hormona tiroidea juega un papel importante en su actividad y estabilidad, tras la unión de T3. Chen, S. L. et al. (2003) vieron que las MAPKs son capaces de aumentar la capacidad de unión al DNA de los TRs y son las principales kinasas responsables de la fosforilación de estos receptores. La activación de esta vía de las MAPKs antagoniza la degradación de los

TRs inducida por T3 y los dominios implicados son: el dominio bisagra ó dominio D y el dominio de unión del ligando ó dominio E.

Por tanto, con el fin de ampliar los estudios sobre los factores implicados en la regulación por receptores nucleares del gen Tfam, el siguiente paso que nos planteamos fue examinar el posible efecto de varias rutas de señalización extracelular sobre la actividad transcripcional del promotor de Tfam, así como de la interacción de estas rutas de señalización extracelular con la actividad de los receptores nucleares estudiados en este trabajo.

El AMP cíclico es un clásico segundo mensajero, que ejerce sus efectos activando la enzima proteína kinasa dependiente de AMPc (proteína kinasa A o PKA). En su estado inactivo, la proteína kinasa A (PKA) es un complejo formado por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras que unen AMP cíclico. Después de la estimulación por AMPc las subunidades reguladora y catalítica de la PKA se disocian permitiendo la translocación al núcleo de la subunidad catalítica y la consecuente fosforilación de sus genes diana. Los resultados mostrados en este trabajo demuestran que la activación de la vía de PKA tiene como consecuencia que el heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta$ <sub>1</sub> vacío sea capaz de inducir la actividad del promotor de Tfam, convirtiéndole en un potente inductor de la transcripción; y por el contrario esta activación bloquea la inducción por T3. Estos resultados, son contradictorios con los trabajos de Leitman, D y cols. (1996), quienes observaron que en células UP937 la activación de PKA aumentaba la capacidad de respuesta a T3 (hasta 2,5-3 veces) de un plásmido reportero conteniendo un TRE y que, en ausencia de T3, no se detectaba ningún efecto sobre la transcripción de este promotor. Sin embargo estos mismos autores demuestran que la activación de la vía de PKA no tenía ningún efecto sobre la regulación por T3 de este promotor en otras líneas celulares como JEG-3, F9, CV-1, HeLa, L929 y HTC. Estos datos, junto con los mostrados en este trabajo, sugieren que el efecto de la activación de PKA sobre la acción del receptor de T3 puede variar dependiendo del contexto celular, y también probablemente del propio promotor.

El análisis de la interacción entre la vía de señalización de PKA y de otros miembros de la familia de receptores nucleares muestra que la activación de esta ruta

tiene diversos efectos sobre la transactivación de Tfam por AR, VD3 o 15d-PGJ<sub>2</sub>. En estudios de transfección transitorias, observamos que la adición de dibutiril AMPc al medio de cultivo bloquea por completo el efecto de VD3 y no afecta el efecto mediado por AR. Este último dato contrasta con lo observado por Rochette-Egly, C. et al. (1995 y 2000) y Taneja, R. et al. (1997) quienes observan que la estimulación de la vía de PKA potencia el efecto de AR. En el caso de PPAR $\gamma$  el tratamiento de células TR con dibutiril AMPc tampoco afecta el efecto inhibitorio de la prostaglandina J<sub>2</sub>.

PKC es una gran familia de proteínas con estructuras muy relacionadas pero con características ligeramente distintas. Todas las isoformas PKC contienen una región N-terminal reguladora y una región C-terminal catalítica, responsable de la actividad serina/treonina kinasa. Los resultados obtenidos en este trabajo analizando el efecto de activadores de PKC sobre la regulación por receptores nucleares del promotor de Tfam demuestran que la activación de la vía de PKC tiene un efecto inductor sobre la actividad basal del promotor, a diferencia de lo observado con la ruta de la PKA. La incubación con PDBu resulta en una activación de la expresión del promotor de Tfam por el heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta$ <sub>1</sub> vacío y la acción de T3 sobre el promotor Tfam es bloqueada de nuevo por la activación de esta ruta de señalización. En cuanto a la acción de los otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares estudiados, nuestros datos muestran que la activación de esta vía no tiene efecto ninguno sobre la regulación mediada por prostaglandina J<sub>2</sub> y, sin embargo, ejerce un control negativo sobre la acción de VD3 y AR sobre la actividad transcripcional del promotor de Tfam. Este efecto de inhibición de la actividad transcripcional de VDR por activación de PKC también se ha descrito por otros autores (Hsieh, J. et al. 1993), quienes han mostrado que la fosforilación del receptor de VD3 en el residuo de serina S51 disminuye la capacidad de unión del receptor y por consiguiente su actividad.

A continuación, quisimos determinar el efecto de la activación de la ruta de señalización de las MAPKs sobre la regulación de la expresión de Tfam por receptores nucleares. Existen datos en la literatura que sugieren un papel importante en la actividad y estabilidad de receptores nucleares, en concreto de los TRs, que ven su capacidad de unión al DNA aumentada tras su fosforilación inducida via MAPKs (Chen, S et al. 2003). Para estudiar esto tratamos las células con dos conocidos factores de crecimiento

activadores de esta ruta: IGF-I y EGF. Nuestros datos demuestran que la adición de IGF-I o EGF al medio de cultivo de las células, induce de manera significativa la actividad basal del promotor de Tfam y ambos factores, al igual que dibutilil AMPc y PDBu, son capaces de convertir el heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta$ <sub>1</sub> en un inductor transcripcional. Sin embargo el tratamiento de células TR con EGF o IGF-I bloquea la transactivación mediado por T3. Ambos factores de crecimiento sí anulan el efecto activador mediada por VD3 y AR sobre el promotor Tfam. Con respecto al efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, ninguno de los dos factores de crecimiento, EGF o IGF-I, es capaz de modificar el efecto negativo que tiene esta prostaglandina sobre la expresión del promotor de Tfam.

Para analizar en detalle la ruta de señalización de PI-3K, utilizamos un mutante constitutivamente activo de dicha enzima denominado K227E/p110 $\alpha$  (Ahtiok, S. et al. 1999). La PI3 kinasa (PI-3K) es una enzima que fosforila el anillo inositol del fosfatidilinositol en la posición 3 y produce las siguientes moléculas PI-3P, PI-3,4-P2 y PI-3,4,5-P3, las cuales activan varias proteínas kinasas, incluyendo PDK-1, PKB, y  $\alpha$ PKC (Toker, A. and L. C. Cantley 1997). En este trabajo mostramos que la coexpresión de K227E/p110 $\alpha$ , al contrario de lo que sucedía con la interacción con otras rutas de señalización, potencia fuertemente la activación transcripcional mediada por T3. Además, se pudo ver también que PI-3K es capaz de conferir, al igual que el resto de las vías de señalización analizadas, un papel activador de la transcripción al heterodímero RXR $\alpha$ /TR $\beta$ <sub>1</sub> vacío. Nuestros resultados muestran también que PI-3K no sólo es capaz de estimular de manera significativa la actividad basal del promotor de Tfam, sino que también potencia los efectos inductores del ácido retinoico y de la vitamina D3. De nuevo, el mutante K227E no es capaz de revertir el efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub>. La observación de que la activación de PI-3K es capaz de inducir significativamente la actividad basal del promotor de Tfam está de acuerdo con datos presentes en la literatura que demuestran que los ratones deficientes en este factor de transcripción presentan unos niveles de apoptosis en diferentes tejidos significativamente elevados con respecto a los ratones controles (Silva, J. P. and N.-G. Larsson 2002; Wang, J. et al. 2001), ya que normalmente se ha asociado a la activación de la ruta de PI-3K con supervivencia celular. También en este sentido es curioso el

hecho de que la inhibición de la actividad del promotor de Tfam por 15d-PGJ<sub>2</sub> no se vea afectada en modo alguno por ninguna de las rutas de señalización analizadas.

Todos estos datos corroboran y sugieren una vez más la existencia en el promotor del factor Tfam de varias secuencias consenso para determinados factores de transcripción, los cuales serian dianas finales de las diferentes rutas estudiadas y presentadas en esta memoria.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. El hipotiroidismo reduce los niveles tanto de mRNA como de proteína del factor de transcripción mitocondrial Tfam en las regiones de hipocampo, estriado y tallo cerebral del cerebro en desarrollo.
2. Las hormonas tiroideas inducen la expresión del promotor humano de Tfam en células de neuroblastoma. Este efecto es específico de isoforma del receptor, siendo TR $\beta$ 1 la isoforma activa.
3. El efecto inductor de T3 sobre el gen Tfam está mediado por diversos elementos de respuesta a esta hormona (TREs): TRE1 (-1239/-1212), PAR1 (-268/-251) y PAR3 (-200/-184).
4. PAR1 y PAR3 son suficientes para conferir respuesta a T3 del promotor de Tfam.
5. La vitamina D3 y el ácido retinoico inducen la expresión del promotor de Tfam en células de neuroblastoma estando este efecto mediado por elementos de respuesta localizados entre los nucleótidos-1275/-757 y -1180/-1169, respectivamente.
6. La 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandina J<sub>2</sub> inhibe la expresión del promotor de Tfam en células de neuroblastoma y su acción podría estar mediada por algún elemento de respuesta a PPAR $\gamma$  no identificado presente en la secuencia -147/+1, o bien a través de un mecanismo indirecto por la interacción de este receptor con algún otro factor de transcripción.
7. La acción de T3 sobre el promotor Tfam es bloqueada por la activación de las rutas de la PKA, PKC y MAPKs, que a su vez inducen dicho promotor y la actividad del heterodímero vacío RXR $\alpha$ /TR $\beta$ 1.
8. La activación de PI-3K potencia la inducción por T3, AR y VD3 del promotor Tfam.
9. La inducción por AR y VD3 del promotor Tfam es bloqueada por activación de la PKC y MAPKs, mientras que la activación de PKA sólo bloquea la acción de VD3.
10. La represión del promotor de Tfam por 15d-PGJ<sub>2</sub> no se vé afectada por ninguna de las rutas de señalización estudiadas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abel, E. D., M.-E. Boers, et al. (1999). "Divergent roles for thyroid hormone receptor {beta} isoforms in the endocrine axis and auditory system." *J. Clin. Invest.* 104(3): 291-300.
- Altiok, S., D. Batt, et al. (1999). "Heregulin induces phosphorylation of BRCA1 through phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT in breast cancer cells." *J Biol Chem* 274(45): 32274-8.
- Alvarez-Dolado, M., M. Gonzalez-Moreno, et al. (1999). "Identification of a mammalian homologue of the fungal Tom70 mitochondrial precursor protein import receptor as a thyroid hormone-regulated gene in specific brain regions." *J Neurochem* 73(6): 2240-9.
- Alland, L., R. Muhle, et al. (1997). "Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression." *Nature* 387(6628): 49-55.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression." *Physiol. Rev.* 81(3): 1269-1304.
- Attardi, G. and G. Schatz (1988). "Biogenesis of mitochondria." *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 289-333.
- Bangur, C. S., J. L. Howland, et al. (1995). "Thyroid hormone treatment alters phospholipid composition and membrane fluidity of rat brain mitochondria." *Biochem J* 305 ( Pt 1): 29-32.
- Barettino, D., M. M. Vivanco Ruiz, et al. (1994). "Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor." *Embo J* 13(13): 3039-49.
- Berger, J., M. D. Leibowitz, et al. (1999). "Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) gamma and PPARdelta Ligands Produce Distinct Biological Effects." *J. Biol. Chem.* 274(10): 6718-6725.
- Berrodin, T. J., M. S. Marks, et al. (1992). "Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein." *Mol Endocrinol* 6(9): 1468-78.
- Berry, M (1974). "Development of the cerebral neocortex of the rat. In: Studies of the development of behavior and the nervous system. Aspects of neurogenesis. Gottlieb, G., ed . New York: Academic Press. Vol. 2:7-67.
- Bigler, J., W. Hokanson, et al. (1992). "Thyroid hormone receptor transcriptional activity is potentially autoregulated by truncated forms of the receptor." *Mol Cell Biol* 12(5): 2406-17.
- Billings, P. C., R. J. Davis, et al. (1992). "Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA." *Biochem Biophys Res Commun* 188(3): 1286-94.
- Bishop-Bailey, D. and T. Hla (1999). "Endothelial Cell Apoptosis Induced by the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Ligand 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2." *J. Biol. Chem.* 274(24): 17042-17048.
- Brand, M. D. and M. P. Murphy (1987). "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." *Biol Rev Camb Philos Soc* 62(2): 141-93.
- Brand, M. D., D. Steverding, et al. (1992). "The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones." *Eur J Biochem* 206(3): 775-81.

- Brent, G. A., J. W. Harney, et al. (1989). "Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element." *Mol Endocrinol* 3(12): 1996-2004.
- Brondani, V., T. Klimkait, et al. (2002). "Promoter of FGF8 Reveals a Unique Regulation by Unliganded RAR[alpha]." *Journal of Molecular Biology* 319(3): 715-728.
- Burnside, J., D. S. Darling, et al. (1989). "Thyroid hormone regulation of the rat glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter activity." *J Biol Chem* 264(12): 6886-91.
- Cao, S. G., P. Cheng, et al. (1995). "Thyroxine stimulates phosphatidylglycerolphosphate synthase activity in rat heart mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1256(2): 241-4.
- Casas, F., P. Rochard, et al. (1999). "A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis." *Mol Cell Biol* 19(12): 7913-24.
- Cassard-Doulier, A. M., M. Larose, et al. (1994). "In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein." *J Biol Chem* 269(39): 24335-42.
- Clayton, D. A. (1991). "Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA." *Annu Rev Cell Biol* 7: 453-78.
- Craig, E. E., A. Chesley, et al. (1998). "Thyroid hormone modifies mitochondrial phenotype by increasing protein import without altering degradation." *Am J Physiol* 275(6 Pt 1): C1508-15.
- Crofts, L. A., M. S. Hancock, et al. (1998). "Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts." *PNAS* 95(18): 10529-10534.
- Chassande, O., A. Fraichard, et al. (1997). "Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities." *Mol Endocrinol* 11(9): 1278-90.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* 7(8): 2745-52.
- Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." *Nature* 377(6548): 454-7.
- Chen, S. L., Y. J. Chang, et al. (2003). "Mitogen-Activated Protein Kinases Potentiate Thyroid Hormone Receptor Transcriptional Activity by Stabilizing Its Protein." *Endocrinology* 144(4): 1407-1419.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Christianson, T. W. and D. A. Clayton (1986). "In vitro transcription of human mitochondrial DNA: accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectionally." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(17): 6277-81.

- Chun, J. and R. Jaenisch (1996). "Clonal Cell Lines Produced by Infection of Neocortical Neuroblasts Using Multiple Oncogenes Transduced by Retroviruses." *Molecular and Cellular Neuroscience* 7(4): 304-321.
- Dalman, F. C., R. J. Koenig, et al. (1990). "In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90." *J Biol Chem* 265(7): 3615-8.
- Danielian, P. S., R. White, et al. (1992). "Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors." *Embo J* 11(3): 1025-33.
- Delerive, P., K. De Bosscher, et al. (2002). "DNA Binding-Independent Induction of I{kappa}B{alpha} Gene Transcription by PPAR{alpha}." *Mol Endocrinol* 16(5): 1029-1039.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism." *Endocr Rev* 20(5): 649-688.
- Diffley, J. F. and B. Stillman (1991). "A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17): 7864-8.
- Dobbing, J. and J. Sands (1973). "Quantitative growth and development of human brain." *Arch Dis Child* 48(10): 757-67.
- Dreyer, C., G. Krey, et al. (1992). "Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors." *Cell* 68(5): 879-87.
- Dummler, K., S. Muller, et al. (1996). "Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues." *Biochem J* 317 ( Pt 3): 913-8.
- Durand, B., M. Saunders, et al. (1994). "Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity." *Embo J* 13(22): 5370-82.
- Earys, J.T. and S.H. Taylor. (1951). The effect of thyroide deficiency induced by methyl thiouracil on the maturation of the central nervous system. *J. Anat.* 85: 350-8.
- Enriquez, J. A., P. Fernandez-Silva, et al. (1999). "Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone." *Mol Cell Biol* 19(1): 657-70.
- Evans, M. J. and R. C. Scarpulla (1989). "Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences." *J Biol Chem* 264(24): 14361-8.
- Evans, M. J. and R. C. Scarpulla (1990). "NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells." *Genes Dev* 4(6): 1023-34.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, et al. (2002). "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." *Nat Genet* 31(3): 289-94.

- Farsetti, A., T. Mitsuhashi, et al. (1991). "Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain." *J Biol Chem* 266(34): 23226-32.
- Felsenfeld, G., J. Boyes, et al. (1996). "Chromatin structure and gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9384-8.
- Fisher, R. P. and D. A. Clayton (1985). "A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro." *J Biol Chem* 260(20): 11330-8.
- Fisher, R. P. and D. A. Clayton (1988). "Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1." *Mol Cell Biol* 8(8): 3496-509.
- Fisher, R. P., J. N. Topper, et al. (1987). "Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements." *Cell* 50(2): 247-58.
- Fondell, J. D., H. Ge, et al. (1996). "Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8329-33.
- Garstka, H. L., M. Facke, et al. (1994). "Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A." *Biochem Biophys Res Commun* 200(1): 619-26.
- Gaub, M. P., M. Bellard, et al. (1990). "Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex." *Cell* 63(6): 1267-76.
- Gelfand, R. and G. Attardi (1981). "Synthesis and turnover of mitochondrial ribonucleic acid in HeLa cells: the mature ribosomal and messenger ribonucleic acid species are metabolically unstable." *Mol Cell Biol* 1(6): 497-511.
- Gensler, S., K. Weber, et al. (2001). "Mechanism of mammalian mitochondrial DNA replication: import of mitochondrial transcription factor A into isolated mitochondria stimulates 7S DNA synthesis." *Nucleic Acids Res* 29(17): 3657-63.
- Ghivizzani, S. C., C. S. Madsen, et al. (1994). "In organello footprint analysis of human mitochondrial DNA: human mitochondrial transcription factor A interactions at the origin of replication." *Mol Cell Biol* 14(12): 7717-30.
- Giguere, V., M. Shago, et al. (1990). "Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor gamma expressed in the mouse embryo." *Mol Cell Biol* 10(5): 2335-40.
- Glass, C. K., R. Franco, et al. (1987). "A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone." *Nature* 329(6141): 738-41.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." *Genes Dev.* 14(2): 121-141.
- Goglia, F., A. Lanni, et al. (1994). "Interaction of diiodothyronines with isolated cytochrome c oxidase." *FEBS Lett* 346(2-3): 295-8.
- Goglia, F., J. Torresani, et al. (1981). "In vitro binding of triiodothyronine to rat liver mitochondria." *Pflugers Arch* 390(2): 120-4.

- Goldberg, Y., C. Glineur, et al. (1989). "Thyroid hormone action and the erbA oncogene family." *Biochimie* 71(2): 279-91.
- Gong, D. W., Y. He, et al. (1997). "Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin." *J Biol Chem* 272(39): 24129-32.
- Gross, N. J. (1971). "Control of mitochondrial turnover under the influence of thyroid hormone." *J Cell Biol* 48(1): 29-40.
- Guenther, M. G., W. S. Lane, et al. (2000). "A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness." *Genes Dev* 14(9): 1048-57.
- Guerra, C., C. Roncero, et al. (1996). "Triiodothyronine Induces the Transcription of the Uncoupling Protein Gene and Stabilizes Its mRNA in Fetal Rat Brown Adipocyte Primary Cultures." *J. Biol. Chem.* 271(4): 2076-2081.
- Hagiwara, M., A. Alberts, et al. (1992). "Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB." *Cell* 70(1): 105-13.
- Hagiwara, M., P. Brindle, et al. (1993). "Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A." *Mol Cell Biol* 13(8): 4852-9.
- Hamburgh, M., L. A. Mendoza, et al. (1971). "The thyroid as a time clock in the developing nervous system." *UCLA Forum Med Sci* 14: 321-8.
- Hargreaves, A., B. Yusta, et al. (1988). "Triiodothyronine (T3) induces neurite formation and increases synthesis of a protein related to MAP 1B in cultured cells of neuronal origin." *Brain Res* 466(1): 141-8.
- Harper, M. E., J. S. Ballantyne, et al. (1993). "Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation." *Biochem Soc Trans* 21 ( Pt 3)(3): 785-92.
- Hashizume, K. and K. Ichikawa (1982). "Localization of 3,5,3'-L-triiodothyronine receptor in rat kidney mitochondrial membranes." *Biochem Biophys Res Commun* 106(3): 920-6.
- Hashizume, K., M. Kobayashi, et al. (1986). "Dependence of the mitochondrial uptake of triiodothyronine (T3) in rat kidney on cytosolic T3-binding protein." *Endocrinology* 119(3): 1063-70.
- Haussler, M. R., G. K. Whitfield, et al. (1998). "The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed." *J Bone Miner Res* 13(3): 325-49.
- Heinzel, T., R. M. Lavinsky, et al. (1997). "A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression." *Nature* 387(6628): 43-8.
- Herrin, D. L. and G. W. Schmidt (1988). "Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization." *Biotechniques* 6(3): 196-7, 199-200.
- Hoch, F. L. (1988). "Lipids and thyroid hormones." *Prog Lipid Res* 27(3): 199-270.
- Hollenberg, S. M., C. Weinberger, et al. (1985). "Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA." *Nature* 318(6047): 635-41.

- Horlein, A. J., A. M. Naar, et al. (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." *Nature* 377(6548): 397-404.
- Horum, M. A., R. B. Tobin, et al. (1992). "The early triiodothyronine-induced changes in state IV respiration is not regulated by the proton permeability of the mitochondrial inner membrane." *Biochem Int* 28(5): 813-21.
- Horst, C., H. Rokos, et al. (1989). "Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-diiodo-L-thyronine." *Biochem J* 261(3): 945-50.
- Hostetler, K. Y. (1991). "Effect of thyroxine on the activity of mitochondrial cardiolipin synthase in rat liver." *Biochim Biophys Acta* 1086(1): 139-40.
- Hsieh, J. C., P. W. Jurutka, et al (1993). "Phosphorylation of the human vitamin D receptor by protein kinase C. Biochemical and functional evaluation of the serine 51 recognition site." *J Biol Chem* 268(20): 15118-26.
- Huang, E. Y., J. Zhang, et al. (2000). "Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway." *Genes Dev* 14(1): 45-54.
- Hughes, E. N., B. N. Engelsberg, et al. (1992). "Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2." *J. BIOL. CHEM.* 267(19): 13520-13527.
- Inagaki, H., S. Kitano, et al. (1998). "Inhibition of mitochondrial gene expression by antisense RNA of mitochondrial transcription factor A (mtTFA)." *Biochem Mol Biol Int* 45(3): 567-73.
- Izquierdo, J. M. and J. M. Cuezva (1993). "Thyroid hormones promote transcriptional activation of the nuclear gene coding for mitochondrial beta-F1-ATPase in rat liver." *FEBS Lett* 323(1-2): 109-12.
- Izumo, S. and V. Mahdavi (1988). "Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription." *Nature* 334(6182): 539-42.
- Juge-Aubry, C. E., E. Hammar, et al. (1999). "Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain.PG - 10505-10." *J Biol Chem* 274(15).
- Kao, H. Y., M. Downes, et al. (2000). "Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression." *Genes Dev* 14(1): 55-66.
- Kastner, P., A. Krust, et al. (1990). "Murine Isoforms of Retinoic Acid Receptor {gamma} with Specific Patterns of Expression." *PNAS* 87(7): 2700-2704.
- Kato, S., H. Endoh, et al. (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase.PG - 1491-4." *Science* 270(5241).
- Katz, R. W. and R. J. Koenig (1994). "Specificity and mechanism of thyroid hormone induction from an octamer response element." *J Biol Chem* 269(29): 18915-20.
- Kliwer, S., B. Forman, et al. (1994). "Differential Expression and Activation of a Family of Murine Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." *PNAS* 91(15): 7355-7359.

- Koenig, R. J. (1998). "Thyroid hormone receptor coactivators and corepressors." *Thyroid* 8(8): 703-13.
- Koenig, R. J., G. A. Brent, et al. (1987). "Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16): 5670-4.
- Koenig, R. J., M. A. Lazar, et al. (1989). "Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing." *Nature* 337(6208): 659-61.
- Kumar, V., S. Green, et al. (1987). "Functional domains of the human estrogen receptor." *Cell* 51(6): 941-51.
- L'Abbe, D., J. Duhaime, et al. (1991). "The transcription of DNA in chicken mitochondria initiates from one major bidirectional promoter." *J. Biol. Chem.* 266(17): 10844-10850.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Lai, J. C., J. M. Walsh, et al. (1977). "Synaptic and non-synaptic mitochondria from rat brain: isolation and characterization." *J Neurochem* 28(3): 625-31.
- Lanni, A., L. Beneduce, et al. (1999). "Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle." *FEBS Lett* 444(2-3): 250-4.
- Lanni, A., M. De Felice, et al. (1997). "Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart." *FEBS Lett* 418(1-2): 171-4.
- Lanni, A., M. Moreno, et al. (1994). "Specific binding sites for 3,3'-diiodo-L-thyronine (3,3'-T<sub>2</sub>) in rat liver mitochondria." *FEBS Lett* 351(2): 237-40.
- Larkin, S., E. Mull, et al. (1997). "Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone." *Biochem Biophys Res Commun* 240(1): 222-7.
- Lazar, M. A. (1993). "Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities." *Endocr Rev* 14(2): 184-93.
- Lazar, M. A., T. J. Berrodin, et al. (1991). "Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor." *Mol Cell Biol* 11(10): 5005-15.
- Lazar, M. A., R. A. Hodin, et al. (1989). "Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-erbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(20): 7771-4.
- Leary, S. C., K. N. Barton, et al. (1996). "Direct effects of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,5-diiiodothyronine on mitochondrial metabolism in the goldfish *Carassius auratus*." *Gen Comp Endocrinol* 104(1): 61-6.
- Lee, J.-H., H.-S. Kim, et al. (1995). "Induction of p53 and apoptosis by [delta]12-PGJ2 in human hepatocarcinoma SK-HEP-1 cells." *FEBS Letters* 368(2): 348-352.

- Lee, J. W., F. Ryan, et al. (1995). "Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator." *Nature* 374(6517): 91-4.
- Leitman, D. C., C. H. Costa, et al. (1996). "Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 271(36): 21950-5.
- Leroy, P., A. Krust, et al. (1991). "Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid." *EMBO J.* 10(1): 59-69.
- Lindholm, D., E. Castren, et al. (1993). "Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation." *J Cell Biol* 122(2): 443-50.
- Liu, Z., J. Wong, et al. (1999). "Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) enhances ligand-dependent and receptor-dependent cell-free transcription of chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9485-90.
- Maher, P. and J. B. Davis (1996). "The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity." *J. Neurosci.* 16(20): 6394-6401.
- Malloy, P. J., J. W. Pike, et al. (1999). "The Vitamin D Receptor and the Syndrome of Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D-Resistant Rickets." *Endocr Rev* 20(2): 156-188.
- Maniatis, T.; Fritsh, E.F. and K.J. Sambrook. (1982). *Molecular cloning. A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Martinez, B., P. del Hoyo, et al. (2001). "Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. PG - 1054-63." *J Neurochem* 78(5).
- Martino, G., C. Covello, et al. (1986). "Direct in vitro action of thyroid hormones on mitochondrial RNA-polymerase." *Mol Biol Rep* 11(4): 205-11.
- McCulloch, V., B. L. Seidel-Rogol, et al. (2002). "A Human Mitochondrial Transcription Factor Is Related to RNA Adenine Methyltransferases and Binds S-Adenosylmethionine." *Mol. Cell. Biol.* 22(4): 1116-1125.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." *Cell* 108(4): 465-74.
- Mellstrom, B., J. R. Naranjo, et al. (1991). "Independent expression of the alpha and beta c-erbA genes in developing rat brain." *Mol Endocrinol* 5(9): 1339-50.
- Mitsubishi, T., G. E. Tennyson, et al. (1988). "Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(16): 5804-8.
- Mizzen, C. A., X. J. Yang, et al. (1996). "The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity." *Cell* 87(7): 1261-70.
- Montoya, J., G. L. Gaines, et al. (1983). "The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units." *Cell* 34(1): 151-9.

- Montoya, J., A. Perez-Martos, et al. (1997). "Regulation of mitochondrial transcription by mitochondrial transcription factor A." *Molecular and Cellular Biochemistry* 174(1-2): 227-230.
- Morel, G., S. Ricard-Blum, et al. (1996). "Kinetics of internalization and subcellular binding sites for T3 in mouse liver." *Biol Cell* 86(2-3): 167-74.
- Munoz, A., A. Rodriguez-Pena, et al. (1991). "Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression." *Mol Endocrinol* 5(2): 273-80.
- Mutvei, A., B. Husman, et al. (1989). "Thyroid hormone and not growth hormone is the principle regulator of mammalian mitochondrial biogenesis." *Acta Endocrinol (Copenh)* 121(2): 223-8.
- Mutvei, A., S. Kuzela, et al. (1989). "Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone." *Eur J Biochem* 180(1): 235-40.
- Naar, A. M., P. A. Beurang, et al. (1999). "Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation." *Nature* 398(6730): 828-32.
- Nagpal, S., A. Zelent, et al. (1992). "RAR- $\beta$ 4, a Retinoic Acid Receptor Isoform is Generated from RAR- $\beta$ 2 by Alternative Splicing and Usage of a CUG Initiator Codon." *PNAS* 89(7): 2718-2722.
- Nagy, L., H. Y. Kao, et al. (1997). "Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase." *Cell* 89(3): 373-80.
- Nordeen, S. K. (1988). "Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers." *Biotechniques* 6(5): 454-8.
- Nuclear receptors committee (1999). "A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily." *Cell* 97(2): 161-3.
- Oberste-Berghaus, C., K. Zanger, et al (2000). "Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators." *J Biol Chem* 275(3): 1787-92.
- OKADA, M., S. F. YAN, et al. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) activation suppresses ischemic induction of Egr-1 and its inflammatory gene targets." *FASEB J.* 16(14): 1861-1868.
- Oklund, S. and P.S. Timiras. (1977). Influences of thyroid levels in brain ontogenesis in vivo and in vitro. In: Grave, G.D., eds. *Thyroid hormones and brain development*. New York. Raven press, 33-47.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* 270(5240): 1354-7.
- Oppenheimer, J. H., D. Koerner, et al. (1972). "Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney." *J Clin Endocrinol Metab* 35(2): 330-3.
- Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, et al. (1974). "Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis." *Endocrinology* 95(3): 897-903.

- O'Reilly, I. and M. P. Murphy (1992). "Treatment of hypothyroid rats with T2 (3,5-di-iodo-L-thyronine) rapidly stimulates respiration in subsequently isolated mitochondria." *Biochem Soc Trans* 20(1): 59S.
- Owen-Hughes, T., R. T. Utley, et al. (1996). "Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex." *Science* 273(5274): 513-6.
- Palacios-Romero, R. and J. Mowbray (1979). "Evidence for the rapid direct control both in vivo and in vitro of the efficiency of oxidative phosphorylation by 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine in rats." *Biochem J* 184(3): 527-38.
- Palomino, T., D. Baretino, et al. (1998). "Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors.PG - 27541-7." *J Biol Chem* 273(42).
- Paradies, G. and F. M. Ruggiero (1989). "Decreased activity of the pyruvate translocator and changes in the lipid composition in heart mitochondria from hypothyroid rats." *Arch Biochem Biophys* 269(2): 595-602.
- Paradies, G. and F. M. Ruggiero (1990). "Stimulation of phosphate transport in rat-liver mitochondria by thyroid hormones." *Biochim Biophys Acta* 1019(2): 133-6.
- Parrado, A., G. Despouy, et al. (2001). "Retinoic acid receptor  $\alpha$ 1 variants, RAR $\alpha$ 1 $\Delta$ B and RAR $\alpha$ 1 $\Delta$ BC, define a new class of nuclear receptor isoforms." *Nucl. Acids. Res.* 29(24): 4901-4908.
- Perez-Castillo, A., J. Bernal, et al. (1985). "The early ontogenesis of thyroid hormone receptor in the rat fetus." *Endocrinology* 117(6): 2457-61.
- Petty, K. J., Y. I. Krimkevich, et al. (1996). "A TATA binding protein-associated factor functions as a coactivator for thyroid hormone receptors." *Mol Endocrinol* 10(12): 1632-45.
- Petz, L. N., Y. S. Ziegler, et al. (2002). "Estrogen Receptor  $\alpha$  and Activating Protein-1 Mediate Estrogen Responsiveness of the Progesterone Receptor Gene in MCF-7 Breast Cancer Cells." *Endocrinology* 143(12): 4583-4591.
- Pil, P. M. and S. J. Lippard (1992). "Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin." *SCIENCE* 256(5054): 234-237.
- Pillar, T. M. and H. J. Seitz (1997). "Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function." *Eur J Endocrinol* 136(3): 231-9.
- Pipaon, C., A. Santos, et al. (1992). "Thyroid hormone up-regulates NGFI-A gene expression in rat brain during development.PG - 21-3." *J Biol Chem* 267(1).
- Pombo, P. M., D. Baretino, et al. (2000). "Transcriptional repression of neurotrophin receptor *trkB* by thyroid hormone in the developing rat brain.PG - 37510-7." *J Biol Chem* 275(48).
- Porterfield, S. P. and C. E. Hendrich (1993). "The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives." *Endocr Rev* 14(1): 94-106.
- Pruss, D., B. Bartholomew, et al. (1996). "An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres." *Science* 274(5287): 614-7.

- Puigserver, P., G. Adelmant, et al. (1999). "Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking." *Science* 286(5443): 1368-71.
- Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." *Cell* 92(6): 829-39.
- Rabelo, R., C. Reyes, et al. (1996). "Interactions among receptors, thyroid hormone response elements, and ligands in the regulation of the rat uncoupling protein gene expression by thyroid hormone." *Endocrinology* 137(8): 3478-87.
- Rachez, C., B. D. Lemon, et al. (1999). "Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex." *Nature* 398(6730): 824-8.
- Rachez, C., Z. Suldan, et al. (1998). "A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system." *Genes Dev.* 12(12): 1787-1800.
- Ribeiro, R. C., P. J. Kushner, et al. (1992). "Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors." *Mol Endocrinol* 6(7): 1142-52.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP." *Biochem J* 345 Pt 2: 161-79.
- Rochette-Egly, C. (2003). "Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation." *Cellular Signalling* 15(4): 355-366.
- Rochette-Egly, C., S. Adam, et al. (1997). "Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7." *Cell* 90(1).
- Rochette-Egly, C., M. P. Gaub, et al. (1992). "Retinoic acid receptor-beta: immunodetection and phosphorylation on tyrosine residues." *Mol Endocrinol* 6(12): 2197-209.
- Rodriguez-Garcia, M., T. Jolin, et al. (1995). "Effect of perinatal hypothyroidism on the developmental regulation of rat pituitary growth hormone and thyrotropin genes." *Endocrinology* 136(10): 4339-50.
- Rodriguez-Pena, A., N. Ibarrola, et al. (1993). "Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain." *J Clin Invest* 91(3): 812-8.
- Sap, J., A. Munoz, et al. (1986). "The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone." *Nature* 324(6098): 635-40.
- Satav, J. G. and S. S. Katyare (1982). "Effect of experimental thyrotoxicosis on oxidative phosphorylation in rat liver, kidney and brain mitochondria." *Mol Cell Endocrinol* 28(2): 173-89.
- Schneider, J. J. and D. A. Hood (2000). "Effect of thyroid hormone on mtHsp70 expression, mitochondrial import and processing in cardiac muscle." *J Endocrinol* 165(1): 9-17.
- Schonfeld, P., M. R. Wieckowski, et al. (1997). "Thyroid hormone-induced expression of the ADP/ATP carrier and its effect on fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation." *FEBS Lett* 416(1): 19-22.

- Seidel-Rogol, B. L., V. McCulloch, et al. (2003). "Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop." *Nat Genet* 33(1): 23-4.
- Shao, D. and M. A. Lazar (1999). "Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you." *J Clin Invest* 103(12): 1617-8.
- Shao, D., S. M. Rangwala, et al. (1998). "Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma." *Nature* 396(6709): 377-80.
- Shoubridge, E. A. (2002). "The ABCs of mitochondrial transcription." *Nat Genet* 31(3): 227-8.
- Silva, J. P. and N.-G. Larsson (2002). "Manipulation of mitochondrial DNA gene expression in the mouse." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1555(1-3): 106-110.
- Solomon, C., J. H. White, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor alpha." *J Clin Invest* 103(12): 1729-35.
- Sterling, K. and M. A. Brenner (1995). "Thyroid hormone action: effect of triiodothyronine on mitochondrial adenine nucleotide translocase in vivo and in vitro." *Metabolism* 44(2): 193-9.
- Sterling, K., M. A. Brenner, et al. (1980). "Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo." *Science* 210(4467): 340-2.
- Sterling, K., G. A. Campbell, et al. (1984a). "Purification of the mitochondrial triiodothyronine (T3) receptor from rat liver." *Acta Endocrinol (Copenh)* 105(3): 391-7.
- Sterling, K., G. A. Campbell, et al. (1984b). "Mitochondrial binding of triiodothyronine (T3). Demonstration by electron-microscopic radioautography of dispersed liver cells." *Cell Tissue Res* 236(2): 321-5.
- Sterling, K. and P. O. Milch (1975). "Thyroid hormone binding by a component of mitochondrial membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(8): 3225-9.
- Stevens, R. J., M. L. Nishio, et al. (1995). "Effect of hypothyroidism on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase in heart and muscle during development." *Mol Cell Biochem* 143(2): 119-27.
- Strait, K. A., L. Zou, et al. (1992). "Beta 1 isoform-specific regulation of a triiodothyronine-induced gene during cerebellar development." *Mol Endocrinol* 6(11): 1874-80.
- Sugawara, A., A. Uruno, et al. (2002). "Transcription Suppression of Thromboxane Receptor Gene by Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma via an Interaction with Sp1 in Vascular Smooth Muscle Cells." *J. Biol. Chem.* 277(12): 9676-9683.
- Sunn, K. L., T.-A. Cock, et al. (2001). "Novel N-Terminal Variant of Human VDR." *Mol Endocrinol* 15(9): 1599-1609.
- Taneja, R., C. Rochette-Egly, et al. (1997). "Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment." *Embo J* 16(21): 6452-65.
- Tata, J. R., L. Ernster, et al. (1963). "The action of thyroid hormones at the cell level." *Biochem. J.* 86: 408-428.

- Tata, J. R. and C. C. Widnell (1966). "Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones." *Biochem J* 98(2): 604-20.
- Toker, A. and L. C. Cantley (1997). "Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase." *Nature* 387(6634): 673-676.
- Tone, Y., T. N. Collingwood, et al. (1994). "Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor." *J Biol Chem* 269(49): 31157-61.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." *Genes Dev.* 8(10): 1224-1234.
- Tremblay, A., G. B. Tremblay, et al. (1999). "Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1." *Mol Cell* 3(4): 513-9.
- Turchi, J. J., M. Li, et al. (1996). "Cisplatin-DNA binding specificity of calf high-mobility group 1 protein." *Biochemistry* 35(9): 2992-3000.
- Umesono, K., V. Giguere, et al. (1988). "Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element." *Nature* 336(6196): 262-5.
- Valcana, T. And N.L. Eberhardt. (1977). Effects of neonatal hypothyroidism on protein synthesis in the developing brain: An open question. In: Grave, G.D., eds. *Thyroid hormones and brain development*. New York: Raven Press. 271-286.
- Vega-Nunez, E., A. M. Alvarez, et al. (1997). "Neuronal mitochondrial morphology and transmembrane potential are severely altered by hypothyroidism during rat brain development." *PG - 3771-8.* *Endocrinology* 138(9).
- Virbasius, C. A., J. V. Virbasius, et al. (1993). "NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators." *Genes Dev* 7(12A): 2431-45.
- Virbasius, J. and R. Scarpulla (1994). "Activation of the Human Mitochondrial Transcription Factor A Gene by Nuclear Respiratory Factors: A Potential Regulatory Link Between Nuclear and Mitochondrial Gene Expression in Organelle Biogenesis." *PNAS* 91(4): 1309-1313.
- Virbasius, J. V. and R. C. Scarpulla (1991). "Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene." *Mol Cell Biol* 11(11): 5631-8.
- Vivanco Ruiz, M. M., T. H. Bugge, et al. (1991). "Functional characterization of a natural retinoic acid responsive element." *Embo J* 10(12): 3829-38.
- Wang, J., J. P. Silva, et al. (2001). "Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(7): 4038-4043.
- Webster, N. J., S. Green, et al. (1988). "The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function." *Cell* 54(2): 199-207.

- Weinberger, C., C. C. Thompson, et al. (1986). "The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor." *Nature* 324(6098): 641-6.
- Weitzel, J. M., C. Radtke, et al. (2001). "Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat.PG - 5148-55." *Nucleic Acids Res* 29(24).
- Wiesner, R. J., T. T. Kurowski, et al. (1992). "Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle." *Mol Endocrinol* 6(9): 1458-67.
- Williams, G. R. (2000). "Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor beta Isoforms." *Mol. Cell. Biol.* 20(22): 8329-8342.
- Williams, G. R. and G. A. Brent (1992). "Specificity of nuclear hormone receptor action: who conducts the orchestra?" *J Endocrinol* 135(2): 191-4.
- Wolffe, A. P. (1994). "Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription." *Trends Biochem Sci* 19(6): 240-4.
- Wolffe, A. P. (1996). "Histone deacetylase: a regulator of transcription." *Science* 272(5260): 371-2.
- Wong, J., Y. B. Shi, et al. (1995). "A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR beta A gene by the thyroid hormone receptor." *Genes Dev* 9(21): 2696-711.
- Wong, J., Y. B. Shi, et al. (1997). "Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor: hormone-regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation." *Embo J* 16(11): 3158-71.
- Wrutniak, C., I. Cassar-Malek, et al. (1995). "A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver." *J Biol Chem* 270(27): 16347-54.
- Wrutniak-Cabello, C., F. Casas, et al. (2001). "Thyroid hormone action in mitochondria." *J Mol Endocrinol* 26(1): 67-77.
- Wu, Z., P. Puigserver, et al. (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." *Cell* 98(1): 115-24.
- Yen, P. M. (2001). "Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action." *Physiol. Rev.* 81(3): 1097-1142.
- Yu, V. C., C. Delsert, et al. (1991). "RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements." *Cell* 67(6): 1251-66.
- Zelent, A., C. Mendelsohn, et al. (1991). "Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing." *EMBO J.* 10(1): 71-81.
- Zhang, J., M. Fu, et al. (2002). "15-Deoxy-prostaglandin J2 inhibits PDGF-A and -B chain expression in human vascular endothelial cells independent of PPAR[gamma]." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298(1): 128-132.