



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES ENCAMINADOS A DILUCIDAR
EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA 3,5-DIYODOTIRONINA (3,5-T₂) EN
TELEÓSTEOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ARTURO MENDOZA CISNEROS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. AUREA OROZCO RIVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. BRENDA ANGUIANO SERRANO, INB
DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO, Facultad de Medicina

MÉXICO MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Evolutiva del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión de la Dra. Aurea Orozco Rivas.

El apoyo financiero fue provisto por las siguientes fuentes: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT), beca doctoral: 227955 y donativo 166357; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT) donativos IN208511 e IN201614).

Agradecimientos

A mi tutora Aurea Orozco Rivas por su apoyo y guía en la realización de mis estudios de doctorado

Al Dr. Valverde por su revisión crítica de mi tesis doctoral

A los miembros de mi comité tutor Dra. Brenda Anguiano y Dra. Luz Navarro por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis doctoral

A los miembros del jurado de examen de grado, Dr. Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Jean Louis Charli, Dr. Alfonso León del Rió, Dra. Susana Castro Obregón.

A mis compañeros de laboratorio Paty, Gaby, Pamela, Aurora, Miguel por su apoyo en el desarrollo de los experimentos

Al la UNAM y al PDCB por crear la oportunidad para seguir con mi desarrollo académico

A mi familia y amigos por el apoyo emocional y camaradería mi mamá Jesús María, mi papá Arturo, mis hermanos Laura Julissa, Janet, César, mi novia Adriana y amigos, Jimena, Juan Carlos, Pepe, David, Dany, Silvia, Mario, Alex, Franco, Aida, Ángeles Edith, Minerva

A Dr. Herbert Samuels por su apoyo durante mi estancia en NYU Langone Medical Center

Finalmente agradezco a mis lectores por su tiempo y por su estudio crítico de mi tesis

Agradecimientos por apoyo técnico: Patricia Villalobos Aguilera, apoyo en técnico en el laboratorio; Leonor Casanova Rico, apoyo administrativo; Lourdes Lara, apoyo en videoconferencia; Ramón Martínez, apoyo en sistemas computacionales; Anaid Antaramian, apoyo en unidad de proteogenómica, Michael Jeziorski, apoyo en unidad de proteogenómica, Miguel Maqueda, asistencia en el laboratorio

Índice

Resumen	3
Abstract	4
Abreviaturas	5
Introducción	7
1 Antecedentes Generales	8
1.1 Receptores nucleares, sus orígenes y sus ligandos	8
2 Receptores de hormonas tiroideas,	10
2.1 Importancia fisiológica	10
2.1.1 Funciones gen-especificas	11
2.1.2 Metamorfosis	13
2.1.3 Neurogénesis	16
2.1.4 Metabolismo energético	19
2.2 Regulación de los TR	20
2.3 Resistencia a hormonas tiroideas	20
2.4 Arreglo estructural y funcional de los TR	22
2.4.1 NTD	23
2.4.2 El DBD	24
2.4.3 El domino D ó región bisagra	26
2.4.4 El LBD	26
2.4.5 El domino F	28
2.4.6 Dimerización de los TR	29
2.4.7 Modificaciones post-traduccionales de los TR	30
2.5 Elementos de respuesta a hormonas tiroideas	31
2.6 Mecanismo de acción de hormonas tiroideas	33
2.6.1 Correguladores	37
2.6.2 Coactivadores	39
2.6.3 Correpresores	41
3 Antecedentes Específicos	43
3.1 La 3,5-diyodotironina es una TH bioactiva	43
3.2 La T2 tiene efectos extranucleares	43
3.3 Efectos genómicos de la 3,5-diyodotironina	45
4 Planteamientos del proyecto	48
4.1 Justificación	48
4.2 Hipótesis	48
4.3 Objetivos	48
5 Materiales y métodos	49
5.1 Clonación de los TRs de tilapia	49
5.2 Ensayos de transactivación usando transfección transitoria	49
6 Resultados	51
6.1 Artículo publicado	52
6.2 Figuras suplementarias	63

7	Discusión	64
8	Conclusiones	69
9	Referencias	70

Resumen

La unión de la triyodotironina (T3) a los receptores de hormonas tiroideas (TRs) es el paso crucial en la regulación de la expresión de los genes modulados por esta hormona. Los TRs se encuentran unidos al promotor de los genes cuya expresión se modula positivamente por T3; en ausencia de este ligando reclutan correpresores, mientras que en su presencia unen coactivadores, los cuales regulan la tasa de síntesis de RNA de los genes blanco. Estudios recientes en nuestro grupo de trabajo han mostrado que la 3,5-diyodotironina (T2), hormona que se produce a través de la desyodación del anillo externo de la T3, es capaz de conservar la expresión eutiroidea de distintos genes T3-dependientes. Además, la T2 induce la formación de un complejo de proteínas nucleares sobre un elemento de respuesta a hormonas tiroideas canónico distinto al que induce T3, sugiriendo que T2 y T3 interactúan con TRs distintos. Más aun, la T2 estimula el crecimiento de teleósteos. Juntos, estos resultados indican que la T2 es una hormona tiroidea con un rol fisiológico, al menos en teleósteos que ejerce sus efectos sobre la transcripción de genes TH-dependientes a través de su interacción con un TR alternativo. El objetivo de la presente tesis fue el identificar los TRs que se expresan en el hígado de tilapia para su posterior caracterización molecular. Así, identificamos dos isoformas del TR β 1 que difieren entre sí por la presencia de un inserto de nueve amino ácidos en el dominio de unión al ligando presente en la isoforma L-TR β 1 pero no en la isoforma S-TR β 1. Además, ambas isoformas son 75 amino ácidos más cortas en el dominio N-terminal (NTD) con respecto al TR β 1 de humano. El L-TR β 1 fue capaz de activar un gen T3-reportero en presencia de T3 y T2 mientras que el S-TR β 1 solo lo activó en presencia de T3. También observamos que la activación del L-TR β 1 mediada por T2 pero no por T3 requiere del NTD del L-TR β 1. Más aún, el L-TR β 1 activa al gen reportero a concentraciones de T2 menores que las de T3, lo cual indica que T2 es un ligando más eficiente para este TR en particular. Dadas estas características, proponemos que T2 podría aumentar la afinidad del TR por ciertos coactivadores o bien podría reclutar coactivadores distintos a los que se reclutan en presencia de T3, lo cual podría contribuir a comprender mejor la pleiotropía funcional de las hormonas tiroideas.

Abstract

The binding of triiodothyronine (T3) to the thyroid hormone receptors (TRs) is the critical first step for gene expression modulation by thyroid hormones (THs). TRs are bound to the promoter of positively T3-modulated genes and in the absence of T3 recruit corepressors, while in the presence of the hormone; they bind coactivators, which modulate the rate of RNA synthesis. All biological effects of TH are attributed to T3. However, recent studies in our work group have shown that 3,5-diiodothyronine (T2) is able to maintain euthyroid expression of different T3-regulated genes. Furthermore, T2 induces the formation of a nuclear protein complex to the canonical TH response element distinct from the one induced by T3, suggesting that T2 and T3 interact with different TRs. Moreover, T2 administered in sub-physiological concentrations stimulates growth of teleosts. Together, these results indicate that T2 is a TH with a physiological role in teleosts and exerts its effects upon transcription of T3-regulated genes through interacting with an alternative TR in teleosts. The interest of the present thesis was to identify and molecularly characterize the TRs expressed in the liver of tilapia. Two isoforms of the TR β 1 were identified; both differ by the presence or not of an insert of nine amino acids in the ligand binding domain of the L-TR β 1 isoform but not the S-TR β 1 isoform. Additionally, both isoforms are 75 amino acids shorter in the N-terminal domain (NTD) as compared to the human-TR β 1. L-TR β 1 was able to activate a T3-reporter gene in the presence of T2 while the S-TR β 1 only activated the reporter gene in the presence of T3. We also observed that the activation of L-TR β 1 mediated by T2 but not T3 requires of the NTD of the L-TR β 1. Furthermore, L-TR β 1 activated the reporter gene at lower concentrations of T2 than those of T3, which indicates that T2 is a more efficient ligand for this particular TR. Given these characteristics, we propose that T2 could increase the affinity of the TR for certain coactivators or could recruit different coactivators from those recruited in the presence of T3, explaining in part the functional pleiotropia of THs.

Abreviaturas

3 β diol	3 β - androstanediol
ABCD2	“ATP binding cassette sub-family D2”
AF1	Función de activación 1
AF2	Función de activación 2
apo-TR α 1	Receptor de hormonas tiroideas α 1 no ligado
BAT	Tejido adiposo pardo
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CARM	Metil transferasa de arginina asociada a coactivadores
CBP	Proteína de unión a CREB
CKI	Caseína cinasa 1
cMyc	Miembro de la familia de protooncogenes Myc c
CoR	Correpresores
Cre	Tirosina recombinasa
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta de cAMP
CTE	Extensión carboxilo terminal
D1	Desyodasa tipo 1
D2	Desyodasa tipo 2
D3	Desyodasa tipo 3
DAD	Dominio de actividad desacetilasa
DBD	Dominio de unión al DNA
Dio1	Desyodasa tipo 1
DR4	Repetido directo 4
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
GC-1	Tiromimético selectivo para TR β
GRTP1	“Growth hormone regulated TBC protein”
Gsta	Glutathion S transferasa alfa
HAT	Acetil transferasa de histona
HDAC	Desacetilasa de histona
HMT	Metil transferasa de histona
Holo-TR	Receptor unido a la hormona
hTFIIB	Factor de transcripción humano IIB
IP6	Palíndrome invertido 6
KI	“Knock inn”
KO	“Knock out”
LBD	Dominio de unión al ligando
LBP	Saco de unión al ligando
NCoR	Correpresor de receptores nucleares
NLS	Secuencia de señalización nuclear

NR	Receptor nuclear
NTD	Dominio amino terminal
nTRE	Elemento de respuesta a hormonas tiroideas negativo
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MMI	Metimazol
mRNA	RNA mensajero
p160	Proteína 160
PAL	Palindromico
PAS-B	Dominio PAS-B
PKA	Proteína Cinasa A
PRMT	Proteína arginina metil transferasa
Pol II	RNA polimersa II
PTM	Modificaciones postraduccionales
RAR	Receptor de acido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
RTH	Resistencia a hormonas tiroideas
RXR	Receptor de retinoides X
SMRT	Mediado de silenciamiento de receptores de hormonas tiroideas y ácido retinoico
siRNA	silenciador de RNA
SRC	Coactivador de receptores a esteroides
SUMO	Small ubiquitin related modifier
SWI/SNF	“SWItch/Sucrose Non Fermentable”
T2	3,5-diyodotironina
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TBL1	“Transducin b-like 1”
TH	Hormonas tiroideas
THRA	Receptor de hormonas tiroideas alfa
THRB	Receptor de hormonas tiroideas beta
TRAP	“Thyroid hormone receptor associated protein”
TRE	Elemento de respuesta a hormonas tiroideas
TRH	Hormona liberadora de tiotropina
TRs	Receptores de hormonas tiroideas
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
UCP1	Proteína desacoplante 1
WD40	Proteína presente en los complejos correpresores

Introducción

Las hormonas tiroideas (TH) son mensajeros endocrinos yodados esenciales para el desarrollo y funcionamiento normal de los vertebrados. Las TH son sintetizadas y secretadas a la circulación por la glándula tiroidea. La tiroxina (T4) es el principal producto de secreción de ésta glándula, sin embargo, la T3 es la hormona a la que le reconocen los efectos nucleares debido a que es hasta 100 veces más afín a los receptores de hormonas tiroideas (TRs) que la T4. Los TRs modulan la expresión de los genes T3-responsivos en ambos sentidos, positiva ó negativamente, según el gen blanco, el tejido y la etapa del desarrollo del organismo, además de ser responsables de la pleiotropía funcional de las TH (Ferreira Azevedo et al., 2008; Orozco and Valverde-R, 2005; Munoz and Bernal, 1997; Fondell, 2013). Recientemente, se ha planteado que algunos ligandos no canónicos pueden ejercer funciones específicas a través de receptores nucleares; así, el ácido litocólico y el 3 β diol son ligandos de receptores a vitamina D y estrógenos, respectivamente y realizan funciones de importancia fisiológica (Ferreira Azevedo et al., 2008; Makishima et al., 2002; Weihua et al., 2001). En este contexto, en nuestro grupo de trabajo se propone que la 3,5-diyodotironina (T2), una TH generada por la desyodación de T3, es un ligando de los TRs. Diversos estudios han mostrado que la T2 tiene efectos sobre la regulación de la tasa de respiración mitocondrial en mamíferos y que su efecto es más rápido que el observado con T3, además no requiere de síntesis de proteínas *de novo*. Por lo anterior, varios autores han concluido que el efecto de la T2 es no-genómico, posiblemente a través de su unión a la subunidad Va del citocromo-c (Hassan and Koh, 2008; Goglia, 2005; Moreno et al., 2002, Arnold et al., 1998).

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que la T2 modula la expresión de genes T3-dependientes en teleósteos. En conjunto, nuestros datos indican que la T2 es una TH bioactiva con un papel fisiológico que ejerce sus efectos a través de un TR. En esta tesis se estudió el mecanismo de acción a través del cual la T2 regula la transcripción de genes T3-dependientes. Para este fin, inicialmente identificamos dos isoformas del receptor de hormonas tiroideas β 1 en el hígado de teleósteos las cuales se caracterizaron en ensayos de transactivación en cultivos celulares para analizar el efecto de T3 ó T2 sobre la expresión de un gen T3-reportero. Posteriormente realizamos estudios de estructura-función para analizar la importancia de distintos dominios funcionales del TR en la activación de la transcripción mediada por T2.

1. Antecedentes Generales

1.1 Receptores Nucleares. Sus Orígenes y sus Ligandos

Los receptores nucleares (NR) son una superfamilia de proteínas que funcionan como factores de transcripción activados por ligando. Los NR se expresan en los principales grupos de metazoarios y tienen un amplio espectro de actividad biológica regulando la expresión de sus genes blanco positiva o negativamente. Los NR están involucrados en diversos procesos asociados a la diferenciación y desarrollo de los vertebrados, además de artrópodos y posiblemente en platelmintos (**Figura 1**) (Asadi et al., 2008; de Mendonca et al., 2000). Hasta ahora se han identificado 48 NR en el genoma humano, los cuales incluyen receptores ligados (con un ligando endógeno identificado), huérfanos (sin un ligando endógeno identificado), y huérfanos adoptados (con uno o varios ligandos endógenos o exógenos más recientemente identificados).

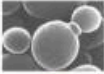
	Organism	Features	Number	Role		
	 Fungi	Cell wall Uni- and Multi-cellular	0 NR	None		
Animals	Metazoans	Porifera	No Tissues No Organs	1-2 NRs	Environmental Sensor	
		Trichoplax	Various Cell Types Multiple Cell Layers	4 NRs		
	Cnidarians	Coral	Tissues Innate Immunity Sensory Organs Digestive System	10 NRs	Endocrine Receptor	
		Sea Anemone	Multiple Germ Layers Neuromuscular System	17 NRs		
	Bilaterians	Nematodes	Nervous System Excretory System Endocrine System	27-270 NRs*		
		Insects	Brain Circulatory System Respiratory System	~21 NRs		
		Vertebrates	Fish	Skeleton Adaptive Immunity		~70 NRs**
			Mammals	Lactation Homeothermic Integumentary System		~48 NRs

Figura 1. Evolución de los receptores nucleares (NRs): relación con la complejidad morfológica de los organismos. Se muestra el número de genes para NR y su rol propuesto en varios organismos representado las diferentes taxones. Tomado de: Sladek, 2011.

Todos ellos juegan un papel central en la capacidad del organismo para transducir la señal de las hormonas endocrinas lipofílicas y retinoides además de esteroides y tiroideas, entre otros mensajeros (Bochukova et al., 2012; Germain et al., 2006).

La habilidad para unir ligandos con alta especificidad es una de las principales características de los NR. Hasta ahora el origen del binomio receptor-ligando se comprende como un proceso de evolución adaptativa concertada o coevolución. Se considera que en el caso de los mensajeros que se producen a través de una ruta metabólica (neurotransmisores, hormonas tiroideas), los genes de la ruta de síntesis y los de los receptores han coevolucionado. En contraste, otras vías de señalización en las que no están involucrados los NR, como es el caso de las hormonas de naturaleza proteínica, se ha propuesto que los genes que codifican para el receptor y la hormona han evolucionado de manera conjunta (Markov et al., 2008)

Los ligandos de los NR se caracterizan por lo siguiente: *i*) no están codificados en el genoma; son moléculas lipofílicas pequeñas [200-1000 ångströms (Å)]; *ii*) ingresan directamente a la célula pasiva- o activamente; *iii*) provienen de la dieta o bien, del medioambiente y/o de precursores metabólicos y, *iv*) generalmente, se absorben en el tracto gastrointestinal. Los registros fósiles indican que los ligandos conocidos de los NR surgieron billones de años antes que los mismos receptores. Además, las enzimas que participan en la síntesis y metabolismo de algunos ligandos como la citocromo P450 se expresan en todos los organismos vivos incluyendo eubacterias y arqueobacterias. Estas evidencias sugieren que los ligandos de los NR preceden a los receptores nucleares (Sladek, 2011). Se ha propuesto que los ligandos primordiales pudieron ser moléculas que los organismos más antiguos utilizaron para “sensar” las condiciones del medio ambiente a través de un receptor nuclear ancestral. Dado que los NR son ubicuos en todos los metazoarios, es posible que esta característica haya jugado un papel crucial en su evolución (Sladek, 2011) Así, la regulación genética ligando-dependiente es posiblemente un mecanismo fisiológico muy antiguo y/o “primitivo” presente en los ancestros comunes de procariontes y eucariontes (Markov et al., 2010; Markov and Laudet, 2011). La capacidad para producir ligandos con alta afinidad y especificidad para un NR pudo haber evolucionado a través de la selección de rutas de síntesis para moléculas que tenían un fuerte efecto positivo en la fisiología animal y así se convirtieron en hormonas sintetizadas

endógenamente (Markov and Laudet, 2011; Markov et al., 2010). Es posible que el NR ancestral haya sido un sensor de lípidos, una molécula que unía con afinidad micro molar diferentes tipos de compuestos hidrofóbicos que pudieron ser componentes de la dieta de los primeros metazoarios. A través de su interacción con una amplia variedad de ligandos, este sensor habría sido capaz de transferir como actividad transcripcional el sutil balance metabólico en las respectivas cantidades de varios compuestos (Markov and Laudet, 2011).

2. Receptores de Hormonas Tiroideas

2.1 Importancia Fisiológica

El origen de los receptores de hormonas tiroideas (TR) puede rastrearse hasta los metazoarios más antiguos de los cuales se conoce la secuencia del genoma. Se han identificado ortólogos de los TRs en platelmintos, moluscos, crustáceos, equinodermos y anfibios, lo cual sugiere que estos receptores se originaron de un TR ancestral común de los *Bilateria* (**Figura 2**) (Wu et al., 2007). Sin embargo, la información disponible hasta ahora sugiere que la capacidad para unir hormonas tiroideas (THs), particularmente T3 (la TH bioactiva), es exclusiva de los TR de vertebrados. No obstante, las THs tienen efectos sobre la diferenciación, maduración y metabolismo en distintas especies de invertebrados, incluyendo cnidarios, equinodermos y artrópodos, aún cuando estas especies no tienen la capacidad para sintetizar a estas hormonas (Flatt et al., 2006). En efecto, la capacidad para sintetizar TH se ha identificado principalmente en vertebrados. Sin embargo, en urocordados (*Ciona intestinalis*), cephalocordados (anfibio) e incluso en no-cordados como el erizo de mar se ha observado síntesis de TH y el metabolismo activo de las mismas semejante al observado en vertebrados (Paris, M., et al 2010). Si el sistema tiroideo es una innovación de los vertebrados aún se desconoce, principalmente debido a que su estudio está limitado a unas cuantas especies.

En vertebrados existen dos genes para TRs: *THRA* y *THRB* (Wu et al., 2007). Ambos genes derivan de un sólo TR ancestral, y se generaron durante los dos eventos de duplicación del genoma descrito en vertebrados. Los dos genes se han mantenido prácticamente sin cambios y presentan una identidad superior al 60 % en todas las secuencias de nucleótidos disponibles hasta ahora (Ensembl) (Wu et al., 2007). Cada gen de TR genera dos isoformas principales: TR α 1, TR α 2, TR β 1 y TR β 2, cuyo patrón de

expresión es específico para cada tejido, etapa del desarrollo e historia de vida del organismo. Además y dependiendo del contexto en el que regulan la expresión de genes TH-responsivos, cada isoforma tiene una relevancia fisiológica particular. Estas conclusiones están sustentadas principalmente por estudios en animales transgénicos donde se observan fenotipos distintos para el *knock-out* (KO) del *THRA* y el *THRB*, o el doble KO. Mientras que el TR α es crucial en el desarrollo posnatal y la función cardiaca, el TR β controla principalmente es desarrollo del oído interno, la retina, el metabolismo en hígado y los niveles de TH. Sin embargo, a la fecha existen dificultades para dissociar los efectos de uno y otro gen ya que ambos juegan un papel crucial en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y, en consecuencia, en los niveles circulantes de TH.

De hecho, los perfiles de expresión tejido-específica sugieren roles funcionales para cada gen, estando el *THRA* asociado a procesos de metabolismo energético y funcionamiento normal del sistema nervioso central (Gil-Ibanez et al., 2013); mientras que el *THRB* participa principalmente en procesos de maduración y diferenciación celular. Si los dos genes para TR desempeñan roles redundantes y más aún, si los dos son imprescindibles para la supervivencia del organismo, es un asunto controvertido ya que existen evidencias que respaldan todas las posibilidades sin excluir ninguna.

Cada una de las funciones en las cuales participan los TRs por sí sola sería material de una tesis doctoral completa. Sin embargo, aquí solo se mencionan algunas de ellas a fin de proveer un contexto fisiológico y facilitar la comprensión conceptual de la importancia funcional de contar con un mecanismo molecular modulado por múltiples factores.

2.1.1 Funciones gen-específicas. Independientemente de su similitud estructural, las funciones de los TRs son muy diferentes. Esta divergencia funcional puede obedecer a los distintos patrones de expresión de uno y otro gen; o a las diferentes propiedades intrínsecas de los receptores. Así, estudios en células C17.2 transfectadas con TR α 1 o TR β 1 muestran repertorios diferentes de genes diana que no se explican por la ocupación diferencial de promotores TH-responsivos (Chatonnet et al., 2013).

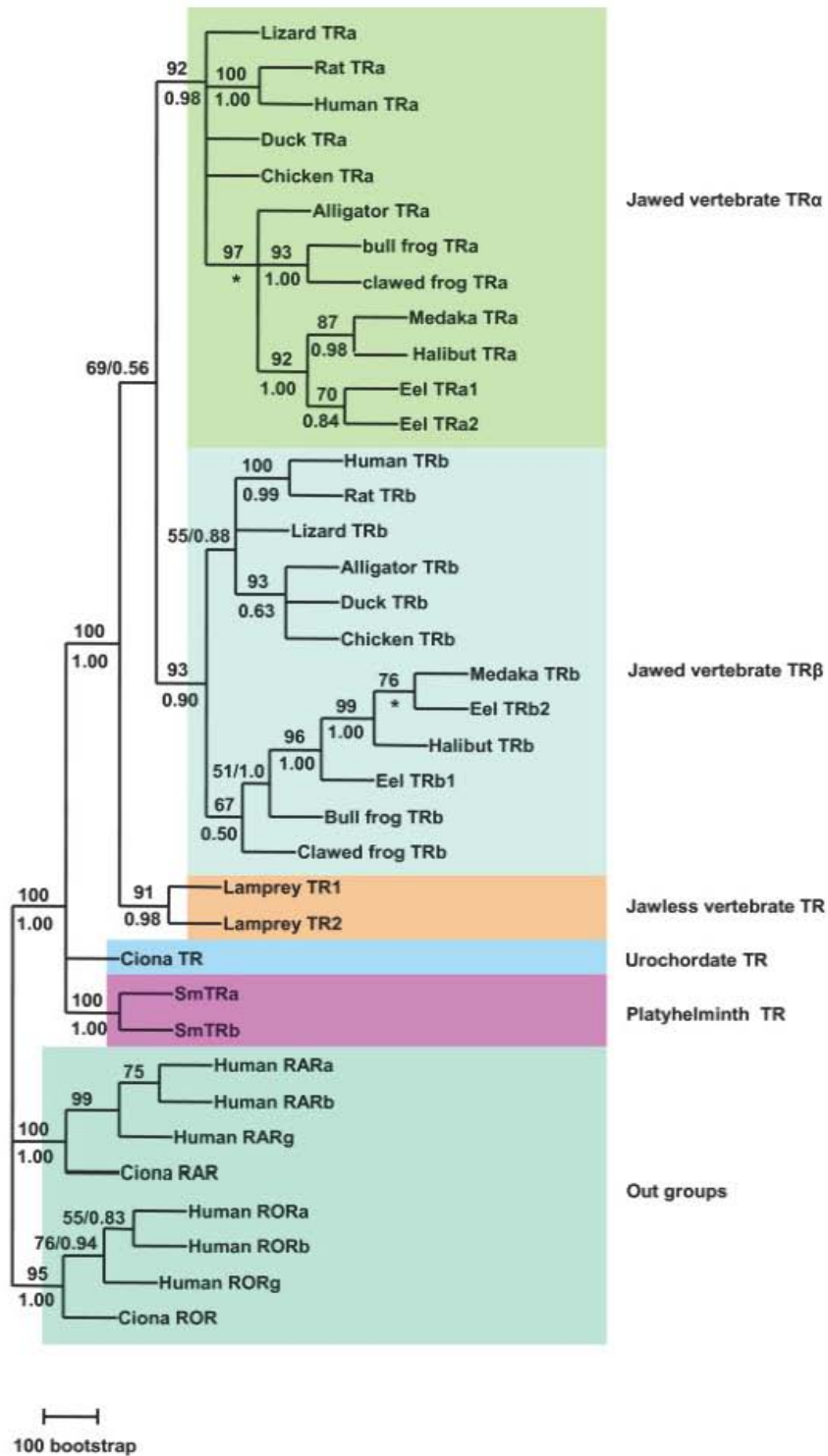


Figura 2. Árbol filogenético de máxima probabilidad derivado de las secuencias de amino ácidos del DBD y LBD. La relación filogenética entre TRs se examinó por el método de máxima probabilidad e interferencia bayesiana. Tomado de: Wu et al., 2007.

No obstante la modulación diferencial de genes, TR α 1 y TR β 1 pueden tener efectos antagónicos sobre la expresión de un mismo gen en función de la etapa del desarrollo. Así, el gen ABCD2, que codifica a una proteína asociada a la adrenoleucodistrofia neonatal, se regula a la alta en etapas tempranas del desarrollo por niveles elevados de T3 y TR α 1, mientras que en la etapa adulta disminuye la T3 y aumenta la expresión de TR β 1 lo cual reprime la expresión del gen ABCD2 en el hígado de rata (Weinhofer et al., 2008). La potencia de cada isoforma de TR para regular la expresión de un gen blanco también juega un papel importante en la modulación de la respuesta a hormonas tiroideas. Así, estudios en células HepG2 transfectadas con TR α 1 ó TR β 1 muestran una respuesta transcripcional específica para cada isoforma sobre un gen T3-reportero y también sobre distintos genes T3-responsivos identificados utilizando micro-arreglos (Chan and Privalsky, 2009). Estos resultados sugieren que la intensidad de la respuesta a T3 puede adaptarse individualmente a los requerimientos del organismo. La ingeniería genética ha permitido dilucidar varias de las funciones gen-específicas para los TR. Utilizando el sistema CRE/loxP para insertar un TR α 1 modificado que no permite la unión de coactivadores con actividad de acetilasa de histonas (ver sección 2.6), se reproducen varios efectos del hipotiroidismo en tejidos que principalmente expresan TR α 1, sugiriendo que en ausencia de ligando el TR α 1 es responsable de gran parte de los efectos de este estado tiroideo. En contraste, animales KO para *THRB* muestran un fenotipo distinto caracterizado principalmente por niveles altos de TSH, ceguera al color, sordera y metabolismo del colesterol alterado (Flamant and Quignodon, 2010). Por lo tanto, el hipotiroidismo y la falta de expresión de TRs en el doble KO generan fenotipos distintos.

2.1.2 Metamorfosis. Debido a su expresión tiempo y tejido específica, los TRs y las THs juegan un papel fundamental en la historia de vida de todos los vertebrados. La metamorfosis es sin duda uno de los procesos biológicos más espectaculares en los cuales participan los TRs. Este proceso se ha descrito en teleósteos y anfibios y se ha documentado extensamente en los peces lenguado (*Hippoglossus hippoglossus* y *Epinephelus coioides*) el atún (*Thunnus orientalis*) y las ranas (*Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*). En todos los casos, los perfiles de expresión de los TRs se modifican de manera tejido-específica en función de las distintas etapas de la historia de vida de cada

especie. En *X. laevis*, y como se ilustra en la **Figura 3**, la expresión del TR α 1 aumenta después de la eclosión y alcanza su punto máximo después de la etapa 45 del renacuajo en tejidos metamórficos como: cola, branquias y cerebro (Wang et al., 2008). En contraste, la expresión del TR β 1 aumenta significativamente a partir de etapas pre-metamórficas en estos mismos tejidos y de manera paralela con el incremento en la concentración de T3 circulante (**Figura 3**) (Wang et al., 2008). Estudios en animales transgénicos que expresan constitutivamente al TR β 1 activo mostraron que este TR *per-se* induce cambios morfológicos similares a los inducidos por el tratamiento con THs en ranas pre-metamórficas, por lo que los TRs parecen ser suficientes para iniciar y mantener el programa de metamorfosis en ranas (Das et al., 2010).

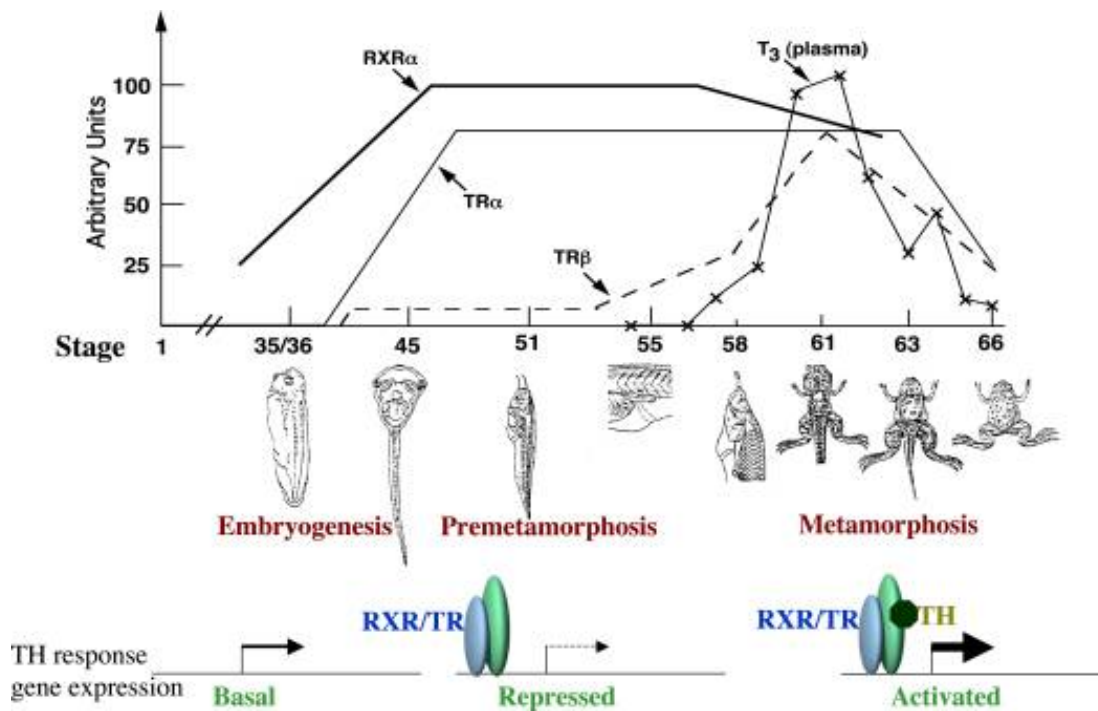


Figura 3. Un modelo funcional dual de los TRs en el desarrollo de la rana. Durante la embriogénesis, los genes TH-responsivos se expresan a niveles basales en ausencia de TH para facilitar el desarrollo de los órganos embrionarios. Después de la eclosión de renacuajos en la etapa 35/36, incrementa la expresión de TR α 1, alcanzando sus niveles máximos por la etapa 45 cuando los renacuajos empiezan a alimentarse. RXR α también se expresa en altas concentraciones en esta etapa, el heterodímero TR/RXR se unen a los genes TH-responsivos y reprimen su expresión debido a la falta de TH, así aseguran el crecimiento apropiado del renacuajo y previniendo la metamorfosis prematura. Cuando los niveles endógenos de TH se incrementan después de la etapa 55, los heterodímeros activan los genes TH-responsivos, como el TR β 1 lo cual dirige hacia la metamorfosis. Tomado de: Das et al., 2010.

Aun en el mismo tejido, los TRs responden de manera distinta al tratamiento con T3 (Johnson and Lema, 2011). El uso de ligandos sintéticos selectivos para TR α 1 o TR β 1 ha permitido diseccionar sus efectos en el mismo tejido. En *X. laevis* la neurogénesis en los núcleos ventricular y subventricular del hipotálamo es dependiente de THs hasta la etapa media-pre-metamórfica, posteriormente se vuelve refractaria a T3. Este proceso puede ser inducido de forma experimental con ligandos sintéticos selectivos del TR α 1 pero no del TR β 1, lo cual indica que es un proceso dependiente de TR α 1 (Denver et al., 2009).

En contraste con otros vertebrados, algunos peces expresan dos genes para el *THRA* generándose dos isoformas del TR α 1 que se conocen como TR α a y TR α b, respectivamente. En el pez lenguado *Epinephelus coioides* se clonaron tres isoformas de los TRs que exhiben un patrón de expresión característico (niveles de mRNA) durante las distintas etapas del desarrollo. Al final de la embriogénesis aumentan TR α a y TR β 1 mientras que TR α b permanece constante. Además, el incremento de TR β 1 es significativamente mayor. Este incremento al final del desarrollo embrionario coincide con la extensa organogénesis y neurogénesis del pez y precede al desarrollo de la segmentación corporal; la aparición de las cápsulas ópticas y la subsecuente formación de la cápsula auditiva y del tubo neural. Los TRs juegan un papel crítico durante estos procesos mediando los efectos de las THs de origen materno, ya que, como en otros vertebrados, la glándula tiroidea de los embriones aun no es funcional (Tang et al., 2008). En el pez *Thunnus orientalis*, se detectaron T3 y T4 en embriones justo antes de la eclosión que subsecuentemente aumentan en la postflexión (último estadio larval ó juvenil temprano). En este pez el cambio de larva a juvenil es un proceso de metamorfosis que al igual que en anfibios implica distintos cambios morfo-funcionales que le permiten al organismo adaptarse y sobrevivir en determinados ambientes. A partir del día 5 post-eclosión ó etapa E (la notocorda aún no esta flexionada) en *T. orientalis* se observan folículos tiroideos funcionales, pero los niveles de T3 y T4 permanecen igual a los del embrión hasta que aumentan en la etapa N (los rayos en las aletas dorsal, caudal y anal están completos) con una cantidad mayor de T4 que T3. Simultáneamente ocurre un aumento en la expresión de TR β 1 y TR α b en la etapa N, mientras que TR α a permanece constante a excepción de un aumento durante la preflexión ó etapa E (Kawakami et al., 2008a). Estos datos sugieren

que al igual que en anfibios, en los teleosteos las hormonas tiroideas son importantes para iniciar y culminar el proceso metamórfico entre la etapa larval y juvenil.

La larva pelágica del *H. hippoglossus* sufre una extensa remodelación durante la metamorfosis que incluye la pérdida de la simetría bilateral externa y genera un juvenil bentónico con ambos ojos en el mismo lado pigmentado del cuerpo. Estos cambios fenotípicos se acompañan de diferentes modificaciones bioquímicas y funcionales entre las que destacan el intercambio de los tipos de globina y queratina, y la producción de nuevas isoformas de proteínas musculares (Galay-Burgos et al., 2008). En el organismo completo se ha observado un incremento en los niveles de T4, T3, y en la expresión de TR α 1, TR β 1 y de la desyodasa tipo 2 (D2: cataliza la activación de T4 a T3) durante las etapas tempranas de la metamorfosis; mientras que la expresión de la desyodasa tipo 3 (D3: cataliza la inactivación de las THs) decae al final de la metamorfosis. En ambos periodos los niveles de expresión de D2 y D3 correlacionan directamente con la actividad enzimática y el aumento en los niveles de T3. Estos cambios son paralelos al aumento en la expresión de TR β 1 y TR α 1 lo cual muestra nuevamente la relación del sistema tiroideo con la metamorfosis en el lenguado (Isorna et al., 2009). En *Senegalese sole* se encontró una isoforma más del TR β 1 que incluye 60 pb en dirección 5' del inserto de 27 pb en el dominio de unión al ligando (ver adelante: sección 6 y 7), ambas isoformas aumentan de forma paralela al aumento de T4 durante la metamorfosis (**Figura 4**). (Manchado et al., 2009).

2.1.3 Neurogenesis. Las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo y diferenciación celular del cerebro en todos los vertebrados y su ingreso al encéfalo esta finamente regulado por su transporte a través de distintas barreras. De manera sobre simplificada, la TH circulante tiene que cruzar las regiones luminal y abluminal de la membrana plasmática de las células endoteliales (microcapilar cerebral). Recuérdese que la barrera hematoencefálica está formada no solo por el apretado epitelio de la microvasculatura cerebral, también por astrocitos que envuelven los microcapilares. Así, una vez que abandona el lecho vascular, la TH ahora tiene que ingresar al astrocito pasando a través de su membrana plasmática. Ya en el astrocito, la T4 puede ser desyodada para producir hormona activa y esta T3 abandonará al astrocito e ingresará ahora a las neuronas o los oligodendrocitos donde se une al TR y ejerce sus funciones reguladoras de la transcripción (**Figura 5**) (Schweizer and Kohrle, 2013). Los TRs pueden

modular la proliferación y diferenciación de los precursores neuronales y también afectan la neurogenesis en el adulto. Igualmente, los TRs regulan la proliferación, maduración y desarrollo del linaje de oligodendrocitos, a través de la represión de c-Myc y ciclina-D1 junto con un incremento de caceina cinasa 1 (CKI) (Pascual and Aranda, 2013).

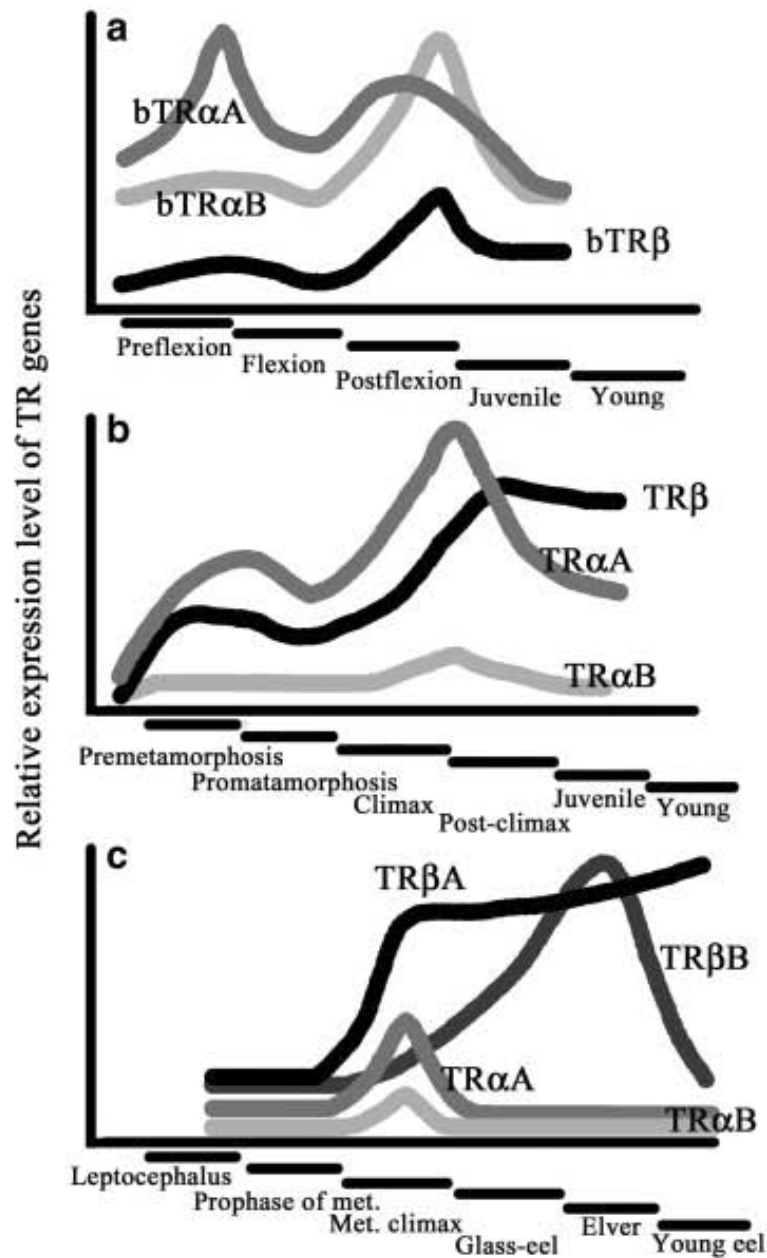


Figura 4. Cambios en la expresión de los genes de TR durante el desarrollo de teleósteos. A) *Thunnus orientalis* b) *Paralichthys olivaceus* TR genes c) *Conger japonicus*. Tomado de: Kawakami et al., 2008a.

En la retina de mamíferos, específicamente en los conos, el TR β 2 controla el patrón de expresión del foto pigmento opsina a partir del día 10 embrionario y decae después del nacimiento (Ng et al., 2009). En ratones *THRB*^{-/-} solo se observa síntesis de opsina de baja longitud de onda en los conos. Además, los ratones KO para el factor de transcripción NeuroD1 no expresan TR β 2 y esta inhibición se revierte al inducir la expresión de NeuroD1 que interactúa con una región intergénica del *THRB* y modula la expresión de TR β 2 (Liu et al., 2008). Recientemente se identificó una mutación del TR α 1 que reduce diez veces su afinidad por T3 y genera un TR α 1 con un potente efecto dominante negativo que previene la inducción de genes T3-responsivos y resulta en un hipotiroidismo cerebral parcial. Los animales con esta mutación muestran un patrón normal de desarrollo pero en la etapa adulta exhiben conducta ansiosa-depresiva que mejora al tratarlos con T3, sin embargo, el déficit locomotor no responde al tratamiento. Estos resultados revelan distintos mecanismos fisiopatológicos inducidos por el TR α 1 dominante negativo (Pilhatsch et al., 2010) y que la proporción entre las isoformas que unen o no T3, TR α 1 y TR α 2, respectivamente, juegan un rol crucial en la modulación del efecto final de T3. Al evaluar la expresión de distintos

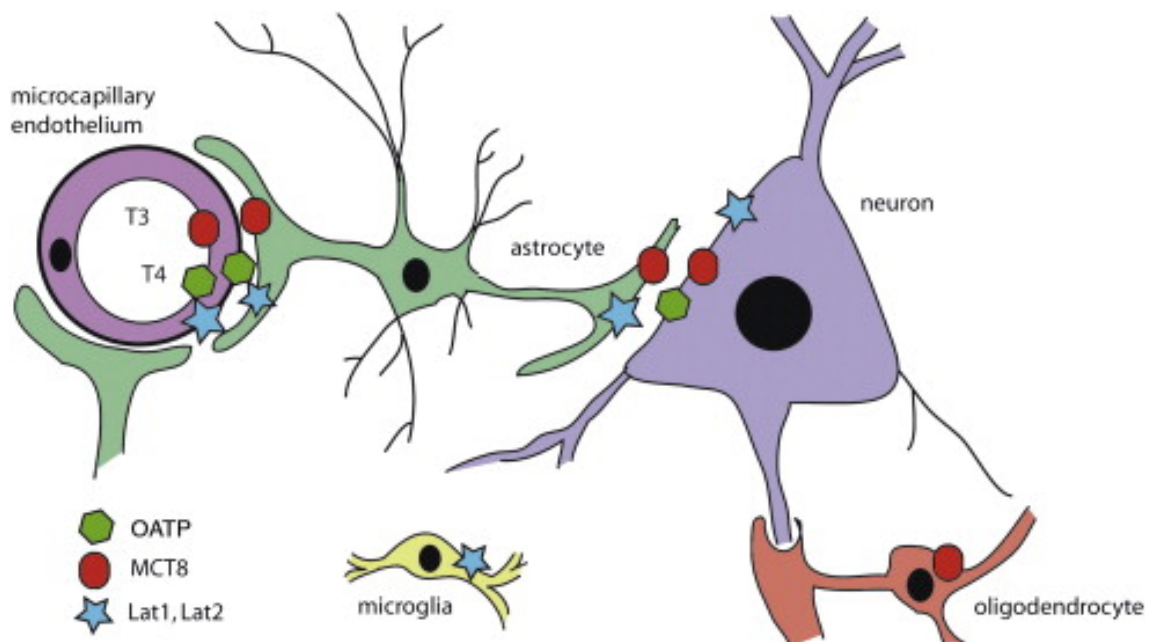


Figura 5. Expresión de los transportadores de THs en las células del cerebro. En su camino del lumen microcapilar al núcleo celular diana, las moléculas de TH tienen que cruzar varias membranas; las membranas luminal y abluminal de las células endoteliales, la membrana del astrocito, y las membranas de las neuronas, oligodendrocitos y microglia. Los transportadores pueden expresarse de forma diferencial en diferentes regiones del cerebro y núcleos individuales. Tomado de: Schweizer and Kohrle, 2013.

genes T3-responsivos en el estriado y la corteza de ratones $TR\alpha^{-/-}$ ó $\beta^{-/-}$ ó $\alpha\beta^{-/-}$, se corroboró el papel del TR no ligado durante la maduración del sistema nervioso central, además de que se observó una mayor potencia del $TR\alpha1$ en la regulación negativa de genes T3-responsivos (Gil-Ibanez et al., 2013).

2.1.4 Metabolismo Energético. El metabolismo energético está estrechamente relacionado con la función tiroidea. El exceso de THs (hipertiroidismo) se caracteriza por un estado metabólico acelerado que incluye, entre otras alteraciones, lipólisis exagerada; pérdida de peso, incremento en la síntesis y excreción de colesterol hepático y niveles bajos de colesterol circulante. En contraste, el déficit de THs (hipotiroidismo) se acompaña de los efectos opuestos (Liu and Brent, 2010).

La homeostasis térmica es una de las principales funciones metabólicas de las TH en los mamíferos e implica la generación de calor o activación de la termogénesis facultativa o adaptativa en el tejido adiposo pardo (BAT). Esta activación esta mediada por la respuesta concertada o sinérgica de los sistemas simpatoadrenal y tiroideo que a través de receptores adrenérgicos y $TR\alpha1$ y $TR\beta2$, respectivamente, estimulan la actividad de la D2, así como la lipólisis y la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1) en las mitocondrias del BAT (Liu and Brent, 2010). Los ratones $TR\alpha^{-/-}$ son incapaces de activar este mecanismo y además son intolerantes al frío. Más aún, estos animales son hiperfágicos y su ingesta calórica está aumentada. Sin embargo, y en contraste con ratones silvestres, no aumentan de peso en respuesta a la dieta alta en grasa. Además, las concentraciones circulantes de T3 están elevadas debido al aumento en la expresión de D1 y D2 (Pelletier et al., 2008). Por el contrario, los animales que expresan el $TR\alpha1$ dominante negativo que no une T3 muestran reducción significativa del tejido adiposo blanco y menor tamaño del hígado; así como decremento en la expresión de enzimas lipogénicas y del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma. Mientras que los animales que expresan el $TR\beta1$ modificado dominante positivo ($TR\beta1PV$ KI) muestran el fenotipo contrario (Araki et al., 2008). Estos datos sugieren que los apo- $TR\alpha1$ y $\beta1$ tienen roles distintos en el metabolismo normal de lípidos y que ambas isoformas contribuyen a la patogénesis del metabolismo de lípidos en el hipotiroidismo.

En este contexto, recientemente se han identificado una isoforma corta del TR en mitocondria. Este TR se ha asociado con un incremento en el metabolismo mitocondrial, además de prevenir la apoptosis en un proceso independiente de transcripción *de novo* (Saelim et al., 2007). Los TRs se unen a elementos de respuesta a hormonas tiroideas en el genoma de la mitocondria y modulan la expresión de las proteínas de la cadena respiratoria. Así se explica la mayor parte de los efectos de las THs en el metabolismo energético y la fosforilación oxidativa, no obstante también se han identificado efectos biológicos de estas hormonas independientes de los TRs, por ejemplo a través de receptor membranal integrina alfa V beta 3 (Psarra and Sekeris, 2008).

2.2. Regulación de los TR.

La regulación de los genes que codifican para los TRs está dada por múltiples factores que modulan la expresión de cada isoforma. Sin embargo, el principal modulador de su expresión es el propio ligando. Durante la ontogenia de distintos vertebrados se ha observado un incremento de T4 y/o T3 circulante acompañado paralelamente con un aumento en la expresión de los TRs. Como se mencionó antes, el desarrollo de los vertebrados está estrechamente relacionado con la presencia de las THs y su depleción farmacológica [metimazol (MMI)] impacta la expresión de los TRs, afectando el funcionamiento normal del organismo tanto en la ontogenia como en la vida adulta. Estudios en peces muestran que el tratamiento con dosis suprafisiológicas de THs reprimen la expresión de los TR mientras que el hipotiroidismo farmacológico (MMI) aumenta su expresión y el cotratamiento con MMI+THs previene el efecto del hipotiroidismo farmacológico inducido por el goitrogeno. (Galay-Burgos et al., 2008; Das et al., 2010; Williams, 2008; Garcia-G et al., 2007; Kawakami et al., 2008b). En humanos se han caracterizado elementos de respuesta a hormonas tiroideas en el gen de *THRB* lo cual explica el efecto del ligando sobre la expresión del receptor (Sakurai, A. et al., 1992).

2.3 Resistencia a hormonas tiroideas.

La principal causa de la resistencia a hormonas tiroideas (RTH) es una mutación en el gen *THRB* la cual genera un TR con afinidad menor por T3 o con una habilidad dañada para interactuar con correguladores. Los perfiles tiroideos de los pacientes con RTH junto con la caracterización molecular de los TRs mutados han permitido aumentar el

conocimiento a cerca del mecanismo de acción de los TRs. Hasta ahora se han identificado 123 mutaciones en el gen *THRB* en pacientes con RTH generalmente asociado a un incremento en los niveles circulantes de T3 y T4. La RTH puede ser generalizada o exclusivamente pituitario en función de la región del *THRB* mutada, ya que la hipófisis expresa principalmente TR β 2 (Kim et al., 2007). Todas las mutaciones descritas a la fecha se encuentran en el dominio de unión al ligando (ver sección 2.4). Además de no ser funcionales, los TR β mutados inhiben la activación de las otras isoformas de TRs. El efecto dominante negativo resultante de los receptores mutados explica en parte la resistencia a la acción de la hormona (Ferreira Azevedo et al., 2008). Por ejemplo, el TR β 1 con la mutación I431V tiene una afinidad 2.6 veces menor por T3 en comparación con el TR β 1 silvestre, lo cual genera alteración en la liberación de correpresores en respuesta a T3, así como un aumento en la concentración efectiva media de T3 necesaria para activar la transcripción de un gen T3-reportero (Ferreira Azevedo et al., 2008). Dada la naturaleza de los TR β 1 mutados en la RTH es posible el diseño y administración de ligandos sintéticos específicos para los TR β 1 mutados. Así, la mutación H435Y puede ser rescatada con ligandos derivados del GC-1, un ligando TR β 1-selectivo (Hassan and Koh, 2008). Sin embargo, la variedad de mutaciones que causan la RTH representa un reto para la clínica y la farmacología, ya que cada mutación genera un fenotipo diferente en el TR β 1 y requiere de su caracterización independiente para generar tratamientos efectivos (Asadi et al., 2008).

Las mutaciones en el *THRA* son poco frecuentes en comparación con el *TRHB* debido a que generalmente son embrionariamente letales. Sin embargo, recientemente se identificó un individuo con una mutación que genera el TR α 1 E403X; esta modificación impide la activación a través de T3 y convierte al TR α 1 mutado en un potente dominante negativo, el individuo tiene síntomas de hipotiroidismo sin embargo tiene niveles bajos de T4 y T3 elevada, lo cual indica que el TR α 1 no ligado está asociado a la fisiopatología del hipotiroidismo (Bochukova et al., 2012). Hasta ahora no ha sido posible caracterizar el fenotipo de mutaciones en el *THRA* usando animales de experimentación debido a la dificultad para generar animales transgénicos viables, lo cual indica que el *THRA* es esencial para el desarrollo embrionario (Nishiyama et al., 2003). Los estudios en animales transgénicos han permitido conocer las funciones contrastantes de *THRA* y *THRB*, y sugieren que éstas están dictadas por la abundancia relativa de las isoformas del receptor, el tipo celular y las diferencias en las propiedades intrínsecas de los receptores.

2.4 Arreglo Estructural y Funcional de los TR

La organización estructural de los TRs es común a todos los NR y consiste en cinco a seis dominios funcionales referidos con las letras A a F (**Figura 6**) (Renaud and Moras, 2000). El dominio amino-terminal (NTD) que comprende a los dominios A/B, es variable y alberga una función de activación independiente de ligando (AF1) (Ivet et al., 2012). Los dominios más conservados son el C y el E. El C se conoce como el dominio de unión al DNA (DBD; 70 aa), y el E como el dominio de unión al ligando (LBD; 250 aa). El dominio D, también llamado “región bisagra” es variable; confiere flexibilidad espacial y vincula el DBD con el LBD y contiene la señal de localización nuclear. El dominio F no siempre está presente y su función es poco comprendida (Renaud and Moras, 2000).

El DBD es el “dominio firma” característico de la superfamilia de receptores nucleares. Este dominio está altamente conservado y confiere a estas proteínas la habilidad de interactuar específicamente con las secuencias de DNA presentes en las regiones promotoras de los genes blanco de las TH y que se conocen como elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE), (Helsen et al., 2012). El dominio LBD juega un papel crucial en la regulación de la actividad del receptor nuclear mediada por ligando. Adicionalmente a su papel en el reconocimiento del ligando, el LBD contiene un subdominio con función de activación (AF2), cuya conformación es altamente dependiente de la unión al ligando. La región bisagra D, junto con la N-terminal y la C-terminal de la región E, están menos conservadas y muestran diferentes características estructurales entre las diferentes isoformas de TR. Por ejemplo, la longitud del NTD en el TR β 1 es más corta que en el TR β 2. También, la estructura secundaria del AF1 consiste principalmente en espirales no estructuradas en vez de α -hélices o β -láminas para el LBD y el DBD. Así el plegamiento del AF1 es muy flexible lo que dificulta su determinación estructural y, consecuentemente, aún no hay modelos estructurales del AF1 en contraste con los cientos de estructuras del DBD y LBD disponibles (Jin and Li, 2010).

N-	NTD	DBD	Hinge	LBD	-C
	<ul style="list-style-type: none"> • AF1 • Cofactor interaction • Highly disordered • Prime target of PTMs • Non-conserved • Receptor stability • Allosteric modulation of receptor structure 	<ul style="list-style-type: none"> • Highly conserved • highly structured • DNA binding • Dimerization (weak) • PTMs • Allosteric modulation of structure 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-conserved • Disordered (varies) • Confers structural flexibility • Dimerization (varies) • NES / NLS • PTMs • Cofactor interactions 	<ul style="list-style-type: none"> • Ligand binding • AF2 • Well conserved • Highly structured • Dimerization (strong) • Abundant cofactor interactions • Allosteric modulation of receptor structure • NLS • PTMs 	

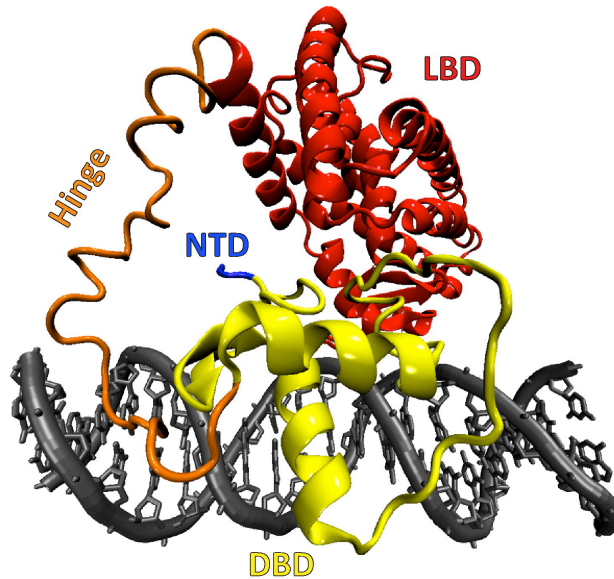


Figura 6. Organización funcional y estructural de los TRs. Los NTD, DBD, bisagra y LBD contribuyen diferencialmente a la función del receptor. Las funciones asociadas a dominios individuales se resumen en la tabla. No todas las funciones aplican a todos los TRs. Se ilustra la estructura de un NR unido al DNA. El DBD y el LBD están estructuralmente conservados entre los NR mientras que el NTD y la bisagra carecen de conservación estructural ó secuencial. NLS; señal de localización nuclear, NES; señal de exportación nuclear, AF; función de activación, PTM; modificación postraduccional. [PDB ID; 3dzy]. Tomado de: Aagaard et al., 2011.

2.4.1 NTD. La estructura tridimensional del NTD (dominios A/B) de los TRs a la fecha no se conoce y aún cuando en solución permanece no-plegada, se cree que adquiere una estructura secundaria ordenada como resultado de interacciones inter- e intra-moleculares. Además, su estructura se modula a través de comunicación alostérica como resultado de la unión al DNA ó al ligando. No obstante, experimentalmente se ha mostrado que el NTD confiere la capacidad de transactivación gen-específica a través de interacciones con proteínas también receptor-específicas (Aagaard et al., 2011). El NTD del TR α 1 es importante para la represión independiente de ligando posiblemente por su rol en la formación de heterodímeros con el receptor de retinoides X (RXR); además, su depleción

disminuye la activación de un gen T3-reportero (Hollenberg et al., 2001). Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina mostraron que este papel singular del NTD del TR α 1 se debe a su capacidad para interactuar de forma específica con el factor de transcripción hTFIIB (ver abreviaturas) (Tomura et al., 1995). En el NTD de TR α 1 se identificaron diez aminoácidos (aa 21 a 30) asociados a la interacción con hTFIIB (Hadzic et al., 1995). Además, el NTD del TR α 1 juega un papel importante en la localización subcelular del receptor. La delección de esta región del TR provoca su localización en el citoplasma mientras que el receptor nativo se encuentra exclusivamente en el núcleo aún cuando no este ligado (Andersson and Vennstrom, 1997). Más aún, los aminoácidos 89 a 116 en el NTD del TR β 2 son necesarios para la activación del gen que codifica para la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en ausencia de ligando y para su represión en presencia de T3 (Langlois et al., 1997). Igualmente, el NTD del TR β 2 es necesario para su interacción con la proteína que une CREB (CBP) (Tian et al., 2006). También se ha observado su participación en la interacción con el dominio PAS-B (ver abreviaturas) de la familia de coactivadores p160 (Privalsky et al., 2009). En conjunto, estas observaciones podrían explicar las propiedades transcripcionales particulares del TR β 2 el cual tiene actividad en ausencia de ligando; recluta coactivadores a concentraciones de T3 significativamente menores, e induce la expresión de genes T3-reporteros con mayor potencia que TR α 1 y TR β 1 (Privalsky et al., 2009). Otros estudios han mostrado que la RHT hipofisiaria se debe a la pérdida de interacciones entre el NTD y el LBD del TR β 2, sin afectar la función normal de TR β 1 (**Figura 7**) (Lee et al., 2011). Además, se observó que TR β 2 interactúa con una serie de proteínas distintas a las que interactúan con TR β 1, las cuales aumentan la actividad transcripcional de TR β 2 sobre un gen T3-reportero (Hahm and Privalsky, 2013).

2.4.2 El DBD. En la superfamilia de los NR, el DBD tiene el mayor grado de conservación con respecto a su secuencia y arquitectura estructural. En los miembros de la superfamilia la región central o “núcleo” del DBD contiene 66 aminoácidos con más de 40% de identidad. Esta secuencia “núcleo” comprende dos α -hélices y dos “dedos” o motivos de unión al zinc, cada uno coordinado por cuatro residuos de cisteína conservados. Estos dedos de zinc se pliegan uno hacia el otro para formar un dominio globular con dos α -hélices localizadas en el extremo C-terminal de los dedos y que se orientan

perpendicularmente entre sí para formar la base del núcleo hidrofóbico (Helsen et al., 2012).

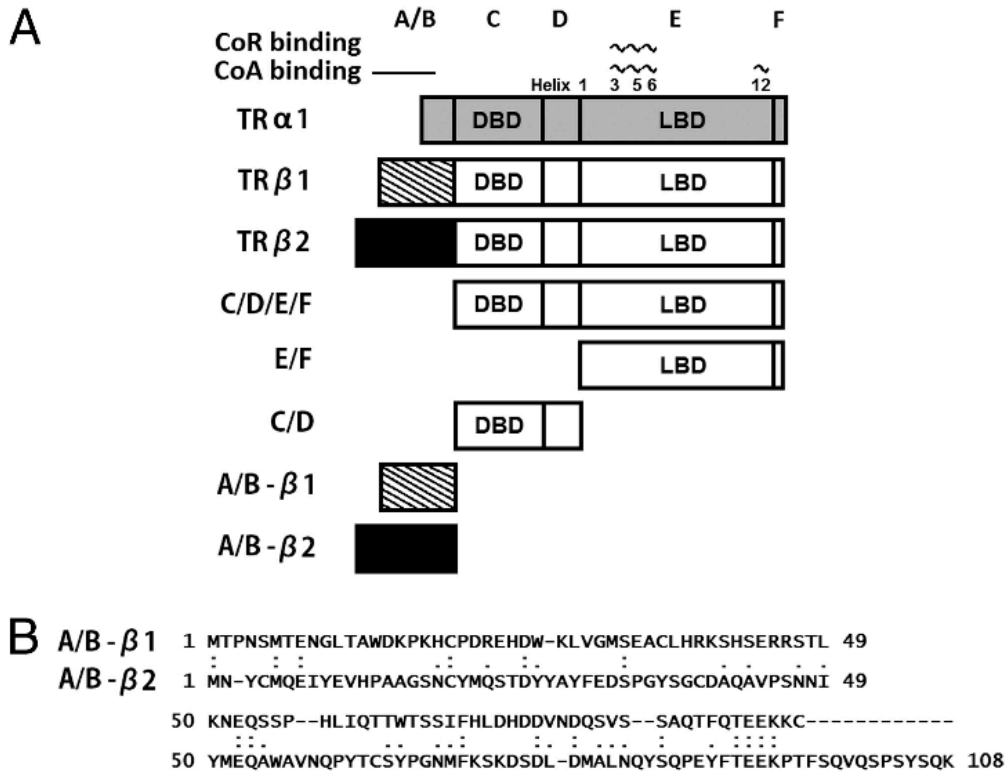


Figura 7. TRβ1 y TRβ2 tienen NTD divergentes pero son idénticos en el resto de los dominios. Panel A, esquema de los TRα1, TRβ1, TRβ2 de humano. Se muestran los sitios de unión para coactivadores y correpresores. Panel B, alineación global de secuencias de los NTD de los TRβ1 y TRβ2. Dos puntos significan identidad de amino ácidos; un solo punto identifica substitución homóloga de amino ácidos. EMBOSS Strether. Tomado de: Hahm and Privalsky, 2013.

La primer α -hélice se posiciona en la ranura principal de la hélice de DNA donde varios aminoácidos hacen contactos base-específicos que permiten el reconocimiento del medio sitio hexamérico (Helsen et al., 2012). Seguido de la región núcleo está la extensión C-terminal (CTE), menos conservada y altamente cargada, que adopta una conformación de α -hélice en los TR. La caja T, localizada al inicio de la CTE, incorpora los residuos que contribuyen a la interface de heterodimerización al unirse al elemento de respuesta conformado como repetido directo espaciado por 4 nucleótidos (DR4) que establece la posición río abajo del TR-DBD en el complejo heterodímero-DNA. La CTE también puede formar contactos extensivos con la columna vertebral de fosfatos en el espaciador, especificando así la dimensión requerida entre los medios sitios reconocidos por el DBD

(Chen and Young, 2010). Los residuos críticos para la unión secuencia-específica al DNA dentro de la primer α -hélice se denominan caja P (Aagaard et al., 2011).

2.4.3 El dominio D ó región bisagra. El dominio D está pobremente conservado entre los TR y se cree que comprende una estructura no plegada que facilita la rotación entre el LBD y el DBD. Sin embargo, se ha observado que en el TR α 1, el dominio D puede plegarse en un α -hélice (H0) anfipática o formar un asa no estructurada. La formación de H0 requiere del contacto entre la ranura de unión a coactivadores formada por la AF2 y un motivo parecido a LxxLL del dominio D (ver sección 2.6.2). La mutación o delección de este motivo inhibe la activación de un gen T3 reportero (Miyamoto et al., 2001) y la unión del TR a un TRE palindrómico (ver sección 2.5)(Nascimento et al., 2006). Además de estas funciones, el dominio D alberga múltiples elementos funcionales incluyendo la secuencia de localización nuclear (NLS), secuencias requeridas para la unión eficiente al DNA, una función de activación Tau, y funciones de represión. También juega un papel en la unión a T3 y en la unión y liberación de correpresores (Aagaard et al., 2011; Nascimento et al., 2006). En este contexto, las mutaciones A234T, R243Q y R243W en el dominio D del TR β 1 de pacientes con RTH generan un TR incapaz de liberar correpresores en presencia de T3 a concentraciones fisiológicas (ver sección 2.6.3) (Safer, 1998). Con respecto a la señal de localización nuclear en el dominio D, estudios de estructura-función muestran que la secuencia KRVAKRKLIEQNRERRRK del dominio D del TR α 1 es suficiente para inducir la translocación al núcleo de la proteína G3 conocida por ser exclusivamente citosólica (Mavinakere et al., 2012).

2.4.4 El LBD. Como en todos los receptores nucleares, la estructura terciaria del LBD de los TR consiste en un “sándwich” de tres capas distintas formadas por 12 α -hélices y 4 β -láminas cortas con el respectivo ligando encerrado en el núcleo hidrofóbico (Estebanez-Perpina et al., 2007). El plegamiento de α -hélices antiparalelas se forma por las hélices (Hs) 4, 5, 8, 9 y 11 emparejadas entre las Hs 1, 2, y 3 por un lado y las Hs 6, 7 y 10 por el otro. En esta estructura, la hélice 12 de activación C-terminal se ubica lejos del núcleo del LBD (Renaud and Moras, 2000). La capa intermedia formada por las Hs 4, 5, 8, 9, solo está presente en la parte media superior del dominio y falta en la parte media inferior. Este arreglo crea una cavidad llamada “bolsa (pocket) de unión al ligando” (LBP)

que, como su nombre lo indica, permite la unión del ligando en el receptor (Jin and Li, 2010). La unión del ligando estabiliza la conformación del receptor a través de contactos directos con múltiples elementos estructurales del receptor incluyendo las Hs 3, 5, 6, 7, 10 y al asa precedente de la hélice AF2 (Martínez et al., 2010). La región C-terminal también forma un α -hélice (AF2), la cual puede adoptar conformaciones múltiples dependiendo de la naturaleza del ligando unido. Las hélices 3, 4, y 12 encierran una ranura hidrofóbica poco profunda que es el sitio de unión de los correuladores (Jin and Li, 2010).

El LBP del TR α y el TR β está compuesto de varios aminoácidos hidrofóbicos y de dos regiones polares. Solo una histidina (hélice11) forma una de esas interacciones polares formando un puente de hidrógeno con el hidroxilo fenólico del anillo externo de la tironina. La mayoría de las interacciones polares, sin embargo, se forman con tres residuos de arginina localizados en la H3 y en las β -láminas, y por una serina en el TR α y una asparagina en el TR β . La alta afinidad del ligando depende principalmente de su hidrofobicidad, ya que los anillos de benceno de las tironinas se estabilizan por una serie de interacciones no polares. El LBP es prácticamente idéntico en los TR α y TR β excepto en que la Ser277 en TR α corresponde a Asp331 en TR β (**Figura 8**) (Araujo et al., 2010). Al ingresar a la “bolsa”, el ligando remodela el LBD y se convierte en parte integral de su núcleo hidrofóbico (Renaud and Moras, 2000). Este cambio conformacional se ha explicado mediante el modelo “trampa de ratón”, el cual propone que la unión del ligando reposiciona la hélice de activación como si entrara en la bolsa y crea así una nueva superficie donde los coactivadores pueden unirse (Renaud and Moras, 2000). Por otro lado, el cambio conformacional inducido por el ligando en la H12 también provoca la liberación de los correuladores (CoR). De hecho, esta liberación de CoR por ligando, no ocurre cuando el receptor esta truncado en la hélice 12 (Renaud and Moras, 2000).

El proceso fundamental que subyace en el control de la transcripción de genes regulados por NR es el de unión/disociación del ligando. El LBP de los NR está inmerso o enterrado en el núcleo hidrofóbico del receptor y no presenta ninguna entrada o salida obvia para el ligando. Este proceso de unión/disociación del ligando se simuló usando técnicas de dinámica molecular basadas en la estructura terciaria del TR obtenida por difracción de rayos X.

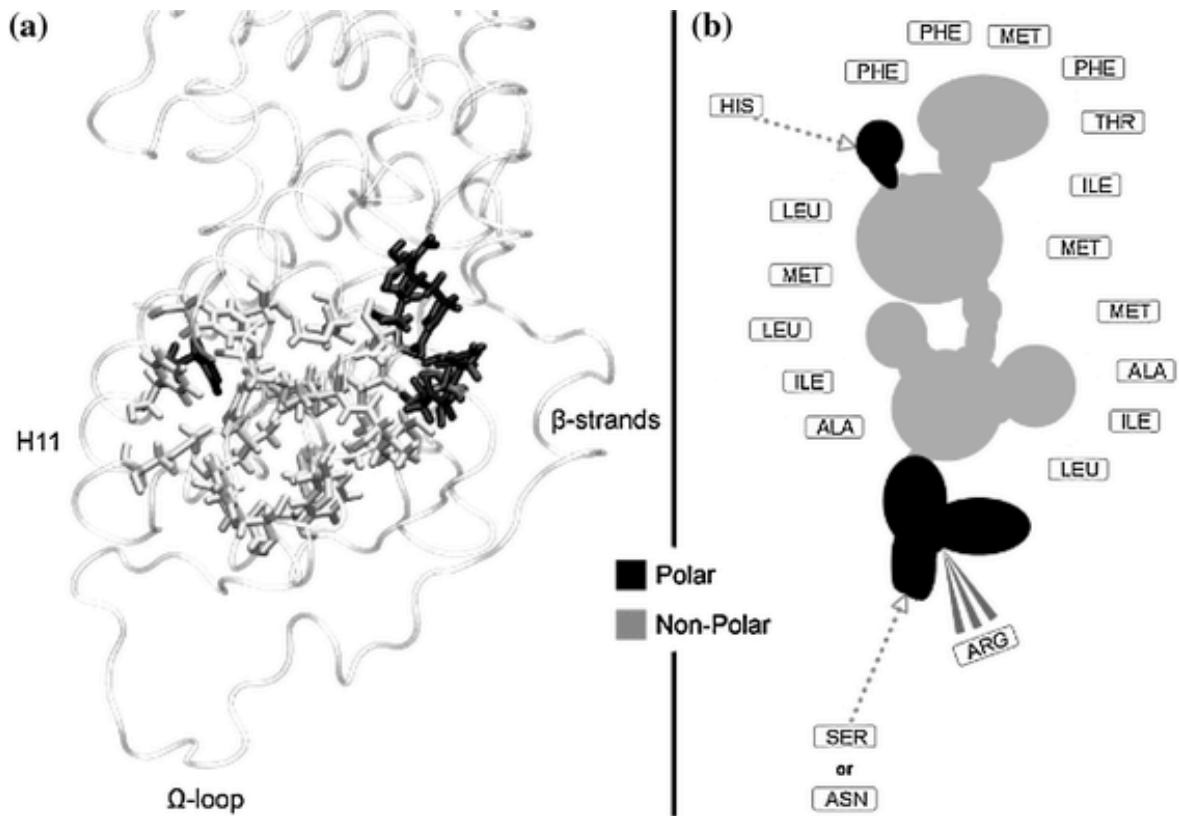


Figura 8. Descripción del saco de unión al ligando en LBP en términos de residuos polares y no polares. A. Los residuos no polares, los cuales constituyen principalmente LBP, se muestran en gris claro, mientras que los residuos polares se muestran en negro. B. Aspecto general de un agonista y sus interacciones con los residuos del LBP. La cabeza y cola polares del ligando y sus interacciones con algunos residuos polares in el LBP. El cuerpo de interacciones hidrofóbicas con un mayor numero de residuos no polares Tomado de: Araujo et al., 2010.

Así, el ligando puede seguir tres vías distintas tanto para unirse como para disociarse del NR: la vía 1 involucra el desplazamiento de la H12 desde la H3; la vía 2 involucra la separación de las H8 y H11 y el asa-omega móvil; en la vía 3, el ligando pasa a través de la cavidad hidrofóbica formada por el re-arreglo en la horquilla- β y el asa entre las H1 y H2. Entonces, sólo pequeñas fluctuaciones, no mayores a las observadas durante las simulaciones control en equilibrio, son suficientes para permitir la entrada y salida del ligando en el LBD de los receptores de hormonas tiroideas (Martínez et al., 2008).

2.4.5 El dominio F. La extensión C-terminal de la H12 denominada dominio F es común en varios miembros de la superfamilia de NR. En el pez cebrá se expresa una isoforma del TR α 1 denominada TR α A1 que tiene un dominio F de 17 aminoácidos C-terminal. El dominio F es importante en la regulación de la respuesta a T3 a través de la

modulación de la interacción con coactivadores, sin embargo, su relevancia funcional durante el desarrollo y crecimiento en el pez cebra aún no se ha determinado (Takayama et al., 2008).

2.4.6 Dimerización de los TR. Los TRs se unen al DNA como monómeros, homodímeros, oligómeros, o bien como heterodímeros con el RXR. Prácticamente todos los dominios funcionales del TR se han asociado con su habilidad para formar dímeros. La superficie de interacción del LBD para la dimerización se encuentra en las H10 y H11 (Ribeiro, 2001), la mitad de la H9 y el asa entre las H8 y H9 (Putcha et al., 2012). En este contexto, estudios de mutagénesis dirigida y de cristalografía mostraron que esta superficie de dimerización es la misma para formar homodímeros y heterodímeros. Además de inhibir la dimerización, las mutaciones realizadas sobre la superficie de dimerización del TR también afectan la activación de un gen T3-reportero y la interacción con el DNA (Ribeiro, 2001). La conformación del LBD es distinta cuando se encuentra como monómero o formando homodímeros o heterodímeros, lo cual tiene un impacto en la afinidad por T3. Así también, estudios de dinámica molecular indican una cinética de disociación de T3 distinta en cada caso, lo cual puede explicar la diferencia en la actividad transcripcional del receptor como monómero, homodímeros o heterodímero (Zhuang et al., 2013). Además, ensayos de unión han mostrado una disminución en la afinidad por T3 cuando TR α 1 forma un heterodímero con RXR en presencia de su ligando 9 *cis*-ácido retinoico, indicando que este último es un inhibidor alostérico del heterodímero TR:RXR (Putcha et al., 2012). Más aún, la formación de homodímeros o heterodímeros está estrechamente relacionada con la presencia o ausencia de T3. Así la T3 interfiere con la formación de homodímeros TR:TR y favorece la formación de monómeros; además, inhibe la interacción entre homodímeros TR:TR con algunos TREs, mientras que no la afecta en la interacción del heterodímero TR:RXR (Togashi, 2005). Sin embargo, también se ha mostrado que homodímeros TR:TR y heterodímeros TR:RXR activan la transcripción a través de diferentes elementos de respuesta en levaduras y células de mamíferos indicando que cada forma es funcionalmente importante (**Figura 9**) (Velasco et al., 2007). Finalmente, estudios de unión por competencia indican que la cinética de unión de la hormona al receptor varía en función del estado oligomérico del receptor. Así, T3 se une y se disocia más rápidamente a monómeros y heterodímeros TR:RXR que a homodímeros TR:TR (Cunha Lima and Rodrigues, 2011).

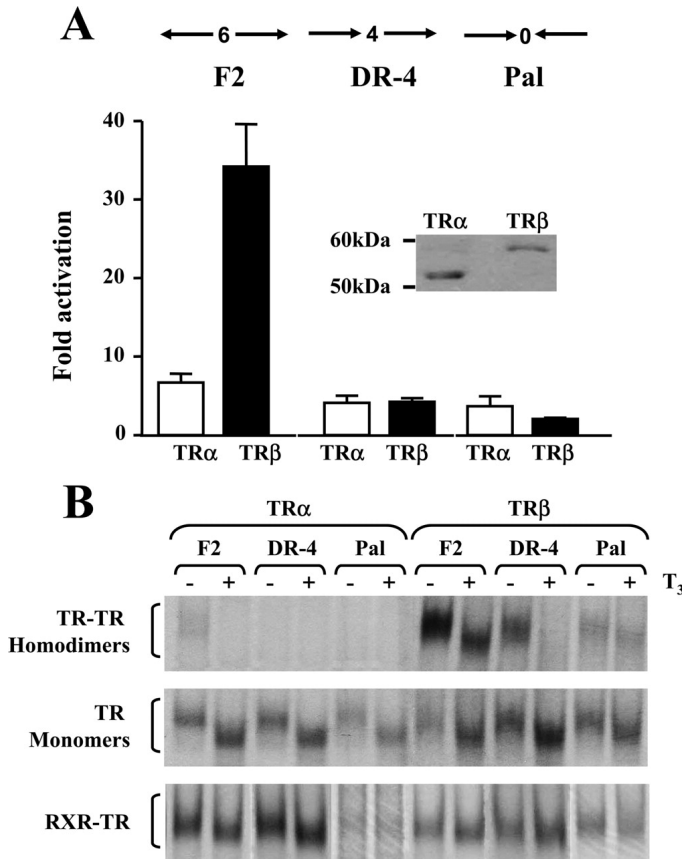


Figura 9. TR β activa la transcripción a través de un TRE F2/IP6 al cual se une como homodímero. **A.** Resultado del análisis de transfección de células U2-OS (células de osteosarcoma en humano), comparando las acciones de ambas isoformas de TRs en diferentes TREs. **B.** El recuadro muestra un Western blot representativo de una membrana a la que se transfirieron extractos de proteínas nucleares de células transfectadas con cada TR y separadas por electroforesis en poliacrilamida usando un oligonucleótido con la secuencia de los distintos TREs. Tomado de: Velasco et al., 2007.

2.4.7 Modificaciones Post-traduccionales de los TR. Los TR son objeto de modificaciones post-traduccionales (PTM) que impactan la conformación del receptor, su afinidad por el ligando y su capacidad de transactivación y transrepresión. En el TR α 1, la región CTE del DBD puede ser acetilada en los residuos de lisina del motivo equivalente a KLKK de otros receptores nucleares, el cual está conservado en el DBD y se asocia al reconocimiento del espaciador en el TRE. Esta modificación está mediada por la CBP y se sabe que es dependiente de T₃. Además de incrementar la unión al DNA, la acetilación del TR α 1 también es importante para la interacción con coactivadores y correpresores. Los TR α 1 mutados en el motivo KLKK son incapaces de mediar la activación de un gen T₃-reportero, lo cual muestra la importancia de este motivo en la transactivación (Sanchez-Pacheco et al., 2009).

Los TRs también pueden ser modificados por “small ubiquitin related modifiers” (SUMOs) específicos. La sumoilación desencadena un plétora de eventos moleculares que pueden alterar tanto el destino como la función de los TR modificados a nivel genómico, no

genómico y epigenético (Treuter and Venteclef, 2011). La relevancia funcional de la sumoilación de los TR α 1 y TR β 1 aún no se ha determinado, sin embargo, estudios *in vitro* indican que la sumoilación de los TRs es importante para la regulación génica mediada por T3 (Liu et al., 2012).

La fosforilación de los TRs es una de la PTMs con mayor impacto sobre la modulación transcripcional mediada por T3. Estudios *in vitro* muestran que la activación de las “mitogen activated protein kinase” (MAPKs) a través de un receptor membranal de tiroxina (T4) induce la fosforilación de residuos de serina en el primer dedo de zinc del TR β 1, esta modificación induce la liberación del SMRT unido al TR y facilita la interacción con coactivadores sin la necesidad de unirse a T3 (Davis, 2000). En contraste, la fosforilación mediada por PKA (proteín kinasa A) en los residuos de serina 28/29 del TR α 1 de pollo impide la interacción entre monómeros pero no entre homodímeros del TR α 1 con el TRE (Tzagarakis-Foster, 1998). En este contexto, la fosforilación del TR α 2 también previene la interacción con el TRE, sugiriendo que la fosforilación es un mecanismo de modulación de la actividad dominante negativa de TR α 2 (Katz et al., 1995). Además, en células COS-1 (células de riñón de mono verde transformadas con SV40) se observó que la fosforilación del TR β 1 puede estabilizar y aumentar su vida media (Ting et al., 1997).

2.5 Elementos de respuesta a hormonas tiroideas

Los TRs se unen a secuencias específicas del DNA en las regiones reguladoras de los genes blanco. Estas regiones, conocidas como elementos de respuesta a hormonas tiroideas o TREs, normalmente contienen al menos dos medios sitios compuestos de secuencias hexaméricas de nucleótidos derivadas de la secuencia consenso AGGT(C/A)A (Brent et al., 1989). Estos medios sitios pueden tener diferentes arreglos, y/o orientaciones que determinan las diferencias en la unión al ligando (Umesono et al., 1991). Los TREs más comunes pueden encontrarse en los siguientes arreglos: *i*) repetido directo separado por cuatro nucleótidos (DR-4); *ii*) palíndroma invertido separado por seis nucleótidos (IP6 ó F2), y *iii*) dos hexámeros en arreglo palindrómico sin espaciador (PAL) (**Figura 10**) (Figueira et al., 2010).

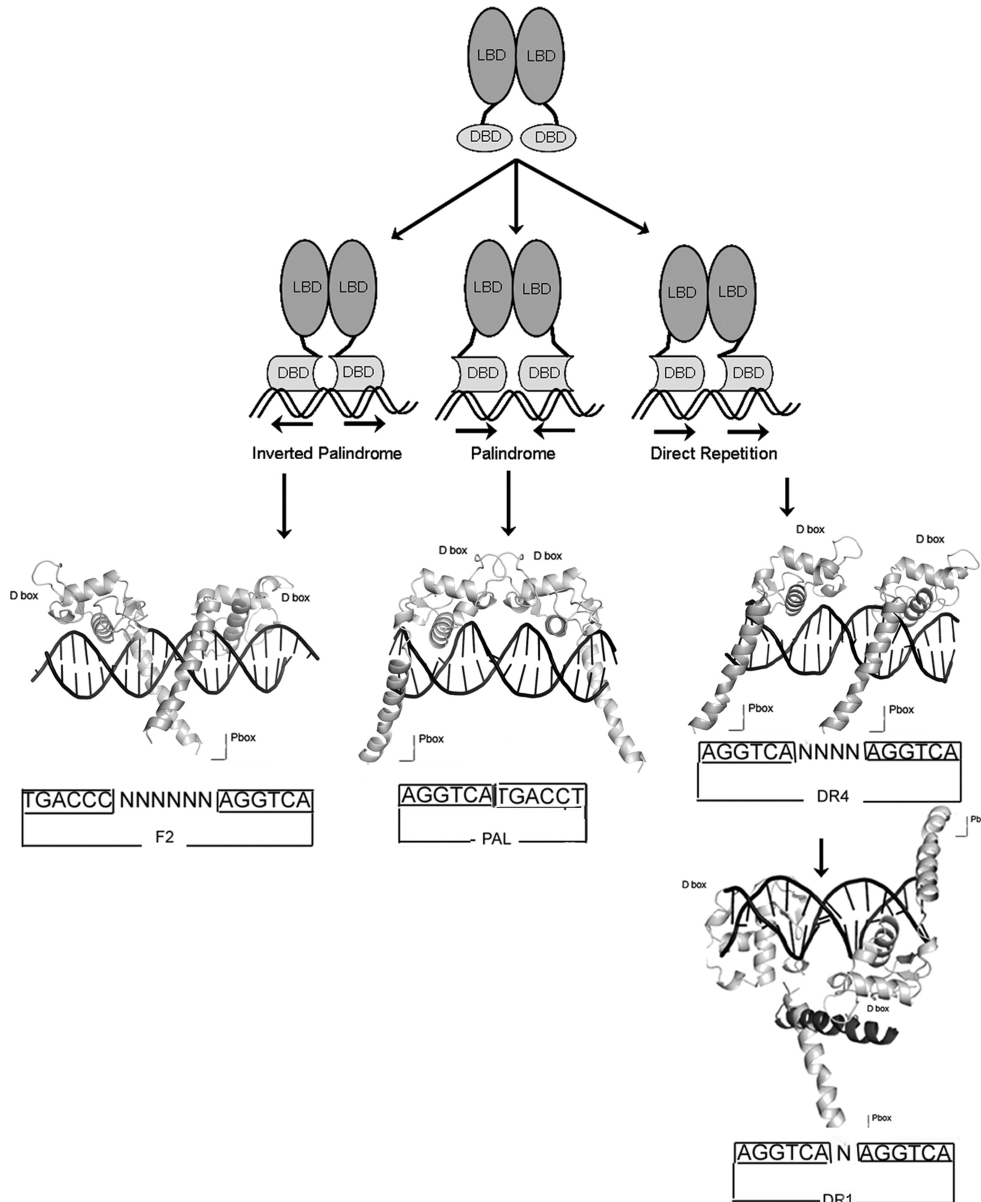


Figura 10. Modelo esquemático de la regulación por TR a través de diferentes TREs. Los homodímeros de TR pueden unirse a diferentes arreglos del TREs: palíndromo invertido (F2 ó IP6), palíndromos (PAL), y repetido directo (DR4). Modelos de las posición de los DBDs en interacción con el DNA. En F2 el DBD muestra una interface de dimerización diferente con las bisagras cruzadas. La interacción con DR4 muestra el mismo arreglo estructural en homodímeros TR/TR que en heterodímeros TR/RXR. Tomado de Figueira et al., 2010.

La orientación relativa del espaciador entre los motivos de reconocimiento juega un papel esencial en la especificidad de la unión del TR al TRE y en la activación de la transcripción. Los TREs palindrómicos se consideran los elementos de respuesta primarios de los TRs homodiméricos. En contraste, los DR4 se unen y activan preferencialmente a los heterodímeros TR:RXR (Umesono et al., 1991). Adicionalmente, la secuencia

espaciadora presente entre los dos medios sitios también puede influenciar la unión y afinidad entre los TRs y los TREs; así un cambio de un solo par de bases en el espaciador puede cambiar el tipo de receptor nuclear que se una y active al elemento de respuesta (Piedrafita et al., 1995) (Umesono et al., 1991). En este mismo contexto, los ensayos de transactivación muestran que la unión de monómeros u homodímeros TR-TRE seguida de la activación transcripcional tiene el siguiente orden de preferencia: F2 o IP6 > IP4 > PAL > DR4 (Piedrafita et al., 1995). Por otro lado y como se ha mencionado, los TRs son capaces de heterodimerizar con RXR en presencia de T3 y esta hormona desestabiliza la unión de homodímeros TR:TR a un subconjunto de TREs, promoviendo la disociación de dímeros hacia monómeros, en consecuencia facilitando la heterodimerización. Por lo tanto, T3 en concentraciones fisiológicas, modifica el balance entre homodímeros y heterodímeros unidos al DNA. Los homodímeros TR:TR se unen con alta afinidad a los elementos palíndricos evertidos que contienen los motivos del medio sitio separados por 4, 5, o 6 pares de bases. Un efecto cooperativo fuerte se observa entre homodímeros TR:TR y un palíndromo inverso (F2 ó IP6), pero no con elementos de respuesta repetidos directos (DR4). Esta unión cooperativa es similar a lo observado para la interacción de heterodímeros TR:RXR con todos los TREs (Figueira et al., 2010). Las constantes de unión (afinidad) de homodímeros TR:TR se encuentran en el intervalo de concentración de 0-100 nM y aumentan en el orden: IP6 < PAL < DR4 (Figueira et al., 2010).

2.6 Mecanismo de Acción de los TR

Los TRs pueden regular la transcripción al estar unido a los TREs en presencia o no de T3. Así, uno de los mecanismos de acción de las THs involucra la regulación positiva de la transcripción basal activada por el complejo TR-T3, la cual es reprimida cuando el TR no está unido a la hormona. En otros casos, la unión de la T3 a su receptor puede reprimir la transcripción. A la fecha, los mecanismos de regulación transcripcional por THs mejor comprendidos son aquellos en los que estas hormonas regulan positivamente al gen blanco. Numerosos estudios han mostrado que en la ausencia de THs, los TRs se unen a los TREs y reprimen la transcripción basal de los genes regulados positivamente por estas hormonas. Dicha represión basal está mediada por proteínas correpresoras que interactúan con los TRs, tales como NCoR (del inglés: *nuclear receptor corepressor*) y SMRT (del inglés: *silencing mediator for RAR and TR*), las cuales interactúan preferencialmente con

TRs no ligados. Los NTDs de ambos NCoR y SMRT reclutan una variedad de complejos de desacetilasas de histonas (HDAC), lo que resulta en hipoacetilación de las histonas locales y una cromatina con estructura represora de la transcripción (Fondell, 2013). Al unir T3, el motivo helicoidal conservado (α -hélice 12) localizado en el dominio de activación (AF2) C-terminal sufre un cambio conformacional significativo. El dominio AF2 realineado crea una superficie de unión hidrofóbica específica para el reclutamiento de los coactivadores que contienen los motivos canónicos LxxLL. Para la mayoría de los NRs, tres distintos tipos de coactivadores son esenciales para la activación de la transcripción: a) los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, los cuales facilitan la accesibilidad al promotor por la acción de otros factores de transcripción; b) las acetilasas y metilasas de histonas (HATs y HMTs respectivamente) que marcan de forma covalente la cromatina, y c) el complejo mediador, que es una interface funcional con la maquinaria basal de la transcripción. La familia de proteínas P160/SRC interactúa con los NRs. Estos coactivadores contienen múltiples motivos LxxLL cruciales para la unión al TR dependiente de T3. Así, P160/SRC actúan como superficies de acoplamiento para el reclutamiento de HATs tales como p300/CBP; HMTs como CARM1 y PRMT1, y los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP como SWI/SNF. Adicionalmente, el reclutamiento inicial de los complejos p160/SRC-p300/CBP al TR unido al promotor de los genes blanco puede facilitar el subsecuente reclutamiento del complejo SWI/SNF. El complejo coactivador mediador, al contrario de los coactivadores modificadores de la cromatina, forma un puente funcional entre los NRs unidos al DNA y otros factores de transcripción activados con la maquinaria basal de la transcripción. De este modo se facilita el ensamblaje y activación de la RNA polimerasa II (Pol II) y sus factores generales asociados en los promotores blanco (**Figura 11**) (Fondell, 2013).

Como se mencionó anteriormente, los TRs modulan la expresión de los genes T3-responsivos positiva- y negativamente en respuesta al ligando. El mecanismo de acción positivo es el que mejor se comprende hasta ahora; sin embargo, el mecanismo de acción negativo, es decir, la represión inducida por el TR unido a T3 aún permanece pobremente comprendido no obstante la mayor parte de los genes T3-responsivos, incluyendo los genes moduladores del eje hipotálamo hipófisis tiroides TSH y el TRH, se regulan negativamente en presencia de T3 (Feng et al., 2000). Dada su relevancia funcional, las cadenas α y β de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la TRH son los genes

sobre los cuales se han generado la mayoría de los hallazgos sobre el mecanismo de regulación negativa T3-dependiente. En este contexto, se ha observado que el TR β 2, es el principal modulador de la expresión de ambos genes *in vivo*. Estudios estructura-función muestran que la activación en ausencia de ligando y represión en presencia de T3 está asociada al NTD único del TR β 2, y requiere particularmente de los aminoácidos 89-120 de este dominio para ambos efectos (Langlois et al., 1997).

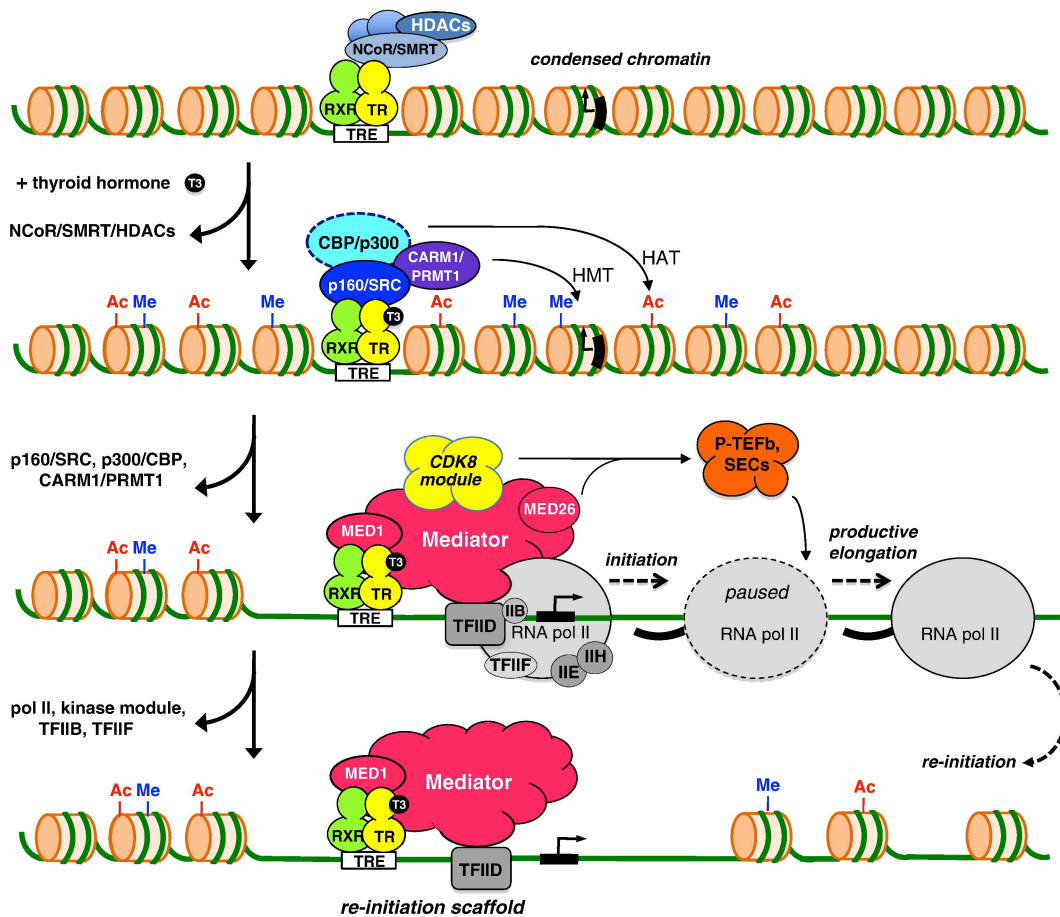


Figura 11. Modelo de los pasos múltiples en la regulación transcripcional dependiente de T3. En ausencia de T3, los heterodímeros TR/RXR están constitutivamente unidos a los TREs en asociación con correpresores como NCoR/SMRT y desacetilasas de histonas (HDACs), lo cual genera una cromatina condensada y el silenciamiento de genes. En presencia de T3, NCoR/SMRT y HDACs se disocian y los coactivadores p160/SRC son reclutados en asociación con acetilasas de histonas (HATS, como CBP/p300) y metil transferasas (HMTs; CARM1/PRMT1) que modifican las histonas en el promotor. Este paso puede incluir el reclutamiento de los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP como SWI/SNF. En un paso temporalmente subsecuente, p160/SRC se disocia y TR/RXR recluta al mediador que forma una interface con el aparato basal de la transcripción Pol II para generar un complejo de preiniciación (PIC) funcional. El ensamblaje del PIC va seguido de la iniciación de la transcripción por Pol II. El mediador recluta al factor de elongación de la transcripción positivo b (P-TEFb) y/u otros complejos de súper elongación (SECs) que facilitan la liberación de la Pol II iniciada del estado pausado en un complejo de elongación productivo. Seguido, Pol II escapa del PIC, RXR/TR-Med1 y otras

subunidades del mediador permanecen unidas al promotor y sirven como un complejo de reciclaje para volver al TR unido al promotor al estado de reiniciación. Tomado de: Fondell, 2013.

La noción de que los TRs interactúan con el DNA para modular la expresión de genes T3-responsivos es un hecho muy bien fundamentado en los genes regulados positivamente, sin embargo en los genes regulados negativamente aún es un tema en debate. Existen varios estudios que respaldan la interacción de los TRs con secuencias de DNA en el promotor de TRH y TSH a los cuales se les denomina genéricamente como TRE negativos (nTRE). Utilizando un TR mutado en el dominio de unión al DNA se observó que el TR pierde su capacidad para unirse al nTRE del gen de la TRH o el de los de las cadenas α y β de TSH, y en consecuencia no reprime su expresión en presencia de T3. Así, los autores concluyen que se requiere de la interacción TR-DNA para la acción de T3 en este caso (Shibusawa et al., 2003). En este contexto, también se han observado sitios de unión para los TRs y otros factores de transcripción como el SP1 sobrepuestos en las regiones promotoras de los genes blanco. Así, se encontró que sólo el TR unido a T3 puede unirse al nTRE del promotor del gen que codifica para la proteína β -amiloidea, y así desplazar al SP1, el cual activa este gen de forma constitutiva; sin embargo, los autores fallaron en proponer una explicación a la represión de este gen en presencia de T3 (Villa et al., 2004). En contraste, el promotor del gen de la desyodasa tipo 1 (*Dio1*) muestra una regulación diferente en función de la matriz celular. En células JEG-3 y a diferencia de lo que ocurre en el resto de las células que expresan este gen, el tratamiento con T3 reprime su expresión. En este caso se observó que la T3 induce la expresión del factor de transcripción JTF específico de JEG-3, el cual se une al promotor de *Dio1* y así reprime su expresión, concluyendo que el mecanismo de regulación negativa de *Dio1* específico de células JEG-3 no requiere de la unión del TR al promotor pero si depende de la presencia de T3. (Kim et al., 2004). De esos estudios, la evidencia de la interacción de TR con el DNA para el mecanismo de regulación negativa proviene de ensayos de retardo de la movilidad electroforética usando segmentos de DNA de los promotores asociados a la regulación negativa por T3. Dichos segmentos se identificaron usando genes reporteros (luciferasa) y la mutación del DBD interfiere con la regulación negativa dependiente de T3 (Shibusawa et al., 2003; Shen, 2004). Sin embargo, la interacción del TR con los nTRE es débil en contraste con la de los TRE positivos y la delección del nTRE no abate la represión inducida por T3. Es importante notar que el correpresor NCoR puede actuar como un coactivador en

genes regulados negativamente por T3 (Kim et al., 2005). En contraste, animales transgénicos con la mutación E457A en el TR β 1 muestran niveles altos de TSH, T4 y T3, así como de los niveles hepáticos de mRNA de Gsta y Dio1 (ver abreviaturas) elevados y bajos, respectivamente. La mutación E457A solo altera la interacción con coactivadores, sin cambiar la afinidad por T3 o por los correpresores lo cual indica que tanto para la regulación positiva como negativa T3-dependiente se requiere de una interacción normal con los coactivadores (Ortiga-Carvalho et al., 2005). Los resultados de la inmunoprecipitación de la cromatina indican una pobre o nula interacción con el aporeceptor TR ó con el TR unido a T3 en promotores de genes regulados negativamente por esta hormona. Sorprendentemente se observó un efecto positivo del NCoR sobre la activación de este tipo de genes en ausencia de T3 (Nygard et al., 2006; Wang et al., 2009). El requerimiento de la interacción del TR con correpresores para la activación en ausencia de T3 se confirmó también en el promotor de SOD1 (superóxido dismutasa 1) (Santos et al., 2006). Se ha descrito que las mutaciones en el DBD del TR interfieren con la modulación negativa T3-dependiente lo cual sugiere la interacción TR-DNA en estos genes; sin embargo, en la regulación de la expresión del gen de la cadena β de TSH se observó que la interacción se da entre el DBD del TR y el factor de transcripción GATA2. GATA2 sí interactúa con el DNA pero lo hace en una región distinta al nTRE reportado y además, la regulación negativa T3-dependiente se mantiene en ausencia del nTRE (Matsushita et al., 2006). Más aún, se ha observado que la acetilación de la H3 en el promotor de α -TSH, que generalmente se asocia a la activación, también reprime de manera T3-dependiente, sugiriendo que la acetilación de H3 puede inducir represión en genes regulados negativamente (Wang et al., 2009). En este contexto, la T3 promueve un incremento en la acetilación en H3K9 y H3K18 y una disminución en la acetilación en H3K27 en el promotor de α -TSH, mientras que la activación de este gen mediada por cAMP a través de p-CREB incrementa la acetilación de H4K5 y H4K8. Juntos estos datos indican que las modificaciones postraduccionales modulan de manera específica la activación/represión de este gen en particular. Más aún sugieren que en cada vía participan corre reguladores distintos (Wang et al., 2010).

2.6.1 Correguladores. La unión del ligando induce cambios en la conformación del receptor de los cuales el efecto sobre la H12 es funcionalmente crucial. En ausencia de ligando la H12 adopta una conformación que favorece la interacción con correpresores

mientras que al unirse el ligando la conformación de la H12 cambia de forma que permite la interacción con coactivadores. Así, la dinámica y conformación de la H12 son factores clave que modulan la transcripción dependiente de ligando. En los TRs, las interfaces de correpresores y coactivadores están sobrepuestas y se forman por los residuos V284, K288, I302, y K306 de las hélices 3, 5, y 6 de acuerdo a la isoforma TR β . La superficie de unión a correpresores incluye además los residuos T277, I280, T281, V283, y C309, que también pertenecen a las hélices 3, 5, y 6 pero están espacialmente más cercanos a H12 en el holo-TR, donde los coactivadores requieren los residuos L454 y E457 de la H12 para interactuar con el TR (Souza et al., 2011). La H12 está acoplada sobre los residuos I280, V283, y C309 en estructuras del holo-TR, de forma que la unión de correpresores requiere un cambio conformacional de H12 desde esta posición. El rol de estos tres residuos (I280, V283, and C309) en la unión de coactivadores y correpresores es esencial para la comprensión del equilibrio conformacional y la dinámica de la H12. Dado que la unión de los coactivadores pero no de los correpresores es dependiente de la interacción directa con la H12, la delección de ésta bloquea la interacción con coactivadores pero incrementa la asociación de correpresores al exponer su superficie de interacción (Souza et al., 2011). Además de la H12, el NTD es importante para estabilizar la interacción con coactivadores. En este contexto, el NTD del TR β 2 pero no del TR β 1 interactúa con dominios ricos en glutamina de los coactivadores de la familia p160, interacción que aumenta el efecto de T3 sobre la activación de la transcripción aún en ausencia del ligando (Lee et al., 2011).

Los TR inducen la remoción de las histonas facilitando el reclutamiento de la RNA polimerasa II. Las histonas, particularmente en su cola N-terminal, son objeto de un gran número de modificaciones postraduccionales incluyendo acetilación, metilación, fosforilación, y ubiquitinación. En particular la di- y trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me₂, H3K9me₃) y la trimetilación de H3K27 (H3K27me₃) pueden promover la formación de heterocromatina compacta que previene la transcripción a través del reclutamiento de la proteína 1 de heterocromatina y grupos de proteínas polycomb (complejos remodeladores de la cromatina). En contraste, las modificaciones de histonas que se asocian con transcripción activa, como la acetilación de las histonas 3 y 4 o la di- o trimetilación de H3K4 (H3K4me₂, H3K4me₃), son comúnmente referidas como modificaciones propias de cromatina laxa (eucromatina) (Matsuura et al., 2012). Adicionalmente a las modificaciones postraduccionales (PTMs) de las histonas, los TRs

ligados a T3 inducen la remoción de los nucleosomas que contienen al TRE a través de un mecanismo aún no determinado en el cual podrían participar las proteínas remodeladoras de la cromatina Brg1 y BAF57 (Matsuura et al., 2012). Así es posible que dichos complejos participen en la remoción de los nucleosomas cercanos al TRE, facilitando el ensamblaje de la maquinaria transcripcional en la región promotora (Shi et al., 2012). Además de facilitar el ensamblaje de los factores generales de transcripción, los TRs ligados a T3, inducen la fosforilación en la serina-2 de la RNA Pol II, modificación asociada a una mayor tasa de síntesis de RNA (Mochizuki et al., 2012).

2.6.2 Coactivadores. Como se mencionó anteriormente, los TRs se unen a los promotores blanco como heterodímeros con el receptor de retinoides X (RXR) y reclutan coactivadores transcripcionales en presencia de T3 y correpresores en ausencia de esta hormona. Los coactivadores que interactúan directamente con el TR ligado que facilitan la transactivación incluyen a los miembros de la familia p160: SRC1 (Steroid Receptor Coactivator), GRIP1 ó SRC2 (Glutamate Receptor Interacting Protein) y ACTR ó SRC3 (acetiltransferasa). Se cree que estas proteínas funcionan en parte por su asociación a HAT potentes tales como p300 que es una proteína de unión a CREB (CBP); estas proteínas fundamentalmente dirigen la actividad HAT hacia el promotor unido al TR, lo que resulta en la acetilación de los nucleosomas y en una cromatina menos compacta (Lee, 2003). Las histonas acetiladas pueden actuar como superficies de unión de distintos coactivadores (Dhalluin et al., 1999). Adicionalmente, algunos miembros de la familia p160 contienen actividad HAT intrínseca (Sharma and Fondell, 2002). La acetilación correlaciona con un incremento de 2 a 3 veces en la transcripción T3-dependiente mediada por TR:RXR (Lee, 2003). Tras la acetilación a través de CBP/p300 se facilita el reclutamiento del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF y el mediador. La subunidad BGR1 del complejo SWI/SNF con actividad ATPasa induce cambios en la topología del DNA los cuales incluyen la formación de sitios con hipersensibilidad a DNAsas y la pérdida de la escalera nucleosomal canónica (Huang et al., 2003). Un segundo tipo de coactivadores para los TRs es el complejo multimérico “TR associated protein (TRAP) mediator complex”, el cual parece unirse al TR ligado a través de una sola subunidad denominada TRAP220 (Sharma and Fondell, 2002). La evidencia muestra un reclutamiento ordenado de los corre reguladores HAT, seguido del mediador TRAP, en diferentes promotores blanco de células de mamífero (Sharma and Fondell, 2002). Así, el reclutamiento de actividad HAT a través de los TRs

unidos a los promotores T3-responsivos posiblemente genera una estructura de la cromatina que permite la unión de otros complejos correguladores multiméricos más grandes. En un paso temporalmente subsecuente, los TRs reclutan al mediador TRAP, el cual a su vez interactúa más directamente con la RNA polimerasa II, la cual aparentemente se encuentra pre-ensamblada en el promotor (Liu, 2005) y potencia la iniciación de la transcripción (Sharma and Fondell, 2002). Al estudiar la dinámica del ensamblaje del complejo transcripcional en respuesta a T3, se observa que tanto el TR como los coactivadores se encuentran unidos al promotor blanco quince minutos después del estímulo con T3, sin embargo, no todos los genes blanco muestran el mismo patrón de reclutamiento de coactivadores; el reclutamiento temporal de TRAP220 y la acetilación de histonas varía entre distintos TRE, mientras que el patrón de reclutamiento de los coactivadores primarios SRC1 y GRIP1 parece ser similar en los mismos promotores. Estas diferencias podrían ayudar a determinar la especificidad y fuerza de la respuesta a T3 de los genes blanco (Liu, 2005). El reclutamiento de coactivadores también se ha estudiado en vertebrados no mamíferos, donde se observó que el complejo coactivador SRC1/CBP (p160/p300) es necesario para la metamorfosis mediada por T3 en ranas, lo cual sugiere que este complejo se recluta en los genes T3-responsivos que modulan este proceso y que el mecanismo de acción de T3 está conservado al menos en parte en vertebrados (Paul et al., 2006).

El reclutamiento de coactivadores al TR se realiza mediante interacciones hidrofóbicas entre sitios conservados en la superficie de los TR y los coactivadores. Los coactivadores contienen varios motivos conservados LxxLL denominados caja de NR (NR box), los cuales adoptan una estructura α -hélice con las tres leucinas embonando en la bolsa hidrofóbica del LBD formada tras el plegamiento del α -hélice 12 en presencia del ligando. Actualmente se han identificado aproximadamente 300 correguladores de los receptores nucleares, y se piensa que el perfil funcional de los TRs en respuesta a T3 es ampliamente determinado por el uso selectivo de estos correguladores transcripcionales (Jin and Li, 2010). Los TRs reconocen de manera específica a los coactivadores al interactuar con los residuos variables dentro de ó flanqueando el motivo LxxLL (Jin and Li, 2010). El reconocimiento del motivo LxxLL por los TRs se estabiliza por dos interacciones principales, las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre aminoácidos

cargados específicos. La abrazadera cargada se comprende de dos aminoácidos conservados en el LBD, un residuo de lisina en la H3 y uno de ácido glutámico en la H12 afianzan la hélice LxxLL formando puentes de hidrógeno con la espina dorsal del péptido (Savkur and Burris, 2004). Distintos motivos LxxLL y secuencias de contexto exhiben afinidades de unión diferenciales por distintos TRs, sugiriendo que estos receptores tienen preferencia por un motivo LxxLL sobre otro en el mismo coactivador o por otro coactivador (Leo and Chen, 2000). Por ejemplo, trece amino ácidos abarcando el motivo LxxLL 2 de GRIP1 bloquean la interacción con el TR β -LBD, mientras que un péptido comprendiendo en el motivo 3 fue mejor competidor por la unión a GR (Darimont et al., 1998). La potencia y eficacia de T3 por el TR resulta tanto de la afinidad por el ligando como de la afinidad que varias proteínas correguladoras tienen por el complejo T3:TR; así, el complejo T3:TR recluta preferentemente SRC3, con una afinidad relativa en el orden nM. Los datos muestran que el SRC3 forma un complejo más estable con T3:TR β (120 min) que con T4:TR β (15 min), lo cual concuerda con la ausencia de actividad en presencia de T4 en ensayos de transactivación, no obstante que TR β se ha cristalizado unido a T4 (Jeyakumar et al., 2008).

2.6.3 Correpresores. En ausencia de ligando, los TR se asocian con proteínas correpresoras tales como el NCoR y el SMRT (Moore and Guy, 2005). NCoR y SMRT son proteínas homólogas de 2500 aa con un 40% de identidad. Ambas proteínas son consideradas como grandes plataformas que actúan como andamio sobre el cual se construye la maquinaria enzimática de represión (Watson et al., 2012). Estas proteínas contienen dominios de represión N-terminal que interactúan con desacetilasas de histonas y dominios C-terminales de interacción con receptores nucleares. Dentro de estos dominios de interacción se encuentran los motivos, (I/L)xx(I/V)I, denominados cajas CoRNR (Moore and Guy, 2005). Este motivo es análogo al LxxLL de los coactivadores, y los estudios estructurales muestran que sus sitios de unión se encuentran sobrepuestos, sin embargo, el péptido del correpresor forma tres vueltas de α -hélice, con la H12 del LBD desplazada de la posición activa (Watson et al., 2012). Los estudios muestran que los TR interactúan preferentemente con NCoR, específicamente con el primer motivo CoRNR el cual es específico para TRs y no se encuentra en SMRT (Moore and Guy, 2005). Sin embargo, el silenciamiento de NCoR o SMRT (siRNA) por separado interfiere con la represión mediada por TRs. Por lo tanto ambos correpresores participan en este proceso (Choi et al., 2008). La

represión está mediada por el reclutamiento de múltiples enzimas desacetilasas de histonas tales como HDAC 1, 3, 4, 7 y Sirtuina 1 (Watson et al., 2012). Ha sido claramente demostrado que el reclutamiento de HDAC3 es esencial para la represión mediada por TRs (Ishizuka and Lazar, 2003). Los complejos correpresores de NCoR y SMRT son esencialmente los mismos y se componen de NCoR/SMRT, HDAC3, WD40-repeated protein, TBL1, y la proteína G supresora, este complejo puede ser objeto de PTM como fosforilación; de hecho, una proteína cinasa de DNA (DNA-PK) es reclutada por el complejo correpresor y la fosforilación de HDCA3 aumenta su actividad, lo cual contribuye a la represión mediada por TRs (Jeyakumar et al., 2007). La región N-terminal del correpresor activa la función catalítica de la enzima HDAC3 que se conoce como el dominio de activación de desacetilasa (DAD); la mutación de este dominio anula la represión por TR. Más aun, estudios *in vivo* muestran que animales transgénicos con una mutación en el dominio DAD muestran desrepresión en genes normalmente regulados positivamente por T3 y disminución de la expresión basal en genes regulados negativamente por T3, lo cual indica que la interacción HDAC3-NCoR es importante para mantener la expresión basal en ambos casos (You et al., 2010). Más aun, la inhibición de la interacción NCoR-TR puede atenuar los síntomas de RTH en ratones transgénicos que expresan un NCoR mutado que no interactúa con TR (Fozzatti et al., 2011).

3. Antecedentes Específicos

3.1 La 3,5-diyodotironina es una TH bioactiva

Aún cuando la glándula tiroides sintetiza y secreta principalmente tiroxina o T4, es la triyodotironina o T3 la molécula a la que se le atribuyen los efectos nucleares sobre la expresión génica. De hecho, la T4 se considera una prohormona que es activada o inactivada a través de un proceso enzimático finamente regulado y que ocurre en prácticamente todas las células del organismo. Este proceso consiste en la remoción de un átomo de yodo del anillo externo o fenilo (vía de activación); o bien, del anillo interno o tirosilo (vía de inactivación) de la molécula de yodotironina. De esta manera, la desyodación del anillo externo de la T4 resulta en la formación de T3, la yodotironina hasta 100 veces más afín que la T4 a los TRs, y por lo tanto la que se ha considerado como responsable de la mayoría de los efectos biológicos de las TH. Por otro lado, la desyodación que ocurre en el anillo interno de la T4 resulta en la formación de la rT3, isómero inactivo de la T3. La desyodación secuencial del anillo externo de la T3 da lugar a la 3,5-T2 (T2), TH a la que también se le ha descrito bioactividad (Horst et al., 1989; Moreno et al., 1998; Goglia, 2005; Garcia-G et al., 2007; García-G et al., 2004).

3.2 La T2 Tiene Efectos Extranucleares.

Los efectos de las THs se pueden agrupar en dos categorías. Los involucrados en el mantenimiento del balance energético y los morfogénicos relacionados a la ontogenia o historia de vida de los organismos. Los efectos sobre el balance energético se conocen desde finales del siglo XIX. Se trata de los bien conocidos efectos termogénicos o calorigénicos de las THs, los cuales fueron descritos por primera vez por el fisiólogo Magnus-Levi (1895). Si bien desde entonces se sabe que las THs regulan el gasto energético, hasta la fecha no son claros los mecanismos moleculares a través de los cuales ocurre esta regulación. Los primeros estudios encaminados a entender dichos mecanismos se remontan a 1963 (Tata., 1963), casi 70 años después de los hallazgos de Magnus-Levi. Estos estudios mostraron de manera clara y elegante, que el aumento en el consumo de oxígeno observado después del tratamiento con TH en ratas hipotiroideas (tiroidectomía),

requería de síntesis de proteínas *de novo* y que el núcleo celular era seguramente el efector final.

Aproximadamente 30 años después se publicaron resultados sorprendentes mostrando que entre las distintas yodotironinas, la T2, al igual que T3 estimulaba el consumo de oxígeno en el hígado hipotiroideo (**Figura 12**) (Horst et al., 1989). La potencia entre las dos yodotironinas era similar (1 pM), sin embargo, el efecto observado con T2 ocurría más temprano que el producido por la T3. Estudios complementarios *in vivo* mostraron que: *i*) la T3 y la (3,5-)T2, pero no la 3,3'-T2 tienen un efecto sobre el metabolismo energético; *ii*) que el efecto observado con T2 es más temprano; y *iii*) que el efecto de T2 no requiere de transcripción *de novo*. Estos dos últimos puntos fueron interpretados como evidencia de que el mecanismo de acción de la T2 era extranuclear (**Figura 13**) (Moreno et al., 1998; Goglia, 2005).

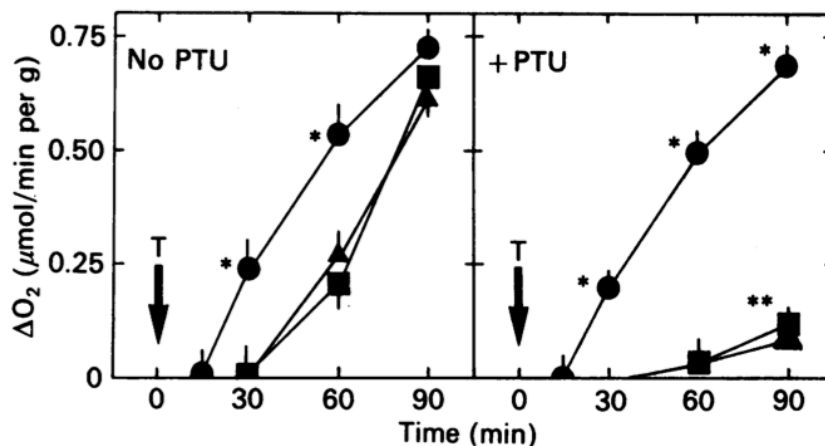


Figura 12. Efecto de las yodotironinas (T; 1 pM) sobre el consumo de O₂ de hígados perfundidos aislados de ratas hipotiroideas en ausencia o presencia de propil-tiouracilo (PTU; 1 microM). Los datos son diferencia del consumo de O₂ sobre los controles (n=7); El consumo a 0 min fue 1.9 microM/min por g (n=3, media ± error estándar). Circulo: T2; Cuadro: T3; Triangulo: T4. *P<0.001 vs T3, T4 y controles. **p <0.001 versus perfusión sin PTU. Tomado de: Horst et al., 1989.

Además de sus acciones sobre el metabolismo energético, otros estudios mostraron que la T2 también tiene efectos extra-mitocondriales como la inhibición de la secreción hipofisaria de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y de la expresión de los receptores TRβ2 (Ball et al., 1997); así como efectos estimulatorios sobre la síntesis de los mRNAs que codifican para la GH (Moreno et al., 1998) y la D1 (Baur et al., 1997). Es

importante destacar que estos resultados se obtuvieron en experimentos *in vitro* (cultivos celulares), en los cuales la magnitud de los efectos de la T2 fue hasta 100 veces menor a la observada con dosis equivalentes de T3.

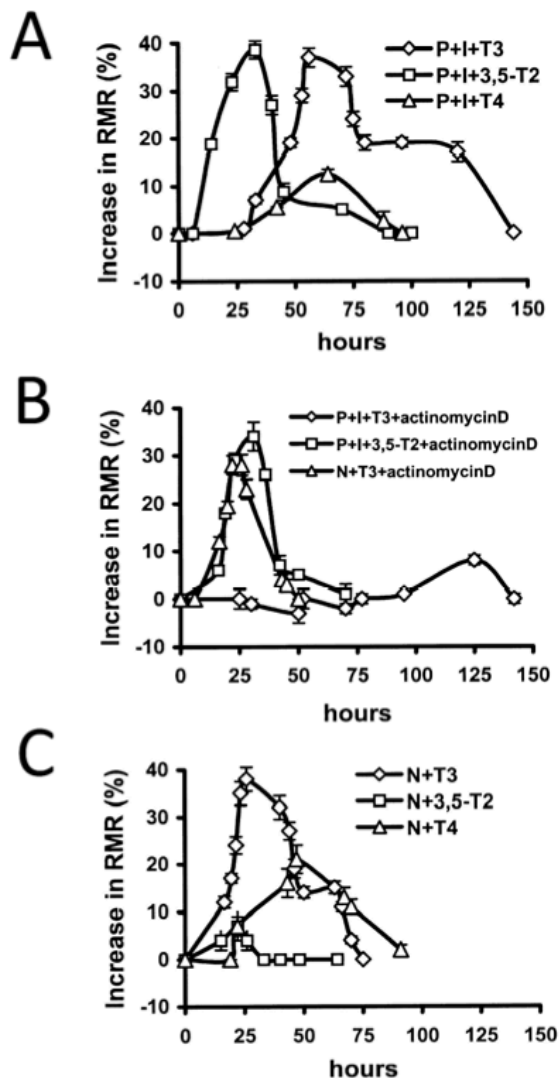


Figura 13. Cambios en el metabolismo basal de ratas hipotiroideas [propil-tiouracilo (P) + ácido iopanoico (I)] y eutiroideas (N) después de la administración de T4, T3 y T2, con o sin administración simultánea de actinomicina D. Tomado de: Moreno et al., 2002.

3.3 Efectos genómicos de la 3,5-diyodotironina

Utilizando un abordaje evolutivo y comparado, nuestro grupo de trabajo ha venido analizando distintos factores y mecanismos que intervienen en la regulación del metabolismo y la acción de las THs. Nuestros modelos biológicos principales son dos especies de teleosteos, el “killifish” *Fundulus heteroclitus* (*Fh*), y la tilapia *Oreochromis*

niloticus. Los resultados que aquí se presentan a continuación se han obtenido en uno u otro de estos dos modelos. A continuación solo se resumirán los hallazgos más relevantes relacionados con la bioactividad de la T2 y su mecanismo de acción.

a) La T2 regula la expresión de genes T3-dependientes *in vivo*. Inicialmente demostramos que al igual que la T3, la T2 regula la expresión de genes T3-dependientes. Así, el tratamiento con dosis suprafisiológicas de T3 o T2 aumenta o disminuye la expresión de genes regulados positiva [(i.e., factor de crecimiento insulinoide (IGF1)], o negativamente [(i.e., desyodasa tipo 2 (D2)] por THs, respectivamente (**Figura 14**) (García-G et al., 2007; Navarrete-Ramírez et al., 2013). Subsecuentemente disecamos el efecto de estas hormonas bloqueando su síntesis (metimazol: MMI) y reemplazando a los organismos con dosis fisiológicas de T3 o T2. En todos los casos, ambas THs rescatan la expresión eutiroides de los genes T3-dependientes estudiados (García-G et al., 2007).

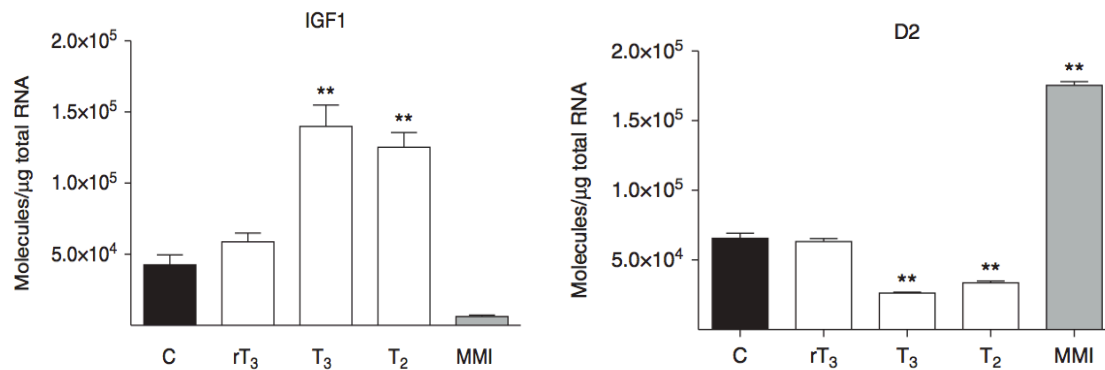


Figura 14. Niveles de mRNA de IGF1 y D2 en el hígado de tilapia después del tratamiento con distintas THs ó MMI . Las tilapias fueron expuestas a 1 nM T3, T2, o rT3 por 30 días. El control negativo se expuso a 4.5 mM metimazol (MMI) . Los valores corresponden a la media + S.E.M. La significancia indica (*P<0.05 and **P<0.001) (Tomado de Navarrete-Ramírez, P. 2013).

b) La T2 y la T3 inducen la formación de complejos transcripcionales distintos *in vivo*. Empleando extractos de las proteínas nucleares hepáticas en ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), encontramos que las proteínas nucleares de peces eutiroides (no tratados) forman dos complejos específicos cuando se incuban con TRES (**Figura 15**). Estos complejos prácticamente desaparecen en el grupo hipotiroideo (MMI), sugiriendo que las THs son necesarias para que el TR forme complejos con el TRE. De manera interesante, en los animales hipotiroideos reemplazados con T3 predomina el

complejo de menor peso, mientras que en aquellos reemplazados con T2 el complejo de mayor peso molecular es el predominante (Garcia-G et al., 2007). En conjunto, estos resultados muestran que la T2 y la T3: *i*) actúan directamente en la regulación de genes TH-dependientes; *ii*) interactúan con proteínas que se unen con alta especificidad a los clásicos TRE, y *iii*) promueven la formación de complejos TRE-TR de distinto peso.

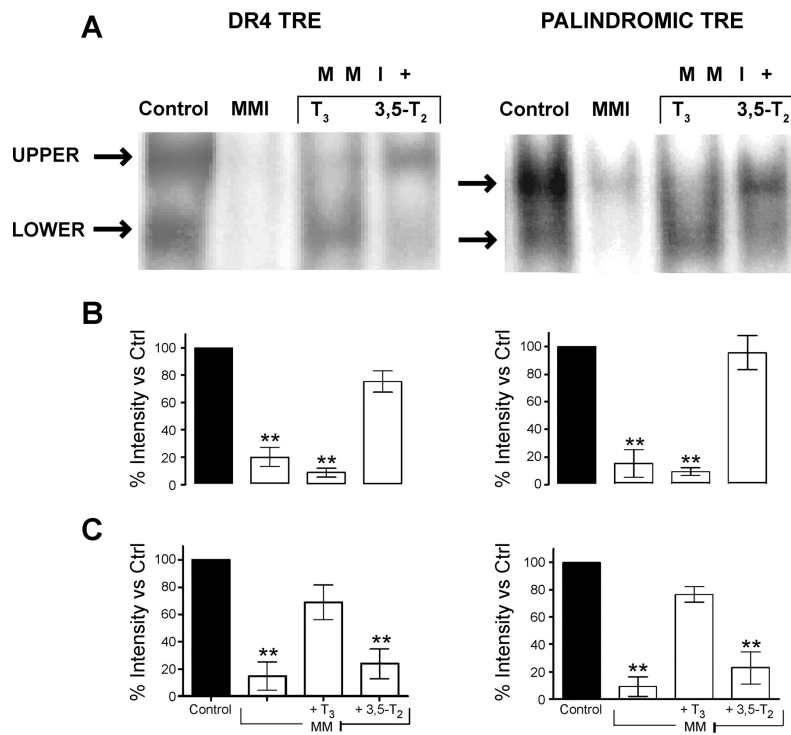


Figura 15. EMSAs representativos de los extractos nucleares de hígados de *F. heteroclitus* tratados con metimazol (4.5 mM) y reemplazados con dosis de 30 nM T3 o T2. Los TRE PAL o DR4 fueron radiomarcados con ³²P. El análisis densitométrico muestra la banda B superior e inferior C. (n=3 ensayos distintos de experimentos distintos) Tomado de: Garcia-G et al., 2007.

4 Planteamientos del proyecto

4.1 Justificación

Las hormonas tiroideas ejercen efectos pleiotrópicos en virtualmente todas las células de los organismos vertebrados, sin embargo, los mecanismos de acción a través de los cuales se realizan estos efectos aún permanecen pobremente comprendidos. La T3 es la hormona a la cual se le atribuyen la mayoría de los efectos biológicos de las hormonas tiroideas, sin embargo, la T2, el objeto de estudio de esta tesis, también presenta actividad biológica. Estudios previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la T2 modula la expresión de genes T3-dependientes posiblemente a través de su interacción con un receptor de hormonas tiroideas. Esto sugiere que la T3 también es una pro-hormona de la cual se origina T2, así planteamos la siguiente hipótesis:

4.2 Hipótesis

La T2 es una hormona tiroidea bioactiva cuyos efectos biológicos se realizan en parte a través de su interacción con un receptor de hormonas tiroideas.

4.3 Objetivo General

Estudiar el mecanismo de acción a través del cual la T2 modula la expresión de genes T3-dependientes.

4.3.1 Objetivos particulares

- Clonar los receptores de hormonas tiroideas que se expresan en el hígado de teleosteos
- Evaluar la capacidad de transactivación in vitro de los TR utilizando un gen reportero acoplado a luciferasa en presencia de T3 ó T2

- Realizar estudios estructura-función de los TR de teleósteos evaluando la capacidad de transactivación de distintas construcciones de TR mutados y quimera utilizando un gen reportero

5 Materiales y Métodos

5.1 Clonación de los TRs de tilapia.

Se realizó la transcripción reversa del RNA total de hígado de tilapia usando oligo-dT. Se usaron las secuencias disponibles de cDNA del TR β 1 de teleósteos disponibles en la base de datos Pubmed. Se clonaron dos fragmentos de 230 y 257 pares de bases los cuales tenían 94% de identidad con otros TR β 1 de teleósteos reportados. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para clonar ambas secuencias usando la técnica de rapid amplification of cDNA ends (RACE). Se obtuvieron dos diferentes cDNAs que codifican para dos isoformas del TR β 1, las cuales difieren solo por 27 pares de bases en el marco abierto de lectura: L-TR β 1 (1188 pb) y S-TR β 1 (1161). Se amplificaron las secuencias completas de los cDNA de las dos isoformas de TR β 1 usando oligonucleótidos específicos para las regiones 5' y 3' y se ligaron en el vector de expresión pcDNA 3.3-TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, California). Las distintas construcciones de receptores mutantes y quiméricas (ver Figura 1 en Mendoza et al., 2013) usadas se realizaron por PCR y se confirmaron por secuenciación una vez insertadas en el vector de expresión (Mendoza et al., 2013).

5.2 Ensayos de transactivación usando transfección transitoria.

Se usaron dos genes T3-responsivos. El gen reportero SERCA (sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase) contiene 5 TREs (2 DR4 y 1 medio sitio) insertados en la región 5' del promotor mínimo del SERCA1 subclonado dentro del vector reportero de luciferasa de luciérnaga pGL3-basic. El Luc-DR4 contiene dos TRE DR4 ideales insertados en la región 5' del promotor mínimo de timidina cinasa (TK) subclonado en el vector pGL2. Se utilizaron

tres líneas celulares: células GH3 (hipófisis de rata), células HEK293T (riñón de embrión humano) y células CV1 (riñón de mono verde). Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina y se mantuvieron a 37°C en incubadora húmeda con 5% CO₂. Las células GH3 se sembraron en platos de 12 pozos (4×10^5 células/pozo) 24 horas antes de la transfección usando DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino dializado (con niveles no detectables de T3 RIA). Las células se cotransfectaron usando lipofectamina 2000 (invitrogen) con la siguiente mezcla de plásmidos 500 ng de los reporteros SERCA ó Luc-DR4 y 300 ng de una de las construcciones del TR β 1 insertadas en pcDNA3.3. El pGL3 basic y el pcDNA 3.3 vacío se usaron como controles. El medio se reemplazó 24 horas después de la transfección con medio fresco que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) dializado más T3 o T2 (100 nM) o vehículo (a concentración final se 10 nM NaOH). Las células se lisaron 48 h después; los lisados se usaron para evaluar la actividad de luciferasa y la concentración de proteínas. Todos los experimentos se realizaron de forma independiente por triplicado (Mendoza et al., 2013).

6 Resultados

Los resultados de esta tesis se publicaron en la siguiente referencia:

Mendoza A, Navarrete-Ramírez P, Hernández-Puga G, Villalobos P, Holzer G, Renaud JP, Laudet V, Orozco A. 3,5-T2 is an alternative ligand for the thyroid hormone receptor β 1. Endocrinology. 2013 Aug;154(8):2948-58. doi: 10.1210/en.2013-1030. Epub 2013 Jun 4.

3,5-T₂ Is an Alternative Ligand for the Thyroid Hormone Receptor β 1

A. Mendoza, P. Navarrete-Ramírez, G. Hernández-Puga, P. Villalobos, G. Holzer, J.P. Renaud, V. Laudet, and A. Orozco

Instituto de Neurobiología (A.M., P.N.-R., G.H.-P., P.V., A.O.), Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Querétaro, 76230 México; Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (G.H., V.L.), Unité Mixte de Recherche 5242 du Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69364 Lyon, France; and NovAliX (J.P.R.), 67400 Illkirch, France

Several liganded nuclear receptors have alternative ligands acting in a tissue-specific fashion and playing important biological roles. We present evidence that 3,5-diiodothyronine (T₂), a naturally occurring iodothyronine that results from T₃ outer-ring deiodination, is an alternative ligand for thyroid hormone receptor β 1 (TR β 1). In tilapia, 2 TR β isoforms differing by 9 amino acids in the ligand-binding domain were cloned. Binding and transactivation studies showed that T₂ activates the human and the long tilapia TR β 1 isoform, but not the short one. A chimeric human TR β 1 (hTR β 1) that contained the 9-amino-acid insert showed no response to T₂, suggesting that the conformation of the hTR β 1 naturally allows T₂ binding and that other regions of the receptor are implicated in TR activation by T₂. Indeed, further analysis showed that the N terminus is essential for T₂-mediated transactivation but not for that by T₃ in the long and hTR β 1, suggesting a functional interaction between the N-terminal domain and the insertion in the ligand-binding domain. To establish the functional relevance of T₂-mediated TR β 1 binding and activation, mRNA expression and its regulation by T₂ and T₃ was evaluated for both isoforms. Our data show that long TR β 1 expression is 10⁶-fold higher than that of the short isoform, and T₃ and T₂ differentially regulate the expression of these 2 TR β 1 isoforms in vivo. Taken together, our results prompted a reevaluation of the role and mechanism of action of thyroid hormone metabolites previously believed to be inactive. More generally, we propose that classical liganded receptors are only partially locked to very specific ligands and that alternative ligands may play a role in the tissue-specific action of receptors. (*Endocrinology* 154: 2948–2958, 2013)

Most nuclear receptors (NRs) are ligand-activated transcription factors that provide a direct link between small extracellular ligands and transcription. The first NRs were discovered as receptors of well-known hormones such as 17 β -estradiol, corticosteroids, or thyroid hormones (THs), and it was demonstrated that transcription of these receptors was activated by a very specific ligand. This formed a strong conceptual framework to understand the mechanism of action of natural hormones. However, some NRs (eg, pregnane X receptors [PXR] and farnesoid receptors [FXR]) are more promiscuous and are

able to bind different ligands with affinities in the micromolar range. This discovery was a first sign that the strong relationship between a specific receptor (eg, TH receptor [TR]) and a specific ligand (eg, T₃) could not be generalized to the entire family of NRs. Recently, evidence has accumulated suggesting that even for the classical endocrine receptors such as the estrogen receptor (ER) or vitamin D receptor (VDR), this relationship may be an oversimplification. The testosterone metabolite 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (3 β Adiol) competes with 17 β -estradiol for binding to ER β in the prostate, the growth of

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

Received January 8, 2013. Accepted May 29, 2013.

First Published Online June 4, 2013

Abbreviations: ER, estrogen receptor; FCS, fetal calf serum; hTR β 1, human TR β 1; LBD, ligand-binding domain; L-TR β 1, long TR β 1 isoform; MMI, methimazole; NR, nuclear receptor; NTD, N-terminal domain; SERCA, sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase; S-TR β 1, short TR β 1 isoform; T₂, 3,5-diiodothyronine; TH, thyroid hormone; TR, TH receptor; TRE, TH response element; VDR, vitamin D receptor.

which it controls (1). Similarly, the VDR is activated by lithocholic acid in the intestine, whereas in other organs, its natural ligand is the bona fide $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 (2, 3). Thus, classical NRs can have different ligands acting in a tissue-specific fashion that can play important biological roles.

T_3 has long been considered the main TH that exerts its effects by interacting with the 2 vertebrate paralogs, $TR\alpha$ and $TR\beta$. However, we and others have shown that 3,5-diiodothyronine ($3,5-T_2$ or T_2), a naturally occurring iodothyronine that results from T_3 outer-ring deiodination (4, 5), is a bioactive molecule (6–8). The initial reports describing T_2 bioactivity showed nongenomic effects upon oxygen consumption different from those induced by T_3 (9, 10). Later, T_2 was also shown to act at the genomic level (6, 7, 11–15), suggesting that T_2 could be, as are lithocholic acid and 3β Adiol for VDR and $ER\beta$, respectively, an alternative ligand for $TR\beta$ 1 and may play a significant role in vivo.

Previous work from our laboratory showed transcriptional effects of both T_2 and T_3 upon hepatic mRNA levels of *GH*, *D2*, and *TR\beta*1 in fish (6, 7). Besides its transcriptional effects, we have demonstrated that hepatic nuclear proteins from hypothyroid killifish replaced with T_2 or T_3 form protein complexes of different weights when incubated with the TH response element (TRE), suggesting that T_2 exerts its transcriptional effects by interacting with a different isoform of the TR (7). Furthermore, we and others have shown that some teleosts express 2 isoforms of the $TR\beta$ 1 that differ only by an insertion of 9 amino acids located at the beginning of the ligand-binding domain (LBD: α -helixes 2 and 3) in the long $TR\beta$ 1 isoform (L- $TR\beta$ 1), whereas the short $TR\beta$ 1 isoform (S- $TR\beta$ 1) lacks the insert (16–18). We here analyzed whether the genomic effects of T_2 were mediated by its interaction with a specific isoform of the $TR\beta$ 1 in teleosts. Our data show that T_2 binds to and activates L- $TR\beta$ 1 and regulates $TR\beta$ gene expression in vivo. Taken together, our results prompted a reevaluation of the role and mechanism of action of TH metabolites previously believed to be inactive. More generally, we propose that classical receptors are only partially locked to very specific ligands and that these alternative ligands may play a role in the tissue-specific action of receptors.

Materials and Methods

In vitro experimental design

*Cloning of the full-length isoforms of the long and short TR\beta*1 from the tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Total RNA from tilapia liver was reverse transcribed (oligo-deoxythymidine). Based on available sequences of teleost $TR\beta$ 1

cDNAs (accession number AF302247.1) (16, 19), degenerate primers that included or not the 27-bp insert were used in touchdown PCRs. The 230- and 257-bp clones obtained had around 94% identity to other teleost $TR\beta$ 1 genes reported. Specific primers were used in 5'- and 3' rapid amplification of cDNA ends in a series of nested PCRs. Two different cDNAs that encode 2 isoforms of the $TR\beta$ 1 were obtained that differ only by 27 bp in their open reading frame: L- $TR\beta$ 1 (1188 bp) and S- $TR\beta$ 1 (1161 bp). The entire $TR\beta$ 1 cDNA sequences were amplified using specific oligonucleotides for the 5'- and 3'-flanking regions and ligated into pcDNA 3.3-TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, California).

Constructs of chimeric and truncated $TR\beta$ 1 isoforms

All $TR\beta$ 1 isoforms used in the present work are depicted in Figure 1. Once generated by PCR, each $TR\beta$ 1 isoform was subcloned into pcDNA 3.3-TOPO and checked by sequencing.

Transient transfection assays

Two T_3 -responsive vectors were used. sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) contains 5 TREs (2 DR4s and one half-site) inserted upstream of the skeletal muscle-specific SERCA1 minimal promoter subcloned into the pGL3-basic firefly luciferase reporter vector (20), and Luc-DR4 contains 2 ideal DR4 TREs inserted upstream from the TK minimal promoter subcloned into the pGL2 (16). Three cell lines were used: GH3 cells (T_3 - and T_2 -responsive [12, 14] and express low levels of TR [NURSA]), HEK293T (T_3 -responsive) (21), and CV1 cells (lack NR expression) (22). All cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin and kept at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 . GH3 cells were plated on 12-well plates (4×10^5 cells per well) 24 h before transfections

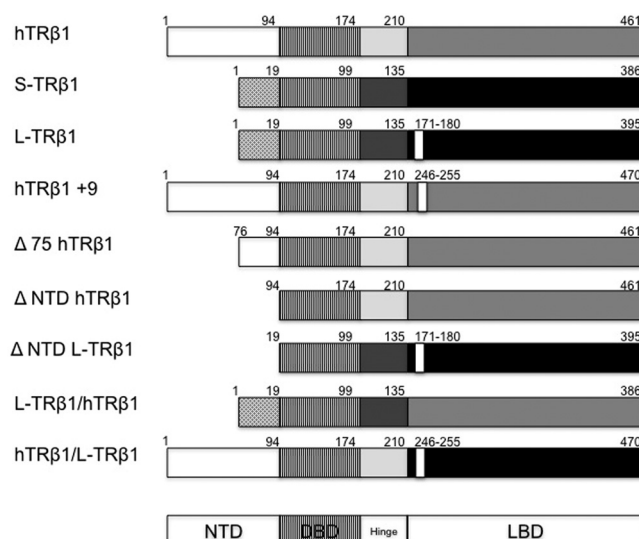


Figure 1. $TR\beta$ 1 constructs. Schematic representation of the $TR\beta$ 1 isoforms hTR β 1, S-TR β 1, and L-TR β 1 expressed in tilapia. The 9–amino-acid insert is represented by a rectangle in the LBD. hTR β 1+9 is the hTR β 1 into which the 9 amino acids found in the L-TR β 1 were inserted; Δ 75 hTR β 1, Δ NTD hTR β 1, and Δ NTD L-TR β 1 are mutated forms of the $TR\beta$ 1 created to analyze the role of the NTD in transactivation. In the chimeras, the full LBD was exchanged between hTR β 1 and L-TR β 1. Abbreviation: DBD, DNA-binding domain.

using DMEM supplemented with 10% dialyzed FCS, which contained nondetectable levels of T₃ (RIA). Cells were cotransfected (Lipofectamine 2000) with 500 ng of either SERCA or Luc-DR4 reporters and 300 ng of one of the TRβ1 constructs inserted into pcDNA3.3 (Figure 1). Empty pGL3 basic and pcDNA 3.3 vectors were used as controls. Media were replaced 24 hours after transfection with fresh culture medium containing 10% dialyzed FCS plus T₃ or T₂ (100nM) or vehicle (final concentration, 10nM NaOH). Cells were lysed 48 hours later; the lysates were assayed for luciferase activity and protein concentration. All experiments were carried out independently at least 3 times.

T₃ binding assays

The TRβ1 cDNA sequences that encode the 3 native isoforms (long, short, and human) were ligated into the vector pXENEX1 (23). *Xenopus* oocytes were injected with 50 nL (100 ng/oocyte) of the different RNAs and incubated for 2 days. T₃ and T₂ binding affinities (K_d) were determined as previously described (24). Briefly, dilutions of expressed protein were incubated overnight at 4°C with 1-3,5,3-[¹²⁵I]T₃ in 100 μL binding buffer (400mM NaCl, 20mM KPO₄ [pH 8], 0.5mM EDTA, 1.0mM MgCl₂, and 10% glycerol) containing 1 mM monothiolglycerol and 50 μg of calf thymus histones. Bound [¹²⁵I]T₃ was isolated by gravity flow through a 2-mL column of Sephadex G-25 to separate bound from free ligand, and bound ligand was quantified using a γ-counter. The approximate number of binding sites per unit volume in the protein preparation was calculated from specific activity of [¹²⁵I]T₃ (3825 counts/min = 1 fmol). Saturation binding analyses were performed with about 20 fmol of TR protein and varying concentrations of [¹²⁵I]T₃ (0.05nM–2nM). K_d values were calculated by fitting saturation curves to the Scatchard equations. A concentration range of 0.1nM to 500nM was used to evaluate competition between T₃ and T₂.

In vivo experimental design

Juvenile tilapias of around 2 g were kept in freshwater tanks at a temperature of 28°C on a 12-hour light, 12-hour dark cycle and fed ad libitum with a commercial diet. Treatments (n = 10 fish per experimental group) were administered by immersion as previously described (6, 7). After treatment, fish were killed by decapitation, and the liver was quickly removed and divided into 2 segments for mRNA (quantitative PCR) and intrahepatic T₃ quantification (RIA) (6). All animal experimentation protocols and procedures were reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of our Institute.

Two experimental approaches were used to evaluate the effects of T₃ and T₂ upon TH-dependent gene regulation. The effects of TH challenge were analyzed by treating fish groups with 100nM T₃ or T₂ for 24 hours, as previously described (7). To dissect the effects of T₃ and T₂, TH synthesis was blocked (4.5mM methimazole [MMI]) and fish groups were simultaneously cotreated with T₃ or T₂ at a final concentration of 30nM for 5 days (7). This MMI treatment significantly reduces the intrahepatic TH content in tilapia, facilitating measurement of the effects of exogenous T₃ or T₂ upon gene regulation (7). For both experiments, control and experimental groups were handled in the same manner, and at least 2 independent treatments were performed.

Quantitative PCR

Total RNA was extracted from tilapia livers and cDNA was reverse transcribed from 2 μg of total hepatic RNA using an oligo-deoxythymidine primer. Quantitative PCR was carried out in duplicate using tilapia β-actin as an internal standard as previously described (7). For β-actin determination, a 234-bp fragment was cloned (accession number AY116536.1) with oligonucleotides 5'-GTGACATCAAGGAGAAGCT-3' (sense) and 5'-CGACGTCACACTTCATGAT-3' (antisense) and used to construct a standard curve. Internal oligonucleotides were used (sense 5'-ACTTCGAGCAGGAGATGG-3' and antisense 5'-GGTGGTTTCGTGGATTCC-3') to amplify a product of 170 bp (3 seconds at 95°C, 7 seconds at 52°C, 8 seconds at 72°C for 45 cycles). To clone and quantify L-TRβ1, a single pair of specific primers (sense 5'-GTGAAGGAAGCTAAGCCTGA-3' and antisense 5'-CACAAGGCAGCTCACAGAAC-3') was designed. The 232-bp clone obtained was used to construct a standard curve, and experimental mRNA samples were analyzed (3 seconds at 95°C, 10 seconds at 52°C, and 10 seconds at 72°C for 55 cycles). For quantification of S-TRβ1, a 141-bp fragment was cloned (sense 5'-GCGGAAATTCCTGCCTGAG-3' and antisense 5'-CACAAGGCAGCTCACAGAAC-3'), and a standard curve was constructed. A 135-bp mRNA fragment was measured with internal primers 5'-GCGGAAATTCCTGCCTGAG-3' (sense) and 5'-GCAGCTCACAGAACATGGGC-3' (antisense) (2 seconds at 95°C, 8 seconds at 52°C, and 7 seconds at 72°C for 45 cycles). For D2 mRNA quantification, a pair of specific primers (sense 5'-GAA ACT TGG TCG TGA GGC-3' and antisense 5'-GCT GGT CTA CAT CGA CGA-3') was used to clone and quantify a 255-bp fragment (2 seconds at 95°C, 7 seconds at 58°C, and 10 seconds at 72°C for 50 cycles). GH mRNA quantification was performed as previously described (7). In all cases, the standard curve ranged from 10² to 10⁹ molecules/μL. Real-time PCR detection and data analyses were carried out on a Light Cycler instrument (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana), as previously described (7).

Statistical analysis

Results were analyzed using ANOVA coupled to a Tukey posttest (control vs treatments) and the software GraphPad Prism version 5. Differences were considered statistically significant at P values ≤ .05.

Results

Tilapia expresses 2 isoforms of TRβ1

We have cloned 2 cDNA sequences from tilapia liver that encode for 2 distinct TRβ1 isoforms (GenBank accession numbers: KF224971 and KF224972). Both sequences lack 75 amino acids at the N-terminal domain (NTD), as compared with human TRβ1 (hTRβ1). Most importantly, one of them, designated as the L-TRβ, contains a 9-amino-acid insert in the LBD, whereas the other one, named the S-TRβ1, lacks it. The amino acid sequences for S-TRβ1 and L-TRβ1 show 95% and 97% identity, respectively, to other teleostean TRβ1. The L-TRβ1 had been described initially in the Japanese floun-

der (25) and later in other teleosts (16); however, just a partial (296–amino-acid) sequence was available for tilapia, which included only the LBD (GenBank accession number AF302247.1). The genome analysis from several teleosts (Ensemble) shows that the 9–amino-acid insert is encoded in a single 27-bp exon, suggesting that the long isoform is produced by an alternative-splicing event.

T₂ inhibits the binding of T₃ to L-TRβ1 in vitro

As depicted in Figure 2 and Table 1, T₃ binds to all 3 TRβ1 isoforms. In contrast, T₂ binds to L-TRβ1 and hTRβ1, but the binding to S-TRβ1 is very low. IC₅₀ values calculated from binding assays are in the same range for T₃ bound to the 3 TRβ1 isoforms as well as for T₂ bound to L-TRβ1. However, these values are higher for T₂ bound to hTRβ1 and even more so when bound to S-TRβ1. These results clearly show that 1) T₂ binds with a high affinity to L-TRβ1, 2) S-TRβ1 binds only to T₃, and 3) hTRβ1 can bind both ligands, but the binding affinity for T₃ is around 40-fold higher than that for T₂.

T₂ stimulates L-TRβ1 and hTRβ1 in GH3 cells

Cotransfection of T₃-responsive GH3 cells with the SERCA reporter gene together with an expression vector

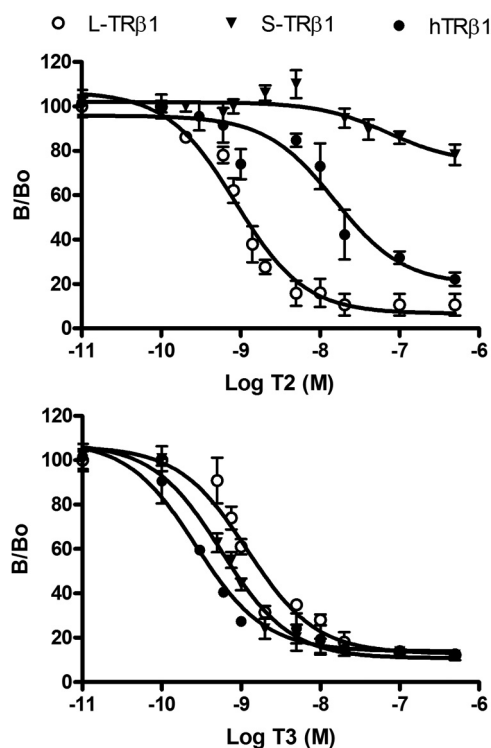


Figure 2. Displacement curves of [¹²⁵I]T₃ by T₂ (top panel) or T₃ (bottom panel) bound to L-TRβ1, S-TRβ1, and hTRβ1. Translation products were incubated with 1 nM of [¹²⁵I]T₃ alone or in the presence of increasing concentrations of T₃ or T₂ (98 and 99% purity, respectively) as described in Materials and Methods. Data are shown as a percentage of specific binding (B) with respect to binding in the absence of competitor (Bo). Results represent the means ± SEM. The 95% confidence intervals were different for all receptors.

encoding hTRβ1 or tilapia S- or L-TRβ1 transfected in the absence of hormone elicited repressed expression of the SERCA reporter below the basal levels, suggesting that all isoforms recruit corepressors (See Supplement Figure 1 published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>). EC₅₀ values from dose-response curves (Table 1) show activation of hTRβ1 and L-TRβ1 by both T₃ and T₂. In contrast, S-TRβ1 showed activation only in the presence of T₃ (Table 1 and Figure 3). Although the response was relatively modest, these results have been replicated in 6 independent experiments, each in triplicate, and they were statistically significant; moreover, the effect of T₂ on SERCA promoter activation was equal to the well-documented effect of T₃. Interestingly, the same effects were observed with the *Fundulus* TRβ1 (data not shown), suggesting that the ability of T₂ to selectively activate L-TRβ1 may be conserved across teleost fish species. It is important to note that GH3 cells express both endogenous and the transfected TR genes, but the expression of endogenous TRs in GH3 is blocked by T₃ and T₂ treatment (12), which allows the effects of the ectopically introduced TRβ1 to be detected above the endogenous background.

We then tested whether the effects were seen in other cell lines or when using a different reporter gene. When SERCA was transfected into CV1 or HEK293T cells, a robust activation by T₃ was observed for all 3 TRβ1s only in the HEK293T cell line and for S-TRβ1 in CV1 cells (Figure 4). This suggests that T₂ activates L-TRβ1 in a cell-specific manner. Similarly, when we used a LUC-DR4-based reporter construct in GH3 cells, no T₂-mediated transactivation was observed; on the contrary, T₂ repressed this reporter when bound to L-TRβ1 in this cell line (Figure 4). Thus, the transactivating effect induced by T₂ in vitro is specific to the reporter gene system employed (SERCA) together with GH3 cells and the long isoform of the tilapia TRβ1.

The 9–amino-acid insert impairs the activation of hTRβ1 in the presence of T₂ and T₃

Interestingly, we noticed that hTRβ1, used as a control, was also activated by T₂ in a promoter- and cell-type-specific manner. This was astonishing because, in terms of sequence, hTRβ1 is equivalent to S-TRβ1 because it does not contain the 9–amino-acid insertion found in L-TRβ1. To further characterize the role of this insert upon the ability to transactivate in the presence of T₂, hTRβ1+9 was constructed. This chimeric receptor showed no response to T₂ (Figure 5), suggesting that the conformation of hTRβ1 naturally allows T₂ binding, whereas the inser-

Table 1. K_d, IC₅₀, and EC₅₀ Values for L-TRβ1, S-TRβ1, and hTRβ1 When Ligated to T₃ or T₂

	L-TRβ1		S-TRβ1		hTRβ1	
	T ₃	T ₂	T ₃	T ₂	T ₃	T ₂
Binding assays						
K _d , nM	0.2	0.2	0.2	17	0.2	8
IC ₅₀	9 × 10 ⁻¹⁰	8 × 10 ⁻¹⁰	5 × 10 ⁻¹⁰	6 × 10 ⁻⁶	3 × 10 ⁻¹⁰	1 × 10 ⁻⁸
Transactivation assays						
EC ₅₀	4 × 10 ⁻⁹	2 × 10 ⁻¹³	3 × 10 ⁻¹⁰	1 × 10 ⁻⁵	9 × 10 ⁻¹²	4 × 10 ⁻⁷

tion of the 9–amino-acid sequence disrupts such conformation and impairs T₂ stimulation of the TR. Taken together, our results suggest that both L-TRβ1 and hTRβ1 independently reach a conformation that allows activation by T₂ and that, in the context of the tilapia receptor, the 9–amino-acid insert regulates this conformation.

The NTD of L-TRβ1 and hTRβ1 is essential for transactivation in the presence of T₂

The results described above suggest that regions of the receptor, in addition to the 9–amino-acid insert, are implicated in TR activation by T₂. Another important difference between L-TRβ1 and hTRβ1 is their NTD, which contains a transactivation function region (AF-1) that is often cell type- and promoter-specific (26, 27). The hTRβ1 NTD comprises 94 amino acids, whereas that of L-TRβ1 has only 19. Three TRβ1 constructs were tested to explore whether the NTD participates in T₂ activation. As shown in Figure 5, ΔNTD L-TRβ1, which lacks the full NTD, lost T₂ but not T₃ transactivating capacity, suggesting that the NTD is indeed required for the T₂ response. However, Δ75 hTRβ1, which still retains the 19 amino acids that are present in the teleostean NTD and includes the putative AF-1, showed statistically significant T₂ stimulation (Figure 5). Furthermore, when the complete NTD was removed from the hTRβ1 (ΔNTD hTRβ1), T₂-mediated transactivating capacity was lost. Together, these results suggest that the NTD of L-TRβ1 and hTRβ1 is required for T₂-mediated transactivation, but not for that of T₃. This further suggests that a specific interaction may exist between this region and the 9–amino-acid insert present in L-TRβ1 that would account for the specific effect of T₂ on L-TRβ1 but not S-TRβ1. This result indicates that in the presence of T₂, L-TRβ1 and hTRβ1 require the NTD to effectively reach their active conformations, possibly by acting as a stabilizer of the TR-coactivator interaction.

The NTD of L-TRβ1 and hTRβ1 regulates the effect of T₂ in an isoform-specific fashion

To test whether a specific tertiary structure is required to modulate the transactivating capacity of L-TRβ1 and hTRβ1 in the presence of T₂, 2 chimeric TRβ1s were constructed in which the LBDs of the 2 receptors were exchanged. Both chimeric TRβ1s were activated only by T₃ and not by T₂ (Figure 5), reinforcing the notion that the conformation of L-TRβ1 and hTRβ1 plays an important role in allowing activation by T₂, most probably via spe-

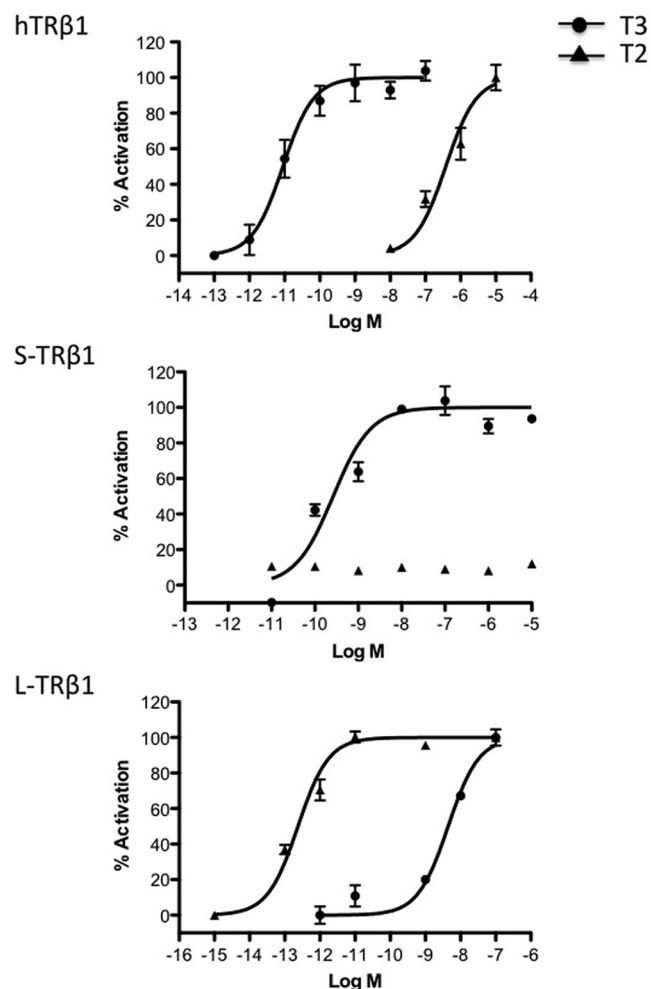


Figure 3. Dose-response curves for T₃ or T₂ activation of hTRβ1, L-TRβ1, and S-TRβ1 isoforms. Transactivation activity was tested using a reporter gene (SERCA) in GH3 cells with increasing concentrations of T₃ or T₂. Results represent the mean ± SEM of at least 3 independent experiments, each in triplicate. X-axis represents the logarithm of T₃ or T₂ molar concentration.

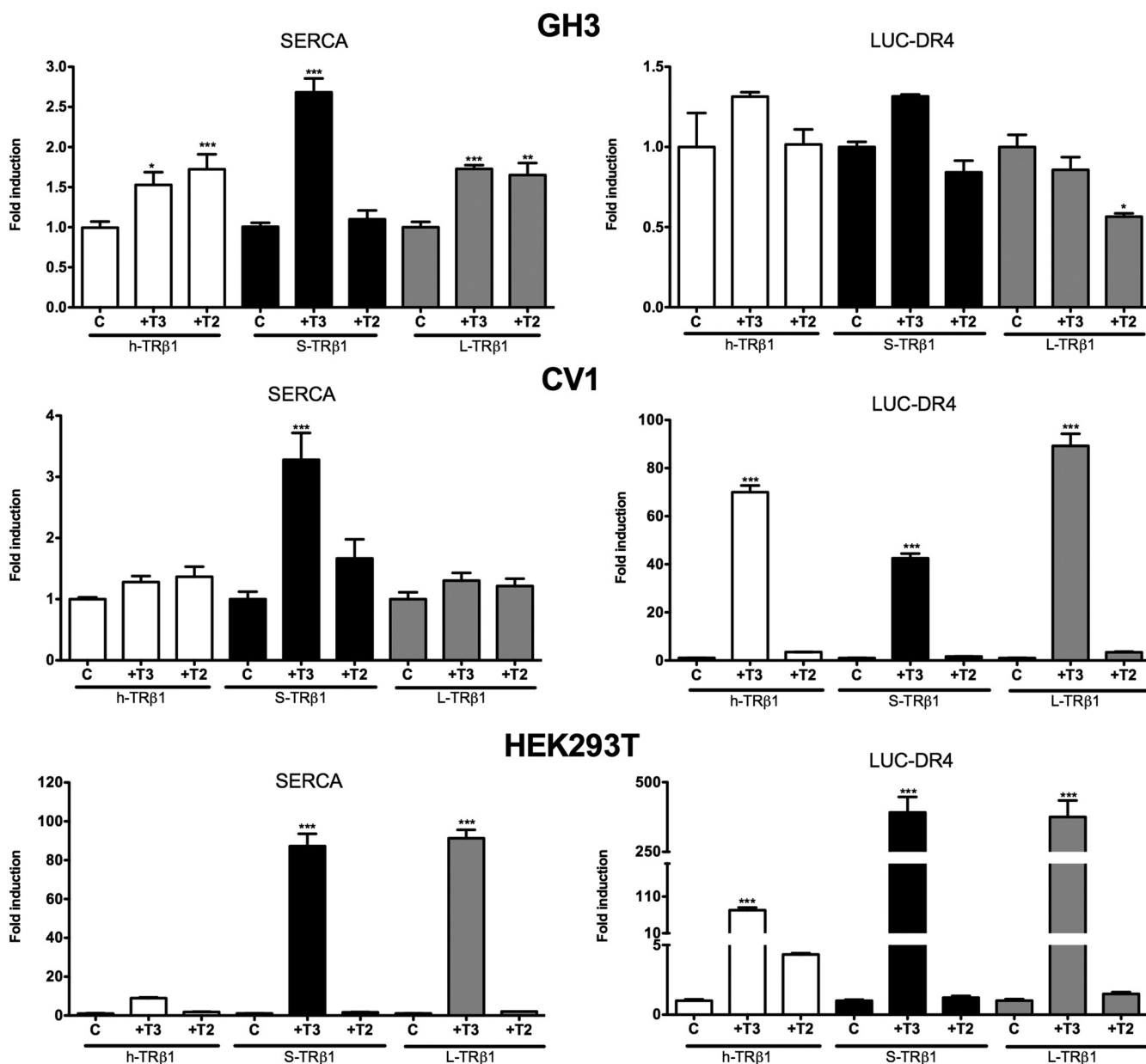


Figure 4. T_2 transcriptional effect is selective for the reporter gene and cellular matrix. GH3, CV1, or HEK293T cells were cotransfected with either a SERCA or a LUC-DR4 reporter gene together with hTR β 1, S-TR β 1, or L-TR β 1 and treated with vehicle (c) or 100nM T_3 or T_2 . The luciferase assay was performed 48 hours after transfection. Data are expressed as fold induction versus vehicle at 100% activation. Results represent the mean \pm SEM of 2 to 3 independent experiments, each in triplicate. *, $P < .1$; **, $P < .001$; ***, $P < .0001$.

cific interactions between the NTD and the N-terminal part of the LBD in which the 9–amino-acid insert is located. Moreover, these results suggest that T_2 and T_3 induce different conformational changes, explaining their different promoter and cell-type activities. Without discounting putative posttranslational modifications of the TR, these results indicate that the binding of T_2 to L-TR β 1 or hTR β 1 is indeed promoting the activation of the reporter gene.

L-TR β 1 is regulated by T_2 in vivo

As shown in Figure 6 (top panel), the expression of L-TR β 1 is 10^6 -fold higher than S-TR β 1. TH challenge

significantly increased intrahepatic T_3 levels in those tilapias exposed to T_3 (21.80 ± 4.8 pg/mg tissue) but not in those treated with T_2 (7.46 ± 0.2 pg/mg tissue), as compared with the control group (6.9 ± 0.4 pg/mg tissue). T_3 treatment decreased only S-TR β 1 mRNA expression, whereas in contrast, T_2 treatment exclusively decreased L-TR β 1 mRNA levels. The 2 TH-regulated genes *GH* and *D2* were up- and down-regulated, respectively, by both T_3 and T_2 (Figure 6).

When treated with MMI alone or coadministered with T_2 , fish showed significantly decreased intrahepatic T_3 concentrations (1.02 ± 0.3 and 1.30 ± 0.3 pg/mg tissue,

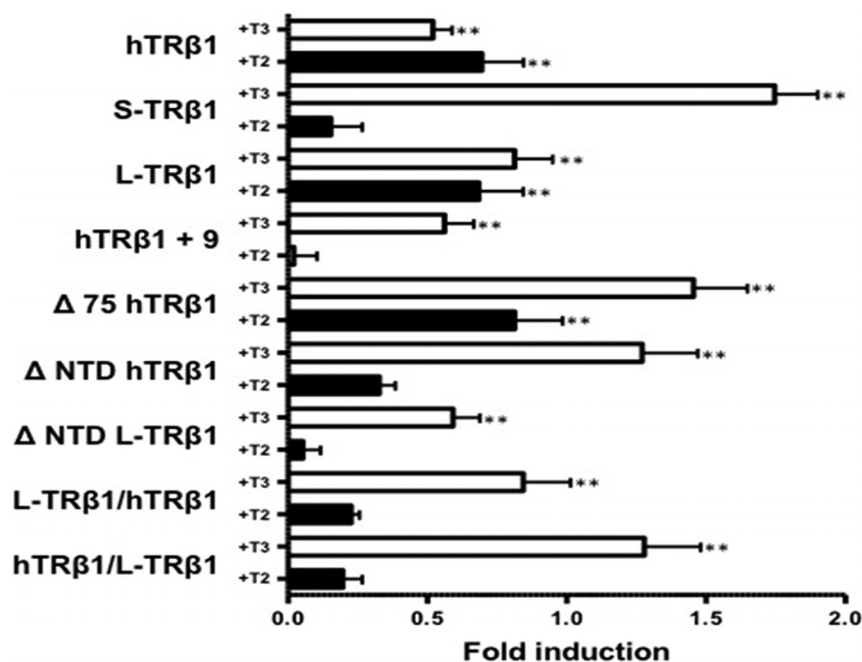


Figure 5. T₂ activates L-TRβ1 and hTRβ1 in a specific, NTD-LBD-dependent manner. A *SERCA* luciferase reporter, a pCDNA3.3 internal control, and the TRβ1 expression vectors indicated were transfected into GH3 cells. The cells were treated with 100nM T₃ or T₂ and lysed; relative luciferase activity was determined, and for each construct, induction was calculated with respect to a transfected control without treatment. Results represent the mean ± SEM of 3 to 6 independent experiments, each in triplicate. Mean and SEM are indicated. **, *P* < .001.

respectively) as compared with controls and with fish co-treated with MMI plus T₃ (7.2 ± 0.3 and 6.34 ± 0.2 pg/mg tissue, respectively). Even though MMI treatment did not completely deplete intrahepatic TH, T₃ levels were lowered enough to induce a response in T₃-dependent genes. Indeed, MMI treatment significantly increased hepatic mRNA expression levels of L-TRβ1, S-TRβ1, and *D2*, whereas it decreased that of *GH* (Figure 6). Interestingly, T₃ replacement restored euthyroid expression of S-TRβ1, and T₂ had a similar effect upon L-TRβ1 expression, whereas both T₃ and T₂ replacement restored that of *GH* and *D2* (Figure 6). Together, results show that T₂ and T₃ specifically regulate expression of L-TRβ1 and S-TRβ1 mRNA, respectively.

Discussion

In the present study, we show that T₂ binds and activates, in a cell- and promoter-specific manner, both the long fish isoform as well as the hTRβ1, whereas T₂ is inactive and has low affinity for the short fish TRβ1 isoform. We explored the mechanistic basis of this selective activation pattern and found that it is dependent upon a specific functional interaction between the NTD and the N-terminal part of the LBD that contains the insertion present in L-TRβ1. In addition, we observed that in vivo, T₂ exerts

a specific regulatory effect on the expression of L-TRβ1. All these data suggest that T₂ should be considered as a ligand of TRβ1; thus, it is an active molecule that can exert specific physiological or developmental effects.

T₂ binds to and activates L-TRβ1 and hTRβ1 in vitro

The question of whether T₂ binds to the TR has been unresolved since the early reports analyzing T₂ bioactivity. Here we show for the first time that T₂ is as potent a ligand as T₃ when binding to L-TRβ1. Furthermore, T₂ binds to hTRβ1 with lower affinity than T₃, as previously shown for rat TRβ1 (11). Our present results suggest that T₂ is only a partial agonist of hTRβ1, whereas for fish T₂ is a physiologically relevant T₃ derivative. The facts that T₂ induces higher transactivating activity in L-TRβ1 than T₃ and that it specifically regulates L-TRβ1 expression in

vivo (see below) suggest that T₂ is the main ligand for this TR isoform in fish. Thus, T₂ is another natural ligand for TRβ1, thereby increasing the possible pleiotropic effects of THs.

T₂ is a cell- and promoter-specific TRβ1 activator

This is the first report showing that the effects of T₂ are in part mediated by a TR. Here we show that T₂ is a selective activator of L-TRβ1 in tilapia as well as of hTRβ1. In vivo, T₂ up-regulates transcription of its receptor; however, results from the in vitro studies show that T₂ activity is cell- or promoter-specific. The most obvious explanation for these results is that T₂ could interact with the ligand-binding pocket of the receptor and produce a specific conformation that would allow the recruitment of a specific set of coactivators. In accord with this model, we have previously shown that nuclear proteins from fish exposed to T₂ or T₃ form different complexes with the TRE (7), suggesting that T₂ effectively alters the conformation of the receptor. Given the observed cell-type specificity, we can predict that various coactivators will be present in some cell types (such as GH3) but not in others (CV-1 and HEK293). It is likely that the promoter structure adds an additional layer of complexity to this model, perhaps by influencing the specific TR conformation generated by T₂, because the structure of the TRE as well as the TR isoform

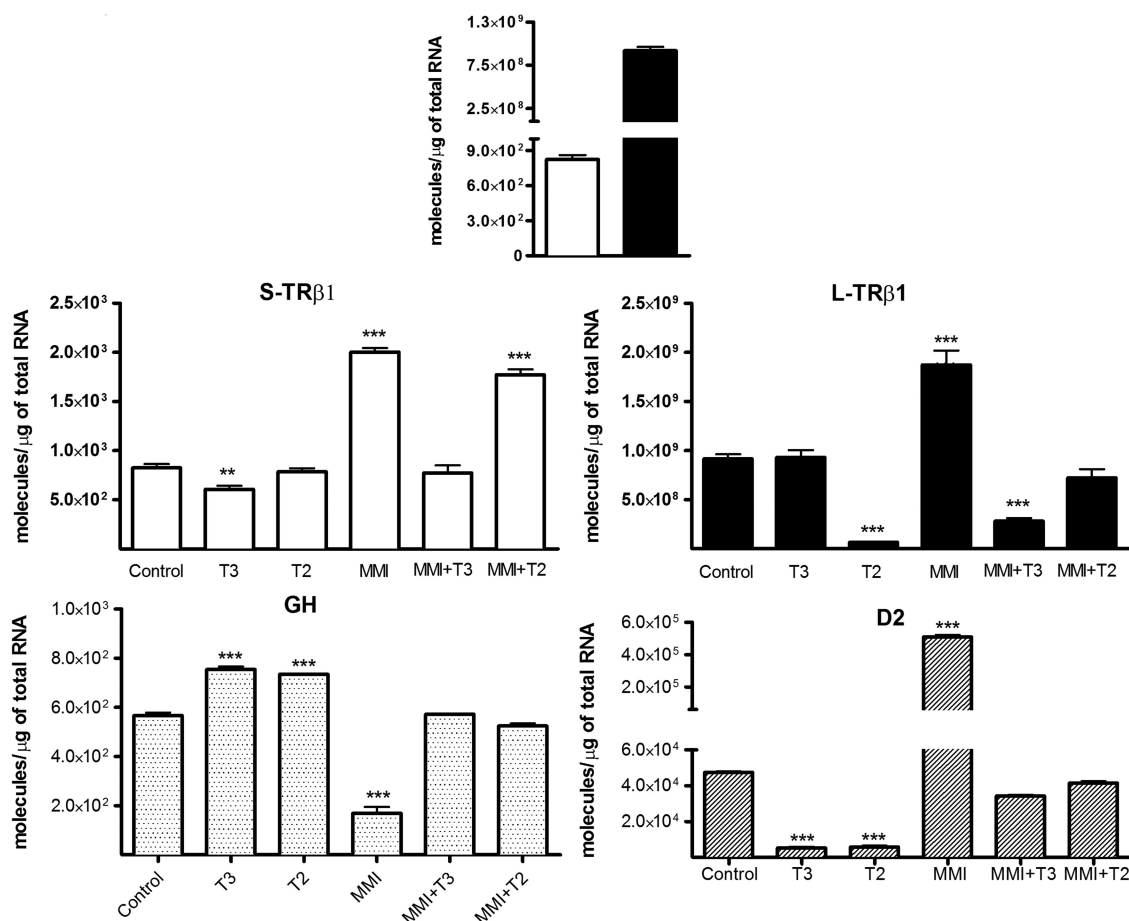


Figure 6. T₂ modulates the expression of L-TRβ1 in tilapia. For TH challenge, tilapias were treated with 100nM T₃ or T₂ for 24 hours. To dissect the effects of T₃ and T₂ upon gene regulation, TH synthesis was blocked by treating fish groups for 5 days with 4.5 mM MMI alone or together with 30nM T₃ or T₂. All treatments were administered by immersion. mRNA levels of S-TRβ1, L-TRβ1, D2, and GH were measured by RT-PCR. Top panel, mRNA levels of L-TRβ1 and S-TRβ1 in the control group; mRNA levels of S-TRβ1, L-TRβ1, D2, and GH in both experimental conditions are shown. n = 10 per experimental group. ** P < .001, *** P < .0001.

could determine the degree of inhibition of a specific gene, as seen in our present results (T₂ repression of L-TRβ1 in GH3 cells) or as observed in the generalized resistance to TH syndrome (28). Thus, it has to be emphasized that the SERCA promoter on which we see an effect has a complex organization with 2 direct repeats and a monomeric site that might contribute to generating a very distinct conformation of the TRβ1 with bound T₂ (20). It must be recalled that the structure of the response element can interfere with the pharmacological response of other NRs (eg, ERs and glucocorticoid receptors) (29). In the case of the glucocorticoid receptor, this effect has been explained on a structural basis (30, 31). Thus, we propose that 3,5-T₂ should be viewed as a selective TH modulator (STORM) that may play a very specific role in regulating a set of genes in a physiologically or developmentally specific fashion (32). A transcriptomic analysis of the T₂ response would be welcomed to determine the set of genes regulated by this compound.

Mechanistic basis of T₂ selectivity for fish TRβ1 isoforms

In the present study, we show that L-TRβ1 mediates transactivation in the presence of T₂ or T₃, whereas S-TRβ1 does so only in the presence of T₃. Despite the fact that L-TRβ1 and S-TRβ1 differ only by a 9-amino-acid insert in the LBD of L-TRβ1, the functional consequence of this insert seems remarkable because it allows the differential activation of the receptor by other ligands. The ability of L-TRβ1 to activate transcription in the presence of T₂ can be explained through at least 2 possible mechanisms: 1) the 9-amino-acid insert could stabilize the L-TRβ1-T₂ interaction, and/or 2) T₂ bound to L-TRβ1 could induce the recruitment of a set of coactivators different from those recruited by the TR bound to T₃. Present results suggest that the 9-amino-acid insert of L-TRβ1 modifies the conformation of the LBD, allowing a strong interaction with T₂ or T₃ and, as discussed later, promoting transactivation through the L-TRβ1 or hTRβ1.

The fact that T₂ activates both L-TRβ1 and hTRβ1 but not S-TRβ1 is puzzling, because hTRβ1 lacks this insert but is stimulated in the presence of T₂. Our results showed that when the 9 amino acids were inserted into the LBD of hTRβ1, T₂ responsiveness was abolished, raising the question of why the 9-amino-acid insert changes TR ligand preference in tilapia but not in human. A plausible explanation is that although the 9-amino-acid insert is fundamental for T₂-mediated activation in the teleostean TR, it changes the conformation of hTRβ1, preventing activation by T₂. In this context, aside from the 9-amino-acid insert, the LBDs of hTRβ1 and L-TRβ1 differ at 17 amino acids distributed throughout the domain. These amino acids could modify the LBD structure, allowing both the stimulation of hTRβ1 by T₂ or T₃ as well as T₂-mediated activation of hTRβ1 without requiring the 9-amino-acid insert. The analysis of this possibility is beyond the scope of this work; however, the LBD of hTRβ1 and L-TRβ1 is only one of the domains related to the T₂ responsiveness observed in these TRs (see below).

Our results clearly show that the NTD may also be related to the activation of L-TRβ1 and hTRβ1 in the presence of T₂. The NTD, like the LBD, has been established as essential for T₃-dependent TR transactivation, heterodimer formation, and coactivator recruitment, at least in mammals (33, 34). Indeed, no activation is observed in the presence of T₂ when the NTD is deleted from hTRβ1 or L-TRβ1. Most interestingly, significant activity is observed in the presence of T₂ when the NTD of hTRβ1 is truncated to only 19 amino acids, resembling the length of the L-TRβ1 NTD. This domain contains the AF-1, which modulates the activity of the receptor (26). Moreover, the chimera in which the hTRβ1 and L-TRβ1 LBDs were interchanged showed significant activity only in the presence of T₃ but not of T₂ (Figure 5). Together, these results suggest that when bound to T₂, L-TRβ1 and hTRβ1 require their native NTD to adopt the active conformation. Another possibility would be that T₂ binding shapes the LBD in a way that allows the interaction with a different set of coactivators, which in turn would require the AF-1 region to stably interact with L-TRβ1 or hTRβ1 and promote gene expression. Thus, as illustrated in Figure 7, a specific and cooperative interaction between the NTD and LBD on L-TRβ1 and hTRβ1 seems necessary to initiate T₂-mediated transactivation, whereas the binding of T₂ or T₃ could induce the recruitment of 2 different sets of coactivators. This mechanism is reminiscent of the situation found for other NRs such as the androgen receptor (35), but to our knowledge, it has never before been observed for TRs.

The structure of the ligand could also explain the difference of effects between T₂ and T₃. In the [hTRβ1 LBD/

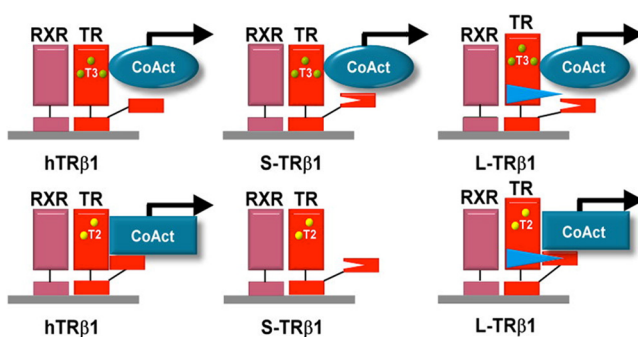


Figure 7. Schematic representation of the putative action mechanism of L-TRβ1, S-TRβ1, and hTRβ1 when ligated to T₃ or T₂. T₃ activates all 3 TRβ1 isoforms without the participation of the NTD, whereas T₂ activates hTRβ1 and L-TRβ1 in an NTD-dependent fashion that includes a putative interaction of this domain with the 9-amino-acid insert of the L-TRβ1. RXR, retinoid X receptor; CoAct, coactivators.

T₃] complex (PDB entry 1XZX), the 3' iodine atom of T₃ is surrounded by a hydrophobic cluster: Phe269 CE1 (4.1 Å), Phe269 CD1 (4.0 Å), Phe272 CB (4.4 Å), Phe272 CD1 (4.3 Å), and Thr273 CG2 (5.0 Å) from H3; Gly345 CA (4.5 Å) and Leu346 CD2 (4.0 Å) from loop 6-7; Met442 SD (4.1 Å) from H11; and Phe455 CZ (4.9 Å) from H12; it also makes a Van der Waals contact with Gly344 O from loop 6-7 (4.0 Å, slightly too long to be a halogen bond, although the geometry would be correct: C-I•••O angle 147.7°, I•••O=C angle = 116.6°) (36) (Supplement Figure 2). Therefore, the 3' iodine atom of T₃ contributes to the stabilization of the coactivator-binding surface involving H12. The residues of hTRβ1 that contact the 3' iodine atom of T₃ are conserved in S- and L-TRβ1, in good agreement with the similar level of binding affinity of T₃ for S- and L-TRβ1 compared with hTRβ1 (Table 1). When T₂ is bound to hTRβ1 LBD, the absence of the 3' iodine atom probably destabilizes H12 slightly, resulting in its suboptimal orientation and thus in suboptimal coactivator recruitment, explaining the partial agonist character of T₂. In the absence of experimental structural data, there is no obvious explanation for the loss of T₂ activity with S-TRβ1 and for its very high activity with L-TRβ1; however, it can be hypothesized that the presence of the 9-amino-acid insert in L-TRβ1 (located in loop 2-3) causes a conformational change in loop 2-3 and/or in the N-terminal part of H3 that could compensate the destabilization of the coactivator-binding surface induced by the absence of the 3' iodine atom in T₂. A possible explanation is that in hTRβ1, the N-terminal part of H3 (and thus indirectly H12) is stabilized by van der Waals contacts between Ile250 in loop 2-3 and Glu267 and His271 from H3. In S-TRβ1, the residue corresponding to Ile250 is a cysteine, a much smaller residue that could not form similar van der Waals contacts; but in L-TRβ1, the presence of the 9-amino-acid insert could restore stabilizing con-

tacts between H3 and H12 either per se or through an additional stabilizing interaction with the NTD.

T₂ modulates the expression of L-TRβ1 in vivo

We had previously reported that TRβ1 was up-regulated in the absence of T₃ or T₂ and down-regulated with an excess of ligand (7). However, that study did not distinguish between the two TRβ1 isoforms. The novel contribution of the present work relies on the individual evaluation of the expression of L-TRβ1 and S-TRβ1. We found a striking difference in the basal levels of mRNA for the 2 isoforms; L-TRβ1 expression is 1×10^6 -fold more than S-TRβ1 in the control group, suggesting that L-TRβ1 modulates most of the TH effects, at least in tilapia liver. Moreover, L-TRβ1 is more sensitive to T₂ (EC₅₀, 2×10^{-13} M) than S-TRβ1 is to T₃ (EC₅₀, 3×10^{-10} M). Interestingly, when the effects of T₂ and T₃ upon L-TRβ1 and S-TRβ1 expression were analyzed separately, we found that T₂ regulates L-TRβ1, whereas T₃ mainly regulates S-TRβ1. However, T₃ also affects the expression of L-TRβ1, an effect that could be due to T₂ possibly generated by outer-ring deiodination of T₃. The differential effects of T₂ and T₃ upon TR isoform expression can be explained by the alternative splicing of TRβ1 pre-mRNA in tilapia by at least 2 different mechanisms: T₂ and T₃ could differentially regulate the expression of the splicing factors in tilapia liver, or they could induce different post-translational modifications on splicing factors, which in turn would modify the alternative splicing of TRβ1 pre-mRNA. Both options remain to be analyzed; however, studies in HepG2 cells show that T₃ regulates the splicing of *THRA*, modifying the TRα1 to TRα2 ratio and increasing TRα2 during hyperthyroidism (37). The fact that T₂ and T₃ modulate the expression of L-TRβ1 and S-TRβ1, respectively, strongly suggests a different signaling pathway for each hormone in tilapia and leads us to propose that there is an extra level in the TH signaling cascade and that 3,5-T₂ is made and regulated specifically for this purpose.

Alternative ligands, a neglected paradigm for NR activation?

Our result should be added to the growing list of endogenous molecules that act as selective NR modulators (SNuRMs) in vivo (38). Such alternative ligands have been demonstrated to elicit relevant effects for several NRs. One of the first examples was lithocholic acid, which was demonstrated to bind the VDR in addition to FXR (3, 39). Another well-known example is 3Adiol, an ERβ ligand in the prostate (1). Interestingly, in both cases, these ligands exhibit a very narrow, tissue-specific action, and the affinity of the receptor for the alternative ligand is relatively low but is consistent with locally higher levels of the alternate

than of the classical ligand. There are several other cases of NRs that may be activated by such alternative ligands, including the retinoic acid receptor, which has been shown to bind and be activated by S-4-oxo-9-*cis*-13,14-dihydro-retinoic acid (40) and the binding of dehydroepiandrosterone and its metabolites to steroid receptors (still speculative) (41) or of several nonaromatic steroids to ERs (42). We propose that T₂ should be added to this list and viewed as a tissue-specific endogenous activator of TRs. The existence of these endogenous ligands is perhaps reminiscent of the various steps during which high-affinity NRs evolved from less selective, low-affinity sensors (43, 44).

Acknowledgments

We thank Dr Warner S. Simonides for providing the SERCA reporter and Dr Dorothy Pless for critically reviewing the manuscript. We acknowledge the technical support of Dr Edith Garay, Leonor Casanova, and Lourdes Lara.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr Aurea Orozco, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro, 76230 México. E-mail: aureao@unam.mx.

This study was supported by grants from PAPIIT 208511 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 166357. A.M. received Fellowship 227955 from CONACYT. Work from the V.L. laboratory is funded by the French Ministry of Research and Technology (Agence Nationale de la Recherche program) and the Ministry of Ecology (Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens program). A.M. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Weihua Z, Makela S, Andersson LC, et al. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:6330–6335.
2. Makishima M, Lu TT, Xie W, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*. 2002;296:1313–1316.
3. Fujishima T, Tsuji G, Tanaka C, Harayama H. Novel vitamin D receptor ligands having a carboxyl group as an anchor to arginine 274 in the ligand-binding domain. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121:60–62.
4. Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, et al. Are the effects of T₃ on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T₃ itself? *Endocrinology*. 2002;143:504–510.
5. Pinna G, Brödel O, Visser T, et al. Concentrations of seven iodothyronine metabolites in brain regions and the liver of the adult rat. *Endocrinology*. 2002;143:1789–1800.
6. García-G C, Jezierski MC, Valverde-R C, Orozco A. Effects of iodothyronines on the hepatic outer-ring deiodinating pathway in killifish. *Gen Comp Endocrinol*. 2004;135:201–209.
7. García-G C, López-Bojorquez L, Nuñez J, Valverde-R C, Orozco A.

- 3,5-Diiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor beta1 in the killifish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R877–R883.
8. Moreno M, de Lange P, Lombardi A, Silvestri E, Lanni A, Goglia F. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid.* 2008; 18:239–253.
 9. Horst C, Rokos H, Seitz HJ. Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine. *Biochem J.* 1989;261: 945–950.
 10. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Rapid stimulation in-vitro of rat-liver cytochrome-oxidase activity by 3,5-diiodo-L-thyronine and by 3,3'-diiodo-L-thyronine. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;99:89–94.
 11. Horst C, Harneit A, Seitz HJ, Rokos H. 3,5-Di-iodo-L-thyronine suppresses TSH in rats in vivo and in rat pituitary fragments in vitro. *J Endocrinol.* 1995;145:291–297.
 12. Ball SG, Sokolov J, Chin WW. 3,5-Diiodo-L-thyronine (T₂) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J Mol Endocrinol.* 1997;19:137–147.
 13. Moreno M, Lombardi A, Lombardi P, Goglia F, Lanni A. Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Sci.* 1998; 62:2369–2377.
 14. Baur A, Bauer K, Jarry H, Köhrl J. 3,5-Diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5' deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. *Endocrinology.* 1997;138:3242–3248.
 15. Sechman A, Pawlowska K, Hrabia A. Effect of 3,3',5-triiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on progesterone production, cAMP synthesis, and mRNA expression of *STAR*, *CYP11A1*, and *HSD3B* genes in granulosa layer of chicken preovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol.* 2011;41:137–149.
 16. Marchand O, Safi R, Escriba H, Van Rompaey E, Prunet P, Laudet V. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J Mol Endocrinol.* 2001;26:51–65.
 17. Mendoza-Cisneros A, Villalobos P, Valverde-R C, Orozco A. 2011 3,5-T₂ and T₃ activate different isoforms of the thyroid hormone receptor β1 in *Fundulus heteroclitus*. Paper presented at: Inaugural meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology, July 13–16, 2011; Ann Arbor, MI. Abstract.
 18. Yamano K, Inui Y. cDNA cloning of thyroid hormone receptor β for the Japanese flounder. *Gen Comp Endocrinol.* 1995;99:197–203.
 19. Johnson KM, Lema SC. Tissue-specific thyroid hormone regulation of gene transcripts encoding iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors in striped parrotfish (*Scarus iseri*). *Gen Comp Endocrinol.* 2011;172:505–517.
 20. Simonides WS, Brent GA, Thelen MH, van der Linden CG, Larsen PR, van Hardeveld C. Characterization of the promoter of the rat sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1 gene and analysis of thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem.* 1996;271: 32048–32056.
 21. Tardáguila M, González-Gugel E, Sánchez-Pacheco A. Aurora kinase B activity is modulated by thyroid hormone during transcriptional activation of pituitary genes. *Mol Endocrinol.* 2011;25:385–393.
 22. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, et al. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 2005;146:2864–2871.
 23. Jeziorski MC, Greenberg RM, Clark KS, Anderson PA. Cloning and functional expression of voltage-gated calcium channel α1 subunit from Jellyfish. *J Biol Chem.* 1998;273:22792–22799.
 24. Cunha Lima ST, Rodrigues ED. The oligomeric state of thyroid receptor regulates hormone binding kinetics. *J Endocrinol.* 2011; 210:125–134.
 25. Yamano K, Araki K, Sekikawa K, Inui Y. Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Dev Genet.* 1994;15:378–382.
 26. Wilkinson JR, Towle HC. Identification and characterization of the AF-1 transactivation domain of thyroid hormone receptor β1. *J Biol Chem.* 1997;272:23824–23832.
 27. Tian H, Mahajan MA, Wong CT, Habeos I, Samuels HH. The N-terminal A/B domain of the thyroid hormone receptor-β2 isoform influences ligand-dependent recruitment of coactivators to the ligand-binding domain. *Mol Endocrinol.* 2006;20:2036–2051.
 28. Zavacki AM, Harney JW, Brent GA, Larsen PR. Dominant negative inhibition by mutant thyroid hormone receptors is thyroid hormone response element and receptor isoform specific. *Mol Endocrinol.* 1993;7:1319–1330.
 29. Lazar MA, Berrodin TJ, Harding HP. Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol.* 1991;11:5005–5015.
 30. Meijnsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science.* 2009;324:407–410.
 31. Hall JM, McDonnell DP, Korach KS. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol.* 2002;16:469–486.
 32. Flamant F, Gauthier K, Samarut J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol.* 2007;21:321–333.
 33. Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE. Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem.* 1995;270: 14274–14280.
 34. Tomura H, Lazar J, Phyllaier M, Nikodem VM. The N-terminal region (A/B) of rat thyroid hormone receptors α1, β1, but not β2 contains a strong thyroid hormone-dependent transactivation function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:5600–5604.
 35. Claessens F, Denayer S, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal.* 2008;6:e008.
 36. Auffinger P, Hays FA, Westhof E, Ho PS. Halogen bonds in biological molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:16789–16794.
 37. Timmer DC, Bakker O, Wiersinga WM. Triiodothyronine affects the alternative splicing of thyroid hormone receptor α mRNA. *J Endocrinol.* 2003;179:217–225.
 38. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3:950–964.
 39. Sun J, Mustafi R, Cerda S, et al. Lithocholic acid down-regulation of NF-κB activity through vitamin D receptor in colonic cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;111:37–40.
 40. Schuchardt JP, Wahlström D, Rüegg J, et al. The endogenous retinoid metabolite S-4-oxo-9-cis-13,14-dihydro-retinoic acid activates retinoic acid receptor signalling both in vitro and in vivo. *FEBS J.* 2009;276:3043–3059.
 41. El Kihel L. Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA): recent reports. *Steroids.* 2012;77:10–26.
 42. Wang P, Wen Y, Han GZ, Sidhu PK, Zhu BT. Characterization of the oestrogenic activity of non-aromatic steroids: are there male-specific endogenous oestrogen receptor modulators? *Br J Pharmacol.* 2009;158:1796–1807.
 43. Laudet V. The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr Biol.* 2011;21:R726–R737.
 44. Bridgham JT, Eick GN, Larroux C, et al. Protein evolution by molecular tinkering: diversification of the nuclear receptor superfamily from a ligand-dependent ancestor. *PLoS Biol.* 2010;8:e1000497.

6.2 Figuras suplementarias

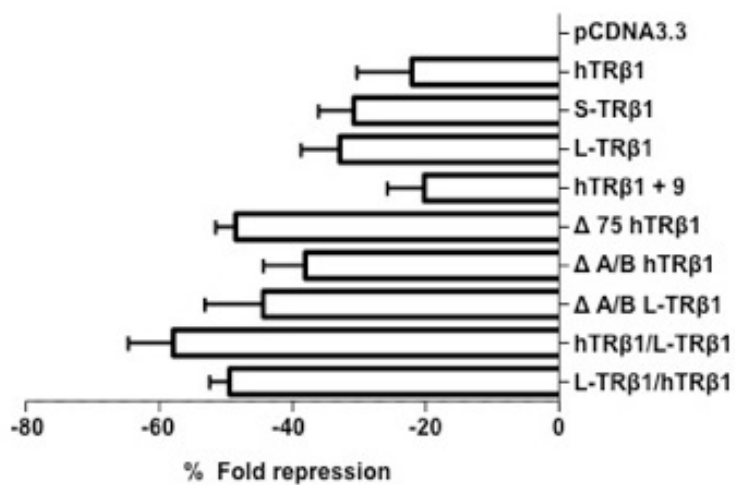


Figura suplementaria 1. Los TRs reprimen la expresión génica en ausencia del ligando. Se co-transfectaron los distintos TRs en células con el gen T3-reportero usando medio con suero dializado. Se realizó el ensayo de luciferasa 48 h postransfección. Tomado de: Mendoza et al., 2013.

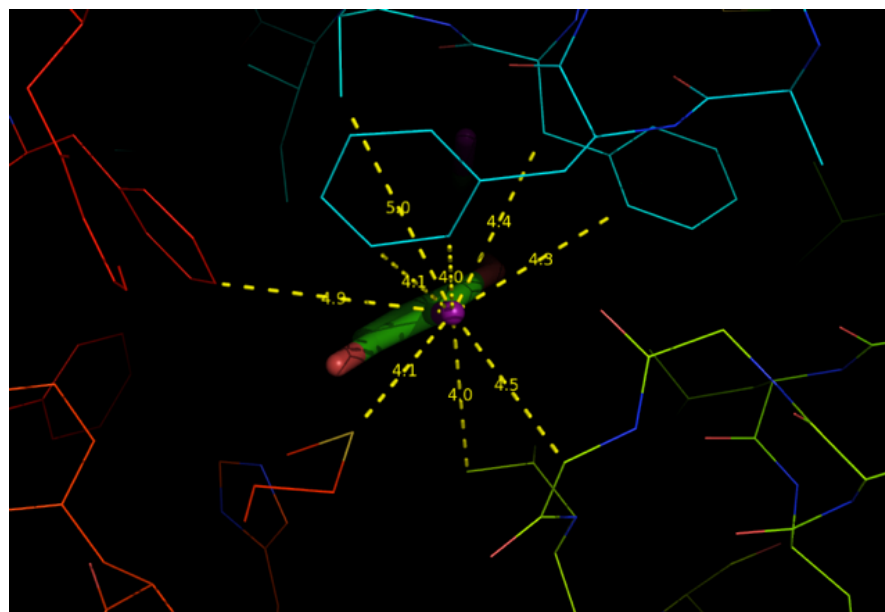


Figura suplementaria 2. Ampliación del cristal TRβ1 unido a T3, se observa el yodo del anillo externo de T3 y la distancia en Armstrongs de los distintas interacciones hidrofóbicas con el TRβ1 Entrada en PDB 1XZX. Tomado de: Mendoza et al., 2013.

7 Discusión

La pleiotropía funcional de las hormonas tiroideas y sus receptores nucleares se ha estudiado desde hace varias décadas; sin embargo, aun no se comprende del todo. Esto se debe en parte a que el mecanismo de acción de las THs es sumamente complejo ya que la interacción TH-TR puede activar o reprimir la expresión de una gran variedad de genes. Además, las THs también tienen efectos a través de mecanismos no-genómicos al interactuar con receptores membranales de tipo integrina donde T4 es el ligando principal, lo cual amplía aun más el abanico de efectos biológicos. Hasta hace poco tiempo, se consideraba a la T3 como el único ligando endógeno de los TRs y por lo tanto como la hormona responsable de los efectos nucleares de las THs. Sin embargo, los estudios de esta tesis doctoral muestran que la T2, TH producida por la desyodación de T3, es un ligando del TR y podría jugar un rol en el funcionamiento y desarrollo normal, al menos de teleósteos. Estudios por otros grupos de trabajo muestran que la T2 aumenta la tasa del metabolismo basal en mamíferos posiblemente a través de un mecanismo de acción no-genómico. Sin embargo, en esta tesis mostramos que la T2 tiene efectos nucleares que se realizan a través de su interacción con un TR en teleósteos y posiblemente en otros vertebrados incluyendo mamíferos. Más aún, mostramos que los efectos tiromiméticos de la T2 son distintos a los efectos de T3, tanto en potencia como en las posibles modificaciones que ejercen sobre la conformación del TR. Por lo tanto, proponemos que la T2 tiene una vía de señalización específica que de manera paralela a la vía de T3 orquesta y modula en una tendencia tiempo y tejido específica los efectos biológicos de las TH en teleósteos, particularmente sobre la modulación de la expresión génica.

En ésta tesis reportamos la identificación y caracterización de dos isoformas del receptor TR β 1. Una presenta un inserto de nueve amino ácidos (Ins9aa) al inicio de dominio de unión al ligando al cual denominamos TR β 1 largo (L-TR β 1), y la otra, que carece de inserto, denominado TR β 1 corto (S-TR β 1). La caracterización molecular y funcional de estas isoformas reveló que en presencia de T2 el L-TR β 1 activa la transcripción de un gen T3-reportero en cultivos celulares y que esta activación requiere del NTD del TR. En contraste, la T3 activa al L-TR β 1 aún en ausencia del NTD. El mRNA de la isoforma L-TR β 1 es el más abundante en el hígado de teleósteos y su perfil de expresión durante el desarrollo y metamorfosis (Kawakami et al., 2008^a; Navarrete-R et al., 2014)

sugiere que la activación del L-TR β 1 por T2 podría jugar un papel fisiológico específico en la historia de vida de los teleosteos, contribuyendo así a explicar parte de la pleiotropía funcional de las hormonas tiroideas.

El LBD del TR β 1 del Pez y del Humano y su Rol en la Unión de T2

La alineación de todas las secuencias del TR β 1 disponibles (n=65) en la base de datos *Ensembl* muestra que excluyendo el Ins9aa, la estructura primaria del L-TR β 1 está relativamente conservada, particularmente en el saco de unión al ligando (LBP). Esto sugiere que la habilidad del L-TR β 1 para activar la transcripción a través de T2 se encuentra directamente relacionada con la presencia del Ins9aa cuya secuencia está conservada en los peces en los cuales se ha identificado esta isoforma (Marchand et al., 2001). Según las predicciones *in silico*, el inserto no adopta una estructura secundaria, sin embargo su ubicación en el asa formada entre las H2 y H3 del LBD puede impactar en la ubicación de ambas hélices en la estructura terciaria de este dominio. Igualmente, en presencia del ligando, el Ins9aa podría adoptar una conformación distinta que incluya interacciones con otros dominios y/o regiones del L-TR β 1. Los estudios de dinámica molecular *in silico* sugieren tres vías que el ligando puede seguir para salir y posiblemente entrar al LBD (Martínez et al., 2008). De acuerdo con estas propuestas y dada la localización del Ins9aa entre las hélices 2 y 3, es probable que una vez dentro del LBP, el ligando se establezca principalmente a través de interacciones hidrofóbicas y dos regiones polares. Una sola histidina localizada en la H11 forma una de las interacciones polares con el hidroxilo fenólico del anillo externo de la tironina. Sin embargo, la mayoría de las interacciones polares con el ligando ocurren con tres residuos de arginina localizados en la hélice 3 y en las hebras β y por una serina en el TR α o una aspargina en el TR β (Araujo et al., 2010). Las interacciones polares del ligando con esta región de la proteína dependen de una intrincada red de puentes de hidrógeno que involucra moléculas de agua circundantes. Sin embargo, la alta afinidad de los ligandos del TR depende principalmente de su hidrofobicidad, ya que sus anillos de tironina son estabilizados por una serie de interacciones no polares. Así, es posible que el Ins9aa facilite la estabilización de la T2 en el LBP a través de las interacciones polares entre la α -hélice 3 y el grupo amino de la tironina. Dado que T3 y T2 difieren sólo por la presencia de un átomo de yodo en el anillo externo, el hecho de que el L-TR β 1 una a ambas tironinas con alta afinidad (Kd 0.2 nM), (Mendoza et al., 2013) indica que el Ins9aa modifica la estructura del LBP de tal forma que

las interacciones hidrofóbicas con el anillo tirosilo (anillo externo), son suficientes para estabilizar a T2 en esta región del LBP aún en ausencia del átomo de yodo. Más aún, indican que los dos yodos del anillo interno son suficientes para que la T2 ó T3 se unan con alta afinidad al L-TR β 1. Aún cuando se sabe que el yodo del anillo externo estabiliza la interacción entre H3 y H12 a través de comunicación alostérica, se requiere evidencia estructural del rol del Ins9aa en la activación/interacción L-TR β 1 /T2. Al respecto y como lo muestran los resultados de esta tesis, la T2 es significativamente más potente (EC50 1E⁻¹¹) que T3 (EC50 1E⁻⁹ M). Este dato sugiere que el menor tamaño de la T2 con respecto a T3 facilita su entrada y estabilización dentro del LBP, además de que la unión de T2 al L-TR β 1 induce cambios conformacionales en el LBD que incluyen la reorientación de la H12 (Souza et al., 2011); la activación del “*switch His-Phe*” (Hassan and Koh, 2006) y la rotación de las hélices asociadas a la dimerización (Ribeiro, 2001); todos ellos asociados a la formación de la superficie de interacción con coactivadores y en consecuencia a la activación de la transcripción. Dada la evidencia experimental, T2 podría inducir estos cambios en la conformación del L-TR β 1/LBD con mayor eficiencia que T3, posiblemente a través de una ruta distinta que incluya interacción con otros dominios funcionales del L-TR β 1 y/o el incremento en la afinidad por coactivadores, lo cual podría explicar la mayor potencia de T2 en el ensayo de transactivación a pesar de tener la misma afinidad que T3 por el L-TR β 1 (ver tabla 1 en la publicación) (Mendoza et al., 2013).

El NTD y su Importancia en la Activación del L-TR β 1 mediada por T2

La estructura del NTD aun no se conoce pero se considera que puede adoptar una conformación funcional en solución y que en presencia de ligando, podría tener un rol funcional al interactuar con otros dominios del NR (Aagaard et al., 2011). En esta tesis mostramos que el L-TR β 1 requiere del dominio N-terminal para activarse en presencia de T2 pero no de T3 (Mendoza et al., 2013). Esta diferencia funcional ligando-especifica sugiere que el L-TR β 1 adopta conformaciones distintas en función del ligando al cual se une. Más aún, la T2 podría modificar la superficie de unión a coactivadores permitiendo la unión de un conjunto distinto del que se une en presencia de T3 ó, posiblemente, aumentar la afinidad del L-TR β 1 por los coactivadores en una tendencia NTD-dependiente. En apoyo a estas posibilidades, existen varios estudios donde se ha determinado el rol funcional de la región NTD de los TRs, tanto en la interacción con coactivadores y el DNA (TRE), así como

con su activación en ausencia de ligando (Aagaard et al., 2011; Tomura et al., 1995; Tian et al., 2006; Lee et al., 2011).

La T2 También es Activa en el TR β 1 en Humanos

Los ensayos de transactivación y unión mostraron que la T2 interactúa con el TR β 1 de humano y que esta activación también depende de la región NTD del hTR β 1, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de T2 está conservado en vertebrados (Mendoza et al., 2013). Sin embargo, la afinidad del hTR β 1 por T2 es menor, lo cual confirma reportes previos que concluyen que T2 es un agonista parcial de este receptor (Ball et al., 1997; Baur et al., 1997). Al respecto, los estudios clínicos recientes (Verge et al., 2012) utilizando el ácido diyodotiropropionico (DITPA), un análogo estructural de THs con afinidad selectiva por el TR β 1 (Pennock et al., 1992), sugieren que dado su parecido estructural con T2, este tioromimético podría utilizarse en el tratamiento de individuos con deficiencia del transportador de T3 MCT8.

¿De donde viene la T2?

El principal precursor de T2 es T3; sin embargo, aun no existe evidencia experimental directa que respalde esta afirmación. No obstante, la hipótesis de que T2 se genera a partir de la desyodación de T3 se basa en observaciones indirectas pero robustas. Se sabe que en los vertebrados incluyendo a los teleósteos, la expresión y actividad de las desyodasas, enzimas que catalizan la activación o inactivación de las THs a nivel celular, se regula tanto por sustrato como por producto (Orozco and Valverde-R, 2005). Así, estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la T2 modula la expresión y la actividad de la desyodasa tipo 2 (D2) en teleósteos (García-G et al., 2004; Garcia-G et al., 2007) y de la desyodasa tipo 1 (D1) en mamíferos (Baur et al., 1997). Ambas enzimas catalizan la remoción estereo-específica del átomo de yodo del anillo externo de la T4 para producir T3 y por esa misma ruta D1 y D2 podrían catalizar la desyodación de T3 para producir T2. También se ha observado que la inhibición de la desyodación (ácido iopanoico: IOP) previene los efectos de la administración de T3 sobre el aumento en la tasa de consumo de oxígeno en ratas, lo cual sugiere que T2 es responsable de estos efectos (Moreno et al., 2002). Recientemente en teleósteos (Little et al., 2013) y en humanos (datos no publicados, J. Köhrle, [American Thyroid Association (ATA) 2013]) se ha mostrado que las concentraciones intramusculares o circulantes de T2 respectivamente son similares a las de

T3. Así, T2 podría jugar un rol similar al de T3 en la modulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. A éste respecto, recientemente se mostró que la administración crónica de T2 causa hipotiroidismo central al disminuir TSH en una tendencia similar a T3 (Figueiredo, AS et al., 2014). Aquí mostramos que la T2 es tan eficiente como T3 para modular la expresión génica a través de un TR en teleósteos lo cual indica que ambas T3 y T2 ejercen efectos biológicos fundamentales para el funcionamiento normal del organismos.

Así proponemos que los estudios subsecuentes deben estar encaminados a definir el rol funcional específico para cada TH y lo cual permitirá la aplicación de T2 o sus análogos estructurales como coadyuvantes en el tratamiento de patologías específicas asociadas al sistema tiroideo.

8 Conclusiones

Los hallazgos mas importantes de este trabajo son los siguientes.

- a) La T2 puede activar la expresión de genes a través de un receptor de hormonas tiroideas en teleósteos.
- b) El domino NTD del L-TR β 1 es necesario para la activación por T2 pero no por T3.
- c) La T2 es un ligando para el L-TR β 1 en teleósteos.
- d) El mecanismo de acción de T2 esta mediado por L-TR β 1 en teleósteos, posiblemente activando la transcripción de genes blanco a través de la interacción con coactivadores distintos a los que se unen en presencia de T3.

9 Referencias

- Aagaard, M. M., Siersbæk, R., and Mandrup, S. (2011). Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1812, 824–835.
- Andersson, M. L., and Vennstrom, B. (1997). Chicken thyroid hormone receptor alpha requires the N-terminal amino acids for exclusive nuclear localization. *FEBS Letters* 416, 291–296.
- Araki, O., Ying, H., Zhu, X. G., Willingham, M. C., and Cheng, S. Y. (2008). Distinct Dysregulation of Lipid Metabolism by Unliganded Thyroid Hormone Receptor Isoforms. *Molecular Endocrinology* 23, 308–315.
- Araujo, A. S., Martínez, L., Paula Nicoluci, R., Skaf, M. S., and Polikarpov, I. (2010). Structural modeling of high-affinity thyroid receptor–ligand complexes. *Eur Biophys J* 39, 1523–1536.
- Arnold, S. Goglia, F. Kadenbach, B. (1998) 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidasa and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur J Biochem* 252(2), 325-30.
- Asadi, B. A., Torjesen, P. A., Haug, E., and Berg, J. P. (2008). Biochemical characterization of four novel mutations in the thyroid hormone receptor beta gene in patients with resistance to thyroid hormone. *Scand J Clin Lab Invest* 68, 563–567. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19378427&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Ball, S. G., Sokolov, J., and Chin, W. W. (1997). 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Endocrinology* 19, 137–147.
- Baur, A., Bauer, K., Jarry, H., and Kohrle, J. (1997). 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. *Endocrinology* 138, 3242–3248.
- Bochukova, E., Schoenmakers, N., Agostini, M., Schoenmakers, E., Rajanayagam, O., Keogh, J. M., Henning, E., Reinemund, J., Gevers, E., Sarri, M., et al. (2012). A Mutation in the Thyroid Hormone Receptor Alpha Gene. *N Engl J Med* 366, 243–249.
- Brent, G. A., Harney, J. W., Chen, Y., Warne, R. L., Moore, D. D., and Larsen, P. R. (1989). Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element. *Molecular Endocrinology* 3, 1996–2004.
- Carosa, E., Fanelli, A., Ulisse, S., Di Lauro, R., Rall, J. E., and Jannini, E. A. (1998). Ciona intestinalis nuclear receptor 1: a member of steroid/thyroid hormone receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11152–11157.
- Chan, I. H., and Privalsky, M. L. (2009). Isoform-specific transcriptional activity of

overlapping target genes that respond to thyroid hormone receptors alpha1 and beta1. *Molecular Endocrinology* 23, 1758–1775.

Chatonnet, F., Guyot, R., Benoit, G., and Flamant, F. (2013). Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E766–75.

Chen, Y., and Young, M. A. (2010). Structure of a Thyroid Hormone Receptor DNA-Binding Domain Homodimer Bound to an Inverted Palindrome DNA Response Element. *Molecular Endocrinology* 24, 1650–1664.

Choi, K.-C., Oh, S.-Y., Kang, H.-B., Lee, Y.-H., Haam, S., Kim, H.-I., Kim, K., Ahn, Y.-H., Kim, K.-S., and Yoon, H.-G. (2008). The functional relationship between co-repressor N-CoR and SMRT in mediating transcriptional repression by thyroid hormone receptor α . *Biochem. J.* 411, 19.

Cunha Lima, S. T., and Rodrigues, E. D. (2011). The oligomeric state of thyroid receptor regulates hormone binding kinetics. *Journal of Endocrinology* 210, 125–134.

Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J., and Yamamoto, K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & Development* 12, 3343–3356.

Das, B., Matsuda, H., Fujimoto, K., Sun, G., Matsuura, K., and Shi, Y.-B. (2010). Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *General and Comparative Endocrinology* 168, 174–180.

Davis, P. J. (2000). Thyroxine Promotes Association of Mitogen-activated Protein Kinase and Nuclear Thyroid Hormone Receptor (TR) and Causes Serine Phosphorylation of TR. *Journal of Biological Chemistry* 275, 38032–38039.

de Mendonca, R. L., Escriva, H., Bouton, D., Zelus, D., Vanacker, J. M., Bonnelye, E., Cornette, J., Pierce, R. J., and Laudet, V. (2000). Structural and functional divergence of a nuclear receptor of the RXR family from the trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Eur J Biochem* 267, 3208–3219. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10824105&retmode=ref&cmd=prlinks>.

Denver, R. J., Hu, F., Scanlan, T. S., and Furlow, J. D. (2009). Thyroid hormone receptor subtype specificity for hormone-dependent neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 326, 155–168.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496.

Estebanez-Perpina, E., Arnold, L. A., Jouravel, N., Togashi, M., Blethrow, J., Mar, E., Nguyen, P., Phillips, K. J., Baxter, J. D., Webb, P., et al. (2007). Structural Insight into the Mode of Action of a Direct Inhibitor of Coregulator Binding to the Thyroid Hormone Receptor. *Molecular Endocrinology* 21, 2919–2928.

- Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P., and Yen, P. M. (2000). Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Molecular Endocrinology* 14, 947–955.
- Ferreira Azevedo, M., Barra, G. B., Medeiros, L. D. de, Simeoni, L. A., Naves, L. A., and Neves, F. de A. R. (2008). A novel mutation of thyroid hormone receptor beta (I431V) impairs corepressor release, and induces thyroid hormone resistance syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52, 1304–1312.
- Figueira, A. C. M., Lima, L. M. T. R., Lima, L. H. F., Ranzani, A. T., Santos Mule, dos, G., and Polikarpov, I. (2010). Recognition by the Thyroid Hormone Receptor of Canonical DNA Response Elements. *Biochemistry* 49, 893–904.
- Figueiredo, A. S., Neto, R. A., Pantaleao, T. U., Santos, M. U., Araujo, R. L. Andrade B. M. Leandro, M. S., Werneck-de-Castro, J. P., Ferreira, A. C. Carvalho, D. P. (2014). 3,5-Diiodothyronine (3,5-T₂) causes central hypothyroidism and stimulates thyroid-sensitive tissues. *J Endocrinol*. Epub
- Flamant, F., and Quignodon, L. (2010). Use of a new model of transgenic mice to clarify the respective functions of thyroid hormone receptors in vivo. *Heart Fail Rev* 15, 117–120.
- Flatt, T., Moroz, L. L., Tatar, M., and Heyland, A. (2006). Comparing thyroid and insect hormone signaling. *Integrative and Comparative Biology* 46, 777–794.
- Fondell, J. D. (2013). The Mediator complex in thyroid hormone receptor action. *BBA - General Subjects* 1830, 3867–3875. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22402254&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Fozzatti, L., Lu, C., Kim, D. W., Park, J. W., Astapova, I., Gavrilova, O., Willingham, M. C., Hollenberg, A. N., and Cheng, S. Y. (2011). Resistance to thyroid hormone is modulated in vivo by the nuclear receptor corepressor (NCOR1). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 17462–17467.
- Galay-Burgos, M., Power, D. M., Llewellyn, L., and Sweeney, G. E. (2008). Thyroid hormone receptor expression during metamorphosis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Molecular and Cellular Endocrinology* 281, 56–63.
- García-G, C., Lopez-Bojorquez, L., Nunez, J., Valverde-R, C., and Orozco, A. (2007). 3,5-Diiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor beta1 in the killifish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R877–R883.
- García-G, C., Jeziorski, M. C., Valverde-R, C., and Orozco, A. (2004). Effects of iodothyronines on the hepatic outer-ring deiodinating pathway in killifish. *General and Comparative Endocrinology* 135, 201–209.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews* 58, 685–704.

- Gil-Ibanez, P., Morte, B., and Bernal, J. (2013). Role of thyroid hormone receptor subtypes alpha and beta on gene expression in the cerebral cortex and striatum of postnatal mice. *Endocrinology* 154, 1940–1947.
- Goglia, F. (2005). Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T(2)). *Biochemistry (Mosc)* 70, 164–172.
- Hadzic, E., Desai-Yajnik, V., Helmer, E., Guo, S., Wu, S., Koudinova, N., Casanova, J., Raaka, B. M., and Samuels, H. H. (1995). A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. *Molecular and Cellular Biology* 15, 4507–4517.
- Hahm, J. B., and Privalsky, M. L. (2013). Research Resource: Identification of Novel Coregulators Specific for Thyroid Hormone Receptor- 2. *Molecular Endocrinology* 27, 840–859.
- Hassan, A. Q., and Koh, J. T. (2006). A Functionally Orthogonal Ligand–Receptor Pair Created by Targeting the Allosteric Mechanism of the Thyroid Hormone Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 8868–8874.
- Hassan, A. Q., and Koh, J. T. (2008). Selective Chemical Rescue of a Thyroid-Hormone-Receptor Mutant, TR β (H435Y), Identified in Pituitary Carcinoma and Resistance to Thyroid Hormone. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 7280–7283.
- Helsen, C., Kerkhofs, S., Clinckemalie, L., Spans, L., Laurent, M., Boonen, S., Vanderschueren, D., and Claessens, F. (2012). Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 411–417.
- Hollenberg, A. N., Monden, T., and Wondisford, F. E. (2001). Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem* 270, 14274–14280. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7782283&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Horst, C., Rokos, H., and Seitz, H. J. (1989). Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine. *Biochem. J.* 261, 945–950. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=2803254&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Huang, Z.-Q., Li, J., Sachs, L. M., Cole, P. A., and Wong, J. (2003). A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *EMBO J* 22, 2146–2155.
- Ishizuka, T., and Lazar, M. A. (2003). The N-CoR/Histone Deacetylase 3 Complex Is Required for Repression by Thyroid Hormone Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5122–5131.
- Isorna, E., Obregon, M. J., Calvo, R. M., Vázquez, R., Pendón, C., Falcón, J., and Muñoz-Cueto, J. A. (2009). Iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors

regulation during flatfish (*Solea senegalensis*) metamorphosis. *J. Exp. Zool.* 312B, 231–246.

- Jeyakumar, M., Liu, X.-F., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Bagchi, M. K. (2007). Phosphorylation of thyroid hormone receptor-associated nuclear receptor corepressor holocomplex by the DNA-dependent protein kinase enhances its histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 282, 9312–9322. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17242407&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Jeyakumar, M., Webb, P., Baxter, J. D., Scanlan, T. S., and Katzenellenbogen, J. A. (2008). Quantification of Ligand-Regulated Nuclear Receptor Corepressor and Coactivator Binding, Key Interactions Determining Ligand Potency and Efficacy for the Thyroid Hormone Receptor †. *Biochemistry* 47, 7465–7476.
- Jin, L., and Li, Y. (2010). Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 1218–1226.
- Johnson, K. M., and Lema, S. C. (2011). Tissue-specific thyroid hormone regulation of gene transcripts encoding iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors in striped parrotfish (*Scarus iseri*). *General and Comparative Endocrinology* 172, 505–517.
- Katz, D., Reginato, M. J., and Lazar, M. A. (1995). Functional regulation of thyroid hormone receptor variant TR alpha 2 by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2341–2348.
- Kawakami, Y., Nozaki, J., Seoka, M., Kumai, H., and Ohta, H. (2008a). Characterization of thyroid hormones and thyroid hormone receptors during the early development of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *General and Comparative Endocrinology* 155, 597–606.
- Kawakami, Y., Yokoi, K., Kumai, H., and Ohta, H. (2008b). The role of thyroid hormones during the development of eye pigmentation in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 150, 112–116.
- Kim, J. H., Park, T. S., Baek, H. S., Kim, G. H., Yoo, H. W., and Park, J. H. (2007). A newly identified insertion mutation in the thyroid hormone receptor-beta gene in a Korean family with generalized thyroid hormone resistance. *J Korean Med Sci* 22, 560–563.
- Kim, S.-W., Ho, S.-C., Hong, S.-J., Kim, K. M., So, E. C., Christoffolete, M., and Harney, J. W. (2005). A novel mechanism of thyroid hormone-dependent negative regulation by thyroid hormone receptor, nuclear receptor corepressor (NCoR), and GAGA-binding factor on the rat cD44 promoter. *J Biol Chem* 280, 14545–14555.
- Kim, S.-W., Hong, S.-J., Kim, K. M., Ho, S.-C., So, E. C., Harney, J. W., and Larsen, P. R. (2004). A novel cell type-specific mechanism for thyroid hormone-dependent negative regulation of the human type 1 deiodinase gene. *Molecular Endocrinology* 18, 2924–2936.

- Langlois, M. F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J. D., Hollenberg, A. N., and Wondisford, F. E. (1997). A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J Biol Chem* 272, 24927–24933.
- Lecroisey, C., Laudet, V., and Schubert, M. (2012). The cephalochordate amphioxus: a key to reveal the secrets of nuclear receptor evolution. *Briefings in Functional Genomics* 11, 156–166.
- Lee, K. C. (2003). Transcriptional Activation by Thyroid Hormone Receptor-beta Involves Chromatin Remodeling, Histone Acetylation, and Synergistic Stimulation by p300 and Steroid Receptor Coactivators. *Molecular Endocrinology* 17, 908–922.
- Lee, S., Young, B. M., Wan, W., Chan, I. H., and Privalsky, M. L. (2011). A Mechanism for Pituitary-Resistance to Thyroid Hormone (PRTH) Syndrome: a Loss in Cooperative Coactivator Contacts by Thyroid Hormone Receptor (TR) 2. *Molecular Endocrinology* 25, 1111–1125.
- Leo, C., and Chen, J. D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, 1–11.
- Little, A.G., Kunisue, T., Kannan, K., Seebacher, F. (2013). Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Biol.* 11:26
- Liu, H., Etter, P., Hayes, S., Jones, I., Nelson, B., Hartman, B., Forrest, D., and Reh, T. A. (2008). NeuroD1 Regulates Expression of Thyroid Hormone Receptor 2 and Cone Opsins in the Developing Mouse Retina. *Journal of Neuroscience* 28, 749–756.
- Liu, Y. (2005). Thyroid Hormone-Regulated Target Genes Have Distinct Patterns of Coactivator Recruitment and Histone Acetylation. *Molecular Endocrinology* 20, 483–490.
- Liu, Y. Y., Kogai, T., Schultz, J. J., Mody, K., and Brent, G. A. (2012). Thyroid Hormone Receptor Isoform-specific Modification by Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Modulates Thyroid Hormone-dependent Gene Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 287, 36499–36508.
- Liu, Y.-Y., and Brent, G. A. (2010). Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21, 166–173.
- livet, Y. B., Rochel, N., and Moras, D. (2012). Structural analysis of nuclear receptors: From isolated domains to integral proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 466–473.
- Makishima, M., Lu, T. T., Xie, W., Whitfield, G. K., Domoto, H., Evans, R. M., Haussler, M. R., and Mangelsdorf, D. J. (2002). Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296, 1313–1316.
- Manchado, M., Infante, C., Rebordinos, L., and Cañavate, J. P. (2009). Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of thyroid hormone

- receptors in Senegalese sole. *General and Comparative Endocrinology* 160, 139–147.
- Marchand, O., Safi, R., Escriva, H., Van Rompaey, E., Prunet, P., and Laudet, V. (2001). Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *Journal of Molecular Endocrinology* 26, 51–65.
- Markov, G. V., and Laudet, V. (2011). Origin and evolution of the ligand-binding ability of nuclear receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 334, 21–30.
- Markov, G. V., Paris, M., Bertrand, S., and Laudet, V. (2008). The evolution of the ligand/receptor couple: A long road from comparative endocrinology to comparative genomics. *Molecular and Cellular Endocrinology* 293, 5–16.
- Markov, G., Bonneton, F., and Laudet, V. (2010). *Nuclear Receptors*. eds. C. M. Bunce and M. J. Campbell Dordrecht: Springer Netherlands.
- Martínez, L., Polikarpov, I., and Skaf, M. S. (2008). Only Subtle Protein Conformational Adaptations Are Required for Ligand Binding to Thyroid Hormone Receptors: Simulations Using a Novel Multipoint Steered Molecular Dynamics Approach. *J. Phys. Chem. B* 112, 10741–10751.
- Martínez, L., Souza, P. C. T., Garcia, W., Batista, F. A. H., Portugal, R. V., Nascimento, A. S., Nakahira, M., Lima, L. M. T. R., Polikarpov, I., and Skaf, M. S. (2010). On the denaturation mechanisms of the ligand binding domain of thyroid hormone receptors. *J. Phys. Chem. B* 114, 1529–1540. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=20043653&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Matsushita, A., Sasaki, S., Kashiwabara, Y., Nagayama, K., Ohba, K., Iwaki, H., Misawa, H., Ishizuka, K., and Nakamura, H. (2006). Essential Role of GATA2 in the Negative Regulation of Thyrotropin Gene by Thyroid Hormone and Its Receptors. *Molecular Endocrinology* 21, 865–884.
- Matsuura, K., Fujimoto, K., Fu, L., and Shi, Y. B. (2012). Liganded Thyroid Hormone Receptor Induces Nucleosome Removal and Histone Modifications to Activate Transcription during Larval Intestinal Cell Death and Adult Stem Cell Development. *Endocrinology* 153, 961–972.
- Mavinakere, M. S., Powers, J. M., Subramanian, K. S., Roggero, V. R., and Allison, L. A. (2012). Multiple novel signals mediate thyroid hormone receptor nuclear import and export. *J Biol Chem* 287, 31280–31297.
- Mendoza, A., Navarrete-Ramirez, P., Hernandez-Puga, G., Villalobos, P., Holzer, G., Renaud, J. P., Laudet, V., and Orozco, A. (2013). 3,5-T2 Is an Alternative Ligand for the Thyroid Hormone Receptor 1. *Endocrinology* 154, 2948–2958.
- Miyamoto, T., Kakizawa, T., Ichikawa, K., Nishio, S., Takeda, T., Suzuki, S., Kaneko, A., Kumagai, M., Mori, J., Yamashita, K., et al. (2001). The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 181, 229–238.

- Mochizuki, K., Ishihara, A., Goda, T., and Yamauchi, K. (2012). RNA polymerase II phosphorylation at serine 2 and histone H3 tri-methylation at lysine 36 are key steps for thyroid hormone receptor β gene activation by thyroid hormone in *Rana catesbeiana* tadpole liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417, 1069–1073.
- Moore, J. M. R., and Guy, R. K. (2005). Coregulator interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Proteomics* 4, 475–482.
- Moreno, M., Lombardi, A., Beneduce, L., Silvestri, E., Pinna, G., Goglia, F., and Lanni, A. (2002). Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143, 504–510. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11796504&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Moreno, M., Lombardi, A., Lombardi, P., Goglia, F., and Lanni, A. (1998). Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Sci* 62, 2369–2377.
- Munoz, A., and Bernal, J. (1997). Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J Endocrinol* 137, 433–445.
- Nascimento, A. S., Dias, S. M. G., Nunes, F. M., Aparício, R., Ambrosio, A. L. B., Bleicher, L., Figueira, A. C. M., Santos, M. A. M., Neto, M. de O., Fischer, H., et al. (2006). Structural Rearrangements in the Thyroid Hormone Receptor Hinge Domain and Their Putative Role in the Receptor Function. *Journal of Molecular Biology* 360, 586–598.
- Navarrete-Ramirez, P., Luna, M., Valverde-R, C., and Orozco, A. (2013). 3,5-diiodothyronine stimulates tilapia growth through an alternate isoform of thyroid hormone receptor 1. *Journal of Molecular Endocrinology* 52, 1–9.
- Ng, L., Ma, M., Curran, T., and Forrest, D. (2009). Developmental expression of thyroid hormone receptor β 2 protein in cone photoreceptors in the mouse. *NeuroReport* 20, 627–631.
- Nishiyama, K., Baba, S., Yamada, T., Matsushita, A., Natsume, H., Nakano, K., Sasaki, S., and Nakamura, H. (2003). Embryonic lethal effect of expressing a dominant negative mutant human thyroid hormone receptor alpha1 in mice. *Endocr J* 50, 561–570.
- Nygaard, M., Becker, N., Demeneix, B., Pettersson, K., and Bondesson, M. (2006). Thyroid hormone-mediated negative transcriptional regulation of *Necdin* expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 36, 517–530.
- Orozco, A., and Valverde-R, C. (2005). Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid* 15, 799–813.
- Ortiga-Carvalho, T. M., Shibusawa, N., Nikrodhanond, A., Oliveira, K. J., Machado, D. S., Liao, X.-H., Cohen, R. N., Refetoff, S., and Wondisford, F. E. (2005). Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *J Clin Invest* 115, 2517–2523.

- Paris, M., Hillenweck, A., Bertrand, S., Delous, G., Escriva, H., Zaiko, D., Cravedi, JP., Laude, V. (2010) Active metabolism of thyroid hormone during metamorphosis of amphioxus. *Interg Comp Biol.* 50, 63-74.
- Pascual, A., and Aranda, A. (2013). Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3908–3916.
- Paul, B. D., Buchholz, D. R., Fu, L., and Shi, Y. B. (2006). SRC-p300 Coactivator Complex Is Required for Thyroid Hormone-induced Amphibian Metamorphosis. *Journal of Biological Chemistry* 282, 7472–7481.
- Pelletier, P., Gauthier, K., Sideleva, O., SAMARUT, J., and Silva, J. E. (2008). Mice Lacking the Thyroid Hormone Receptor- Gene Spend More Energy in Thermogenesis, Burn More Fat, and Are Less Sensitive to High-Fat Diet-Induced Obesity. *Endocrinology* 149, 6471–6486.
- Pennock, G. D., Raya, T. E., Bahl, J. J., Goldman, S., and Morkin, E. (1992). Cardiac effects of 3,5-diiodothyropropionic acid, a thyroid hormone analog with inotropic selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 263, 163–169.
- Piedrafita, F. J., Bendik, I., Ortiz, M. A., and Pfahl, M. (1995). Thyroid hormone receptor homodimers can function as ligand-sensitive repressors. *Molecular Endocrinology* 9, 563–578.
- Pilhatsch, M., Winter, C., Nordström, K., Vennström, B., Bauer, M., and Juckel, G. (2010). Increased depressive behaviour in mice harboring the mutant thyroid hormone receptor alpha 1. *Behavioural Brain Research* 214, 187–192.
- Privalsky, M. L., Lee, S., Hahm, J. B., Young, B. M., Fong, R. N. G., and Chan, I. H. (2009). The p160 coactivator PAS-B motif stabilizes nuclear receptor binding and contributes to isoform-specific regulation by thyroid hormone receptors. *J Biol Chem* 284, 19554–19563.
- Psarra, A.-M. G., and Sekeris, C. E. (2008). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life* 60, 210–223.
- Putcha, B.-D. K., Wright, E., Brunzelle, J. S., and Fernandez, E. J. (2012). Structural basis for negative cooperativity within agonist-bound TR:RXR heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6084–6087.
- Renaud, J. P., and Moras, D. (2000). Review Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci* 57, 1748–1769.
- Ribeiro, R. C. J. (2001). Definition of the Surface in the Thyroid Hormone Receptor Ligand Binding Domain for Association as Homodimers and Heterodimers with Retinoid X Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 276, 14987–14995.
- Saelim, N., Holstein, D., Chocron, E. S., Camacho, P., and Lechleiter, J. D. (2007). Inhibition of apoptotic potency by ligand stimulated thyroid hormone receptors located in mitochondria. *Apoptosis* 12, 1781–1794.

- Safer, J. D. (1998). Defective Release of Corepressor by Hinge Mutants of the Thyroid Hormone Receptor Found in Patients with Resistance to Thyroid Hormone. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30175–30182.
- Sakurai, A., Miyamoto, T., DeGroot, L.J. (1992). Cloning and characterization of the human thyroid hormone receptor beta 1 gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 29, 78-84
- Sanchez-Pacheco, A., Martinez-Iglesias, O., Mendez-Pertuz, M., and Aranda, A. (2009). Residues K128, 132, and 134 in the Thyroid Hormone Receptor- Are Essential for Receptor Acetylation and Activity. *Endocrinology* 150, 5143–5152.
- Santos, G. M., Afonso, V., Barra, G. B., Togashi, M., Webb, P., Neves, F. A. R., Lomri, N., and Lomri, A. (2006). Negative regulation of superoxide dismutase-1 promoter by thyroid hormone. *Mol Pharmacol* 70, 793–800.
- Savkur, R. S., and Burris, T. P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* 63, 207–212.
- Schweizer, U., and Kohrle, J. (2013). Function of thyroid hormone transporters in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3965–3973.
- Sharma, D., and Fondell, J. D. (2002). Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7934–7939.
- Shen, X. (2004). Regulation of regional expression in rat brain PC2 by thyroid hormone/characterization of novel negative thyroid hormone response elements in the PC2 promoter. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 288, E236–E245.
- Shi, Y.-B., Matsuura, K., Fujimoto, K., Wen, L., and Fu, L. (2012). Thyroid hormone receptor actions on transcription in amphibia: The roles of histone modification and chromatin disruption. *Cell & Bioscience* 2, 1–1.
- Shibusawa, N., Hollenberg, A. N., and Wondisford, F. E. (2003). Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J Biol Chem* 278, 732–738.
- Sladek, F. M. (2011). What are nuclear receptor ligands? *Molecular and Cellular Endocrinology* 334, 3–13.
- Souza, P. C. T., Barra, G. B., Velasco, L. F. R., Ribeiro, I. C. J., Simeoni, L. A., Togashi, M., Webb, P., Neves, F. A. R., Skaf, M. S., Martínez, L., et al. (2011). Helix 12 Dynamics and Thyroid Hormone Receptor Activity: Experimental and Molecular Dynamics Studies of Ile280 Mutants. *Journal of Molecular Biology* 412, 882–893.
- Takayama, S., Hostick, U., Haendel, M., Eisen, J., and Darimont, B. (2008). An F-domain introduced by alternative splicing regulates activity of the zebrafish thyroid hormone receptor α . *General and Comparative Endocrinology* 155, 176–189.

- Tang, X., Liu, X., Zhang, Y., Zhu, P., and Lin, H. (2008). Molecular cloning, tissue distribution and expression profiles of thyroid hormone receptors during embryogenesis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology* 159, 117–124.
- Tata, JR. (1963) Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and puromycin. *Nature* 197, 1167-8
- Tian, H., Mahajan, M. A., Wong, C. T., Habeos, I., and Samuels, H. H. (2006). The N-Terminal A/B domain of the thyroid hormone receptor-beta2 isoform influences ligand-dependent recruitment of coactivators to the ligand-binding domain. *Molecular Endocrinology* 20, 2036–2051.
- Ting, Y. T., Bhat, M. K., Wong, R., and Cheng, S. Y. (1997). Tissue-specific stabilization of the thyroid hormone beta1 nuclear receptor by phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 4129–4134.
- Togashi, M. (2005). Rearrangements in Thyroid Hormone Receptor Charge Clusters That Stabilize Bound 3,5',5-Triiodo-L-thyronine and Inhibit Homodimer Formation. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25665–25673.
- Tomura, H., Lazar, J., Phyllaier, M., and Nikodem, V. M. (1995). The N-terminal region (A/B) of rat thyroid hormone receptors alpha 1, beta 1, but not beta 2 contains a strong thyroid hormone-dependent transactivation function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5600–5604.
- Treuter, E., and Venteclef, N. (2011). Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1812, 909–918.
- Tzagarakis-Foster, C. (1998). Phosphorylation of Thyroid Hormone Receptors by Protein Kinase A Regulates DNA Recognition by Specific Inhibition of Receptor Monomer Binding. *Journal of Biological Chemistry* 273, 10926–10932.
- Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C., and Evans, R. M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255–1266.
- Velasco, L. F. R., Togashi, M., Walfish, P. G., Pessanha, R. P., Moura, F. N., Barra, G. B., Nguyen, P., Rebong, R., Yuan, C., Simeoni, L. A., et al. (2007). Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem* 282, 12458–12466. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17311926&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Verge, C. F., Konrad, D., Cohen, M., Di Cosmo, C., Dumitrescu, A. M., Marcinkowski, T., Hameed, S., Hamilton, J., Weiss, R. E., and Refetoff, S. (2012). Diiodothyropropionic Acid (DITPA) in the Treatment of MCT8 Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, 4515–4523.

- Villa, A., Santiago, J., Belandia, B., and Pascual, A. (2004). A response unit in the first exon of the beta-amyloid precursor protein gene containing thyroid hormone receptor and Sp1 binding sites mediates negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine. *Molecular Endocrinology* 18, 863–873.
- Wang, D., Xia, X., Liu, Y., Oetting, A., Walker, R. L., Zhu, Y., Meltzer, P., Cole, P. A., Shi, Y.-B., and Yen, P. M. (2009). Negative regulation of TSHalpha target gene by thyroid hormone involves histone acetylation and corepressor complex dissociation. *Molecular Endocrinology* 23, 600–609.
- Wang, D., Xia, X., Weiss, R. E., Refetoff, S., and Yen, P. M. (2010). Distinct and histone-specific modifications mediate positive versus negative transcriptional regulation of TSHalpha promoter. *PLoS ONE* 5, e9853.
- Wang, X., Matsuda, H., and Shi, Y. B. (2008). Developmental Regulation and Function of Thyroid Hormone Receptors and 9-cis Retinoic Acid Receptors during *Xenopus tropicalis* Metamorphosis. *Endocrinology* 149, 5610–5618.
- Watson, P. J., Fairall, L., and Schwabe, J. W. R. (2012). Nuclear hormone receptor co-repressors: Structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 440–449.
- Weihua, Z., Makela, S., Andersson, L. C., Salmi, S., Saji, S., Webster, J. I., Jensen, E. V., Nilsson, S., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2001). A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6330–6335.
- Weinhofer, I., Kunze, M., Rampler, H., Forsspetter, S., Samarut, J., Plateroti, M., and Berger, J. (2008). Distinct modulatory roles for thyroid hormone receptors TR α and TR β in SREBP1-activated ABCD2 expression. *European Journal of Cell Biology* 87, 933–945.
- Williams, G. R. (2008). Neurodevelopmental and Neurophysiological Actions of Thyroid Hormone. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 784–794.
- Wu, W., Niles, E. G., and LoVerde, P. T. (2007). Thyroid hormone receptor orthologues from invertebrate species with emphasis on *Schistosoma mansoni*. *BMC Evol Biol* 7, 150.
- You, S. H., Liao, X., Weiss, R. E., and Lazar, M. A. (2010). The Interaction between Nuclear Receptor Corepressor and Histone Deacetylase 3 Regulates Both Positive and Negative Thyroid Hormone Action in Vivo. *Molecular Endocrinology* 24, 1359–1367.
- Zhuang, S., Bao, L., Linhananta, A., and Liu, W. (2013). Molecular modeling revealed that ligand dissociation from thyroid hormone receptors is affected by receptor heterodimerization. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 44, 155–160.