

II. Les hormones en el control de l'expressió gènica

Podem definir hormona com una substància química a) endocrina, secretada en els líquids corporals per una cèl.lula o un grup de cèl.lules que exerceix un efecte fisiològic sobre el control d'altres cèl.lules; b) paracrina, que produeix una acció fisiològica sobre les cèl.lules veïnes de les que l'han secretada; c) autocrina, que té un efecte fisiològic sobre la mateixa cèl.lula que l'ha secretada. Algunes hormones afecten totes o quasi totes les cèl.lules de l'organisme mentre que altres són específiques de teixit, en funció de la presència de receptor.

II.a. Hormones esteroïdals, tiroïdals, vitamina D i àcid retinoic

Les *hormones esteroïdals* tenen una estructura química semblant a la del colesterol i la majoria deriven d'aquest metabòlit. Són secretades per: a) escorça suprarenal (cortisol i aldosterona), b) ovaris (estrògens i progesterona), c) testicles (testosterona) i d) placenta (estrògens i progesterona).

Enzims representats numèricament en l'esquema següent:

- 1 = 20,22-hidroxilasa-desmolasa (P-450scc)
- 2 = 17 α -hidroxilasa (P-450c17)
- 3 = 17,20-desmolasa (P-450c17)
- 4 = sulfoquinasa
- 5 = 3 β -hidroxisteroide-deshidrogenasa- Δ^{4-5} isomerasa
- 6 = 21-hidroxilasa (P450c21)
- 7 = 11 β -hidroxilasa (P-450c11)
- 8 = 18-metil-oxidasa (P450c11)
- 9 = 18-deshidrogenasa (P450c11)
- 10 = 17 β -hidroxisteroide-deshidrogenasa

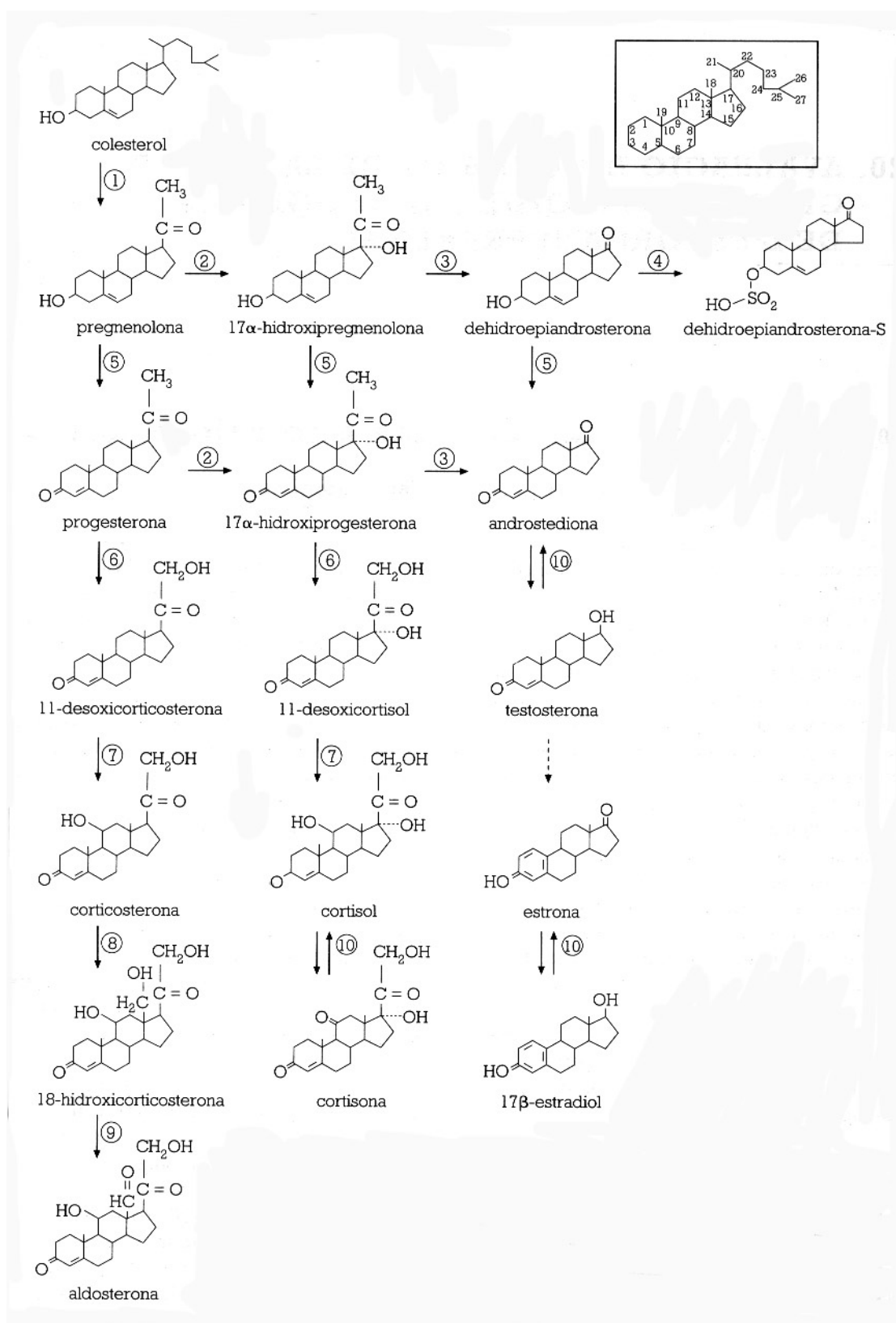


Fig.2. Les hormones esteroidals. Estructura química del colesterol, testosterona, dihidrotestosterona, 17-β estradiol, progesterona, aldosterona i cortisol.

Les hormones tiroïdals són derivats iodats de l'aminoàcid tirosina i són secretades per la glàndula tiroide.

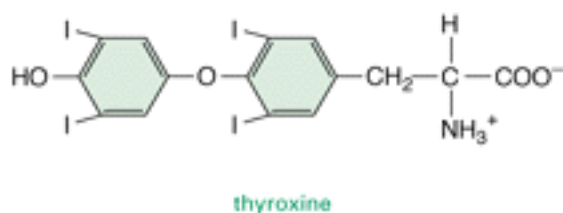
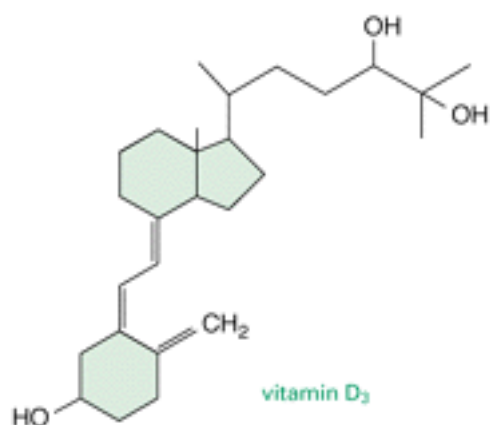


Fig3. Les hormones tiroïdals.Estructura química.

La vitamina D, en la seva forma biològicament més activa, és una hormona esteroïdal, l'1,25-dihidroxi-vitamina D (1,25[OH]₂D), que té una potent activitat estimuladora de l'absorció intestinal de calci i fòsfor i de la resorció d'aquests dos elements a l'os (13). L'acid retinoic és el metabolit natural biològicament més actiu de la vitamina A (retinol) i exerceix el seu efecte sobre el desenvolupament, diferenciació cel.lular i homeostasi (14). Existeixen dos tipus de receptor d'àcid retinoic que tenen com a lligand l'àcid *all-trans* retinoic o l'àcid 9-*cis* retinoic.

a)



b)

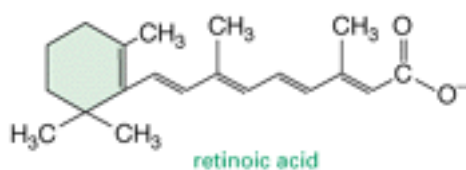


Fig.4. Vitamina D i àcid retinoic. a) La vitamina D forma part d'un grup de compostos d'estructura química similar anomenats secosteroides. Estructura química de la forma de vitamina D biològicament més activa, 1,25-(OH)₂D₃ (calcitriol). b) Les dues formes actives de l'àcid retinoic; àcid *all-trans* retinoic i àcid 9-*cis* retinoic.

II.a.1. Receptors

Els receptors de les hormones esteroïdals i tiroïdals són membres d'una gran família de factors de transcripció activats per lligand que inclouen els *receptors esteroïdals*, els quals comprenen els receptors de progesterona (PR), d'andrògens (AR), d'estrògens (ER), de glucocorticoides (GR) i de mineralocorticoides (MR), i els *receptors d'hormona tiroïdal*

(TR), *d'àcid retinoic* (RXR , RAR) i *vitamina D* (VDR), així com també un gran grup de proteïnes anomenades *receptors orfes*, els lligands i/o la funció dels quals és desconeguda, encara que actualment es coneixen alguns dels seus lligands, com ho són els àcids grassos i els ecosanoids pel PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) (15), els retinoids i els farnesoids pel RIP14/FXR (16), diferents oxisterols pels receptors orfes LXR i SF-1 (17, 18), diferents esteroides i glucocorticoides sintètics i antiglucocorticoides pel PXR (pregnane X receptor) (19), entre d'altres.

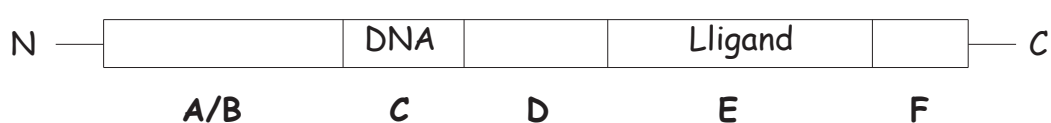
Aquests receptors poden actuar tant com activadors transcripcionals com repressors en tots els aspectes de la funció biològica, incluint el desenvolupament, metabolisme i reproducció.

A) Estructura:

Els *receptors de la superfamília d'hormones esteroïdals i tiroïdals* tenen una estructura característica (20) (Fig. 5). El *domini N-terminal A/B* és molt variable en longitud i seqüència. Generalment aquest domini té la funció de transactivació, interaccionant amb la maquinària basal de transcripció, factors de transcripció específics, coactivadors i/o repressors i factors de la cromatina. És una regió important per l'especificitat de receptors que reconeixen el mateix element de resposta. La *regió C*, és responsable de la dimerització, té un domini d'unió a DNA (*DBD*), format per dues estructures de dits de zinc, que és el que dirigeix la unió a l'element de resposta. Existeix també una *regió D*, molt variable, que té el domini de localització nuclear i una *regió E* amb un domini d'unió a hormona o lligand (*LBD*), que reconeix el lligand, assegura la selectivitat i contribueix a l'especificitat. Aquesta

regió és funcionalment complexe ja que també s'hi troben regions d'unió a xaperonines (*heat-shock proteins*), de dimerització, transactivació, localització nuclear, etc. En la part C-terminal del LBD es troba el domini de dimerització més important, que pot formar estructures de cremallera de leucines, típiques dels receptors que dimeritzen. Finalment, la *regió F*, és una regió variable de la que no es coneix la funció.

a)



b)

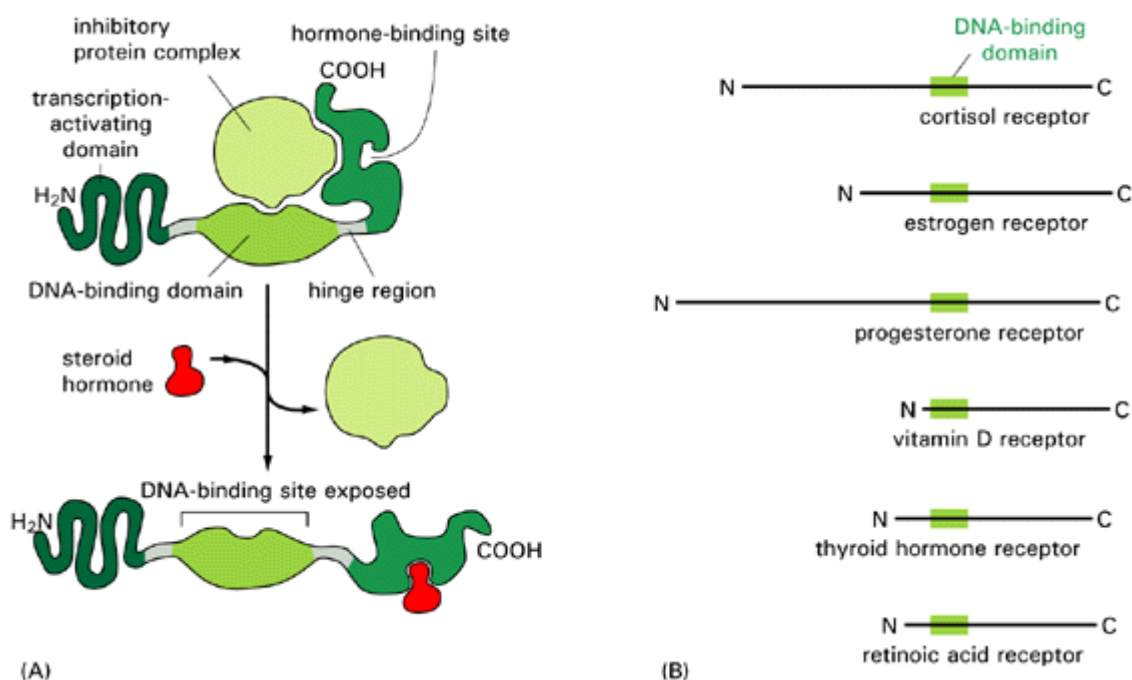


Fig. 5. Estructura dels receptors de la superfamília d'hormones esteroïdals i tiroïdals: dominis estructurals i funcionals. a) Esquema. b) A) Representació dels canvis conformationals del receptor en presència del lligand. B) Localització del lloc d'unió a DNA de receptors de la superfamília.

B) Mecanismes d'acció hormonal:

a) Unió a DNA

Els ***receptors esteroïdals***, en absència d'hormona, estan associats amb complexos preformats de proteïnes que inclouen hsp90 (*heat-shock protein* de 90 kDa) i hsp70 i són translocats entre el citoplasme i el nucli. No obstant, la quantitat relativa de receptor que es troba en el citoplasme depèn del tipus de receptor, és a dir; en absència d'hormona, GR i AR semblen ser predominantment citoplasmàtics, mentre que PR i ER són predominantment nuclears (21, 22). La unió del lligand provoca la dissociació de les xaperonines, la dimerització del receptor i la unió a un element de resposta d'esteroides específic, la seqüència consens del qual és una seqüència invertida repetida separada per tres nucleòtids.

ER reconeix la seqüència AGGTCA_{nnn}TGACCT i GR, PR, AR i MR reconeixen la mateixa seqüència consens AGAAC_{nnn}TGTTCT (23). Per explicar l'especificitat de la resposta hormonal produïda per aquest grup de receptors, s'han descrit diferents mecanismes possibles que són; altres seqüències en *cis* pròximes d'elements de resposta a on s'uneixen altres factors de transcripció, receptors teixit específics, participació de coactivadors i l'estructura de la cromatina. Però, a més a més, treballs recents indiquen que AR per una banda i GR, PR i MR per l'altra presenten característiques d'unió a DNA diferents (24). S'ha identificat que la subseqüència 5'-GGTTCT-3', és la responsable d'excloure la unió de GR a les seqüències "GR-like". L'element 5'-GGTTCT_{tg}AGTACT-3', en la regió promotora del gen de la probasina, interacciona selectivament amb el domini d'unió a DNA del receptor d'androgens de rata i no amb el del receptor de glucocorticoides. S'ha demostrat que residus

del segon dit de zinc i de l'extensió C-terminal (CTE) de 12 aminoàcids determinen la diferència en la unió a aquesta seqüència dels dos receptors (24). També s'ha observat que repeticions directes de TGTTCT (regió consens) separades per 3 bp espaïadores permeten la unió d'AR i no de GR (24, 25). Aquesta podria ser la base d'un possible mecanisme pel que AR preferencialment interaccionaria amb seqüències específiques de DNA. Per altra banda, Zhou *et al* (26), identifiquen un lloc d'unió de 17 bp específic pel receptor d'androgens, que està constituït per repeticions invertides i directes. 5'-GGAACGGAACATGTTCT-3', presenta el mateix motiu de lloc d'unió que el consens per GRE però en una organització diferent, que li confereix l'especificitat.

Els *receptors tiroïdals, d'àcid retinoic, vitamina D i orfes* es troben en el nucli, en els seus llocs d'unió a DNA específics, en absència de lligand. En concret, els TRs s'uneixen a TREs en els que els mig llocs d'unió estan organitzats com palíndroms, repeticions directes i palíndroms invertits (TRE_{pal} s, DRs i IPs, respectivament) de la seqüència AGGTCA (27). VDR s'uneix a DRs de AGGTCA separats per 3 nuceòtids (DR3), 4 per TR (DR4) i 5 per RAR (28). A part de TR, els RAR i RXR també s'uneixen a TRE_{pal} . Els receptors orfes, segons el grup al que pertanyen, poden unir-se com homodímers, heterodímers o monòmers a seqüències concretes de DNA.

b) Proteïnes reguladores

Les proteïnes reguladores o coreguladors tenen la capacitat d'augmentar (coactivadors) o disminuir (corepressors) l'activitat de gens regulats per receptors nuclears d'una manera

depenent o indepenent de lligand. Aquesta última es donaria a través de la fosforilació del receptor o a través de proteïnes com pot ser la ciclina D1 que pot reclutar coactivadors per l'ER no unit a lligand (29).

Podem considerar que una proteïna és un coactivador si: a) interacciona directament amb el domini d'activació del receptor nuclear de manera depenent d'agonista; b) interacciona amb la maquinària basal de transcripció; o c) no pot ser reclutada per augmentar la transcripció en absència del receptor nuclear. Per altra banda un corepressor s'ha d'unir: a) al receptor no unit a lligand, b) a la maquinària basal de transcripció o c) augmentar la repressió transcripcional basal (29, 30). S'han identificat factors de la cromatina com coactivadors (SWI/SNF, ADA/GCN5) i corepressors (SMRT o N-CoR) (29).

Els receptors nuclears també poden interaccionar amb diferents components de la maquinària basal de transcripció, amb factors intermitjos de la transcripció (TIFs) com ERAP, RIP140, GRIP170, SUG1, TIF1, TIF2, entre altres, que constitueixen un pont entre els factors de la maquinària basal de transcripció i els factors de transcripció de seqüència específica, i amb aquests últims (AP1, Oct1, HNF3, GATA-1, C/EBPs, etc) (29).

Proteïnes reguladores dels receptors esteroïdals:

Proteïnes reguladores del receptor d'andrògens

S'han identificat diferents coreguladors que interaccionen de manera dependent d'hormona amb les regions C-terminal de diferents receptors nuclears. La majoria de

coreguladors són promiscus, de manera que els receptors són capaços d'unir-se amb alguns d'ells i probablement de forma simultània. Ikonen *et al* (31), identifiquen seqüències aminoacídiques importants per la transactivació mitjançada per l'AR de rata (rAR) i demostren que la capacitat d'utilització per determinats coactivadors de dites seqüències, que constitueixen dues regions diferents del domini N-terminal del receptor, implicades en l'activació transcripcional, està modulada per la unió de l'hormona al LBD. Concretament, els seus resultats indiquen que els coactivadors F-SRC-1 i CBP/p300, a part d'augmentar la transactivació mitjançada per AR també faciliten l'associació dependent d'androgen del N i C terminal del rAR. CBP/p300 (32) són proteïnes cointegradores de diferents vies de senyalització, amb una activitat inherent histona acetilasa i amb la capacitat de reclutar una altra histona aciltransferasa (PCAF), que també estan implicades en la regulació transcripcional produïda pels receptors nuclears. No obstant, altres coactivadors dels receptors nuclears actuen de forma diferent, com per exemple SRC-1, que activa PR, GR, ER i inhibeix rAR. McEwan *et al* (33), demostren que una regió del N terminal de l'AR que presenta la major capacitat de transactivació, pot reclutar la maquinària basal de transcripció a un promotor diana i la seva unió al factor de transcripció general TFIIF. A part de les proteïnes ARA70 i TIF2, de les que ja fa temps que es coneix que augmenten la transactivació mitjançada per AR (34, 35), s'han identificat, recentment, un gran nombre de proteïnes que també actuen com a coreguladors d'aquest receptor. Tan *et al* (36), caracteritzen un coactivador de l'AR que és idèntic a la molècula activadora del receptor de T₃ (TRAM1, *Thyroid receptor activator molecule-1*) però sense els aminoàcids 1-458 i pertany al subgrup SRC-3 del grup del coactivador de receptors esteroïdals SRC-1 humà. També, s'ha identificat la ciclina E com coactivador de l'AR (37) i FHL2 (proteïna de funció desconeguda amb motius LIM, que es caracteritzen per un motiu doble de dit de zinc constituït per cisteïnes) com coactivador específic de l'AR, en pròstata (38). Una altra

proteïna que s'ha identificat que interacciona amb el receptor d'andrògens és la Ubc9, que és un homòleg dels enzims conjugadors d'ubiquitina E2, i estimula la transactivació dependent d'AR perquè catalitza la conjugació d'una molècula petita semblant a ubiquitina (SUMO-1, *Small ubiquitin-like molecule-1*) a diferents proteïnes diana, entre les que es troba l'AR. Una de les conseqüències d'aquesta modificació és que es bloqueja la ubiquitinització i la degradació mitjançada pel proteosoma (39). Huang *et al* (40), identifiquen una proteïna d'unió a GRIP1 (*mouse glucocorticoid receptor-interacting protein*) que és una variant del factor Zac1 (*Zinc finger transcription factor*) i s'uneix a la regió C-terminal dels coactivadors de la família p160. Aquest nou coactivador anomenat mZac1b augmenta l'activitat dependent de lligand dels receptors nuclears (AR, ER, GR i TR) però també pot actuar com un repressor per alguns gens *reporter* i en algunes línies cel·lulars. És a dir, pot interaccionar amb els receptors nuclears i amb els seus coactivadors, i pot jugar un paper negatiu o positiu en la regulació de la funció del receptor nuclear. Finalment, una proteïna amb un mecanisme de coactivació dels receptors nuclears diferent, és la proteïna SNURF (*Small nuclear RING finger protein*). SNURF interacciona amb el DBD dels receptors d'AR, ER i PR i és capaç tant d'augmentar la transcripció dependent de receptors esteroïdals com la transcripció basal, per tant, es suggereix que SNURF actua com un factor pont entre els receptors esteroïdals i altres factors de transcripció (41).

*Proteïnes reguladores dels **receptors tiroïdals***

Com ja s'ha esmentat, l'acció dels receptors nuclears és producte de la participació d'altres factors, que poden ser complexes formats per diferents subunitats. Näär *et al* (42), identifiquen un complex format per 16 o més subunitats, algunes de les quals són productes

gènics desconeguts, mentre que altres formen part, també, d'altres cofactors constituïts per diferents proteïnes. Dit complex s'anomena *activator-recruited factor* (ARC) però, com que es creu que és idèntic o que presenta coactivadors altament relacionats amb els del complex DRIP (vitamin-D-receptor interacting protein), s'anomena, també, ARC/DRIP. És possible que aquest complex interaccioni amb diferents receptors nuclears i és conegut que augmenta la transactivació dependent de lligand mitjançada per VDR i TR en assaigs de transcripció sense cèl·lules (43). També, pot ser que el complex TRAP (*Thyroid hormone receptor auxiliary protein*) sigui molt semblant al complex ARC/DRIP. Els TRAPs, com el seu nom indica, poden interaccionar amb els TRs. Caira *et al* (44), han identificat un nou coactivador anomenat RAP250 que pot formar part d'un nou complex coactivador o ser un membre no identificat del complex TRAP/DRIP. S'ha observat que el seu mRNA s'expressa en diferents teixits però és més elevat en els òrgans reproductius (testicle, prostata i ovari) i cervell.

TR també interacciona en el seu domini d'unió a lligand amb proteïnes anomenades TRIPs (TR-interacting proteins). Aquestes depenen de l'hormona per interaccionar amb el receptor, però, unes només interaccionen quan T_3 és present i altres quan T_3 és absent. Moltes TRIPs mostren interaccions dependents de lligand semblants pel RXR, però cap amb el receptor de glucocorticoides. D'acord amb els efectes pleiotròpics de TR i RXR, diferents TRIPs presenten una similitud significativa en la seqüència aminoacídica de proteïnes implicades en diferents vies reguladores (45). També es coneix la interacció de TR amb TAF_{II}110 (TATA box-binding protein (TBP) -associated factors) (46). Walfish *et al* (47), indiquen que la proteïna GRIP1, que és un membre de la família ERAP160 de coactivadors de receptors nuclears (que inclou SRC-1 i TIF2), actua com adaptador entre el complex receptor-ligand unit als corresponents elements de resposta de GR, ER, AR i TR, RAR

i RXR homodimers i TR o RAR/RXR heterodimers i l'aparell d'iniciació de transcripció (TIA). Aquests autors postulen que GRIP1 potencia l'activació de TR/RXR, que és molt dèbil si GRIP1 és absent. Anteriorment, Chin *et al* (48), van hipotetitzar l'existència d'un adaptador amb la mateixa propietat. Dangsheng *et al* (49), identifiquen un nou coactivador nuclear anomenat NRIF3 (*Nuclear receptor coactivator*) que específicament interacciona i potencia l'efecte de TR i RXR de manera dependent de lligand però no de RA, VDR, PR, GR o ER.

RXR reconeix diferencialment les conformacions de TR amb lligand o sense i aquestes diferències semblen jugar un paper important en el reclutament de corepressors (N-CoR i SMRT) als heterodimers TR-RXR en absència de T_3 i de coactivadors en presència de T_3 (50). Segons Olson *et al* (51), RXR és necessari per l'expressió gènica quan els elements de resposta estan constituïts per mig llocs d'unió a DNA subòptims, mentre que els TRs són suficients per activar màximament l'expressió gènica si els elements de resposta són òptims.

c) Fosforilació

Els receptors nuclears integren tant els senyals directes produïts pel lligand com els que provenen de receptors de membrana. La família de receptors esteroïdals i tiroïdals són fosfoproteïnes i alguns receptors esteroïdals són hiperfosforilats amb la unió de l'hormona, suggerint que hi ha un lligam entre l'estat de fosforilació i l'estat d'activació d'aquests receptors. L'activació de cascades de transducció de senyal per moduladors de quinases i fosfatases pot estimular l'activitat d'alguns receptors esteroïdals, que són; AR, ER, GR i

PR. També, però, l'activació de quinases regulades per senyals extracel·lulars pot inhibir l'activació transcripcional mitjançada per GR. A més a més, diferents receptors esteroïdals com l'ER humà o de rata, el PR de pollastre i l'AR humà poden ser activats d'una manera independent de lligand per factors de creixement, neurotransmissors i altres compostos que modulen la fosforilació intracel·lular i els esdeveniments de desfosforilació. Per tant, com que les reaccions de fosforilació i desfosforilació són produïdes per diferents enzims, aquest és un mecanisme que permet a la cèl·lula alterar l'activitat de la proteïna en resposta a diferents vies de senyalització.

AR és fosforilat en múltiples llocs però es coneix poc sobre les quinases que hi intervenen. El receptor és detectat com un doblet de 110 kDa i 112 kDa en gels de SDS/poliacrilamida, i és l'espècie de 112 kDa la que està fosforilada (52). Krstic *et al* (53), indiquen que tant ERK2 i CDC2 són quinases que directament fosforilen el receptor. Moilanen *et al* (54), caracteritzen una nova proteïna quinasa serina-treonina de 130 kDa, anomenada ANPK, que interacciona amb la regió de dit de zinc de l'AR. No obstant, el receptor no sembla ser el substrat de l'ANPK *in vitro* i la sobreexpressió d'ANPK no augmenta la fosforilació del receptor *in vivo*. L'ancoratge d'ANPK a l'AR podria fer que la quinasa pogués reclutar proteïnes substrat específiques que són coreguladors d'AR, components de la maquinària basal, o proteïnes estructurals de la cromatina, tals com histones. Conseqüentment, la fosforilació d'aquestes proteïnes augmentaria la interacció amb el receptor o estabilitzaria complexos multiproteics. Per altra banda, ANPK podria estar implicada en l'estabilització de la interacció entre regions amino i carboxi-terminals d'AR, fet influenciat per altres proteïnes coreguladores (31). ANPK mostra selectivitat de substrat per histones del *core* nucleosomal i catalitza només la fosforilació de la histona H3, pel què es pot especular que ANPK està implicada en la reorganització dels nucleosomes en regions

promotores regulades per AR. També es coneix que la transactivació dependent de lligand de l'AR de rata és potenciada per l'activació de les vies de fosforilació de PKA i PKC (55). Reinikainen *et al* (56), demostren que les respostes androgèniques estan també acoplades a les vies de fosforilació en tirosines. Per evidències indirectes es creu que AR no és fosforilat per MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*), les quals es troben en la cascada de senyalització que s'inicia per receptors de membrana amb activitat tirosina kinasa, però, és possible que l'augment en la transactivació androgènica sigui degut a la fosforilació d'altres factors de la maquinària transcripcional.

L'anàlisi de la fosforilació de TR és incompleta. Els TRs són fosforilats i la fosforilació augmenta la unió a DNA (57). Per altra banda, la unió d'un mutant que no pot unir lligand, està regulada negativament per fosforilació. Lefebvre *et al* (58), han demostrat que la desfosforilació de RAR α i RXR α disminueix la seva unió a DNA.

Actualment, s'està proposant un nou model de senyalització via receptors nuclears, en el que es substitueix el model estàtic de llibre de text, que representa els receptors nuclears com a factors de transcripció activats per lligand, per un de més complex i dinàmic, en el que, tant el lligand com la senyalització per proteïnes quinases regulen tant la funció transcripcional com l'estabilitat proteica dels receptors nuclears. La troballa que la via de les MAPKs marca a PR i RXR α per la degradació dependent de proteosoma és innovadora i té implicacions importants per la funció d'aquests receptors (59). També, no hem d'oblidar que la relació que existeix, per exemple, entre les vies de MAPKs i receptors nuclears és complicada, ja que cada via de senyalització pot regular l'altra i els efectes poden ser tant positius com negatius. El cas de GR i la via de les MAPKs il·lustra molt bé aquesta relació. L'antagonisme que existeix entre glucocorticoides i agonistes d'AP1 implica la interacció

entre el domini d'unió a DNA de c-Jun i el del GR, impedit la unió al DNA dels dos factors de transcripció. No obstant, aquest antagonisme és més complicat, ja que GR bloqueja l'activació de SAPK (*Stress-activated protein kinase*, quinasa que es troba en la via de les MAPKs), la qual activada per estímuls antiinflamatoris, pot fosforilar directament el GR i inhibir l'activació del GR induïda per dexametasona (59).

d) Efectes no genòmics de les hormones esteroïdals i tiroïdals

Les hormones esteroïdals i tiroïdals no només produeixen els seus efectes fisiològics a través de la regulació de la transcripció, ja que els efectes ràpids produïts per dites hormones no poden donar-se de la mateixa manera. Fa uns pocs anys que es reconeixen les accions no genòmiques de les hormones esteroïdals.

Els efectes ràpids produïts per les hormones esteroïdals i tiroïdals poden donar-se per dos mecanismes:

a) Interacció de les hormones esteroïdals amb proteïnes inespecífiques o lípids de membrana. Els efectes no específics es produirien a concentracions elevades d'hormones esteroïdals i l'especificitat parcial d'aquests efectes podria ser deguda a la diferent lipofília i polaritat d'aquestes hormones. La interacció hormona esteroïdal-membrana afecta a les propietats fisicoquímiques de la membrana, tals com la fluïdesa i el microambient de les proteïnes de la membrana.

b) Interacció de les hormones esteroïdals i tiroïdals amb receptors específics. Wehling

(60) proposa un model simplificat que integra els efectes no genòmics específics i els efectes genòmics de les hormones esteroïdals i tiroïdals (Fig.6). En dit model, l'acció ràpida de dites hormones implicaria receptors de membrana putatius amb la conseqüent producció de segons missatgers i de transport electrolític. Obviament, les hormones esteroïdals i tiroïdals també actuarien a través dels seus receptors nuclears i ambdós mecanismes serien coreguladors d'un ampli ventall d'efectes en la cèl.lula, controlant també els seus propis efectes genòmics.

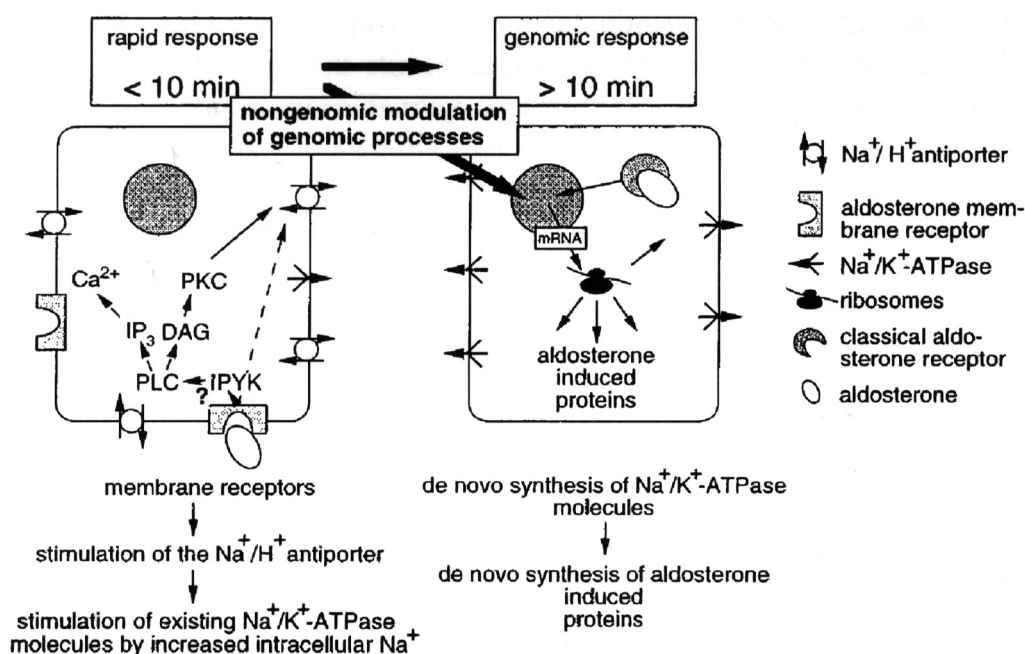


Fig.6. *Efectes no genòmics de les hormones esteroïdals.* Model en dos passos de l'acció dels mineralocorticoides, que amb petites modificacions, pot aplicar-se a altres esteroïdes (60). A més a més de l'esquema representatiu de la teoria genòmica clàssica de l'acció dels mineralocorticoides (dreta), la via no genòmica (esquerra) comprèn els efectes ràpids de l'aldosterona sobre el transportador de Na^+/H^+ , missatgers secundaris intracel·lulars (IPYK, tirosina quinasa intermediària; IP_3 , inositol-1,4,5-trifosfat; DAG, diacilglicerol; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, calci intracel·lular lliure; PKC, proteïna quinasa C), i la unió de l'aldosterona a receptors de membrana.

II.b. La cromatina en la regulació hormonal

El DNA eucariota en el nucli de la cèl.lula està organitzat en cromatina, la unitat bàsica de la qual són els nucleosomes. Beato *et al* (61, 62), demostren que l'organització nucleosomal del promotor del MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) pot ser essencial pel sinergisme entre receptors hormonals i altres factors de transcripció, implicats en la inducció òptima de dit promotor. S'ha demostrat que la deplecció nucleosomal, a més de produir un augment de l'activitat constitutiva del promotor del MMTV en absència del receptor i de l'hormona, provoca la disminució de la inducció depenent de NF-1 (*Nuclear factor-1*) en resposta a l'hormona. Per tot això, es proposa que l'organització nucleosomal del MMTV, que està implicada tant en la repressió constitutiva com en el sinergisme entre receptors i NF-1, és crítica per què es dongui la transcripció adequada després de la inducció produïda per l'hormona. Dels resultats obtinguts es proposa un model hipotètic de reorganització de la cromatina en diferents passos i és el següent (Fig.7):

- 1- Els receptors nuclears hormonals s'uneixen als HREs accessibles de la superfície del nucleosoma.
- 2- Els receptors nuclears poden reclutar tant directament o via TIFs, els factors que participen en la reorganització de la cromatina (com el complex SWI/SNF).
- 3- També, pot necessitar-se l'acetilació de les cues de les histones del *core* pel complex ADA/GCN5, l'eliminació de la histona H1, o/i la dissociació parcial d'un dímer d'histones H2A/H2B.
- 4- Més molècules de receptor i altres factors de transcripció poden ocupar els seus llocs en el promotor. Probablement, tots els factors específics de seqüència cooperen en el reclutament final i estabilització del complex d'iniciació de la

transcripció.

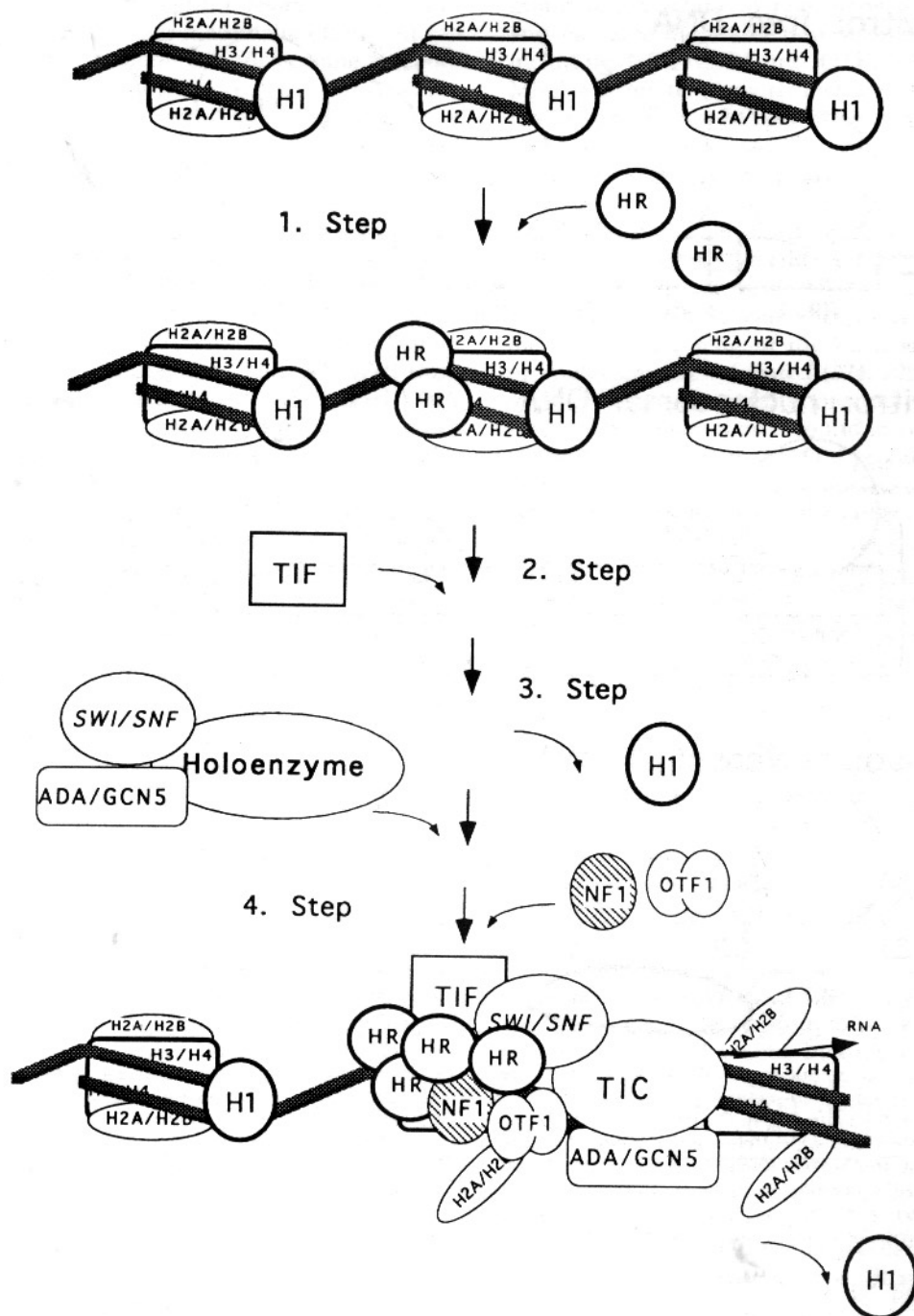


Fig.7. Receptors esteroïdals i cromatina. Model proposat per Beato, et al (62).

La regulació de l'expressió gènica per receptors nuclears permet determinar la relació entre coactivadors, corepressors i la cromatina. Com ja s'ha esmentat, els receptors nuclears tenen la capacitat d'unir-se eficientment als seus elements de resposta en la cromatina. Un altre exemple ben conegut és el mecanisme d'activació-repressió dels receptors tiroïdals. En absència de lligand, el TR i el RAR recluten un complex corepressor que conté histones acetilases, activitat enzimàtica primordial per produir el silenci transcripcional. La unió de l'hormona provoca l'eliminació del complex corepressor i el reclutament d'un complex d'histona acetiltransferases. Per tant, es proposa un model de regulació gènica en el que el receptor no unit a lligand provoca un ensamblatge repressor de la cromatina però, en resposta a l'hormona, el receptor recluta coactivadors amb activitat histona acetiltransferasa per desestabilitzar l'estructura repressora de la cromatina i la conseqüent activació transcripcional. Li *et al* (63), estudien el paper del coactivador p300 amb funció acetiltransferasa en la reorganització de la cromatina i determinen que p300 no intervé en la disrupció de la cromatina però facilita la transcripció si prèviament hi ha hagut una reorganització d'aquesta. L'acetilació d'histones sembla proporcionar un lligam entre la modificació de la cromatina i la transcripció, però dita acetilació no és un mecanisme d'activació transcripcional universal, ja que encara que alguns gens poden ser activats selectivament per un augment en l'acetilació de les histones, altres no.

Les dades de Heinzl *et al* i d'Alland *et al* (64), contribueixen a la proposta d'un model en tres passos per esquematitzar el mecanisme general a través del qual el receptor d'hormona tiroïdal regula la transcripció (Fig.8).

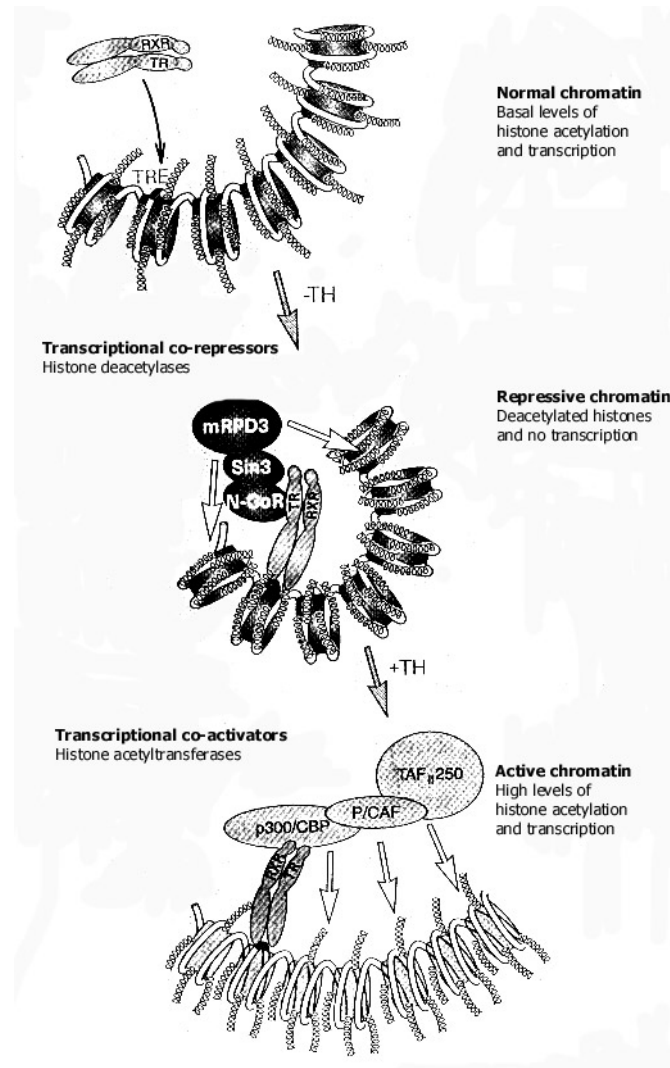


Fig.8. Receptors tiroïdals i cromatina (64).

II.c. Regulació androgènica i tiroïdal

Els efectes principals produïts pels **andrògens** es donen en els teixits del tracte reproductor, però també en fetge, ronyó, múscul i cervell. Els andrògens amb una major activitat són la testosterona (T) i la 5- α -dihidrotestosterona (DHT). En els testicles es sintetitza i secreta fonamentalment T, la qual viatja per la sang unida a una proteïna

plasmàtica transportadora d'hormones sexuals que és sintetitzada en el fetge (*Androgen-Binding Protein*, ABP). Quan el complex T-transportador arriba a la cèl.lula diana, la T se separa i travessa la membrana citoplasmàtica. En el citoplasme pot unir-se directament al receptor, ser transformada a DHT per la 5- α -reductasa o ser aromatitzada a estrògens per l'acció de l'enzim P450 aromatasas. La T és transformada a DHT per l'enzim 5- α -reductasa, en els òrgans perifèrics que la presenten, tals com la pròstata, fetge, pell i glàndules submaxil.lars.

El tipus d'androgen actiu present a cada cèl.lula és un altre mecanisme pel que es pot generar una resposta específica. Durant el desenvolupament sexual dels mascles, la T és necessària pel desenvolupament dels òrgans sexuals interns mentre que la DHT és imprescindible pel desenvolupament dels òrgans externs. També s'han observat diferències en els efectes reguladors de T i DHT sobre l'expressió de nombrosos gens, incluint les citokines IL-4, IL-5 i interferó γ (65). En rates i humans s'ha demostrat que la DHT s'uneix amb una major afinitat a l'AR i forma un complex molt més estable que la T. La diferència en la interacció amb el receptor s'ha relacionat amb la capacitat de cada androgen per estimular la transcripció d'un gen concret (66). Les cèl.lules que tenen 5- α -reductasa poden amplificar l'acció de la T, transformant-la a DHT, fet que resulta en un mecanisme de regulació local. Fins al moment, no ha sigut possible determinar quin dels dos andrògens és el principal efector biològic en cada teixit, possiblement, depèn de la presència o absència de l'enzim 5- α -reductasa (67).

COLESTEROL

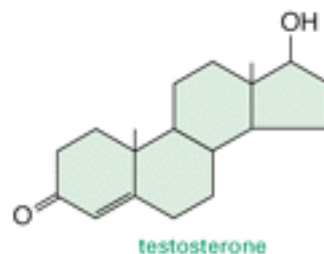
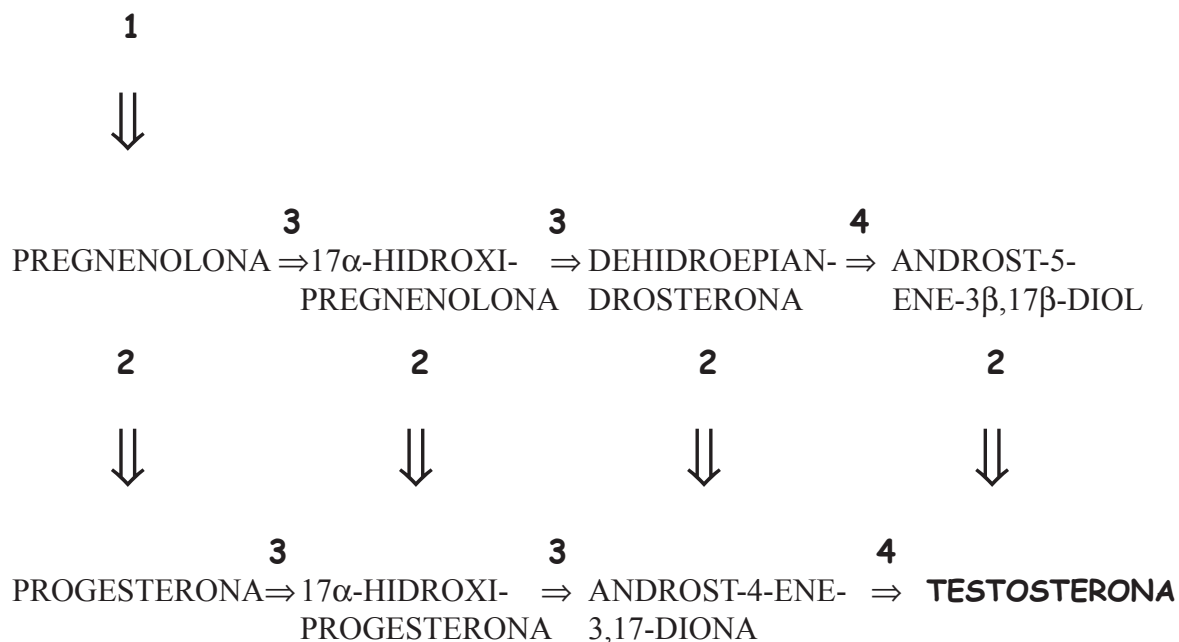


Fig.9. Via de síntesi d'andrògens en els testicles. Els números corresponen als enzims que catalitzen

cada una de les reaccions enzimàtiques:

1 = P450scc

2 = 3-β-esteroide-deshidrogenasa/Δ⁵,Δ⁴isomerasa

3 = 17-α-hidroxilasa/C17--C-20 liasa/P450c17

4 = 17-β-hidoxiesteroide deshidrogenasa

Com els demás esteroides, els andrògens exerceixen els seus efectes a nivells diferents. L'acció principal es realitza a nivell transcripcional, però també pot ser a nivell postranscripcional, estabilitzant el mRNA d'alguns gens de ronyó de ratolí (68).

Les **hormones tiroïdals**, 3, 5, 3'-triiodotironina (T_3) i 3, 5, 3', 5'-tetraiodotironina o tiroxina (T_4), realitzen un ventall ampli d'accions, al contrari d'altres hormones, l'acció de les quals és altament específica (69). En l'animal adult exerceixen la seva acció en quasi tots els òrgans i teixits. Clínicament, l'excés o defecte de l'hormona circulant es reflecteix en síndromes ben coneguts de hipo i hipertiroïdisme. En els períodes pre- i perinatal de la vida de l'animal, les hormones tiroïdals afecten considerablement el creixement, desenvolupament i diferenciació.

El manteniment d'una funció tiroïdal normal depèn de la integritat fisiològica de l'eix hipotàlem-hipòfiso-tiroïdal (Fig.10). L'hipotàlem contribueix al funcionament d'aquest sistema mitjançant la producció de l'hormona alliberadora de tirotropina (TRH). Aquesta hormona és un tripèptid sintetitzat per neurones hipotalèmiques que l'aboquen a la sang del sistema porta-hipofític.

A través d'aquest sistema vascular arriba a l'adenohipòfisi, a les cèl.lules tirotroques de la qual indueix la secreció de tirotropina (TSH). Al seu torn, aquesta darrera hormona és alliberada a la circulació sanguínia i arriba a la glàndula tiroide, on estimula la síntesi i secreció de les hormones tiroïdals: T_4 i T_3 . Després de la seva secreció, la major part de les hormones tiroïdals s'uneixen a proteïnes del plasma, les quals es sintetitzen en el fetge.

La T_4 present a la sang és un producte exclusiu de la glàndula tiroide. En condicions normals, només un 20% de la T_3 que circula per la sang se sintetitza en aquesta glàndula, mentre que el 80% restant deriva del metabolisme extratiroïdal de la T_4 . Tot i que la T_4 és l'hormona més abundant a la sang, la seva molècula no sembla tenir activitat biològica intrínseca. Sembla que l'activitat metabòlica de les hormones tiroïdals com les seves accions inhibidores de la síntesi hipofisària de TSH estan mitjançades per la concentració intracel.lular de T_3 . Aquesta hormona intracel.lular es podria generar *in situ* a partir del metabolisme intracel.lular de la T_4 o bé derivar directament de la circulació. La T_3 intracitoplasmàtica és transportada al nucli, on s'uneix a un receptor específic. D'aquesta unió es deriven els seus efectes biològics.

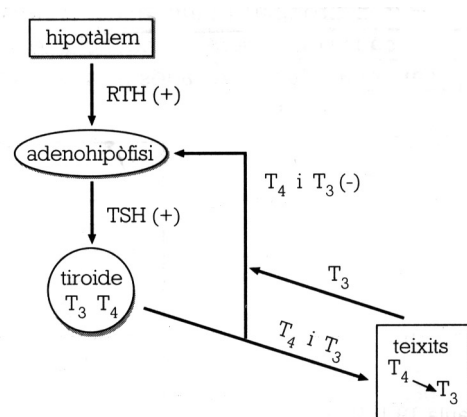


Fig.10. Eix hipotàlem-hipòfiso-tiroïdal.

Els principals efectes de l'hormona tiroïdal en l'expressió gènica es donen a nivell transcripcional, encara que també hi ha exemples de regulació postranscripcional (70) i de control de la síntesi de proteïna, tant a nivell traduccional com postraduccional (71).

Es pot recalcar que l'hipotiroïdisme primari provoca un retard molt important del

creixement i de la maduració òssia. El diagnòstic de les formes congènites se sol fer en edats molt primerenques, però hi ha formes lleus o subclíniques d'inici postnatal, la màxima expressió clínica de les quals és el retard del creixement i de la maduració òssia. García-Villalba *et al* (72), indiquen que la T_3 i el RA indueixen el promotor del gen que codifica per la GH de rata i que el RXR α augmenta dita transactivació produïda per ambdues hormones.

II.c.1. CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (CEBPs)

Les CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBPs) són proteïnes que es poden trobar en la via de senyalització induïda per T_3 o GH (73, 74) i per l'estat androgènic (75).

Les C/EBPs formen part d'una família de factors de transcripció amb homologies estructurals i funcionals. Les semblances entre els membres de la família de C/EBPs suggereixen una història en l'evolució de duplicacions genètiques amb una subseqüent pressió de diversificació. La família de proteïnes resultant varia en l'especificitat de teixit i en la capacitat de transactivació. Actualment, hi ha sis membres de la família que són els següents; α , β , γ , δ , ϵ , ζ , alguns dels quals tenen diferents isoformes.

C/EBP, com altres factors de transcripció, és una proteïna modular que està constituïda per un domini d'activació, una regió bàsica d'unió a DNA i un domini de dimerització ric en leucines, anomenat cremallera de leucines. La dimerització de les C/EBPs és un prerrequisit per la unió al DNA. L'especificitat d'unió a DNA, no obstant, està determinada per la superfície de contacte del DNA, i concretament per tres aa de la regió bàsica que es troben en la interfase proteïna-DNA. El domini responsable de l'activació o repressió

transcripcional està localitzat en el final N-terminal de la proteïna (76).

Els efectes pleiotròpics de les C/EBPs són en part deguts a: l'expressió teixit i estadi específica, el degoteix en la lectura ribosomal, modificacions postraduccionals, i especificitats d'unió a DNA variables. Aquests mecanismes produeixen quantitats variables d'isoformes de C/EBPs, disponibles per dimeritzar i unir-se a diferents llocs en diferents teixits (9).

C/EBP α : Per un mecanisme d'exploració ribosomal es generen dues isoformes de C/EBP α . La proteïna completa té un pes molecular de 42 kDa i està constituïda per 3 dominis de transactivació. Una fracció dels ribosomes ignoren els dos primers codons AUG i inicien la transcripció en el tercer codó AUG, 351 nucleòtids més avall del primer AUG. Aquesta proteïna més curta de 30 kDa conserva els dominis de dimerització i d'unió a DNA però posseeix un potencial de transactivació alterat en comparació amb la isoforma de 42 kDa (76).

C/EBP β : Les diferents isoformes de C/EBP β , com passa per a C/EBP α , són producte del degoteig en l'exploració ribosomal d'un únic mRNA. Les isoformes de 38 kDa, 35 kDa i 32 kDa, també anomenades LAPs (*Liver activating proteins*), conserven el domini d'activació trobat en altres C/EBPs, com també, dos dominis reguladors, RD1 i RD2, que confereixen una unió a DNA inhibidora en un context tipus cel·lular específic. Les proteïnes truncades, anomenades LIPs (*Liver inhibitory proteins*), de 21 kDa, 16 kDa i 14 kDa presenten només els dominis d'unió a DNA i de cremallera de leucines. L'heterodimerització de les LIPs amb les LAPs, disminueix l'activitat transcripcional en quantitats estequiomètriques, suggerint un mecanisme dominant negatiu de la regulació

transcripcional. Per altra banda, modificacions postranscripcionals de C/EBP β per proteïna quinases, en la via de senyalització traduccional de C/EBP β , semblen activar la transcripció (76).

C/EBP γ : El mRNA de C/EBP γ s'expressa de forma ubíquua encara que el nivells més elevats es troben en cèl.lules indiferenciades, progenitores. L'heterodimerització de C/EBP γ amb C/EBP α i C/EBP β atenua la transcripció dels gens diana, suggerint una regulació dominant negativa de la transactivació per C/EBP en cèl.lules indiferenciades, no induïdes (76).

C/EBP δ : C/EBP δ presenta una expressió constitutiva en l'intestí, teixit adipós i pulmó, i nivells alts d'expressió en tots els teixits després de l'estimulació per LPS (*Lipopolysaccharide*). Pot formar heterodímers amb C/EBP α i C/EBP β i té una capacitat de transactivació semblant a la d'aquestes dues proteïnes, però divergeix en el seu domini d'unió a DNA i té una afinitat d'unió a DNA disminuïda (76).

C/EBP ϵ : L'expressió més elevada de C/EBP ϵ es troba en línies cel.lulars semblants a mieloblasts i promielòcits (76).

C/EBP ζ : C/EBP ζ és una proteïna induïda per dany al DNA. C/EBP ζ actua com un inhibidor dominant negatiu de l'activació transcripcional de C/EBPs, degut a que impedeix la unió de l'heterodímer que ell forma amb C/EBP α o C/EBP β a la seqüència de DNA *enhancer* clàssica de C/EBP (76).

II.d. GH i IGF-I

La GH (Hormona de creixement) és una hormona polipeptídica secretada per les cèl·lules somatotropes de la hipòfisi anterior, que actua a través de receptors específics i estimula la producció d'IGF-I pel fetge i altres teixits. Els nivells de transcripció gènica i els nivells sèrics de GH estan controlats per diferents esdeveniments neuronals, metabòlics i hormonals. Entre altres, tant la somatostatina hipotalèmica com l'IGF-I perifèric, inhibeixen la secreció de GH mentre que l'hormona hipotalèmica alliberadora de GH induïx l'expressió gènica i l'alliberament de GH pituitària (Fig.11). La secreció espontània de GH és pulsativa i variable al llarg de les 24 hores. El patró de secreció de GH és dependent del sexe i és a través d'aquest patró diferent, com la GH regula diferencialment l'expressió de determinats citocroms P450 hepàtics en mascles i femelles (77). A més a més, es coneix que STAT5b és el principal mediador dels efectes dels pols de GH plasmàtica en l'expressió gènica hepàtica específica de mascles (78).

L'IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*) és un pèptid bàsic de 70 aminoàcids i PM 7,6 kDa, amb estructura homòloga a la insulina humana. La seva síntesi està regulada principalment per la GH i per l'estat nutricional. Com ja s'ha esmentat, l'IGF-I exerceix al seu torn un retrocontrol negatiu sobre l'alliberament de la GH, estimulant la secreció de somatostatina. L'IGF-I s'uneix amb alta afinitat als receptors d'IGF-I i amb menys afinitat als receptors d'IGF-II/manosa-6-fosfat. El receptor d'IGF-I presenta una gran homologia estructural amb el receptor de la insulina però l'IGF-I té una baixa afinitat per aquest últim, fet que pot explicar per què els efectes semblants als de la insulina produïts per IGF-I, s'obtenen per nivells més elevats que altres efectes del pèptid (79, 80). L'IGF-I circula unit a proteïnes transportadores (IGFBPs), cosa que prolonga la seva vida mitjana i determina uns

nivells plasmàtics establerts sense grans fluctuacions al llarg del dia (81).

Les accions biològiques realitzades per l'IGF-I es poden classificar en dos grups: acció mitogènica o estimuladora del creixement i acció sobre funcions cel·lulars diferenciades. L'IGF-I és produït majoritàriament pel fetge i d'aquí transportat pel flux sanguini fins als llocs on exerceix la seva acció (acció endocrina), però la producció d'IGF-I també té lloc a múltiples teixits, on actua localment (acció paracrina i autocrina).

L'IGF-I, IGFBPs i els receptors de GH i IGF-I estan expressats normalment en el ronyó adult (rata) suggerint la participació de GH i IGF-I en la funció fisiològica de la nefrona. L'expressió d'aquestes proteïnes està altament organitzada i és diferent al llarg dels diferents segments anatòmics i funcionals de la nefrona (82). Per altra banda, l'expressió del sistema GH-IGF-I renal canvia durant el desenvolupament del ronyó, fet que suggereix una funció per aquest sistema durant la nefrogènesi i el desenvolupament renal (82).

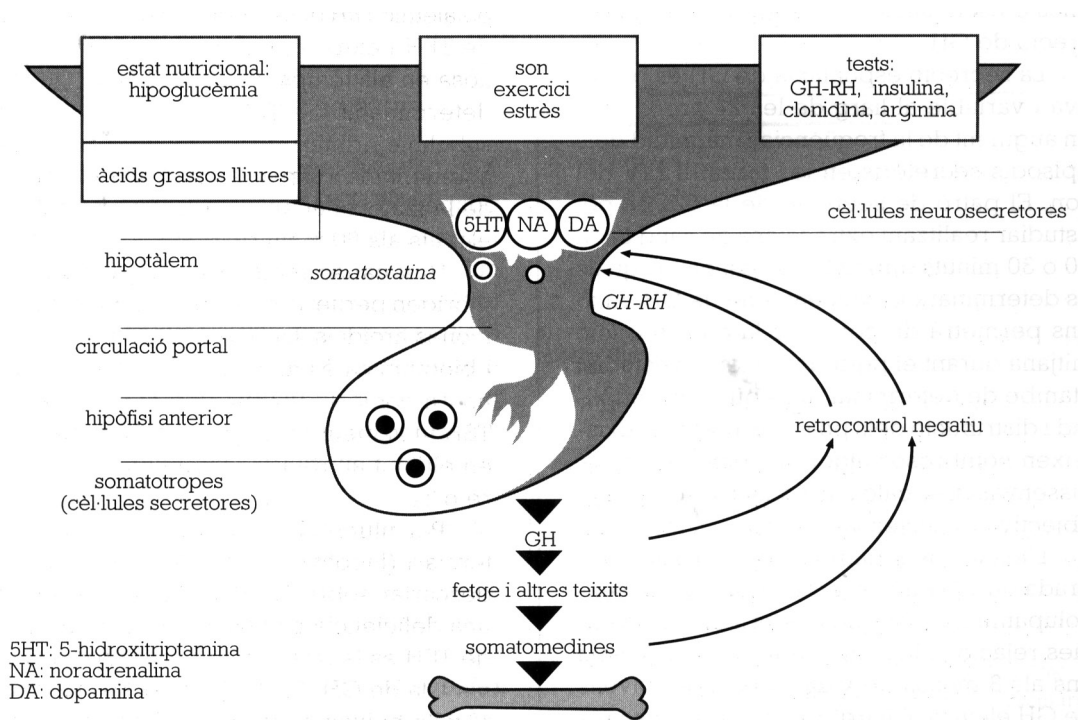


Fig. 11. Regulació de la secreció de GH.

II.d.1. Mecanismes d'acció de GH i d'IGF-I

El receptor d'IGF-I és producte d'un sol gen tant en rosegadors com en humans. La seva estructura està determinada per modificació postraduccional. Un tall postraduccional genera una subunitat α de ~ 140 kDa i una subunitat β de ~ 95 kDa, que estan unides per ponts disulfur. Finalment, l'holoreceptor és tetramèric i està constituït per dos dímers $\alpha\beta$.

La subunitat α del receptor està localitzada en l'espai extracel·lular i és el lloc d'unió del lligand. La subunitat β penetra per la membrana i s'extén fins al compartiment intracel·lular. Aquesta subunitat presenta un domini tirosina quinasa citoplasmàtic, que fosforila residus tirosina en l'altra subunitat del mateix receptor, quan el lligand s'ha unit a la subunitat α . Aquesta reacció d'autofosforilació inicia una sèrie d'activacions quinasa específiques que, com una cascada, activen factors de transcripció nuclears, de manera que transmeten els senyals mitogènics i metabòlics al nucli de la cèl·lula. La via d'activació intracel·lular pot ser transmesa pel receptor d'IGF-I activat a través de la fosforilació d'IRS-1 (*Insuline receptor substrate-1*) i de MAPKs.

Les MAPKs poden ser dividides almenys en tres àmplies famílies segons la similitud en la seqüència, activadors i finalment per l'especificitat de substrat (83) (Fig.12). Les clàssiques proteïnes ERKs (*Extracellular signal-regulated kinases*) van ser identificades en el context de la senyalització produïda per factors de creixement, mentre que les famílies JNK (*Jun NH₂-terminal kinase*) i p38 van ser descrites en la resposta de la cèl·lula a l'estrés i la inflamació. La regla general que descriu que un estímul físic o bioquímic concret (mitogen, estrés osmòtic,...) activa una determinada MAPK ha canviat, ja que cada família de MAPKs està activada d'una manera relativament específica per una sèrie de MKKs, és a dir,

concretament, una MKKK (quinasa de la quinasa de la MAPK) activa a una MKK (quinasa de la MAPK) i aquesta a una MAPK.

Encara que les tres principals famílies de MAPKs estan expressades en el ronyó sencer i són detectables en diferents models de cultiu cel.lular renal, no es té gaire informació sobre els patrons d'expressió específics de tipus cel.lular i els seus activadors i efectors *in vivo* (83).

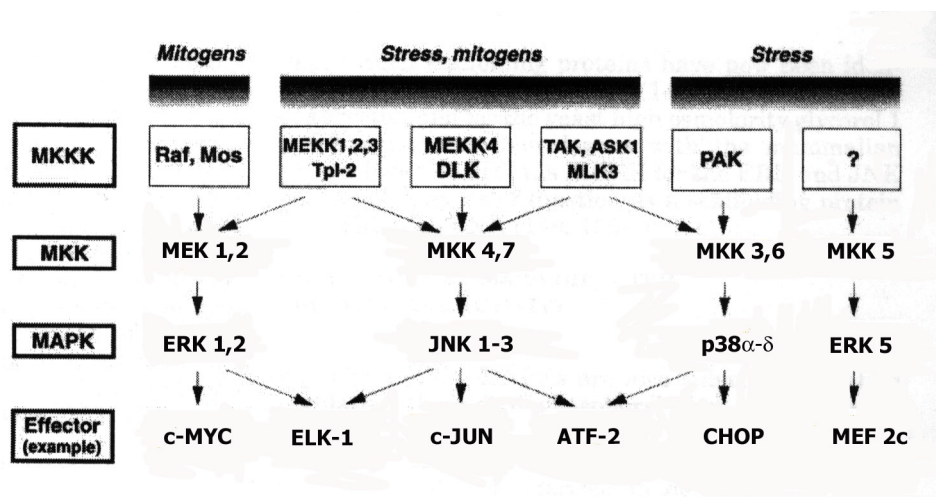


Fig.12. Esquema d'activadors i efectors de les principals famílies de MAPKs (83).