

ELEMENTS EN CIS RESPONSABLES DE L'ESPECIFICITAT TISSULAR I REGULACIÓ HORMONAL (AMPC) DE LA TRANSCRIPCIÓ DEL GEN UCP

Pilar Yubero, Roser Iglesias, Teresa Mampel, Octavi Viñas,
Francesc Villarroya i Marta Giralt

Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular B.
Departament de Bioquímica i Fisiologia. Universitat de Barcelona.

RESUM

La funció termogènica del teixit adipós marró (TAM) és possible gràcies a la presència d'una proteïna mitocondrial exclusiva, la proteïna descobladora ("uncoupling protein", UCP). L'expressió del gen *ucp*, a més de presentar una regulació teixit-específica, també està sotmesa a una regulació hormonal (principalment via AMPc) i lligada al desenvolupament. El nostre objectiu es centra en l'anàlisi de la regió 5' del gen *ucp* per tal d'identificar elements en cis implicats en la seva regulació transcripcional. Experiments de transfecció transitoria en sistemes heteròlegs (línies cel·lulars establertes HepG2, CHO) de la construcció (-4551)UCP-CAT (que conté 4.5 kb de la regió 5' del gen *ucp* clonades en pBLCAT3) mostren una activitat transcripcional gairebé indetectable. En canvi, aquesta construcció és transcripcionalment activa en transfeccions transitories en un sistema homòleg. Aquest es basa en l'obtenció de preadipòcits aïllats de TAM de ratolí, que són induïts a proliferar i diferenciar-se *in vitro* en adipòcits marrons madurs capaços d'expressar el gen *ucp* endogen, moment en què es realitza la transfecció. Així mateix, (-4551)UCP-CAT respon a l'estimulació per AMPc en aquest cultiu primari. La regulació transcripcional teixit-específica es manté en la construcció (-896)UCP-CAT. S'ha procedit a l'anàlisi "footprint" amb *DNase I* d'aquesta regió (-896/+92) utilitzant extractes de proteïna nuclear de TAM i de fetge. A més de regions protegides per ambdós extractes nuclears, també s'han identificat com a mínim dues regions amb un comportament diferenciat.

INTRODUCCIÓ

L'adipòcit marró és un tipus cel·lular dels mamífers especialitzat en la termogènesi facultativa (1). La capacitat per part de l'adipòcit marró d'expressar el gen de la proteïna descobladora (*ucp*, "uncoupling protein") és una característica fenotípica única d'aquest tipus cel·lular, que el diferencia de tots els altres tipus cel·lulars inclòs l'adipòcit blanc (2). UCP és precisament la proteïna de membrana mitocondrial interna que actua com a desacoblador natural i fa possible l'activitat termogènica del teixit adipós marró (TAM). L'expressió del gen *ucp* està sotmesa a regulació transcripcional, no només en relació a l'especificitat tissular sinó també durant el desenvolupament i per l'acció de l'AMPc i les hormones tiroïdals (3,4,5). Els elements del gen responsables d'aquesta regulació transcripcional són desconeguts.

En el present treball ens hem proposat investigar la presència en la regió 5' del gen *ucp* d'elements *en cis* responsables d'aquests fenòmens de regulació. El fet que no s'hagi pogut establir una línia cel·lular de TAM que expressi el gen *ucp* endogen dificulta l'abordatge

d'estudis funcionals clàssics de l'activitat transcripcional dirigida per la regió 5' del gen. Alternativament, hem desenvolupat la metodologia de transfecció transitòria de cultius primaris d'adipòcits marrons diferenciats *in vitro*. Així mateix, hem posat a punt l'obtenció d'extractes de proteïna de nuclis aïllats de TAM.

MATERIALS I MÈTODES

Plasmidis

A partir del plasmidi (-4551)UCP-CAT, que conté la regió -4551/+116 del gen UCP de rata (6) clonada en pBLCAT3, s'obtingué la construcció (-896)UCP-CAT per digestió amb HindIII aprofitant la diana natural a -896 del gen UCP i la del polilinker en 5'. El plasmidi pRSV- β gal, que conté el promotor RSV dirigint l'expressió de la β -galactosidasa, s'emprà com a control intern d'eficiència de transfecció. pBLCAT3 es va utilitzar com a control negatiu d'activitat transcripcional.

Cultius cel·lulars i transfecció

El cultiu primari d'adipòcits marrons es va realitzar a partir de TAM dels dipòsits interescaular i axil·lar de ratolins Swiss de 3-4 setmanes segons el protocol descrit per Champigny i col. (7). Es procedí a l'aïllament de cèl·lules precursors de l'estroma vascular, que es van sembrar en plaques de 60 mm i foren induïdes a diferenciar-se a adipòcits marrons en un medi DMEM/F12 (1:1) suplementat amb sèrum fetal de vedella (FCS) al 10%, àcid ascòrbic 100 μ M, insulina 20 nM i triiodotironina (T3) 2 nM. Donat que la inducció de l'expressió del gen UCP endogen té lloc al voltant del dies 7-8 de cultiu, els experiments de transfecció transitòria es van realitzar a dia 9 de cultiu. Per a la transfecció s'utilitzà el mètode del fosfat càlcic, emprant 20 μ g de (-4551)UCP-CAT o 10 μ g de (-896)UCP-CAT (per tal d'igualar el nombre de còpies de plasmidi a transfectar) juntament amb 3 μ g del control intern pRSV- β gal, per placa. Les transfeccions es van fer directament sobre la placa durant 4 h. Després es realitzava un "shock" amb glicerol al 10%, dos rentats amb PBS i es tornava a afegir el mateix medi de diferenciació. En els experiments amb AMPc, s'afegia aleshores l'anàleg 8-Bromo-AMPc a una concentració final al medi de 0.5 mM. Les cèl·lules es recol·lectaven 20 hores després. Les transfeccions transitòries de les línies cel·lulars d'hepatoma humà HepG2 i d'ovari de hamster xinès CHO també es van fer utilitzant el mateix mètode i quantitats de plasmidis, només que les cèl·lules es recol·lectaven 48 hores després de la transfecció i la transfecció d'HepG2 es feia amb les cèl·lules en suspensió. El medi de cultiu d'ambdós tipus cel·lulars fou DMEM amb 10% FCS. Les activitats cloramfenicol acetil transferasa (CAT) i β -galactosidasa es van quantificar utilitzant protocols estàndard (8). La comparació de transfeccions independents es va fer assajant quantitats d'extractes cel·lulars equivalents en termes d'activitat β -galactosidasa.

Assaigs de protecció a la DNasa I tipus "footprint"

El DNA es marcà per un sol extrem, utilitzant *ad*CTP-P³² i el fragment Klenow de la DNA polimerasa. Per tal de mapar tota la regió d'interès, es van emprar llocs de restricció que deixen extrems protuberants situats a -608 (*NheI*), -309 (*Sau3A*) i -174 (*SpeI*). Les condicions d'incubació i electroforesi han estat prèviament descrites (9). La seqüenciació es va fer pel mètode de Maxam i Gilbert (8).

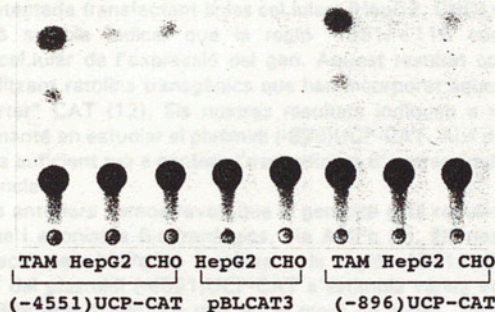
Obtenció d'extractes de proteïna nuclear

L'obtenció d'extractes de proteïna nuclear a partir de teixits de rata (fetge i TAM) es va dur a terme segons el protocol de Gorski i col. (10) amb les modificacions de Landschulz i col. (11).

RESULTATS

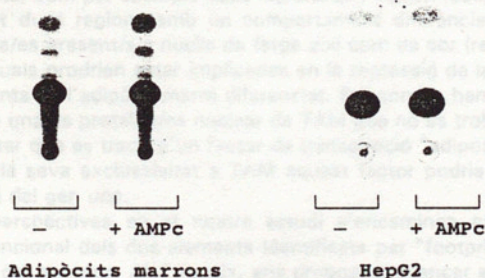
L'expressió dels plasmidis (-4551)UCP-CAT i (-896)UCP-CAT depèn del tipus cel·lular

El resultat obtingut amb els experiments de transfecció transients ens indiquen, en condicions de diferenciació en cultiu, que el funcional element en cis en el gen *ucp* i l'activitat del plasmidi (-4551)UCP-CAT transfectat en adipòcits marrons primaris és superior a la de la mateixa transfecció en les cel·lules HepG2 i CHO que no expressen el gen *ucp* endogen. Això indica que la regió -4551/+1000 conté elements implicats en l'especificitat cel·lular de l'expressió del gen. Aquest resultat concorda amb dades recents obtingudes utilitzant sondes transgèniques que indiquen que la regió dirigim l'expressió del gen "reporter" UCP-CAT (12). Els nostres resultats indiquen que aquesta expressió diferencial es manté en estudiar el plasmidi (-896)UCP-CAT, ja que la regió -896/+92 del gen *ucp* sembla ser més específica que la regió -4551/+1000. Aquest resultat concorda amb els resultats obtinguts amb sondes transgèniques que indiquen que la regió -896/+92 del gen *ucp* sembla ser més específica que la regió -4551/+1000.



L'efecte estimulador de l'AMPC sobre la transcripció del gen *ucp* depèn d'elements *in cis* presents al plasmidi (-4551)UCP-CAT

El resultat obtingut amb els experiments de transfecció transients ens indiquen, en condicions de diferenciació en cultiu, que el funcional element en cis en el gen *ucp* i l'activitat del plasmidi (-4551)UCP-CAT transfectat en adipòcits marrons primaris és superior a la de la mateixa transfecció en les cel·lules HepG2 i CHO que no expressen el gen *ucp* endogen. Això indica que la regió -4551/+1000 conté elements implicats en l'especificitat cel·lular de l'expressió del gen. Aquest resultat concorda amb dades recents obtingudes utilitzant sondes transgèniques que indiquen que la regió dirigim l'expressió del gen "reporter" UCP-CAT (12). Els nostres resultats indiquen que aquesta expressió diferencial es manté en estudiar el plasmidi (-896)UCP-CAT, ja que la regió -896/+92 del gen *ucp* sembla ser més específica que la regió -4551/+1000. Aquest resultat concorda amb els resultats obtinguts amb sondes transgèniques que indiquen que la regió -896/+92 del gen *ucp* sembla ser més específica que la regió -4551/+1000.



La regió -507/-500 del gen *ucp* uneix proteïnes presents específicament a extractes nuclears de TAM mentre que la regió -401/-378 uneix proteïnes presents específicament a extractes nuclears de fetge



DISCUSSIÓ

Els resultats obtinguts amb els experiments de transfecció transitòria ens indiquen, en primer lloc, que s'ha aconseguit la posta a punt d'un sistema cel.lular, adipòcits marrons de ratolí diferenciats en cultiu, per a l'estudi funcional d'elements *en cis* en el gen *ucp*. L'activitat del plasmidi (-4551)UCP-CAT transfectat en adipòcits marrons primaris és vàries vegades superior a la detectada transfectant línies cel.lulars (HepG2, CHO) que no expressen el gen *ucp* endogen. Això sembla indicar que la regió -4551/+116 conté elements implicats en l'especificitat cel.lular de l'expressió del gen. Aquest resultat concorda amb dades recents obtingudes utilitzant ratolins transgènics que han incorporat aquesta regió dirigint l'expressió del gen "reporter" CAT (12). Els nostres resultats indiquen a més que aquesta expressió diferencial es manté en estudiar el plasmidi (-896)UCP-CAT. Així doncs, la regió -896/+92 del gen *ucp* sembla suficient per a conferir l'especificitat d'expressió d'aquest gen en els adipòcits marrons diferenciats.

Estudis anteriors demostraven que el gen *ucp* està regulat a nivell transcripcional per la noradrenalina i agonistes β -adrenèrgics, via AMPc (4). Els nostres resultats indiquen que aquesta regulació per AMPc es localitza a la regió -4551/+92 del gen *ucp*. L'activitat transcripcional del plasmidi (-4551)UCP-CAT s'estimula vàries vegades respecte la basal en presència de 8-bromo-AMPc 0.5 mM en el medi de cultiu. Aquesta resposta a l'AMPc és independent de l'especificitat tissular, ja que es detecta tant en transfeccions transitòries d'adipòcits marrons diferenciats com de cèl.lules HepG2.

Donat que els nostres resultats suggerien l'existència d'elements *en cis* a la regió -896/+92 responsables de l'expressió teixit-específica del gen *ucp*, vam procedir a l'anàlisi d'aquesta regió mitjançant la tècnica de protecció a la DNasa tot comparant extractes de proteïna nuclear de TAM i de fetge. A més de regions protegides per extractes nuclears d'ambdós teixits, com per exemple dues regions que lliguen factors de transcripció C/EBP (8), hem identificat dues regions amb un comportament diferenciat. La regió -401/-378 uneix una/es proteïna/es present/s a nuclis de fetge així com de cor (resultats no mostrats) però no de TAM, les quals prodrien estar implicades en la repressió de la transcripció del gen *ucp* en cèl.lules diferents de l'adipòcit marró diferenciat. Per contra, hem identificat una regió (-507/-500) que lliga una/es proteïna/es nuclear de TAM que no es troba a nuclis de fetge. Si bé no podem descartar que es tracti d'un factor de transcripció "adipocitari" en general, en cas que es demostrés la seva exclusivitat a TAM aquest factor podria estar implicat en l'activació transcripcional del gen *ucp*.

Les perspectives en el nostre estudi s'encaminen cap a la determinació de la importància funcional dels dos elements identificats per "footprint" en l'especificitat tissular de l'expressió del gen *ucp*. Així mateix, ens proposem avançar en el mapatge funcional de la regió 5' del gen *ucp* amb l'objectiu d'identificar els elements *en cis* responsables de la regulació transcripcional per AMPc del gen.

REFERÈNCIES

- 1.- Nicholls,D.G., Cunningham,S.A., Rial,E. (1986) in *Brown Adipose tissue* (Trayhurn, P. and Nicholls, D.G., eds) pp. 52-85, Edward Arnold Publ. London
- 2.- Ricquier,D., Raimbault,S., Champigny,O., Miroux,B., Bouillaud,F. (1992) *FEBS Lett.* 303, 103-106.
- 3.- Giralt,M., Martin,I., Iglesias,R., Viñas,O., Villarroya,F., Mampel,T. (1990) *Eur. J. Biochem.* 193, 297-302
- 4.- Ricquier,D., Bouillaud,F., Toumelin,P., Mory,G., Bazin,R., Arch,J., Penicaud,J.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 13905-13910.
- 5.- Tuca,A., Giralt,M., Villarroya,F., Viñas,O., Mampel,T., Iglesias,R. (1993) *Endocrinology* 132, 001-008.
- 6.- Bouillaud,F., Raimbault,S., Ricquier,D. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 783-792.
- 7.- Champigny,O., Holloway,B.R., Ricquier,D. (1992) *Mol. Cell. Endocrinol.* 86, 73-82.
- 8.- Giralt,M., Yubero,P., Manchado,C., Iglesias,R., Viñas,O., Mampel,T., Villarroya,F. *J. Biol. Chem.*, submitted
- 9.- Ausubel,F.M. *et al.*, Eds. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 1 i 2. John Wiley & Sons, Inc. Nova York.
- 10.- Gorski,K., Carneiro,M., Schibler,U. (1986) *Cell* 47, 767-776.
- 11.- Landschulz,W.H., Johnson,P.F., Adashi,E.Y., Graves,B.J., McKnight,S.L. (1988) *Genes & Dev.* 2, 786-800.
- 12.- Dr. Daniel Ricquier, comunicació personal