



Vall d'Hebron
Hospital
Centre d'Investigacions en
Bioquímica i Biologia Molecular
CIBBIM



Universitat Autònoma
de Barcelona

Tesi Doctoral

CLONATGE, CARACTERITZACIÓ I REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL
GEN S_A MURÍ. IDENTIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA I IMPLICACIÓ DE LA
MATEIXA EN EL METABOLISME MITOCONDRIAL

Realitzar per

Cristina Aresté i Calero

per tal d'obtar al grau acadèmic de
Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular

Treball realitzat al Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM)
dels Hospitals Vall d'Hebron, sota la direcció de la
Dra. Anna Meseguer i Navarro

Tesi adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, programa de Bioquímica i
Biologia Molecular (opció A, bienni 1998-1999), de la **Universitat Autònoma de Barcelona**.
Tutor Dr. Josep Antoni Biosca.

Cristina Aresté i Calero

Dra. Anna Meseguer i Navarro

Barcelona, Març de 2005

AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria agrair als meus pares el seu recolzament, valentia i esforç perquè jo pogués realitzar els meus estudis universitaris lluny de casa, tot i saben que no seria fàcil. Sense ells mai hagués arribat aquí.

Una menció molt especial per en Josep que sempre ha estat al meu cantó amb una paciència infinita; mai li podré estar prou agraïda pel seu amor i suport en tots aquests anys.

A la meva directora de tesi, l'Anna, per haber-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, pel seu ferm optimisme i per haver-me trasmés l'idolatria pel món de la investigació.

Molt especialment als meus companys, Olga, Joan, Cristina Cebrián, Lluís, Núria, Nour, David, Òscar, Marta Valeri, Jesús i Alba; gràcies per la vostra amistat, sempre disposats a escoltar-me i a ajudar-me incondicionalment. Està sempre present un record molt entranyable de Montse, Cristina Puche, Maya, Anna Menoyo i Toni N, amb els que he compartit molts bons moments.

A tota la resta de companys de la planta 14 i de la "Grisolia", gràcies pel vostre suport i ajut. A tots/es els/les nouvinguts/des, moltíssims ànims.

Agrair al Dr. Francesc Villarroya i a la Dra. Roser Iglesias per les seves valuosíssimes aportacions a aquest treball i, l'ofrena del seu laboratori per ensenyar-me alguns dels secrets del món dels àcids grassos i els PPAR.

A la Carme, la Verònica, la Mireia, l'Anna i la Sònia, encara recordo el primer dia quan ens vam conèixer, que ets de Lleide??, em vau acollir amb els braços oberts creant-se entre totes un lligam indestructible, amigues de plors, riatlles i juergues incansables, gràcies!

Moltes GRÀCIES a tothom!

On s'aperçoit que le travail scientifique ne peut pas être réduit à son résultat final: la fécondité véritable réside dans l'activité par laquelle ce travail s'actualise, dans ses contradictions inhérents, ses impasses méritoires, ses degrés successifs d'élaboration.

Le vagabond ensorcelé
Nicolas Leskov

INDEX

Llistat d'abreviatures	7
RESUM	11
INTRODUCCIÓ	15
1. El ronyó	15
1.1 Estructura renal	15
1.1.1 La nefrona	15
• El corpuscle renal	16
• El túbul proximal	16
• La nansa de Henle	17
• Els túbuls distals i col·lectors	18
• L'aparell juxtaglomerular	18
1.2 Trets funcionals	18
2. Mecanismes d'acció de les hormones esteroïdals	20
2.1 Caràcters generals	20
2.2 Les hormones esteroïdals com a reguladores de l'expressió gènica	20
2.3 Els andrògens	22
2.3.1 Resum general	22
2.3.2 Biosíntesi	22
2.3.3 Transport i metabolisme dels andrògens	23
2.3.4 Accions biològiques dels andrògens	24
2.3.5 El ronyó com a model per l'estudi de l'acció androgènica	25
• Gens regulats per andrògens a ronyó	26
3. La superfamília dels receptors nuclears	27
3.1 Característiques estructurals	27
3.2 Factors que influencien en l'activitat dels receptors nuclears	28
3.3 Interacció receptor-DNA	30
3.4 El receptor d'andrògens	31
3.4.1 Estructura del receptor d'andrògens	31
3.4.2 Localització i distribució del AR	32
3.4.3 Unió del receptor d'andrògens al DNA, especificitat d'acció	32
3.4.4 Coreguladors del AR	34
• Coactivadors del AR	34
• Corepressors del AR	35
3.4.5 Regulació de l'expressió del receptor d'andrògens	35
3.5 Els receptors nuclears PPAR	36
3.5.1 Estructura dels PPAR	36
3.5.2 Mode d'acció dels PPARs i unió a DNA	37

3.5.3 Lligants dels PPAR	40
3.5.4 Expressió tissular dels PPARs	42
3.5.5 PPAR γ	43
3.5.6 PPAR α	45
3.5.7 PPAR β/δ	48
4. La Mitocòndria	48
4.1 Introducció	48
4.2 Estructura de les mitocòndries	49
4.3 Transport de les proteïnes dins la mitocòndria	50
<i>El sistema TOM en mamífers</i>	51
<i>El sistema TIM en mamífers</i>	52
4.3.1 Processament, plegament de les proteïnes importades a la mitocòndria	53
4.3.2 Regulació de l'import i la comunicació nucli-mitocòndria	54
4.4 Metabolisme mitocondrial	54
4.4.1 Oxidació dels àcids grassos	55
• Activació dels àcids grassos	55
• Acil-CoA sintetases per àcids grassos de cadena mitja (<i>Medium-chain acyl-CoA synthetase</i>)	56
• Entrada dels àcids grassos a la mitocòndria	57
• Via de la β -oxidació	58
• El cicle de l'àcid cítric	59
5. El gen S _A	60
5.1 Introducció	60
5.2 El gen S _A murí	62
• La proteïna S _A murina	64
OBJECTIUS	69
MATERIALS	73
1. Animals i teixits	73
1.1 Ratolins (<i>Mus musculus</i>)	73
1.2 Procediment quirúrgic	73
1.2.1 Castració	73
1.3 Tractaments	73
1.3.1 Tractament amb andrògens i amb estrògens	73
1.3.2 Tractament amb els agonistes del PPAR	73
1.3.3 Extracció dels teixits	74
2. Línies cel·lulars	74
2.1 Cèl·lules	74
• PKSV-PCT, PKSV-PR	74
• MDCK	75

• CV-1	75
• HEK293	75
• HEPG2	75
2.2 Medis de cultius	75
• Medi HEPG2	75
• Medi PKSV-PCT3/ PKSV-PR10	76
• Medi MDCK, CV-1 i HEK293	76
3. Soques bacterianes	77
3.1 JM109	77
3.2 Epicurian Coli®XL1-Blue competent cells	77
3.3 XL1-Blue MRA (P2)	77
3.4 DH5- α	77
3.5 TOP10	77
4. Vectors	77
5. Reactius químics	79
6. Oligonucleòtids	79
7. Instrumentació i aparells	81
MÈTODES	87
1. Purificació d'àcids nucleics	87
1.1 Extracció de RNA total	87
• Extracció de RNA total amb el kit RNeasy de QIAGEN	88
1.2 Purificació de DNA plasmídic	88
1.2.1 Mini-preparació de DNA plasmídic (miniprep)	88
1.2.2 Maxi-preparació de DNA plasmídic (maxiprep)	88
1.3 Purificació del DNA del bacteriòfag λ	88
1.3.1 Mini-preparació de DNA del bacteriòfag λ (lambda-miniprep)	88
1.3.2 Maxi-preparació de DNA del bacteriòfag λ (lambda-maxiprep)	88
1.4 Extacció de DNA genòmic	89
1.5 Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa	90
1.6 Purificació dels productes de PCR o RT-PCR	91
2. Anàlisi d'àcids nucleics	91
2.1 Marcatge radioactiu de sondes de DNA	91
2.1.1 Marcatge d'oligonucleòtids en 5'	91
2.1.2 Marcatge de sondes per <i>Random priming</i>	92
2.2 Anàlisi de DNA	92
2.2.1 Southern-blot	92
2.2.2 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	94
2.2.3 Seqüenciació automàtica de DNA	94

• Seqüenciació de DNA plasmídic i/o productes de PCR	95
• Seqüenciació de DNA de fag	95
2.3 Anàlisi de RNA	95
2.3.1 Northern-blot	95
2.3.2 RT-PCR	96
2.3.3 Amplificació ràpida de l'extrem 5' del cDNA (5'-RACE)	97
2.3.4 Primer extension	98
3. Cribatge d'una llibreria genòmica de ratolí	100
4. DNA recombinant	103
4.1 Clonatge i subclonatge de DNA	103
4.1.1 Clonatge estàndard de DNA	103
• Digestió de DNA	103
• Defosforilació del vector	103
• Lligació entre vector i l'insert	104
4.1.2 Clonatge de productes de PCR	104
4.2 Transformació de Bacteris competents	105
4.2.1 Preparació de bacteris competents per electroporar	105
4.2.2 Electroporació	105
4.2.3 Transformació per xoc tèrmic	106
4.3 Mutagènesi	106
5. <i>Radiation hybrid panel</i> (mapatge d'híbrids per radiació)	107
6. Cultius cel·lulars i transfeccions	107
6.1 Cultius cel·lulars	107
6.1.1 Tripsinització	108
6.1.2 Recompte de cèl·lules	108
6.1.3 Conservació de cèl·lules	108
6.1.4 Descongelació de cèl·lules	109
6.2 Deplecció del sèrum fetal d'esteroids	109
6.3 Transfecció transitòria	109
6.4 Construcció de plasmidis reportadors recombinants	110
6.4.1 Transfecció transitòria de construccions reportadores	111
6.5 Assaig dels gens reportadors	112
6.5.1 Assaig d'activitat luciferasa	112
6.5.2 Assaig d'activitat SEAP	112
7. Assaig de retard en gel o EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	113
7.1 Extracció nuclear a partir de ronyons i fetges de ratolí	113
7.2 Tècnica d'EMSA	114

8. Anàlisi i expressió de proteïnes	115
8.1 Obtenció d'anticossos policlonals anti-S _A	115
8.2 Extracció de proteïna	116
8.3 SDS-PAGE d'una dimensió i Western-blot	117
8.4 Producció de la proteïna de fusió S _A -FLAG	118
8.5 Immunoprecipitació de proteïnes de fusió amb FLAG i western-blot amb anticossos monoclonals anti-FLAG	118
8.5.1 Immunoprecipitació	118
8.5.2 Western-blot amb l'anticòs anti-FLAG	119
8.6 Immunocitoquímica amb l'anticòs anti-FLAG	120
8.7 Co-localització mitocondrial	121
8.8 Marcatge metabòlic	121
8.9 Traducció in vitro de cDNAs mitjançant lisats de reticulòcit	122
8.10 Assaig de l'activitat enzimàtica, mesura de CO ₂	122
8.11 Extracció de triglicèrids	123
Annex composició solucions i medis de cultius bacterians	124
RESULTATS	127
1. Regulació androgènica del gen S _A a ronyó de varies soques de ratolí	127
2. Efecte dels estrògens en l'expressió del gen S _A murí en ronyó i fetge	127
• Expressió del mRNA del gen S _A en ratolins femella ovariectomitzades	129
3. Expressió del gen S _A en diferents teixits de ratolí	129
4. Clonatge i caracterització del gen S _A murí	131
• Mapatge cromosòmic del gen S _A de ratolí mitjançant <i>Radiation Hybrid Mapping</i>	133
5. Identificació de diferents inicis de transcripció del gen S _A	134
• Primer extension	134
• 5'-RACE	135
• RT-PCRs	136
6. Identificació i anàlisi del promotor del gen S _A	139
6.1 Activitat transcripcional del promotor	141
6.1.1 Anàlisi dels diferents fragments del promotor del gen S _A	141
6.1.2 Anàlisi de la resposta del promotor del gen S _A de ratolí al receptor d'andrògens murí (mAR)	143
• Anàlisi de la resposta del fragment de promotor, -496Luc, al receptor d'andrògens (mAR), en diferents línies cel·lulars	144
6.1.3 Anàlisi d'una caixa E-box en el promotor del gen S _A	146
7. Estudi comparatiu de la proteïna S _A	151

• Possible existència de la proteïna SA en altres espècies de mamífers	152
<i>La proteïna SA en l'Orangutà (Pongo pymaeus)</i>	153
<i>El gen SA en gos (Canis familiaris)</i>	153
<i>El gen SA en la vedella (Bos taurus)</i>	154
<i>Possible gen SA en el porc (Sus scrofa)</i>	154
<i>Possible presència del SA en una espècie no mamífera com la gallina (Gallus gallus)</i>	155
8. Producció d'anticossos policlonals contra la proteïna S _A i identificació de la mateixa per Western-blot	155
9. Localització cel·lular de la proteïna S _A	156
• Bloqueig del transport de la proteïna S _A a mitocòndria	158
10. Altres trets característics de la proteïna S _A murina	159
• Aproximació de la vida mitja de la proteïna S _A	159
11. Anàlisi de l'activitat <i>medium-chain acyl-CoA synthetase</i> de la proteïna S _A en les cèl·lules PCT3 i PR10	160
12. Identificació d'un possible domini d'unió als àcids grassos en la proteïna S _A murina	161
13. Acció dels factors de transcripció PPAR sobre l'expressió del gen S _A	163
13.1 Activitat transcripcional del promotor del gen S _A en presència dels receptors PPAR i RXR	164
13.2 Efecte dels receptors PPAR i agonistes en diferents línies cel·lulars	165
13.3 Expressió del mRNA del gen S _A en presència d'agonistes dels PPAR en rato- lins mascle	166
DISCUSSIÓ	171
CONCLUSIONS	191
BIBLIOGRAFIA	195
ANNEX	217

ABREVIATURES

aa	aminoàcid
b, kb	base, kilobase
cDNA	DNA complementari
Ci	Curie
cfu	unitats formadores de colònia
cpm	contes per minut
Da, kDa	Dalton, kilodalton
DEPC	dietilpirocarbonat
DNA	àcid desoxiribonucleic
F	Faradai
g	gram
h	hora
m	metre
M	molar
min	minut
mRNA	RNA missatger
N	normal
o/n	<i>overnight</i>
pb	parell de bases
pfu	unitats formadores de calba de lisi
RNA	àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
RT	temperatura ambient
s	segon
UV	ultra violat
Vf	volum final
Ω	ohm

Als meus pares i al meu germà

Al Josep

RESUM

Aquest treball està centrat en l'estudi i caracterització del gen S_A de ratolí. Inicialment, en el nostre laboratori, es va identificar com un gen regulat per andrògens d'expressió exclusivament renal. Analitzant la distribució tissular del gen S_A s'ha observat que s'expressa en altres teixits com el fetge, l'estómac o el testicle. S'ha aprofundit en l'estudi de la regulació del gen S_A per part de les hormones sexuals, andrògens i estrògens, en el ronyó i el fetge de ratolí, òrgans a on s'expressa de forma abundant, especialment al ronyó.

S'ha clonat el gen S_A de ratolí complet, determinant l'organització genòmica i els límits exò/intrò; s'han obtingut diferents transcrits resultat de la transcripció del gen, la diferència entre ells es troba en la regió 5' gràcies a les diverses combinacions que es donen entre els tres primers exons no codificants del gen. S'han clonat 2 Kb del promotor pròxim del gen S_A . Diferents fragments d'aquesta regió s'han fusionat al gen reportador luciferasa i les construccions obtingudes s'han utilitzat per determinar l'activitat promotora, en assajos de transfecció transitòria. Aquests assajos han permès definir i posteriorment analitzar possibles elements reguladors presents en el promotor S_A , implicats tant en l'expressió basal com en la resposta andrògena del gen, en vaires línies cel·lulars renals i una línia cel·lular hepàtica.

S'han produït anticossos policlonals contra pèptids sintètics específics de la proteïna S_A que han permès identificar-la en extractes proteics de ronyó de ratolí. S'ha comprovat que la seva regulació androgènica és paral·lela a la del corresponent mRNA. La S_A s'ha identificat com una *medium-chain acyl-CoA synthetase* mitocondrial, en aquest treball hem demostrat la seva localització mitocondrial en una línia cel·lular renal, així com, la seva activitat enzimàtica en front a un substracte hidrocarbonat com l'àcid octanoic. L'elevada homologia a nivell de seqüència aminoacídica que presenta la S_A amb altres enzims acil-CoA sintetasa ens ha permès identificar un domini d'unió a l'àcid gras en la proteïna molt conservat en tots aquests enzims. Mitjançant tècniques de mutagènesi hem observat que algun dels aminoàcids que formen aquest domini podrien ésser essencials en l'activitat enzimàtica de la S_A .

Donat que la proteïna S_A participa en el metabolisme dels àcids grassos, en aquest treball hem estudiat la possible implicació dels receptor nuclears PPAR sobre l'expressió del gen S_A , realitzant estudis *in vitro* a nivell d'activitat promotora en assajos de transfecció transitòria i, realitzant estudis *in vivo* amb ratolins mascle que s'han sotmés al tractament farmacològic d'agonistes específics per aquests receptors.

INTRODUCCIÓ

1. EL RONYÓ

Constitueix l'òrgan fonamental de l'aparell urinari propi dels vertebrats. Importa i exporta grans volums d'aigua i soluts en resposta a diferents situacions fisiològiques.

El ronyó està implicat en mecanismes homeostàtics i ho duu a terme a través d'una filtració selectiva glomerular, mitjançada per l'elevada pressió sanguínea en el glòmerul, la secreció tubular i, la reabsorció; tots aquests són els processos que regulen conjuntament la concentració dels productes finals del metabolisme, la pressió osmòtica, la composició iònica, i el volum del mitjà intern.

El ronyó també intervé en dos mecanismes homeostàtics molt importants mitjançats per hormones:

- La síntesi d'eritropoietina, implicada en la producció d'eritròcits per part de la medul·la òssia.
- El manteniment i regulació de la pressió sanguínea, pel sistema renina-angiotensina. El ronyó secreta renina, enzim que catalitza el pas d'angiotensinogen a angiotensina II, un dels principals vasoconstrictors arterials i un important estímul per la secreció d'aldosterona per la glàndula suprarenal, que regula la quantitat de Na^+ reabsorbit en el ronyó.

1.1 Estructura Renal

Els ronyons són dos òrgans parells situats a la part posterior de l'abdomen sota el peritoneu, un a cada banda de la columna vertebral. Cada un d'ells està envoltat per un embolcall fibrós, que forma una ferma làmina que cobreix tot l'òrgan. En humans i en la majoria de mamífers, cada ronyó s'alimenta d'una sola artèria renal, que emana directament de l'aorta abdominal de manera que rep la sang arterial a la màxima pressió disponible.



Fig 1. Secció vertical del ronyó.
Obtingut de la pàgina web http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/1101.htm

En un tall longitudinal del ronyó, es poden identificar dos zones: l'escorça o còrtex, situada en la part externa i la medul·la situada en la part interna. La medul·la està composta per diverses estructures en forma piramidal, anomenades piràmides renals. Cada piràmide, es divideix en una zona externa, pròxima al còrtex i una zona interna convergent cap al sinus renal. En la majoria dels mamífers petits, com rates, ratolins i conills, el ronyó conté una sola piràmide anomenant-se, unipapil·lar;

en canvi les espècies de major tamany, com el gos o l'home, tenen ronyons multipapil·lars, o sigui, el ronyó conté més d'una piràmide renal.

1.1.1 La Nefrona

La unitat funcional del ronyó és la nefrona, el ronyó de mamífer està constituït a partir d'un gran nombre de nefrones, per exemple, un ronyó humà conté ~1milió de nefrones i una rata adulta al voltant de 30.000 nefrones.

La nefrona està composta per una porció glomerular denominada càpsula de Bowman

i un túbul que penetra cap a la medul·la i que es divideix en tres regions principals: el túbul proximal, la nansa de Henle i el túbul distal. Una porció del túbul distal, contacta amb el glomèrul del qual es va originar, donant lloc a una estructura anomenada aparell yuxtaglomerular.

Es pot dividir la nefrona funcionalment en segments; on cada un d'ells desenvolupa diferents funcions específiques donades en darrer terme pels gens expressats en cada un dels segments.

Es diferencien dos tipus bàsics de nefrones, unes en les que els glòmeruls es troben en la part externa del còrtex i tenen nanses de Henle curtes que es mantenen en l'escorça o penetren solament en la zona externa de la medul·la anomenades nefrones corticals i unes altres que posseeixen el glomèrul en el còrtex intern i tenen nanses de Henle llargues que penetren profundament en la zona interna de la medul·la anomenades nefrones yuxtamedul·lars.

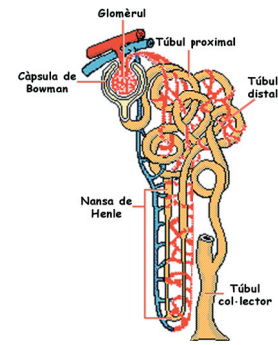


Fig 2. Esquema de la nefrona. Versió adaptada de l'obtinguda en la mateixa pàgina web que la figura 1.

El Corpuscle Renal

Els túbuls renals s'inicien en els corpuscles renals, que es componen de dues parts: el glomèrul i una coberta membranosa -la càpsula de Bowman- que constitueix el començament del túbul proximal.

El glomèrul és un conjunt de capil·lars sanguinis entortolligats units per teixit connectiu. Aquest capdell deriva d'un petit brot arterial -el *vas aferent*- que penetra dins de la càpsula emergint pel mateix punt en forma de vena resultant, el *vas eferent*. La càpsula de Bowman, consisteix en una membrana basal de cèl·lules epitelials que embolcalla al glomèrul.

El Túbul Proximal

Topològicament es distingeixen dos components del túbul proximal; la *pars convoluta*, de forma entortolligada i que és la continuació de l'epiteli parietal de la càpsula de Bowman, i la *pars recta* més o menys rectilínia endinsant-se en zones més internes en les projeccions medul·lars.

En rata, ratolí, conill i alguns simis -però no en humans- es poden distingir en el túbul proximal tres segments morfològicament diferents: el S₁, el S₂ i el S₃.

El segment S₁ forma part inicial del túbul proximal; comença en el glòmerul i transcorre en la pars convoluta aproximadament unes 2/3 parts de la mateixa. El segment S₂ cobreix l'últim terç de la pars convoluta i la part inicial de la pars recta.

El segment S₃ constitueix el túbul recte proximal, localitzat en el còrtex intern profund i la part externa de la medul·la externa.

Les característiques estructurals i funcionals de les cèl·lules epitelials de cada un dels segments van variant al llarg del túbul i, es coneixen com a cèl·lules S₁, S₂ i S₃. En el ronyó humà però, només es distingeixen positivament les parts contorta i recta. La cèl·lula tubular epitelial prototip té forma columnar amb una membrana apical amb vora en respall o *brush border* molt desenvolupat; una membrana basal que li serveix d'adhesiu i suport i, un citoesquelet organitzat i molt especialitzat per interaccions amb la membrana plasmàtica i amb proteïnes d'adhesió. La cèl·lula és polaritzada amb compartimentalització apical-basolateral

essencial per la funció del túbul.

Les cèl·lules S₁ contenen una àmplia membrana apical tipus *brush-border*, que incrementa la superfície de contacte amb la llum del túbul, augmentant la seva capacitat per reabsorvir petits compostos orgànics presents en el filtrat glomerular. Els microvilli que conformen l'anomenat *brush border* estan coberts per un glicocàlix i conté gran varietat d'enzims -fosfatasa alcalina, peptidasa, etc.- involucrats en la degradació de pèptids i altres substàncies en productes que poden ser transportats a l'interior de la cèl·lula. També posseeixen un aparell vacuolar i lisosomal molt desenvolupat, la funció del qual és l'endocitosi i degradació de macromolècules de l'ultrafiltrat, com l'albumina o proteïnes plasmàtiques de baix pes molecular. El nucli és gran i es troba en el centre de la cèl·lula. La superfície basolateral d'aquestes cèl·lules també està amplificada gràcies a la formació de prolongacions que s'interdigiten amb les prolongacions de les cèl·lules adjacents deixant un espai intercel·lular. Les cèl·lules S₁ contenen un alt nombre de mitocondries i apareixen en el microscopi electrònic llargues i tortuoses localitzant-se en els processos cel·lulars laterals pròxims a la membrana plasmàtica.

Les cèl·lules S₂ tenen microvellositats més curtes i menys denses que les cèl·lules S₁, així com menor complexitat en les prolongacions laterals, tenen mitocondries més menudes i en menor nombre. En les cèl·lules S₃ els processos laterals són virtualment absents amb menor nombre de mitocondries i repartides de manera aleatòria per la cèl·lula. L'únic orgànel molt abundant en les cèl·lules S₃ són els peroxisomes, importants en el metabolisme lipídic i la β -oxidació d'àcids grassos.

El pas de S₁ a S₂ és progressiu, mentre que el de S₂ a S₃ és abrupte en diverses espècies, entre elles rata i ratolí. També es produeix una disminució progressiva de la maquinària de transport i de l'aparell endocític i lisosomal, que correspon amb els canvis que pateix el líquid al llarg del túbul.

La pars convoluta del túbul proximal juga un paper important en la reabsorció de Na⁺, HCO₃⁻, Cl⁻, K⁺, Ca²⁺, PO₄³⁻, aigua i soluts orgànics com la glucosa i els aminoàcids. És aquí on es reabsorbeix aproximadament la meitat de l'ultrafiltrat. La pars recta, està implicada en la secreció d'àcids i bases orgàniques i amb freqüència es veu afectada per acumulació de compostos nefrotòxics, com drogues i metalls pesats.

La Nansa de Henle

Es tracta d'un segment del túbul renal en forma de nansa, situat entre el túbul proximal i túbul distal, que penetra en la medul·la renal. Està constituïda per una primera branca descendent, una branca prima ascendent i una branca gruixuda ascendent. Reabsorbeix

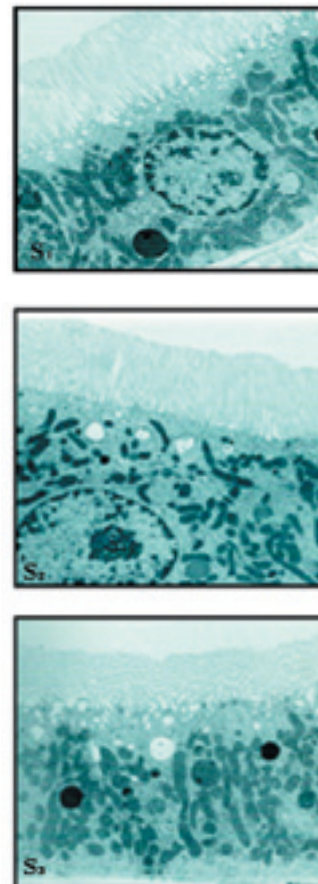


Fig 3. Segments del túbul proximal renal. Micrografies electròniques dels segments S₁, S₂ i S₃ del túbul proximal renal de rata (x10.600). Adaptat i modificat de: Brenner, B.M. "The Kidney".

tinina, etc.)

3) Reduir al màxim les quantitats d'aigua i sals (Na^+ , Cl^-) excretades, normalment fins a menys d'un 1% del filtrat.

En una descripció aproximada de la nefrona es podria dir que les cèl·lules tubulars de la porció proximal processen i reabsorbeixen més del 80% del filtrat glomerular i que les parts subsegüents de la nefrona estan encarregats del “control fi” de l'excreció d'electròlits, anions i cations orgànics, aigua i ions d'hidrogen per mantenir l'homeòstasi. El bicarbonat (HCO_3^-) filtrat, en contrast, es reabsorbeix extensivament a tot el seu llarg. El fluid que abandona el túbul proximal és una solució de clorur de sodi que conté petites quantitats de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , urea, HCO_3^- i substàncies orgàniques secretades, havent-se reduït aproximadament a la meitat del volum filtrat inicialment i mantenint-se la mateixa osmolaritat.

En les parts més distals de la nefrona es dona predominantment, la reabsorció de clorur de sodi, l'excreció de l'excés d'aigua o la seva conservació, la reabsorció de calci i magnesi i, la secreció de potassi.

En general, la presència o activitat del transport d'un metabòlit determinat reflecteix les necessitats metabòliques d'un teixit en particular. Per exemple, en el túbul proximal la glutamina és un precursor important per l'amoniagènesi; els enzims necessaris per aquesta via estan localitzats en la mitocondria essent el transport de la glutamina a la mitocondria molt alt en les cèl·lules del túbul proximal.

Una altra via per identificar substractes preferents pel ronyó és determinar quins d'aquests substractes exògens són oxidats. Estudis *in vivo* en la producció de CO_2 a partir de substractes marcats amb ^{14}C han demostrat que hi ha una gran varietat de substractes metabòlics que poden ser oxidats en el ronyó. Els combustibles metabòlics més importants són el lactat, la glutamina, la glucosa, els àcids grassos lliures, el citrat i els cossos cetònics; veure taula 1.

Existeix una marcada diferència en el metabolisme cel·lular segons les diferents regions del ronyó. El còrtex presenta preferentment metabolisme aeròbic en canvi en la medul·la es dona la glicòlisi anaeròbica o aeròbica. El coeficient respiratori (CO_2 generat per O_2 consumit) és relativament baix en el còrtex suggerint que predomina l'oxidació dels àcids grassos, en canvi en la medul·la es dona un coeficient respiratori propi de l'oxidació dels carbohidrats.

Degut a aquesta activitat metabòlica diferencial al llarg de la nefrona, els enzims implicats en cada una de les rutes metabòliques també es distribueixen de manera heterogènia en la nefrona. Per exemple, els enzims implicats en el metabolisme de la glucosa, l'hexoquinasa o la fosfofructoquinasa es troben al llarg de tots els segments de la nefrona, amb activitats

Taula 1. Substractes preferents al llarg de la nefrona.

Segment de la nefrona	Substracte preferent
Túbul Proximal	Àcids grassos, cossos cetònics, lactat, glutamina, glutamat, piruvat, citrat, acetat
Nansa de Henle	Lactat, glucose, cossos cetònics, àcids grassos, acetat
Túbul contortat distal	Glucosa, lactat, β -hidroxibutirat
Conducte col·lector cortical	Glucosa, lactat, β -hidroxibutirat, àcids grassos
Conducte col·lector de la medul·la externa	Glucosa, lactat, β -hidroxibutirat, glutamina
Conducte col·lector de la medul·la interna	Glucosa, lactat

Adaptat i modificat de: Brenner, B.M. “The Kidney”

relativament baixes en el túbul proximal. En canvi, els enzims fosfoenolpiruvat carboxiquinasa o la fructosa-1,6-bifosfat implicats en la gluconeogènesi es troben localitzats exclusivament en el túbul proximal, particularment en el segment S₁. L'oxidació dels àcids grassos a acetil-CoA es dona en la β -oxidació, en el ronyó es dona tant en la mitocòndria com en el peroxisoma; l'activitat de la 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa mitocondrial és alta en el túbul distal contornejat i en el túbul proximal, l'activitat dels enzims mitocondrials està normalment relacionada amb l'heterogènia distribució de les mitocòndries al llarg de la nefrona.

2. MECANISMES D'ACCIÓ DE LES HORMONES ESTEROÏDALS

2.1 Caràcters Generals

En un organisme pluricel·lular és necessària la coordinació funcional entre totes les cèl·lules que el componen, essent veritablement complexa en un organisme superior; és imprescindible doncs, una complicada, coordinada i ordenada xarxa de comunicacions formant un acord jeràrquic. La xarxa endocrina, constituïda per les hormones, representa un dels sistemes principals de comunicació entre cèl·lules; destaquem les hormones esteroïdals implicades en processos de desenvolupament i control d'altres activitats fisiològiques.

Es poden identificar principalment, tres tipus principals d'esteroides, segons la seva funció biològica:

1) Els esteroides adrenals:

-Els glucocorticoides -com el cortisol- promou la gluconeogènesi i la formació de glucogen, i també augmenta la degradació de greixos i proteïnes; a més permeten que els animals responguin a l'estrés, de fet l'absència de glucocorticoides pot ser letal.

-Els mineralcorticoides -com l'aldosterona- actuen sobre el túbul distal renal i origina un increment de la reabsorció de sodi i l'excreció de potasi i protons, provocant un increment del volum i de la pressió sanguínia.

2) Els esteroides sexuals:

-Els andrògens -com la testosterona- responsables del desenvolupament dels caràcters sexuals masculins.

-Els estrògens -com l'estrone- necessaris pel desenvolupament dels caràcters sexuals femenins.

-Els progestàgens -un gestagen- prepara els revestiments de l'úter per la implantació de l'òvul, és essencial pel manteniment de l'embarç

3) La vitamina D i els seus derivats metabòlics, juguen un paper essencial en el control del metabolisme del calci i del fòsfor.

2.2 Les Hormones Esteroïdals com a Reguladores de l'Expressió Gènica

Les hormones esteroïdals clàssiques esmentades en l'apartat anterior, són sintetitzades i secretades per les glàndules endocrines, viatgen a través del corrent sanguini fins a les seves cèl·lules diana, penetrant-hi per difusió simple o facilitada; a l'interior de la cèl·lula s'uneixen als seus receptors específics donant lloc a una resposta específica a nivell de la transcripció

gènica (Tsai *et al*, 1994).

Degut a la natura lipofílica de les hormones esteroïdals, circulen unides a proteïnes transportadores. Normalment l'hormona travessa la membrana plasmàtica per difusió simple encara que existeixen fenòmens de transport actiu de l'hormona cap el citoplasma (Willnow *et al*, 2002). Un cop dins la cèl·lula l'hormona pot interaccionar amb el seu receptor mediador de l'acció hormonal.

La localització dels receptors abans d'unir-se a l'hormona, és variable. Els receptors GR, ER o AR, per exemple, es troben en equilibri dinàmic entre el nucli i el citoplasma en canvi els receptors RXR, TR o RAR, per exemple, es troben permanentment en el nucli (Tsai *et al*, 1994). En absència de lligant, els receptors més grans -AR, ER, etc.- es troben en forma de monòmers, associats amb proteïnes chaperones -hsp90, hsp70- i amb les immunoflines hsp56, p59. L'associació amb aquestes proteïnes manté al receptor en una forma inactiva, quan l'hormona se li uneix, es produeix una dissociació dels hsp i un canvi conformacional que permet la translocació al nucli.

Els receptors d'aquest grup sempre dimeritzen com a homodímers i, s'uneixen amb elevada afinitat a una seqüència específica, anomenada element de resposta hormonal (HRE), en el promotor dels gens als que regulen.

Altres receptors de menor tamany com RXR, TR, etc. i la majoria dels receptor orfes, no estan associats a les hsp en absència de lligant i poden trobar-se en forma de monòmer o dímer no associat al DNA, o bé com a dímers units al seu HRE. L'hormona pot unir-se en qualsevol d'aquests estats, provocant un canvi conformacional, necessari per tal que es dugui a terme l'activació de la transcripció. Aquests receptors poden dimeritzar en forma de homodímers o heterodímers (Tsai *et al*, 1994).

La regulació de l'expressió gènica mediada per les hormones esteroïdals ha esdevingut un camp tradicional de l'endocrinologia molecular (Beato, 1989; Cato *et al*, 1992; Tsai *et al*, 1994; Mangelsdorf *et al*, 1995); en la figura 5 es resumeix esquemàticament el mecanisme clàssic d'acció de les hormones esteroïdals.

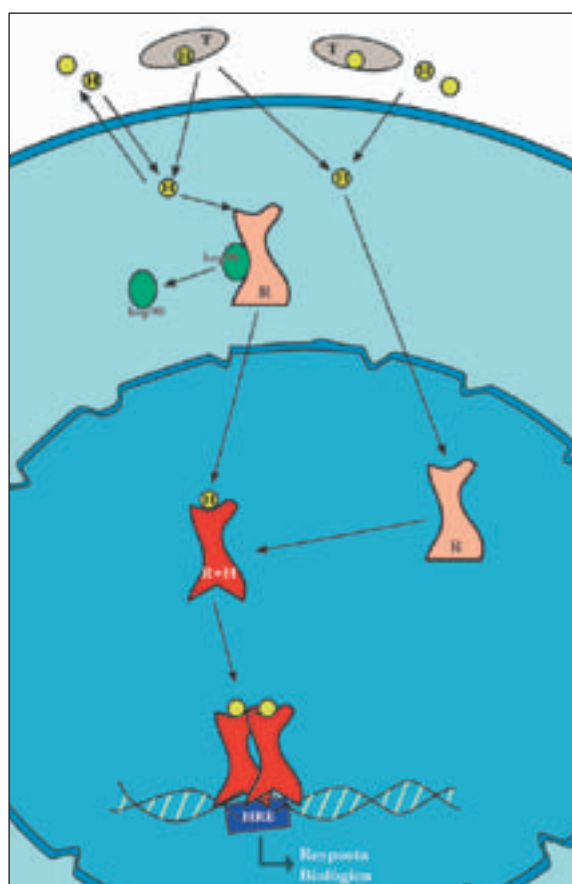


Fig 5. Model esquemàtic i general dels mecanismes d'acció de les hormones esteroïdals.

Les hormones (H) circulen majoritàriament unides a proteïnes transportadores (T), penetren dins la cèl·lula per difusió i s'uneixen als seus receptors específics (R) que poden estar localitzats en el nucli o en el citoplasma. El complex receptor-hormona (R+H) es transloca a dins del nucli i dimeritza, unint-se als elements de resposta específics en el DNA (HRE), provocant la transactivació del gen.

2.3 Els Andrògens

2.3.1 Resum General

Els andrògens són les hormones encarregades d'induir la diferenciació, desenvolupament i manteniment dels òrgans reproductius masculins, així com el desenvolupament dels caràcters sexuals secundaris masculins. També actuen sobre el sistema nerviós central i el cervell determinant la diferenciació de certes regions cerebrals i el desenvolupament del comportament reproductor. Existeix una hipertròfia -augment del tamany cel·lular- o hiperplàsia -augment del nombre de cèl·lules- o ambdues coses, provocada pels andrògens de manera teixit específica.

Els andrògens són esteroides de 19 carbonis amb un nucli de ciclopentaperhidrofenantré que conté un grup funcional oxigenat en el carboni-3 i en el carboni-17. Les dues hormones esteroidals més importants en el mascle adult són, la testosterona (T) i el seu derivat la 5- α -dihidrotestosterona (DHT). La testosterona és el principal androgen produït pels testicles, a part d'altres intermediaris androgènics alliberats en petites quantitats, com l'androstenediona i l'androstenediol.

En la femella, els ovaris i la placenta sintetitzen traces de testosterona i, en ambdós sexes l'escorça adrenal, pot produir en determinades circumstàncies esteroides -com a principals l'androsterona, l'androstenediona, la dihidroepiandrosterona i la dihidroxiandrostendiona- amb significància funcional.

2.3.2 Biosíntesi

La molècula precursora de les hormones esteroidals és el colesterol, que prové de la dieta o bé de la síntesi endògena, on vint-i-set dels seus àtoms de carboni provenen de l'acetil-CoA.

Les lipoproteïnes circulants LDL són els principals transportadors de colesterol en sang, incorporant-se als teixits per endocitosi via receptor. En les cèl·lules de Leydig de rata, la via externa és la font principal de colesterol per la síntesi de testosterona. En canvi en humans, els dos processos d'obtenció de colesterol -tan per síntesi, com per via externa- són igualment importants (Griffin *et al*, 1998).

En la figura 6 es representa de manera esquemàtica la via biosintètica de la testosterona i els seus metabòlits actius.

Les hormones esteroidals contenen un màxim de 21 àtoms de carboni, mentres que el colesterol en té 27, per tant la primera etapa de la síntesi és l'eliminació d'una unitat C₆ de la cadena de colesterol per formar pregnenolona. Aquesta primera etapa transcorre dins la mitocòndria de les cèl·lules de Leydig i també al còrtex de les glàndules adrenals, passant de C₂₇ a C₂₁, la última reacció d'aquesta etapa està catalitzada per la Desmolasa.

La conversió de la pregnenolona a testosterona requereix quatre reaccions, que poden transcorre en quatre rutes paral·leles. Una d'elles s'anomena Δ^5 que procedeix de l'oxidació a 3-ceto de la pregnenolona donant lloc a la 17-hidroxipregnenolona i la segona anomenada Δ^4 , perquè a més de l'oxidació, l'enllaç Δ^5 isomeritza a Δ^4 donant lloc a la 17-hidroxiprogesteron. L'activitat de cada una d'aquestes vies varia entre les diferents espècies de mamífer. En el cas

dels testicles humans preval la ruta Δ^5 , mentre que en els rosegadors dominaria la Δ^4 (Griffin *et al*, 1998).

L'escisió de la cadena lateral de la 17-hidroxiprogesterona dóna lloc a l'androstenediona, de 19 carbonis, finalment la reducció del seu grup 17-ceto, donarà lloc a la testosterona.

Tot aquest grup de reaccions està catalitzat per membres de la família dels citocroms P450 (CYP), com per exemple la 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD).

Els estrògens es sintetitzarien a partir dels andrògens per la pèrdua del grup metil angular, C-19, i per la formació d'un anell A aromàtic. Aquestes reaccions requereixen NADPH i O₂ i, es porten a terme per la CYP450 aromatasas.

La reacció limitant de tot el procés de síntesi és el pas de colesterol a pregnenolona catalitzat per la Desmolasa, per tant la velocitat d'aquesta reacció condiciona la producció total de testosterona. És important, també, la formació de dihidrotestosterona en testicle, encara que la majoria de llocs de formació i acció són els teixits perifèrics.

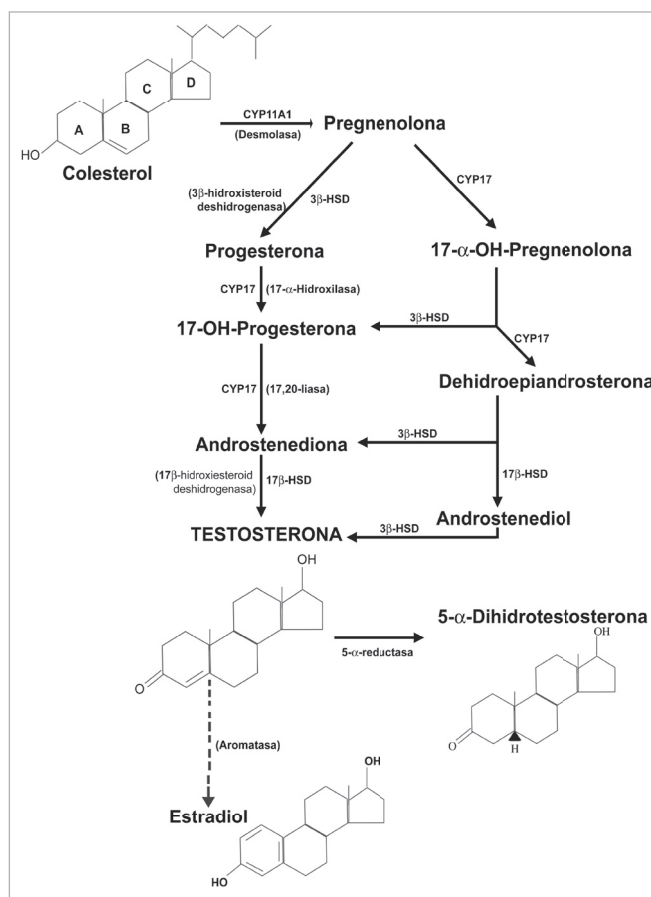


Fig 6: Ruta d'obtenció de la testosterona i els seus metabòlits actius. (Adaptat i modificat de: *Bioquímica*, Lubert Stryer 4^a ed. Ed. REVERTÉ)

2.3.3 Transport i Metabolisme dels Andrògens

Els andrògens, com la resta de les hormones esteroidals, són transportades des dels seus llocs de síntesi fins als seus òrgans diana pel corrent sanguini.

Degut a la seva poca solubilitat, viatgen units a proteïnes transportadores; pel cas de la testosterona, circula unida majoritàriament a albúmina i a la SHBG/ABP (*sex hormone binding-globulin/ androgen-binding protein*). Els estrògens de la mateixa manera, viatgen units o a l'albúmina o a una SHBG.

La testosterona (T) pot patir transformacions en els teixits extraglandulars per amplificar i modificar la seva acció. Per una banda pot reduir-se cap a esteroides 5 α -reduïts -principalment la Dihidrotestosterona (DHT)- o bé ser aromatitzats per formar estradiol en els teixits perifèrics.

FORMACIÓ DE LA DIHIDROTESTOSTERONA

L'enzim responsable de la formació de la DHT a partir de la T és la 5 α -reductasa (EC 1.3.99.5) (Russell *et al*, 1994). Tant en humans com rosegadors, existeixen dos isoenzims de tipus I i de tipus II, codificats per dos gens diferents, ambdues localitzades en el reticle endo-

plasmàtic. L'òrgan principal de producció de DHT és la pròstata, al voltant del 95% dels andrògens prostàtics és DHT. En la majoria d'òrgans reproductius masculins amb presència de 5 α -reductasa la T és transformada a DHT molt important en fenòmens de desenvolupament de la pròstata, l'aparell sexual masculí, el creixement del pèl o la calvície masculina.

FORMACIÓ DE L'ESTRADIOL

L'aromatització de la T a estradiol es produeix mitjançant l'enzim citocrom P450 19 (CYP19 EC 1.14.14.1) o Testosterona aromataasa.

EXCRECIÓ

La concentració plasmàtica dels andrògens està determinada per l'equilibri entre la seva síntesi, la seva inactivació i excreció fora de l'organisme. Per facilitar l'excreció de l'hormona no tant sols s'inactiva sinó que pot patir diverses oxidacions i ser conjugats amb grups polars com els glucuronats i sulfats que fa que siguin més solubles. La reacció d'inactivació transcorre principalment en el fetge, que conté enzims encarregats d'aquest fenomen com varies hidroxilases, les UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), o les sulfotransferases (STs).

El catabolisme de la testosterona genera derivats com els 17-cetoesteroides -androstèrona o etilcolanolona- entre d'altres. Els metabòlits finals són excretats majoritàriament per l'orina.

2.3.4 Accions Biològiques dels Andrògens

Els andrògens estan implicats en diferenciació, desenvolupament i manteniment de les funcions reproductives masculines; també confereixen el dimorfisme sexual en teixits no implicats en caràcters sexuals com el teixit ossi, el teixit adipòs, el nerviós, el múscul esquelètic, el ronyó i el fetge (Wu, 1997). Les seves funcions fisiològiques s'extenen al llarg de la vida de l'animal des de la diferenciació sexual heterogamètica de l'embrió fins a l'establiment i manteniment definitiu dels adults.

Els andrògens testiculars regulen l'expressió d'un gran nombre de gens incloent els d'algunes hormones, receptors, enzims, proteïnes estructurals i gens *housekeeping*. Un cop la testosterona arriba a la cèl·lula diana mitjançant les proteïnes transportadores específiques, travessa la membrana citoplasmàtica i en el citoplasma pot unir-se directament al receptor o bé ser transformada a DHT o aromatitzada, com ja s'ha explicat. L'acció nuclear dels andrògens està mediada a través de la unió amb el receptor d'andrògens (AR), la T o la DHT s'uneix al receptor activant-lo, adquirint així, capacitat per unir-se al seu HRE -en el cas dels andrògens anomenat element de resposta a andrògens o ARE (*androgens response element*)- i a altres proteïnes reguladores, influent en l'expressió gènica dels gens que posseeixin aquest ARE i, donant lloc a una fenotip induït per andrògens.

A part de la seva acció reguladora a nivell de DNA, també s'ha demostrat la seva implicació en la regulació post-transcripcional principalment a través de mecanismes d'estabilització del mRNA (Vercaeren *et al*, 1989; Paek *et al*, 1987). S'ha descrit un component posttranscripcional en l'expressió renal del citocrom Cyp2e1 regulat per andrògens en ratolí. També es coneix que els andrògens indueixen l'acumulació del mRNA de EGF en les glàndules submaxil·lars de ratolins mascle (Pascall, 1997). Els andrògens modifiquen l'activitat de les proteïnes que s'uneixen al mRNA, concretament en les regions 3'-UTR (*3'-untranslated region*)

riques en adenosines i uridines anomenades regions riques en AU (*AU-rich regions*) (Shefflin *et al.*, 2000). Els andrògens regularien els nivells i la distribució subcel·lular de varies proteïnes d'unió a regions riques en AU, com per exemple la HuR o les isoformes de la AUF1 (Shefflin *et al.*, 2001), influïent en la vida mitja de determinats missatgers.

Com s'ha comentat anteriorment els andrògens no tant sols actuen sobre els teixits reproductius sinó que també ho fan sobre els no reproductius, provocant així una sèrie de respostes específiques, activant o inhibint alguns gens concrets que conjuntament manifesten un caràcter sexualment dimòrfic en aquest teixit diana. Per exemple en el fetge s'ha demostrat en les tres espècies, rata, ratolí i humana, que alguns gens, sobretot els implicats en el metabolisme d'esteroides, els gens implicats en l'*imprinting* neonatal i els gens que codifiquen per proteïnes secretades com les MUPs (*major urinary proteins*), s'expressen diferent segons el sexe. La síntesi de MUPs a nivell hepàtic vindria controlada hormonalment a nivell de mRNA (Knopf *et al.*, 1983).

El principal lloc d'acció de la testosterona extragenitalment és en el múscul esquelètic. L'habilitat dels andrògens per estimular el creixement muscular està relacionat amb la seva capacitat per incrementar la retenció del nitrogen de la dieta.

A nivell perifèric, els andrògens també duen a terme diverses accions, per exemple en el sistema nerviós central, la pell, la glàndula salival o el moll de l'òs (Bardin *et al.*, 1981).

2.3.5 El Ronyó Murí com a Model per l'Estudi de l'Acció Androgènica

El ronyó de ratolí és un dels teixits extragonadals més andrògen-depenent (Lund *et al.*, 1991), presenta una sèrie de característiques que faciliten l'estudi dels efectes androgènics a nivell de transcripció gènica:

1. Els andrògens tenen un efecte hipertròfic amb una baixa estimulació de la síntesi de DNA (Berger *et al.*, 1989). Aquests efectes específics, probablement no reflexen diferències en els mecanismes d'acció androgènica entre els diferents teixits, sinó en la identitat dels gens que responen a l'hormona.

2. La *testosterona 5 α -reductasa* presenta una activitat mínima per tant, la generació de DHT és limitada dins el teixit. En el ronyó murí és la testosterona i no la DHT l'efector fisiològic del fenotip androgènic (Catterall *et al.*, 1986)

3. Els andrògens indueixen l'expressió d'un nombre variat de gens en el ronyó murí. Dins del ronyó, el lloc principal d'acció es dona sobre les cèl·lules epitelials del túbul proximal. L'hormona estimula la hipertròfia dels túbuls proximals i de les cèl·lules de la càpsula de Bowman (Berger *et al.*, 1989). Aquest procés bé acompanyat per marcats canvis estructurals i morfològics sobretot a nivell de mitocondries i del sistema lisosomal (Koenig *et al.*, 1980).

El ronyó dels mascles és més gran que el de les femelles en moltes espècies animals, inclosos els ratolins (Seyle, 1939), les diferències observades en la mida renal en ratolins s'atribueixen a l'estat androgènic de l'animal; l'administració de testosterona a femelles o la castració a mascles fa augmentar o disminuir respectivament la mida dels ronyons (Jean-Faucher *et al.*, 1987).

Existeix dimorfisme sexual en el metabolisme i l'excreció d'anions i cations orgànics en el ronyó murí; es coneix que existeixen diferències lligades al sexe en el transport d'ions

orgànics per part del ronyó, per exemple la testosterona té un efecte estimulador en la secreció d'anions i cations orgànics (Bowman *et al*, 1972). En general, la secreció renal d'anions orgànics en mascles és superior que en femelles, per tant molts xenobiòtics són excretats de l'organisme més ràpidament en animals mascle que en animals femella.

També s'ha descrit l'existència de dimorfisme sexual en l'aclariment, la farmacocinètica i l'excreció tubular de varies substàncies i fàrmacs. Aquesta divergència, però, es dona segons els compostos ja que alguns d'ells pateixen una excreció urinària superior en femelles que en mascles o viceversa (Kleinman *et al*, 1966; Reyes *et al*, 1998; Urakami *et al*, 1999; Goldstone *et al*, 1982).

Gens Regulats per Andrògens a Ronyó

Les cèl·lules del túbul proximal renal són la diana principal en el tractament amb andrògens a ronyó induïnt l'expressió de tota una sèrie de gens específics. S'han descrit tot un conjunt de gens que s'indueixen en el túbul proximal en resposta a la testosterona (Berger *et al*, 1989). Entre ells trobem gens que codifiquen per proteïnes enzimàtiques com la β -glucuronidasa (β -gluc) (Bardin *et al*, 1978), l'alcohol deshidrogenasa (Felder *et al*, 1988), l'ornitina decarboxilasa (ODC) (Pajunen *et al*, 1982), o gens que codifiquen per a proteïnes de funció desconeguda, com la *Kidney androgen-regulated protein* (KAP) (Meseguer *et al*, 1987) o la D7Rp2 (King *et al*, 1986). A tots aquests gens coneguts regulats per andrògens s'han anat afegint nous gens identificats en els darrers anys tan en ratolí com en rata. Entre aquest conjunt de nous

Taula 2. Classificació funcional d'alguns gens murins regulats per andrògens a ronyó

Categoria funcional	Gen	Referències
Enzims hidrolítics	β -Glucuronidasa (<i>Gus</i>)	Bardin <i>et al</i> , 1982
Metabolisme aminoàcids/ poliamines	Ornitina decarboxilasa (<i>Odc</i>)	Pajunen <i>et al</i> , 1978
	Arginasa	Swank <i>et al</i> , 1997
	<i>Spemidine/Spermine N1-acetyltransferase</i> (SSAT)	Bettuzzi <i>et al</i> , 2001
Enzims de la Fase I del meta- bolisme oxidatiu	Citocrom P450 2c1 (<i>Cyp2e1</i>)	Davis <i>et al</i> , 1993
	Citocrom P450 4b1 (<i>Cyp4b1</i>)	Imakoa <i>et al</i> , 1995
	Citocrom P450 4a12 (<i>Cyp4a12</i>)	Holla <i>et al</i> , 2001
	Alcohol deshidrogenasa 1 (<i>Adh-1</i>)	Felder <i>et al</i> , 1988
Enzims de la Fase II del metabolisme oxidatiu	amilamina N-acetiltransferasa 2 (<i>Nat2</i>)	Smolen <i>et al</i> , 1993
	UDP-glucuronosiltransferases (<i>UGT</i> 's)#	Rush <i>et al</i> , 1983
Metabolisme lipídic	SA (<i>acil-CoA sintetasa</i>)*	Melià <i>et al</i> , 1998
Sistema renina-angiotensina	Angiotensinògen (<i>Ang-n</i>)	Ellison <i>et al</i> , 1989
Transport d'anions i de cations orgànics	<i>Organic anion transporting polipeptide 1</i> (<i>Oatp1</i>)	Isern <i>et al</i> , 2001
	<i>Organic anion transporting polipeptide-d</i> (<i>Oatp-d/MJAM</i>)	Isern <i>et al</i> , 2003
	<i>Organic cation transporter 2</i> (<i>Oct2</i>)#	Urakami <i>et al</i> , 2000
Altres	<i>Sex-limited protein</i> (<i>Slp</i>)	Nelson <i>et al</i> , 1997
	<i>Kidney androgen-regulated protein</i> (KAP)	Meseguer <i>et al</i> , 1989
	" <i>androgen-inducible RP2 mRNA</i> " (D7Rp2e)	King <i>et al</i> , 1986
Senyalització cel·lular	<i>c-met</i> (receptor de HGF)	Dudkowska <i>et al</i> , 2001

En rata, * Tema central de la tesi

gens regulats per andrògens es troba el gen S_A (Melià *et al*, 1998); és el tema principal d'aquesta tesi per tant es fa una descripció molt més detallada al final d'aquesta introducció.

En la taula 2 es presenta un resum d'alguns dels gens murins regulats per andrògens a ronyó.

Entre els gens murins que es representen en aquesta taula es troben un dels citocroms P450 (Cyp4b1), un transportador d'anions orgànics (Oatp) i un nou gen identificat al nostre laboratori anomenat MJAM, reconegut posteriorment com un membre de la família dels Oatp's (Isern *et al*, 2001; Isern *et al*, 2003). Donat que no es coneix el significat fisiològic de l'acció androgènica a ronyó, aquests gens identificats en ratolí podrien aportar informació sobre el significat del dimorfisme sexual renal.

3. LA SUPERFAMÍLIA DELS RECEPTORS NUCLEARS

Els receptors d'hormones esteroïdals, tiroïdals o retinoides, són els efectors a través dels quals aquestes hormones exerceixen la seva acció sobre l'expressió gènica. Presenten una elevada homologia estructural, el que ha portat a agrupar-los en una superfamília denominada dels receptors nuclears, reunint el major nombre de factors de transcripció conegut en eucariotes (Tsai *et al*, 1994). Inclou, entre d'altres, els receptors dels esteroides: estrògens (ER), andrògens (AR), progesterona (PR), glucocorticoides (GR) i els mineralcorticoides (MR). S'inclouen també, els receptors de l'hormona tiroïdal (TR), de la vitamina D3 (VDR), d'àcids retinoic i 9-cis-retinoic (RAR i RXR, respectivament) i, de l'ecdisona (EcR) (Evans, 1980; Beato *et al*, 2000).

Els receptors clàssicament anomenats "orfes", denominats així perquè encara no es coneix o es coneixia per molts d'ells, els putatius lligants ni la funció. Com a exemples els receptors PPAR (*Peroxisome-Proliferator Receptor*), el PXR (*Pregnane X Receptor*) o el AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) entre d'altres pertanyen també a la superfamília dels receptors nuclears (Giguere, 1999).

L'activitat dels receptors nuclears pot estar controlada com a mínim mitjançant tres mecanismes diferents:

- 1) Unió del receptor al seu lligant.
- 2) Modificacions covalents, per exemple per fosforilació.
- 3) Interaccions amb altres factors de transcripció, coactivadors o corepressors.

3.1 Característiques Estructurals

Tots els receptors nuclears presenten una estructura altament conservada, composta per varis dominis o regions estructurals, que presenten diferents funcions però que interaccionen entre elles.

Aquests dominis es poden dividir en quatre principals i/o en cinc depenent del receptor nuclear, que són:

-El domini A/B o domini modulador N-terminal, com el seu nom indica situat en l'extrem N-terminal, és molt variable en seqüència i en longitud entre els diferents receptors. Participa en la transactivació -coneguda com AF-1 (*activation function 1*)- a través de la interacció amb components del complex transcripcional, coactivadors i altres transactivadors. Aquest

domini també podria ser important per l'especificitat dels receptors que reconeixen el mateix element de resposta.

-El domini C, està molt conservat entre tots els membres de la família i ocupa d'uns 66-70 aminoàcids. Té una estructura de dits de zinc tipus II, en els que la coordinació del zinc es dona entre quatre residus de cisteïna, en lloc de dos cisteïnes i dos histidines com és habitual en altres proteïnes. Els dits de zinc intervenen en la dimerització i són els responsables de la unió del receptor al DNA.

-El domini D, conecta les zones d'unió al DNA i d'unió a l'hormona. Sembla ser que funciona com una frontissa, permetent canvis conformacionals del receptor. Aquesta regió també pot contenir un domini de localització nuclear -ER, GR i PR- i/o un domini de transactivació -GR i TR-. Els dominis de localització nuclear són rics en arginines i lisines i confereixen a les proteïnes que els posseeixen, la propietat de fixar-se a proteïnes nuclears no histones; quan aquesta seqüència està exposada, el receptor tendeix a localitzar-se en el nucli i quan està coberta per altres proteïnes, el receptor es distribueix per tota la cèl·lula (Beato, 1989). La zona de localització nuclear es solapa amb la seqüència d'unió a la proteïna hsp90. La coincidència de les dos funcions en un espai tant restringit suposa que siguin total o parcialment incompatibles estèricament, es a dir, no poden exercir-se simultàniament.

-El domini E, es situa en la meitat carboxílica de la molècula i conté el domini d'unió a l'hormona (LBD). Té una longitud d'uns 250 aminoàcids, que per la seva naturalesa li confereix un caràcter hidrofòbic, apte per interactuar amb molècules orgàniques de baix pes molecular, com els esteroides. Aquest domini presenta una elevada homologia pel mateix receptor entre espècies distants. Els aminoàcids no conservats entre diferents membres de la família poden ser importants per proporcionar especificitat a la unió de cada receptor amb la seva hormona (Diaz-Chico *et al*, 1996). Generalment són zones importants per la interacció amb les hsp, la dimerització, la localització nuclear, la repressió i la transactivació (Tsai *et al*, 1994). El domini major de dimerització situat en aquesta regió funcional és ric en leucines, que s'estructura en forma de "cremallera de leucines". A l'extrem d'aquest domini es situa la segona funció transactivadora, anomenada AF-2.

-El domini F, localitzada en l'extrem C-terminal d'alguns receptors. Encara no s'ha pogut determinar la seva funció específica.

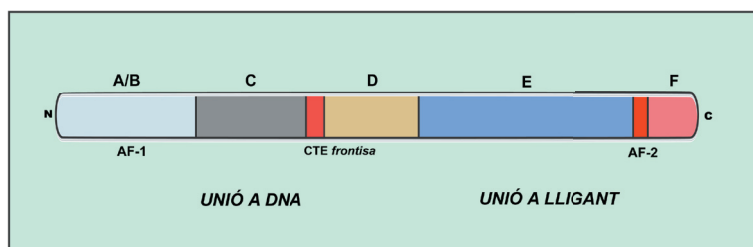


Fig 7. Imatge esquemàtica dels dominis estructurals i funcionals del receptor de les hormones esteroidals

3.2 Factors que Influencien en l'Activitat dels Receptors Nuclears

La intensitat de la resposta hormonal es controla continuament per aconseguir un major equilibri funcional, des de l'entrada de les hormones a la cèl·lula fins a la finalització de la seva acció, existeixen doncs, un conjunt d'elements que intervenen en aquest procés.

Els nivells de receptor, estan determinats per l'equilibri entre els nivells d'expressió dels gens que els codifiquen i de la seva vida mitja. Com passa amb qualsevol gen, els que codifiquen pels receptors nuclears estan sota la regulació d'altres senyals. Aquesta regulació no segueix un patró únic sinó que és específica de teixit. En la majoria d'ocasions és el propi lligant qui controla l'expressió del seu receptor.

Interacció amb altres proteïnes, existeixen proteïnes reguladores o coreguladores que s'uneixen als receptors nuclears actuant com a pont amb la maquinària transcripcional que potenciaran l'efecte sobre la seva acció. Es poden distingir dos tipus de proteïna reguladora depenent de l'efecte produït sobre la transcripció: els coactivadors, augmenten l'activitat transcripcional regulada pel receptor nuclear i els corepressors amb capacitat silenciadora.

Tant uns com els altres interaccionen normalment amb els receptors nuclears de manera lligant dependent (Onate *et al*, 1995), encara que ho poden fer sense la presència del lligant quan el receptor ha patit una modificació com per exemple la fosforilació. Altres proteïnes que interaccionen amb els receptors nuclears són les pròpies de la maquinària transcripcional i, proteïnes de la cromatina. La naturalesa i concentració d'aquestes proteïnes en cada tipus cel·lular afecta l'activitat dels receptors.

Nivells de fosforilació, la fosforilació és el principal procés que augmenta el grau d'activació dels receptors units a lligant. Els receptors esteroïdals són fosforilats i defosforilats per enzims específics. Alguns residus es fosforilen de manera lligant dependent, altres independentment de la presència de l'hormona i la majoria són fosforilats per una proteïna nuclear després de la unió del complex hormona-receptor-DNA. L'estat de fosforilació del receptor afecta tant a la seva afinitat per l'hormona com a la seva capacitat transcripcional.

L'estructura de la cromatina, pot jugar un paper modulador molt important en la transcripció gènica. La interacció dels factors de transcripció amb els elements *cis* del DNA es veu alterada per la conformació i organització de la cromatina. L'estructura de la cromatina pot regular l'expressió gènica de tres maneres: 1.-empaquetant gens que no han de ser transcrits en eucromatina per afavorir l'acció dels factors de transcripció en els gens actius; 2.- impedit la unió dels factors de transcripció; 3.- afavorint la interacció entre factors allunyats.

El promotor MMTV és un dels sistemes en els que s'ha estudiat amb més profunditat el paper que juga l'estructura de la cromatina en la regulació de l'expressió gènica. El lloc d'activació de la transcripció -per a factors com NF-1 o OTF-1- es troba sobre un nucleosoma, és necessari la presència dels glucocorticoides i la seva unió a l'PHRE, que sí es troba accessible, per produir una reordenació en el nucleosoma permetent la unió dels factors de transcripció als seus elements de resposta, produint la transcripció (Truss *et al*, 1995).

En aquest procés juguen un paper important diferents factors de remodelació de la cromatina, com el complex SWI/SNF, que utilitza ATP per desorganitzar la cromatina (Yoshinaga *et al*, 1992; Fryer *et al*, 1998). En aquest model, la cromatina juga un paper inhibitor de la transcripció, però els nucleosomes la poden induir d'una manera directa Schild *et al* van demostrar que, en un sistema de transcripció *in vitro*, era necessària la formació d'un nucleosoma en una regió determinada del promotor de la vitelogenina B1 de *Xenopus* perquè la transcripció per estrògens fos eficient, facilitant la interacció entre un ERE situat a -300bp respecte al punt inicial de la transcripció (Schild *et al*, 1993).

Activació independent de lligant, a més de l'efecte sinèrgic de la fosforilació en l'activació del receptor dependent de lligand, s'ha observat que factors que intervenen en les vies de fos-

forilació intracel·lular també poden activar els receptors nuclears en absència d'hormona. Per exemple, s'ha vist que el receptor de l'hormona progesterona pot ser activat per un inhibidor de fosfatases, l'àcid ocaidaic, o per un activador de la proteïna kinasa A, el 8-bromo cAMP, en absència de progesterona (Denner *et al*, 1990).

El fet que els receptors nuclears poden actuar com substractes en els processos de fosforilació/defosforilació, els integra dins el sistema de senyalització de la membrana cel·lular. Tanmateix, l'activitat de la transcripció gènica induïda pels receptors nuclears modifica l'abundància de proteïnes que participen com a mediadors en el sistema de senyalització de la membrana. D'aquesta manera es produeix un veritable entrecruament de senyals entre receptors de membrana i de receptors nuclears (Tsai *et al*, 1994).

3.3 Interacció Receptor-DNA

Cada hormona provoca una resposta en un gen determinat gràcies a que els receptors reconeixen seqüències específiques anomenades elements de resposta a hormona o HRE (*hormone response elements*).

Els receptors de les hormones esteroïdals posseeixen dos dits de zinc amb seqüència consens Cys-X₂-Cys-X₁₋₃-Cys-X₂-Cys i la interacció de l'àtom de zinc es dona amb les quatre cisteïnes. La regió C-terminal de cada dit forma una hèlix α que s'uneix al DNA i la part N-terminal forma làmines β . S'ha vist per tècniques espectroscòpiques i cristal·logràfiques que l'hèlix α , estableix contactes específics amb el DNA situant-se en el solc gran. La diferència en el contingut dels aminoàcids d'aquest domini determina la preferència del receptor per un HRE o per un altre.

S'han identificat les seqüències consens dels HRE per diferents hormones, es tracta d'una seqüència de 5 o 6 nucleòtids palindròmic separats per varis nucleòtids espaiadors sense seqüència fixa, en direcció inversa o directa; això indicaria que els receptors s'hi uneixen com a dímers on cada un d'ells s'uneixen a la part simètrica de l'element.

Els elements que determinen l'especificitat dels receptors per seqüències del tipus AGAA-CA o AGGTCA, es van descobrir mitjançant estudis *in vivo* amb GR i ER. Cap dels dos s'uneix ni es transactiva a través del HRE de l'altre. En el subgrup de receptors que reconeixen la seqüència AGGTCA, l'estructura en repetició directa o inversa i el nombre de nucleòtids espaiadors són els factors importants per l'especificitat de l'element de resposta respecte al seu receptor.

Mentre que els GR, PR, MR, AR i ER s'uneixen al DNA com a homodímers i reconeixen elements de resposta palindròmic, altres receptors com el TR, RAR, RXR, VDR i PPAR reconeixen repeticions directes de la seqüència AGGTCA, s'anomenen seqüències DR-1, DR-2, etc., a les repeticions directes amb un, dos, etc., nucleòtids de separació. Aquests últims receptors s'uneixen amb molta més afinitat com a heterodímers amb el receptor RXR, que com a homodímers.

Taula 3. Elements de resposta a hormones (HRE) de varis receptors esteroïdals.

Receptor	HREconsens
GR, PR, MR, AR	GGTACA n ₃ TGTTCT
ER	GTACA n ₃ TGACC
TR α , TR β	AGGTCA n ₂ AGGTCA AGGTCA n ₄ AGGTCA
RAR α,β,γ	AGGTCA n _{5,2,7} AGGTCA
RXR α,β,γ	AGGTCA n ₃ AGGTCA
VDR	AGGTCA n ₂ AGGTCA
PPAR α,β,γ	AGGTCA n AGGTCA

Adaptat i modificat de: Williams textbook of Endocrinology (9th ed), pp62 i Hormones 2nd ed, pp41

La qüestió de l'especificitat en les diferents respostes originades pels receptors GR, PR, MR i AR, que reconeixen exactament el mateix HRE, no està del tot resolta. Se sap que hi participen, la naturalesa de la interacció del dímer amb el HRE, el context del promotor en el que es troba l'element de resposta, les diferències d'expressió dels propis receptors i les interaccions proteïna-proteïna amb altres components de la maquinària de transcripció.

3.4 El Receptor d'Andrògens.

L'acció dels andrògens sobre els seus gens diana ve donada per la unió de l'androgen amb el seu receptor -AR- que pertany a la superfamília dels receptors nuclears. S'ha pogut clonar el cDNA de l'AR de diferents espècies, que ha permès avançar en la caracterització molecular i cel·lular de la fisiologia i fisiopatologia dels andrògens (Chang *et al*, 1988; Lubahn *et al*, 1988).

3.4.1 Estructura del Receptor d'Andrògens

El receptor d'andrògens és una de les proteïnes més grans dins de la superfamília de receptors nuclears. La seqüència aminoacídica deduïda conté entre 909 i 912 aminoàcids amb un pes molecular de 110 kD pels receptors humà i rata. El gen que codifica per el AR es troba localitzat en el cromosoma X.

L'AR, com d'altres membres de la superfamília de receptors nuclears, està subdividit en quatre dominis funcionals, el domini N-terminal de transactivació (A/B), el domini d'unió a DNA (DBD), la regió de frontissa i el domini d'unió a lligant (LBD). Mitjançant anàlisis de delecions i mutacions del receptor en experiments de transfecció, s'han identificat en l'AR dos funcions d'activació de la transcripció; una funció d'activació NH₂-terminal o AF-1, que funciona de manera lligant-independent quan és separat de manera artificial del LBD, creant un receptor activat de manera constitutiva (Jenster *et al*, 1995; Tora *et al*, 1989). L'altra funció d'activació o AF-2 és lligant-depenent i es troba localitzada en el domini LBD, la mutació o delecio d'AF-2 redueix dramàticament l'activació transcripcional en resposta al lligant (Tora *et al*, 1989; Baretino *et al*, 1994; Durant *et al*, 1994; He *et al*, 1999; Bevar *et al*, 1999).

EL domini DBD com els de la resta de receptors nuclears, consisteix en dos dits de zinc que reconeixen la seqüència consens específica.

La regió de frontissa com el seu nom indica uneix els dominis DBD i LBD, a més l'AR conté una senyal de localització nuclear depenent de lligant (NLS), que es troba en la regió C-terminal del domini DBD i el domini frontissa (Jenster *et al*, 1993; Zhou *et al*, 1994).

El domini LBD de l'AR, a més de formar la butxaca d'unió al lligant, media la interacció entre l'AR i diferents hsp (Fang *et al*, 1996) i interacciona amb la regió N-terminal de l'AR, estabilitzant la unió a l'androgen (He *et al*, 1999). Estudis cristal·logràfics han permès veure que la butxaca d'unió a lligant està localitzada entre les 11-13 α -helix (Williams *et al*, 1998; Nolte *et al*, 1998; Brzozowski *et al*, 1997). S'ha vist a més que la unió del lligant indueix un canvi conformacional en el que l'helix 12 i el domini AF-2 es plega en darrere a través de la butxaca d'unió al lligant (Brzozowski *et al*, 1997; Bourguet *et al*, 1995).

Tot i així aquestes dades encara no s'han pogut comprovar amb l'estructura tridimensional de la seqüència sencera del receptor nuclear.

3.4.2 Localització i Distribució del AR

El AR es troba localitzat en el citoplasma de la cèl·lula diana en forma inactiva, associat al complex de chaperones, *hsp90* i la *hsp70*; quan s'uneix al seu lligant, T o DHT, s'allibera de les *hsp* translocant-se cap al nucli de la cèl·lula, on homodimeritza amb altres molècules de receptor "activat", unint-se al seu element de resposta. L'eliminació dels andrògens del medi de cultiu, allibera al receptor de la seva unió a la cromatina i provoca la seva exportació fora del nucli al citoplasma, per ser reciclat.

El receptor d'andrògens està present en la majoria del teixits. Mitjançant les tècniques d'immunohistoquímica i d'unió amb andrògens marcats radioactivament amb ³H, s'ha pogut establir la distribució del receptor. La taula 4 representa els valors en abundància relativa del mRNA del AR respecte als nivells d'expressió en pròstata en diferents teixits de rata, determinada per RT-PCR (Keller *et al*, 1996).

Taula 4. Abundàncies relatives del mRNA de AR en varis teixits.

Teixit	♂	♀
Pròstata	100	-
Hipotàlam	42	217
Glàndula adrenal	141	186
Epidídim	115	-
Glàndula tiroïdal	68	ND
Pituïtària	56	9
Múscul (quadríceps)	35	ND
Ronyó	27	7
Fetge	18	9
Cor	8	7
Testicle	20	-
Vesícula seminal	25	-
Vagina	-	9
Ovari	-	4
Úter	-	2
Glàndula submaxil·lar	17	ND

Els valors estan representats en percentatges respecte al de pròstata. ND, no determinat. Keller *et. al.* 1996.

3.4.3 Unió del Receptor d'Andrògens al DNA. Especificitat d'Acció.

El receptor d'andrògens s'uneix a un element de resposta a andrògens (ARE) per induir els seus efectes a nivell transcripcional. La seqüència consens d'aquest ARE es va identificar mitjançant l'assaig de selecció de llocs d'unió a DNA, amb un *pool* d'oligonucleòtids representatius de possibles AREs i posteriors assajos de retard en gel (Roche *et al*, 1992), observant-se que era pràcticament idèntica a la seqüència consens de l'element de resposta a glucocorticoides (GRE). Se sap a més, que els receptors AR, GR, PR i MR, reconeixen *in vitro* els mateixos elements de resposta organitzats en una repetició invertida -espaiada per tres nucleòtids- que s'han anomenat elements de classe I (Claessens *et al*, 2001).

Sovint, múltiples AREs es troben localitzats en els promotors dels gens diana, o bé alguns AREs estan presents en les regions reguladores dels gens o mostren divergències respecte a la seqüència consens òptima establerta com a element de resposta a andrògens, tot això estableix un nivell de regulació gènica diferent i específica per part del receptor d'andrògens en els seus gens diana.

Algun dels AREs més ben caracteritzats corresponen a gens que responen als andrògens, com per exemple, el gen de l'antigen prostàtic específic (PSA), la kaliceïna-2 (KLK-2), la probasina (PB) o la *sex limited protein* (Slp), entre d'altres, veure taula 5.

L'estudi detallat dels promotors que responen a andrògens ha estat realitzat per alguns gens, la majoria dels quals són d'expressió prostàtica, com a exemple descriurem breument algun d'aquests gens que responen a andrògens.

La *PROBASINA (PB)*, gen que s'expressa en les cèl·lules epitelials de la pròstata de rata i que codifica per una proteïna nuclear que es secreta. Regulada per andrògens *in vivo*, s'ha demostrat que conté dos AREs potencials en el seu promotor que actuen de manera cooperativa en la regulació del gen (Rennie *et al*, 1993).

La *C3*, és una de les tres subunitats de la proteïna prostateïna, és una de les principals proteïnes que es secreta de la pròstata de rata. Està composta per dos heterodímers (C1:C2 i C2:C3). Les tres subunitats estan codificades per gens diferents i, és l'expressió de la subunitat C3 la que està regulada per andrògens (Tan *et al*, 1992).

PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN (PSA), l'antigen específic prostàtic és una serin-proteasa de la família de les kalicreïnes, sintetitzada per les cèl·lules de l'epiteli luminal de la pròstata humana. S'utilitza com a marcador tumoral en el càncer de pròstata. S'han identificat dos AREs funcionalment actius en el seu promotor, ARE-I i ARE-II (Cleutjens *et al*, 1996; Cleutjens *et al*, 1997).

KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN, KAP, gen murí que s'expressa de manera molt abundant en el túbul proximal del ronyó (Meseguer *et al*, 1987; Meseguer *et al*, 1989; Meseguer *et al*, 1990). La seva expressió està regulada majoritàriament per andrògens, però també per hormones tiroïdals en ratolins mascle i femella (Solé *et al*, 1994; Solé *et al*, 1996). S'ha identificat una seqüència ARE en el seu promotor solapada amb la caixa TATA, assajos de transfecció transitòria amb construccions reportadores, han demostrat la seva resposta a DHT, l'activitat dels quals disminueix al mutar l'element (Soler *et al*, 2002).

Existeixen també, alguns ARE de seqüència no consens, que mostren preferències per l'AR. L'activitat dels ARE no consens també pot dependre de la interacció del AR amb altres factors de transcripció que s'uneixen a seqüències flanquejants (Murtha *et al*, 1993)

El tipus d'androgen actiu present en una 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 la T i la DHT sobre l'expressió de nombrosos gens, incloent-hi les citocines interleucina-4 (IL-4), IL-5 i interferó γ (Araneo *et al*, 1991). En rates i humans s'ha demostrat

Taula 5. Seqüències d'alguns elements de resposta a andrògens (ARE) identificades en diferents gens.

ARE	Seqüència	Ref
AREcanònic	AGGCA n ₃ TGTCT	Roche <i>et al</i> , 1992
PBARE-1	ATAGCA tct TGTCT	Rennie <i>et al</i> , 1993
PBARE-2	AGTACT cca AGAAC	"
PSARE-1	AGAACA gca AGTGCT	Cleutjens <i>et al</i> , 1997
C3 (1) Element C	AGTACG tga TGTCT	Tan <i>et al</i> , 1992
KLK-2	GGAACA gca AGTGCT	Murtha <i>et al</i> , 1993
arMEP24ARE	TGTTGA gag AGAAC	Ghyselinck <i>et al</i> 1993
p21ARE	AGCACG cga GGTCC	Lu <i>et al</i> , 1999
SlpHRE-2	TGGTCA gcc AGTCT	Adler <i>et al</i> , 1993
SlpHRE-3	GAAACA gcc TGTTCT	"
Gus DHS-3	AGTACT tgt TGTCT	Lund <i>et al</i> , 1991
KAPARE	GGTACA gga TGTATA	Soler <i>et al</i> , 2002
MVDPARE	TGAAGT tcc TGTCT	Darne <i>et al</i> , 1997

Abreviacions: PB, probasina; PSA, prostatic specific antigen; KLK2, glandula kalikrein 2; arMEP24, murine epididimal protein 24kDa; Slp, sex-limited protein; Gus, β -glucuronidase; KAP, Kidney androgen-regulated protein; MVDP, mouse vas deferens protein.

que la DHT s'uneix amb major afinitat al AR i forma un complex molt més estable que la testosterona. 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 (Desleypere *et al*, 1992).

3.4.4 Coreguladors del AR

L'activació de la transcripció per part dels receptors esteroidals requereix com a últim pas el reclutament de la RNA polimerasa II (pol II) al promotor dels gens diana. Com és ben sabut aquest reclutament es dona mitjançant la formació del complex de preinici de la transcripció a través dels factors generals de la transcripció (GTFs) i, que l'acció general dels coreguladors facilita o s'encarrega de la comunicació entre el receptor nuclear i la maquinària transcripcional (Roeder, 1996). S'ha comprovat, però, que alguns receptors nuclears poden interaccionar directament amb alguns GTFs. Entre ells es troba l'AR; el domini N-terminal del receptor d'andrògens és capaç de reclutar el TFIIF directament i a més interaccionar de manera directa amb el TFIIH a través, també, del seu domini N-terminal, unint-se a la subunitat catalítica cdk7 del motiu CAK de TFHII (Svejstrup *et al*, 1996; Rochette-Egly *et al*, 1997; McEwan *et al*, 1997; Lee *et al* 2000).

Coactivadors del AR

La funció que es va assignar inicialment als coreguladors va ser la de formar un pont entre el receptor nuclear unit al DNA i la maquinària de transcripció, classificats per aquest fet com a coreguladors tipus I, la resta de coreguladors encarregats del plegament, la unió del lligant, l'estabilitat i la translocació al nucli de la proteïna, s'anomenen tipus II.

S'han identificat diversos coreguladors tipus I i tipus II per l'AR, com a exemple de coreguladors tipus I trobem coactivadors com SRC-1 (NcoA-1); el receptor d'andrògens interacciona amb SRC-1 a través dels seus dominis N-terminal i DBD produint-se una acció *enhancer* en la unió de les regions NH₂/COOH-terminal del AR (Spencer *et al*, 1997; He *et al*, 1999; Ikonen *et al*, 1997). El coactivador CBP, també facilita la interacció entre NH₂/COOH-terminal del AR, posseeix activitat acetiltransferasa i interacciona amb membres de la família dels SRC (Yao *et al*, 1996; Ikonen *et al*, 1997; Aarnisalo *et al*, 1998; Fronsdal *et al*, 1998) i, l'ARA54 augmenta l'activació de la transcripció mitjançada per AR en presència de DHT (Kang *et al*, 1999); entre molts d'altres.

Entre els de tipus II trobem, l'ARA 70, una de les funcions d'aquest coactivador és augmentar la transactivació del AR en resposta a T o DHT, es postula a més, que podria estar implicat en l'estabilitat del receptor un cop se li ha unit el lligant; l'ARA24/Ran podria ser el responsable de l'augment en el transport del mRNA del AR a citoplasma per ser traduït i, a més a més, ajuda en l'exportació de l'AR del nucli al citoplasma, després d'exercir la seva funció (Gorlich *et al*, 1999).

Existeixen molts altres coactivadors, encara que algun d'ells no es coneix la funció específica, és important destacar la promiscuitat d'aquests coreguladors, que poden interaccionar amb altres receptors nuclears.

Els coreguladors també participen en el remodelatge de la cromatina a través de la modificació d'histones o reclutant complexos encarregats de modificar l'estructura de la cromatina. Alguns coactivadors de l'AR actuen com a mediadors de la transducció de senyals,

ja que l'activitat transcripcional del receptor d'andrògens pot estar influenciada per factors de creixement i citoquines a través de l'estimulació de múltiples cascades de transducció de senyals. L'estimulació d'una cascada de kinases pot afectar l'activitat del AR, mitjançant la fosforilació del receptor.

La fosforilació juga un paper molt important en la regulació de l'activitat dels receptors d'hormones esteroïdals. Tenen lloc principalment en el domini de transactivació de l'extrem N-terminal, el que suggereix que la fosforilació pot està implicada en la regulació de la transcripció (Gioeli *et al*, 2002).

En el AR s'han identificat al menys 12 llocs susceptibles de ser fosforilats per diversos tipus de kinases. Tres d'aquests llocs, dos Ser en la regió N-terminal i una Ser en la regió frontal han estat confirmats per mutagènesi dirigida. S'ha vist que la fosforilació directa del AR, influeix en la seva habilitat per interaccionar amb els coreguladors; per exemple, l'AR és una diana directa de la kinasa Akt, una de les kinases de la via de transducció de senyals PI3K, la fosforilació de l'AR per part de Akt, resulta en la disminució en l'activitat transcripcional del receptor, associada a la inhabilitat de l'AR d'unir-se a ARA70 (Lin *et al*, 2001).

Per una altra banda, l'estimulació de la via de les MAPK per la sobreexpressió de ErbB2/Her2/Neu, augmenta l'activitat transcripcional de AR a través de la seva fosforilació, facilitant la unió AR-ARA70. Existeixen, però, altres vies de transducció de senyals involucrades en la regulació del AR, i dels coreguladors del receptor d'andrògens, a través de TGF- β , la β -catenina o ARA55, per exemple (Heinlein *et al*, 2002).

Corepressors del AR

Es coneix ben poc dels corepressors del receptor d'andrògens, s'han identificat tres corepressors, la ciclina D1, la calreticulina i l'HBO1.

La ciclina D1, redueix l'activitat transcripcional del AR en presència de l'androgen sintètic R1881 (Knudsen *et al*, 1999), es suggereix que la ciclina D1 inhibeix la transactivació del receptor a través d'un mecanisme independent de la seva funció en la regulació del cicle cel·lular.

La calreticulina inhibeix la unió del AR-R1881 al seu element de resposta, el paper que hi juga la calreticulina, però, encara està per determinar, ja que aquesta es troba localitzada en el reticle endoplasmàtic i en el nucli.

L'HBO1, presenta un domini acetiltransferasa, es postula que podria acetilar proteïnes no histones involucrades en la regulació transcripcional de AR, reduint l'habilitat d'aquestes proteïnes de facilitar la transactivació de AR induïda per l'androgen (Iizuka *et al*, 1999).

3.4.5 Regulació de l'Expressió del Receptor d'Andrògens

La quantitat de receptor varia en un teixit durant el desenvolupament, l'edat i en els diferents processos de transformació i necessitats fisiològiques i bioquímiques.

El gen que codifica pel receptor d'andrògens es troba en el cromosoma X. Està compost per 8 exons i 7 introns. La seva expressió està regulada a nivell transcripcional, traduccional i posttraduccional. El gen dóna lloc a dos isoformes del AR en molts tipus cel·lulars. En la majoria de les cèl·lules la isoforma A, de 87kDa, representa solament el 20% o menys del receptor i la isoforma B, de 110kDa, més del 80%. La isoforma A, sembla derivar d'una tra-

ducció alternativa que s'inicia en la Met 188, en lloc de la Met 1 (Wilson *et al*, 1996).

El promotor del gen del receptor d'andrògens, no conté seqüències TATA ni CAAT. Els elements que dirigeixen l'inici de la transcripció són una seqüència iniciadora situada per davant del lloc d'inici de la transcripció i una caixa GC uns 45 pb *upstream*. Els promotors del AR murí i humà contenen dos llocs d'inici de la transcripció, separats per 13 pb.

L'expressió del AR està autorregulada pels andrògens de manera teixit i cèl·lula específica (Quarmby *et al*, 1990). En la rata, la castració augmenta els nivells de mRNA de AR en molts teixits i si es tracta posteriorment amb testosterona es redueix a valors normals. Per una altra banda, estudis realitzats amb la línia cel·lular LNCaP de càncer de pròstata mostren que els andrògens estableixen la proteïna AR i en alguns teixits augmenten la taxa de traducció (Wolf *et al*, 1993).

L'expressió del gen que codifica per l'AR també està regulada per senyals iniciades per hormones en la membrana cel·lular, factors de creixement i neurotransmisors, que activen vies de fosforilació/defosforilació. Per exemple, l'hormona estimuladora del folicle, augmenta els nivells de mRNA del AR en cèl·lules de Sertoli; l'hormona del creixement, la prolactina i el factor de creixement epidèrmic augmenten els nivells de mRNA en cèl·lules de pròstata. En el promotor del gen del AR murí i de ratolí es troba un element CRE que estimula la transcripció. En el promotor del gen del AR murí s'han trobat seqüències d'unió per als factors de transcripció AP1 i AP2 que medien els efectes de les senyals de membrana i en el gen del AR de rata, s'ha detectat una seqüència d'unió per NF- κ B, que disminueix la taxa de transcripció.

3.5 ELS RECEPTORS NUCLEARS PPAR

Els PPARs (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors*) participen en el metabolisme energètic de la cèl·lula regulant l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme lipídic, glucídic i l'adipogènesi. Originàriament, van ser classificats com a receptors "orfes", però ràpidament van passar a ser un dels grups més ben caracteritzats amb un gran nombre de lligands reconeguts, tan naturals com sintètics.

Els PPARs reconeixen una seqüència de DNA consens molt ben definida en la regió promotora dels seus gens diana i, s'hi uneixen formant un heterodímer amb el RXR.

S'han identificat tres subtipus diferents, que són: **PPAR α** (NR1C3), **PPAR β/δ** (NR1C2, NUC1 o FAAR) i **PPAR γ** (NR1C3), tots tres presenten una estructura i un mode molecular d'acció molt conservat però estan codificats per gens diferents.

Els gens regulats per cada isotipus de PPAR són divergents i poden variar entre espècies. Els mecanismes que donen l'especificitat de la regulació per part de cada PPAR no es coneix exactament però, sí està clar la diferència en els nivells d'expressió espai-temporals dels PPAR així com la seva afinitat diferencial pels elements dels promotors.

3.5.1 Estructura dels PPAR

Com la resta dels receptors nuclears posseeix una estructura modular composta per quatre dominis independents però que interactuen entre ells, el domini N-terminal o modu-

lador, el domini d'unió a DNA (DBD), la regió frontissa i el domini d'unió a lligant (LBD) (Giguère,1999).

La regió N-terminal, és la regió que té més variabilitat entre les diferents isoformes i subtipus. El gen que codifica per la PPAR γ genera tres transcrits diferents que traduïts, donen tres dominis N-terminal o moduladors diferents, donant lloc a les tres isoformes de PPAR γ a partir d'un únic gen. Aquest domini conté l'activitat AF-1 responsable de l'activació constitutiva del receptor. El domini d'unió a DNA (DBD), consisteix en dos dits de zinc responsables de la unió dels PPAR a la regió reguladora dels gens que contenen llurs elements de resposta i, la regió CTE (*carboxy-terminal extension*) que participa en la dimerització i en el reconeixement de les seqüències flanquejants riques en adenines i timines per part dels PPARs (Hsu *et al*, 1998). Associat al primer dit de zinc hi ha la P-box responsable del reconeixement directe de l'element de resposta.

El domini d'unió a lligand (LBD), localitzat en la regió C-terminal està implicat en la unió a lligant, la dimerització amb el receptor RXR, la interacció amb diferents *hsp*, la localització nuclear i l'activació del receptor. Estudis cristal·logràfics han mostrat que el domini LBD està compost per 13 α -helix i 4 petites làmines β que formen un espai hidrofòbic formant la butxaca on s'uneix el lligant. L'estructura d'aquesta butxaca és força comuna en altres receptors nuclears, però en el cas dels PPAR existeixen dos diferències fonamentals; els PPARs presenten una cavitat o butxaca molt més gran que la resta dels receptors nuclears i, està poc conservat entre els diferents PPARs (Nolte *et al*, 1998; Xhu *et al*, 1999); aquest fet donaria a entendre que el tamany de la butxaca és la responsable de la diversitat de lligants que existeixen per aquests receptors i la diversitat dóna l'especificitat que mostren aquests compostos pels diferents subtipus de PPAR.

3.5.2 Mode d'acció dels PPARs i unió a DNA

Els PPARs s'uneixen al DNA a una seqüència específica o element de resposta anomenat *PPREs* (*Peroxisome proliferator response elements*) formant heterodímers amb el receptor del retinoid X (RXR), existeixen tres isoformes, **RXR α** , **β/δ** , i **γ** , tots ells s'activen per l'agonista endògen 9-cis-àcid retinoic (Kliewer *et al*, 1992).

Els PPARs són factors de transcripció dependents de lligant, la unió del receptor al seu agonista li produeix un canvi conformacional que li permet dimeritzar amb el RXR i reclutar tot un conjunt de coactivadors donant com a resultat la transcripció dels seus gens diana (Dowell *et al*, 1997).

S'han trobat nombrosos lligants per als PPARs, la majoria són àcids grassos de característiques diverses i els seus derivats metabòlics, on s'inclou una gran varietat d'eicosanoides i prostaglandines. Recentment, s'ha demostrat que els PPARs són les principals dianes d'un nombre considerable de compostos sintètics utilitzats en el tractament de la diabetes i la dislipidèmia. Donat el caràcter dels seus lligants, els PPARs s'encarreguen de la transactivació de nombrosos gens implicats en el metabolisme dels àcids grassos així com en el manteniment de l'homeòstasi lipídica, és destacable la funció del PPAR γ en el manteniment de l'equilibri glucosa-insulina, ja que és el principal receptor per una gran varietat de drogues utilitzades en el tractament de la diabetes.

En la figura 8 es representa de manera molt esquemàtica i general el mode d'acció dels

receptors PPAR.

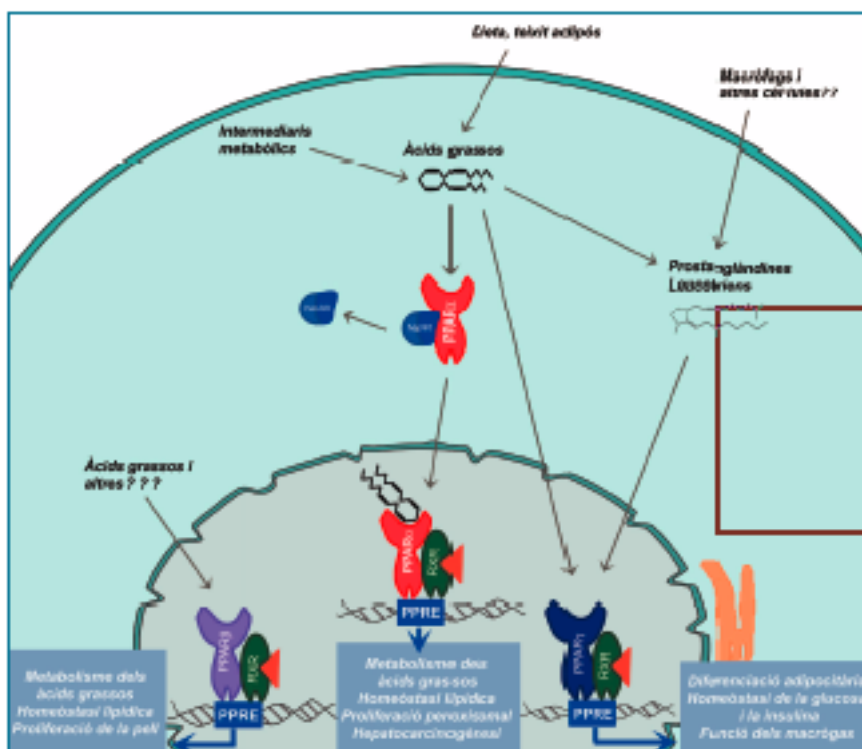


Fig 8. Representació general i esquemàtica del mode d'acció dels PPAR. La unió al seu lligand li confereix l'habilitat de dimeritzar amb el receptor RXR i reconèixer l'element de resposta PPRE. Els gens que responen als PPAR estan implicats bàsicament en la regulació del metabolisme lípid, la proliferació peroxisomal i la diferenciació adipocitària, entre d'altres.

Els elements de resposta dels PPARs (PPRE) són repeticions directes de dos hexanucleòtids amb la seqüència consens AGGTCA separats per un únic nucleòtid (DR-1). Aquesta seqüència, o similar, s'ha trobat en nombrosos gens que responen als PPAR incloent l'*acyl-CoA oxidasa* i l'*adipocyte fatty acid-binding protein* (Wahli *et al*, 1995). Alguns dels PPRE més ben caracteritzats corresponen a gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos com el gen que codifica per la MCAD (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*) o els gens implicats en la β -oxidació peroxisomal com el gen *Acyl-CoA oxidase* (ACO), veure taula 6.

S'ha definit com a PPRE una seqüència d'aproximadament 17 parells de bases que conté una regió flanquejant en 5', un nucli DR-1 imperfecte i una adenina com a nucleòtid espaiador dels dos hexàmers (Ijpenberg *et al*, 1997; Nakshatri *et al*, 1998). La seqüència *upstream* flanquejan al DR-1 dona polaritat per reconèixer la seqüència de DNA per part de l'heterodímer. El receptor PPAR s'uneix a l'element de resposta en 5', mentre que el RXR es situa en 3' de la seqüència (Ijpenberg *et al*, 1997; Castelein *et al*, 1997). Aquesta regió flanquejant es la que dona l'especificitat per un determinat subtipus de PPAR.

La unió dels PPARs per a un determinat tipus de PPRE pot estar modulada pel subtipus de receptor RXR amb el que dimeritza. El subtipus RXR γ augmenta la capacitat del PPAR γ

Taula 6. Elements de resposta a PPAR (PPRE) identificats en varis gens.

Gen	Seqüències PPRE	Referència
ME	TTCT GGGTCA A AGTTGA	Ijpenberg <i>et al</i> , 1997
ACO (A)	GACC AGGACA A AGGTCA	Dreyer <i>et al</i> , 1993; Tugwood <i>et al</i> , 1992; Krey <i>et al</i> , 1993; Osumi <i>et al</i> , 1991; Varanasi <i>et al</i> , 1996
ACO (B)	AGCA AGGTAG A AGGTCA	
ACS	TTTC AGGGCA T CAGTCA	
ACOX	TAGA AGGTCA C TGGTCA	
Apo A-II	TACC AGGGTA A AGGTTG	Vu-Dac <i>et al</i> , 1995
Apo C-III	GAGC TGGTCA A AGGTCA	Reue <i>et al</i> , 1988; Hertz <i>et al</i> , 1995
aP2	TACT GGATCA G AGTTCA	Tontonoz <i>et al</i> , 1994(1)
Cyp 4A1	AACT AGGGTA A AGTTCA	Muerhoff <i>et al</i> , 1992; Krey <i>et al</i> , 1997; Aldridge <i>et al</i> , 1995
Cyp4A6-X	AAGT AGGACA A AGGCCA	
HD	ATGT AGGTAA T AGTTCA	Zhang <i>et al</i> , 1992; Krey <i>et al</i> , 1997; Bardot <i>et al</i> , 1993
L-FABP	ATAT AGGCCA T AGGTCA	Issemann <i>et al</i> , 1992
LPL	AAGA GGGGGA A AGGGCA	Schoonjans <i>et al</i> , 1996
MCAD	TCTC CGGGTA A AGGTGA	Gulick <i>et al</i> , 1994
MTHMGS	AACT GGGCCA A AGGTCT	Rodriguez <i>et al</i> , 1994
PEPCK (PCK1)	CCCA CGGCCA A AGGTCA	Tontonoz <i>et al</i> , 1995
PEPCK (PCK2)	AACT GGGATA A AGGTCT	“
UCP	AGTG TGGTCA A GGGTCGA	Sears <i>et al</i> , 1996

Abreviatures: **ME**, malic enzyme; **ACO/ACOX**, acyl-CoA oxidase; **ACS**, acyl-CoA synthase; **Apo A-II**, apolipoprotein A-II; **ApoC-III**, apolipoprotein C-III; **aP2**, adipocyte lipid-binding protein; **Cyp4A**, microsomal ω -fatty acid hydroxylase; **HD**, enoyl-CoA hydratase/3-OH-acyl-CoA dehydrogenase o enzim bifuncional; **L-FABP**, liver fatty acid binding protein; **LPL**, lipoprotein lipase; **MCAD**, medium-chain acyl-CoA dehydrogenasa; **MTHMGS**, mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; **PEPCK**, phosphoenolpyruvate carboxykinase; **UCP**, uncoupling protein. Adaptat i modificat de: Ijpenberg *et al*, 1997.

d'unir-se a l'element de resposta, en canvi el subtipus RXR α potencia la unió del PPAR α als elements de resposta de baixa afinitat per aquests receptors (Juge-Aubry *et al*, 1997).

L'activitat dels PPARs pot ser modificada per altres factors com proteïnes reguladores i mecanismes involucrats en canvis postraduccionalment d'aquests receptors.

Recentment, s'han identificat algunes proteïnes cofactors, coactivadors i coreguladors que medien l'habilitat dels receptors nuclears per iniciar o suprimir la transcripció dels seus gens diana. Els coactivadors interactuen amb els receptors nuclears a través d'un motiu conservat LXXLL (Heery *et al*, 1997; Torchia *et al*, 1997). Aquest domini coactivador és orientat per un "charge clamp" formats per l'helix 3 i l'helix 12 de l'AF-2 del LBD, formant-se així una fenestra hidrofòbica en la superfície del receptor formats per l'helix 3,4 i 5, i l'helix AF-2 (Nolte *et al*, 1998).

Alguns coactivadors com per exemple CBP/p300 i el SRC-1 (*steroid receptor coactivator*), posseeixen activitat acetilasa que poden remodelar l'estructura de la cromatina (Zhu *et al*, 1996). Un altre grup representat pels membres del complex DRIP/TRAP com la proteïna d'unió a PPAR (PBP/TRAP220) (Zhu *et al*, 1997), formen un pont entre el receptor i la maquinària d'inici de la transcripció.

La unió de PPAR al DNA també pot estar regulada mitjançant la competència per l'element de resposta amb altres receptors, per exemple els DR-1 poden ser reconeguts per diferents membres de la superfamília de receptors nuclears a part dels PPAR, s'hi uneixen el

RAR, el HNF-4, el COUP-TF1, el COUP-TF2 i el RXR en forma d'homodímers o heterodímers amb el RXR. La preferència d'aquests receptors per un DR-1 en particular ve donat per canvis puntuals en la seqüència de l'element de resposta així com la competència entre els diferents receptors segons la seva abundància en la cèl·lula (Nakshatri *et al*, 1998; Hertz *et al*, 1995).

Els elements de resposta a estrògens i a hormones tiroïdals (ERE i TRE respectivament) són dos excepcions com a PPREs. Els PPARs poden unir-se a l'ERE del gen de la vitelogenina A2 inhibint la seva resposta a estrògens (Keller *et al*, 1995). De la mateixa manera els PPARs influeixen de manera positiva o negativa sobre l'acció de la T₃ en alguns gens depenent de si l'element de resposta és un DR-2 o un DR-4 i del tipus de T₃R (Winrow *et al*, 1996).

Està descrit que altres senyals hormonals poden modular l'activitat dels PPAR per modificacions covalents de la proteïna. Estudis en cèl·lules CV-1 i HepG2 han demostrat que la insulina pot fosforilar PPAR α i duplicar la seva activitat transcripcional, efecte mitjançat per les MAPKs (Shalev *et al*, 1996; Juge-Aubry *et al*, 1999). Els factors EGF i PDGF disminueixen l'activitat transcripcional de PPAR γ degut a la fosforilació del receptor, també, per varies MAPKs (Hu *et al*, 1996; Camp *et al*, 1997).

3.5.3 Lligants dels PPAR

LLIGANTS NATURALS

Degut al paper que hi juguen els PPARs en el metabolisme lipídic, la recerca dels lligants naturals començà amb els àcids grassos i els eicosanoides; verificant-se com a lligants naturals autèntics dels PPARs. Els àcids grassos i els derivats dels eicosanoides s'uneixen i activen el PPAR γ amb una afinitat a nivell de concentracions de micromolar, equivalent als nivells existents d'aquests metabòlits en sèrum; encara que el rang de concentració intracel·lular no es coneix. El PPAR γ prefereix els àcids grassos poliinsaturats, que inclou els àcids grassos essencials com l'àcid linolènic, l'àcid linoleic, l'àcid araquidònic i l'àcid eicosapentaenoic (Xu *et al*, 1999).

Els derivats de les protanglandines 2 (PGI₂), la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), són lligants i agonistes pel PPAR γ a nivells de 2-5 μ M (Forman *et al*, 1995; Kliewer *et al*, 1995), tot i que la importància fisiològica d'aquest lligant roman encara desconeguda perquè les concentracions cel·lulars no han estat encara determinades.

El PPAR α pot ser activat per una gran varietat d'àcids grassos saturats i insaturats que inclouen l'àcid palmític, l'àcid oleic, l'àcid linoleic i l'àcid araquidònic (Gottlicher *et al*, 1992). S'han trobat un gran nombre d'àcids grassos que s'uneixen directament amb el receptor amb afinitat de micromolar (Kliewer *et al*, 1997; Forman *et al*, 1997). Els metabòlits derivats de l'activitat de la 5-lipooxigenasa, el leucotrié B₄ i el 8(S)-HETE (8(S)-hidroxi-eicosatetraenoic) van ser identificats com a lligants per al PPAR α (Yu *et al*, 1995), tot i que aparentment no estan presents en la cèl·lula a uns nivells suficients per classificar-se com a lligants naturals, la localització nuclear de la 5-lipooxigenasa, l'enzim responsable de la síntesi dels leucotriens, indicaria que aquests metabòlits assolirien els nivells necessaris per activar al PPAR α (Brock *et al*, 1995).

Degut a la seva elevada afinitat pels lligants endògens, que es mantenen dintre del rang dels nivells que hi ha circulant en sang, és plausible afirmar que la funció primària del PPAR α

és la de sensor dels nivells d'àcids grassos lliures en els teixits on s'expressa.

Com els altres PPAR, el PPAR δ interacciona amb àcids grassos saturats i insaturats; aquests lligants són selectivament, els intermediaris entre els de PPAR γ i PPAR α (Xu *et al*, 1998). És destacable l'afinitat que presenta el PPAR δ , a nivells de micromolar, per l'àcid gras poliinsaturat dihomog-àcid linoleic, EPA, i l'àcid araquidònic (Forman *et al*, 1997). L'àcid palmític així com el seu anàleg metabòlicament estable, l'àcid 2-bromopalmític, han estat identificats com agonistes per el PPAR β/δ (Amri *et al*, 1995). S'ha demostrat que un nombre determinat d'eicosanoides incloent-hi la PGA1 i la PGD2 activarien el PPAR β/δ (Yu *et al*, 1995). La carbaprostaciclina i la prostanglandina semisintètica són també agonistes per aquest receptor (Forman *et al*, 1997).

LLIGANTS SINTÈTICS

Les *Tiazolidinacions* (TZDs), entre les que s'inclou la troglitazona, la pioglitazona, la rosiglitazona, l'englitazona i la ciglitazona, s'uneixen selectivament al PPAR γ (Lehmann *et al*, 1995; Berger *et al*, 1995; Willson *et al*, 1996). El rosiglitazona s'uneix al receptor amb una elevada afinitat ($K_d \sim 40$ nM), mentre que la pioglitazona, l'englitazona i el ciglitazona són lligants menys potents.

Les TZDs indueixen la diferenciació dels adipòcits i l'increment de l'expressió de gens de l'adipòcit, com per exemple la aP2 (*adipocyte fatty acid-binding protein*) (Kletzien *et al*, 1992; Harris *et al*, 1994). Independentment, Spiegelman i col·laboradors mostraren que el PPAR γ s'uneix a l'element de resposta en la regió 5' del gen de l'aP2 controlant la seva expressió específica en l'adipòcit (Tontonoz *et al*, 1994).

Les TZDs es van desenvolupar primer amb finalitats terapèutiques, com agents antidiabètics i hipolipidèmics. Algunes TZDs, com el rosiglitazona, el troglitazona i el pioglitazona, s'utilitzen en el tractament de la diabetes tipus II, actuen disminuint la resistència a la insulina i, disminuint els nivells de glucosa i triglicèrids en plasma (Moller *et al*, 2001). Recentment s'han presentat nous agonistes potents per a PPAR γ com els derivats de l'àcid fenilacètic (L-805645) (Berger *et al*, 2001), un no-TZD, el GW2570, també amb propietats antidiabètiques en humans (Willson *et al*, 2000).

Altres compostos sintètics amb finalitat terapèutica que actuen via PPAR γ i PPAR α són les drogues anti-inflamatòries no esteroïdals (NSAIDs), que inclouen l'indometacina, el fenoprofè i l'ibuprofè (Lehmann *et al*, 1997).

Existeix un antagonista sintètic per PPAR γ , el GW0072, que interacciona amb diferents aminoàcids del domini LBD del receptor; que en experiments *in vitro* amb cèl·lules en cultiu bloqueja la diferenciació adipocitària (Oberfield *et al*, 1999).

Els fibrats, àcids carboxílics anfipàtics que han estat utilitzats amb èxit en el tractament de la hipertrigliceridèmia, són agonistes del PPAR α . El clofibrat és el prototip d'aquesta classe de fibrats, es va desenvolupar abans que s'identifiquessin els PPARs; en experiments *in vivo* amb ratolins es va identificar com un eficaç hipolipidèmic (Thorp *et al*, 1962). Més tard es va comprovar que induïa la proliferació peroxisomal en rosegadors (Hess *et al*, 1965). El WY-14643, l'àcid 2-arilitioacètic anàleg del clofibrat, són potents agonistes pel PPAR α murí, també ho és l'àcid ureidobutíric amb una robusta activitat hipolipidèmica *in vivo* (Brown *et al*, 1999).

Tot i que encara està per definir el paper fisiològic del PPAR β/δ , es coneix algun lligant específic per aquest receptor. El bezafibrat és un lligant específic per PPAR β/δ en *Xenopus*,

però en mamífers la seva activitat sobre el PPAR δ és baixa i, presenta afinitat per PPAR α (Krey *et al*, 1997); el lligant L-165041 és aproximadament 30 vegades més selectiu pel PPAR β/δ , que pel PPAR γ , a més, s'ha vist que aquest compost augmenta els nivells de lipoproteïnes d'elevada densitat en rosegadors (Leibowitz *et al*, 2000).

3.5.4 Expressió Tissular dels PPARs

El patró d'expressió dels diferents subtipus i isoformes dels PPARs és molt dissemblant en els diferents teixits, presenta també una divergència d'expressió a nivell cel·lular en un mateix teixit; a mesura que han augmentat els coneixements sobre els PPARs s'ha pogut observar la relació que existeix entre l'especificitat d'expressió i la funcionalitat d'aquests receptors.

Degut al seu paper dintre de la regulació del metabolisme lipídic, els primers estudis comparatius que es van fer dels nivells d'expressió dels mRNA dels receptors entre diferents teixits tant en rata com en ratolí adults, mostraren un patró d'expressió força ampli, essent significatiu en teixits amb un cost energètic elevat; com són: fetge, ronyó, cor, teixit adipós marró, intestí, glàndula adrenal i múscul esquelètic (Isseman *et al*, 1990). En la figura 9 es mostra l'expressió comparativa dels receptors PPAR α , PPAR γ i PPAR β/δ en teixits de rata adulta.

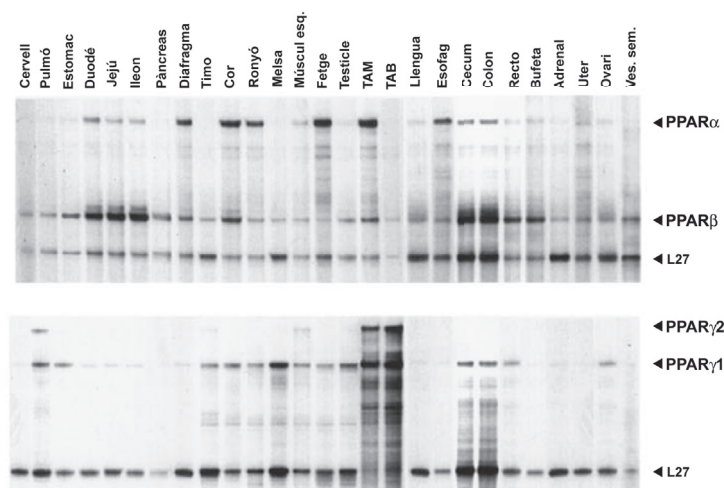


Fig. 9. Anàlisi comparatiu de l'expressió de PPAR α , PPAR γ i PPAR β/δ en 22 òrgans de rata adulta, mitjançant l'assaig de protecció de RNasa.

Adaptada i modificada de l'article: Escher *et al* 2001.

De tots els teixits analitzats en rata, el PPAR β és l'isotipus més abundant, presenta nivells d'expressió elevats en el tracte digestiu, ronyó, cor, diafragma i l'esòfag; en la resta dels òrgans analitzats l'expressió de PPAR β es de 4-5 vegades menor. El PPAR α s'expressa en cèl·lules amb molta activitat catalítica dels àcids grassos i amb una activitat dependent dels peroxisomes com els hepatòcits, cèl·lules del túbul proximal renal, adipòcits del teixit marró i la mucosa intestinal (Escher *et al*, 2001).

El PPAR γ s'expressa majoritàriament en teixit adipós. La isoforma γ 1 presenta un patró comparable al de PPAR α en ratolí. En humans, hi ha expressió en múscul esquelètic, cor i fetge (Fajas *et al*, 1997). La isoforma γ 2 està relacionada en diferenciació adipocitària i s'expressa gairebé de manera exclusiva en teixit adipós blanc i marró (Tontonoz *et al*, 1994). L'expressió de

PPAR γ 3 està restringida a macròfags, a l'intestí i al teixit adipós (Ricote *et al*, 1998; Fajas *et al*, 1998).

En el ronyó la distribució dels mRNA dels diferents subtipus de PPAR varia segons la regió renal, el PPAR α s'expressa predominantment en cortex i es localitza bàsicament en el túbul proximal renal; PPAR γ segons alguns autors s'expressaria exclusivament en la medul·la interna, tot i que d'altres l'han trobat també en cortex. La distribució del mRNA de PPAR δ/β s'ha vist al tot el llarg de la nefrona, tant a medul·la com a còrtex (Yang *et al*, 1999). Com ja s'ha comentat abans, els PPARs heterodimeritzen amb el RXRs; estudis *in vitro* han mostrat que els tres subtipus de RXR α , $-\beta/\delta$, $-\gamma$, segueix un patró d'expressió similar als dels subtipus de PPARs amb els que heterodimeritza majoritàriament, així el RXR α , s'expressa sobretot, en el còrtex renal, concretament en el túbul proximal com el PPAR α i en la medul·la interna com PPAR γ afavorint-se els heterodímers, PPAR α -RXR α i PPAR γ -RXR α . L'RXR β/δ s'expressa al llarg de tota la nefrona coincidint amb l'expressió de PPAR β/δ , suggerint que poden tenir una funció constitutiva al llarg de tots els segments de la nefrona (Yang *et al*, 1999).

3.5.5 PPAR γ

El PPAR γ es va clonar a partir de moltes espècies de mamífer inclosa l'humana; es coneixen dos isoformes expressades en el ratolí (Zhu *et al*, 1995) i l'humà (Elbrecht *et al*, 1996) anomenades γ 1 i γ 2. La diferència entre les dos isoformes és troba en que γ 2 conté 30 aminoàcids addicionals en el seu domini N-terminal degut a l'utilització diferencial del promotor, en el que es dona un processament alternatiu del RNA procedent del mateix gen. PPAR γ 2 està expressat sobretot en teixit adipós, mentre que PPAR γ 1 s'expressa en un rang més ample de teixits que inclouen, cor, múscul esquelètic, intestí llarg i curt, ronyó, pàncreas i pulmó (Fajas *et al*, 1997).

PPAR γ és necessari per la diferenciació adipocitària; inicialment es va demostrar que interaccionava directament amb l'element *cis* que regulava l'expressió adipòcit específica de la proteïna aP2 (*fatty acid-binding protein*) (Tontonoz *et al*, 1994). La introducció i sobreexpressió de PPAR γ en una línia cel·lular de fibroblast (NIH-3T3) en presència de diferents agonistes, induïa l'acumulació de lípids i la diferenciació de les cèl·lules en adipòcits madurs (Tontonoz *et al*, 1994).

En els adipòcits, el PPAR γ regula l'expressió de nombrosos gens involucrats en el metabolisme lipídic, inclou aP2 (Tontonoz *et al*, 1994), el PEPCK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*) (Tontonoz *et al*, 1995), l'acil-CoA sintasa (Schoonjans *et al*, 1995) i, el LPL (*lipoprotein lipase*) (Schoonjans *et al*, 1996). Tots aquests gens presenten PPREs en les seves regions reguladores.

El PPAR γ també regula gens encarregats de controlar l'homeòstasi energètica de la cèl·lula; s'ha demostrat que el receptor incrementa l'expressió de proteïnes desacopladores mitoncondrials, UCPs (*uncoupling proteins*), tan *in vitro* com *in vivo* (Kelly *et al*, 1998). En la taula 7 es representa alguns dels gens regulats per PPAR γ , així com la seva implicació funcional.

El receptor PPAR γ , està associat amb diversos gens relacionats amb l'acció de la insulina. La TNF α , una citoquina proinflamàtica expressada en adipòcits, disminueix la transducció de senyal depenent d'insulina (Hotamisligil *et al*, 1993) produïnt-se resistència a l'hormona. Els agonistes de PPAR γ inhibeixen l'expressió de TNF α en el teixit adipós de ratolins obesos (Hofmann *et al*, 1994) i per tant inhibeixen la resistència a la insulina induïda per TNF α (Miles

et al, 1997). S'ha comprovat també, que la proteïna IRS-2 que està implicada en la transducció de senyals provocada per la insulina en teixits sensibles a l'hormona, augmenta la seva expressió en adipòcits en cultiu i teixit adipòs humà en presència d'agonistes de PPAR γ (Smith *et al*, 2001).

La proteïna Acrp30 (*Adipocyte-related complement protein*), és una proteïna secretada per l'adipòcit, s'ha vist recentment que *in vivo* actua disminuint la glucosa, els triglicèrids i els àcids grassos lliures (Fruebis *et al*,

2001; Berg *et al*, 2001). El tractament de ratolins diabètics amb agonistes de PPAR γ normalitza els nivells baixos de mRNA de Acrp30 i incrementa els seus nivells en plasma. En humans, els pacients que presenten diabetis tipus 2 tenen els nivells en plasma de Acrp30 reduïts comparats amb els subjectes normals (Hotta *et al*, 2000); el tractament d'aquests pacients amb rosiglitazone, un agonista per PPAR γ , incrementa els nivells de Acrp30; en canvi els fenofibrats agonistes per PPAR α , no hi tenen cap efecte (Combatsianis *et al*, 2001).

Donat que el PPAR γ s'expressa predominantment en el teixit adipós, prevaleix la hipòtesi que l'eficàcia, *in vivo*, que presenten els agonistes de PPAR γ en accions directes sobre les cèl·lules del teixit adipós, tenen efectes secundaris en altres teixits que responen a la insulina com per exemple el múscul esquelètic i el fetge. Els nivells de PPAR γ en múscul esquelètic són molt baixos, el tractament amb rosiglitazone en rates resistents a insulina produeix la normalització en l'acció de la insulina en el teixit adipós en menys de 24 hores, en canvi la recaptació de la glucosa mediada per la insulina en múscul esquelètic no es millora fins a alguns dies més tard després de l'inici de la teràpia (Zierath *et al*, 1998).

Anàlisis recents revelen que alguns gens que contenen un PPRE i que estan induïts en el teixit adipós estan suprimits en múscul esquelètic; un exemple es la *piruvat dehidrogenasa quinasa 4* (Way *et al*, 2001). És de suposar, doncs, que la supressió mitjançada per PPAR γ d'aquests gens en múscul esquelètic produeixi un increment net en l'oxidació de la glucosa.

Per tant, els intermediaris dels efectes metabòlics beneficiosos dels agonistes de PPAR γ en teixits distants, com fetge i múscul esquelètic, estan probablement involucrats en efectes combinats com: a) afavorir la captació mitjançada per la insulina en el teixit adipós, i el magatzem i catabolisme dels àcids grassos lliures (Oakes *et al*, 2001), b) induir la producció de factors derivats de l'adipòs amb activitat potencial de sensibilització a la glucosa com Acrp30 i c) suprimir els nivells circulants i/o accions dels causants de la resistència a insulina també derivats de l'adipòs com TNF α (Steppan *et al*, 2001).

Taula 7. Gens regulats *in vivo* per agonistes de PPAR γ

Gen	Regulació	Funció potencial
aP2	↑ TAB	Unió intracel·lular dels àcids grassos
Acil-Co sintetasa	↑ TAB	Lipogènesi i/o catabolisme
PEPCK	↑ TAB	Síntesi glicerol (per triglicèrids)
LPL	↑ TAB	Hidròlisi dels triglicèrids
CD36	↑ TAB	Transportador àcids grassos
FATP-1	↑ TAB ↓múscul	Transportador àcids grassos
UCP-1	↑ TAM ↑ TAB	Desacoplador respiració mitocondrial
UCP-3	↑ TAB	Desacoplador respiració mitocondrial
CPT1	↑ TAB	Translocació àcids grassos dins mitocondria
IRS-2	↑ TAB	Receptor insulina mediador de senyals
PDK4	↑ TAB ↓múscul	Inhibició de la oxidació de la glucosa
Acrp30	↑ TAB	Proteïna secretada per l'adipòcit
TNF α	↓ TAB	Citoquina proinflamatòria
11- β -HSD-1	↓ TAB ↓Fetge	Control intracel·lular de la conversió del cortisol actiu

Abreviatures: TAB, teixit adipós blanc; TAM, teixit adipós marró; CPT1, Carnitine plamitoyl transferase 1; IRS-2, Insulin receptor substrate-2; 11- β -HSD-1, 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase; la resta estan definides en el text.

El receptor PPAR γ juga un paper important en la resposta inflamatòria. L'expressió de PPAR γ es regula a l'alça en la diferenciació de monòcits a macròfags (Chinetti *et al*, 1998). El tractament amb agonistes de PPAR γ en macròfags de rosegadors, *in vitro*, disminueix la producció de ON (òxid nítric) (Ricote *et al*, 1998); tot i que els agonistes sintètics, les TZD, a través de PPAR γ no produeixen canvis en la producció de citoquines, si s'ha observat amb el seu lligant natural, la PGJ2, que antagonitza l'activitat de diferents factors de transcripció implicats en l'estimulació de l'expressió gènica de les citoquines (Thieringer *et al*, 2000). Respecte a la implicació de PPAR γ en la regulació d'alguns gens en macròfags, però, hi ha controvèrsia, alguns autors demostren que la implicació dels agonistes de PPAR γ en la producció de citoquines es dona per un mecanisme independent al receptor (Chawla *et al*, 2001); en contra d'altres, han demostrat que el rosiglitazone bloqueja la síntesi de citoquines en línies cel·lulars de còlon, inhibint l'activació de la via de NF κ B (Su *et al*, 1999).

Recentment, es relaciona al PPAR γ amb varies formes de càncer, tenint en compte que els seus lligants inhibeixen la proliferació cel·lular quan s'indueix la diferenciació adipocitària; s'ha demostrat per exemple, que l'activació del receptor per pioglitazone bloqueja el cicle cel·lular i causa la diferenciació de cèl·lules de liposarcoma en cultiu primari (Tontonoz *et al*, 1997). En humans, el troglitazone causa diferenciació en liposarcomes avançats (Demetri *et al*, 1999). S'ha vist també que es troba expressat en adenocarcinomes mamaris en humans; a més inhibeixen el creixement del tumor en models de ratolí de carcinoma mamari (Elstner *et al*, 1998). Tenint en compte aquests resultats PPAR γ podria ser un suport terapèutic en aquest tipus de càncer.

Resultats contradictoris es mostren en càncer de còlon, PPAR γ s'expressa a nivells molt alts en tumors primaris i en línies cel·lulars de càncer de còlon (DuBois *et al*, 1998). En ratolins APC^{min/+} (un model amb poliposi hereditària), el tractament amb TZD incrementa el nombre de pòlips de còlon (Saez *et al*, 1998; Lefebvre *et al*, 1998).

3.5.6 PPAR α

De les diferents isoformes d'aquests receptors nuclears, el PPAR α murí va ser el primer membre clonat, tot seguit es va aconseguir a partir d'altres espècies com la rata i l'humà (Gottlicher *et al*, 1992; Sher *et al*, 1993; Issemann *et al*, 1999). En els rosegadors i els humans, el PPAR α està expressat en nombrosos teixits amb molta activitat metabòlica com el fetge, el ronyó, el cor, el múscul esquelètic i el teixit adipòs marró (Braissant *et al*, 1996; Auboeuf *et al*, 1997), també està present en l'endoteli vascular (Inoue *et al*, 1998) i en les cèl·lules de múscul llis vascular (Staels *et al*, 1998). Alguns autors han trobat el mRNA de PPAR α en cèl·lules del sistema immune com els monòcits/macròfags i les cèl·lules T i B (Jones *et al*, 2002; Marse *et al*, 2002).

Dels tres isotipus de PPARs coneguts fins ara, PPAR α és el que està millor caracteritzat. El PPAR α es pot activar per nombrosos lligants endògens i sintètics; molt breument, els àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga, els eicosanoides, el leucotrié B4 (intermediari inflamatori), els àcids hidroxieicosatetraenoics i les prostanglandines D1 i D2 es troben entre els millors lligants naturals de PPAR α (Keller *et al*, 1993; Yu *et al*, 1995; Devchand *et al*, 1996; Forman *et al*, 1997). Es creu que l'activació de PPAR α per part dels lligants endògens es dona en primer lloc durant el dejú degut a l'entrada de grans quantitats d'àcids grassos lliures en els plasma sanguini (Kersten *et al*, 1999; Leone *et al*, 1999); tot i que una dieta específica en uns àcids grassos concrets poden actuar com a potents activadors de PPAR α (Ren *et al*, 1996).

Entre els lligants sintètics es troben els fibrats, com el gemfibrozil, el bezafibrate, el clofibrat i el fenofibrat; aquestes molècules s'utilitzen en el tractament de la dislipidèmia i malalties cardiovasculars (Fruchart *et al*, 1999; Kersten *et al*, 2000).

La relació funcional entre l'oxidació dels àcids grassos i PPAR α es va establir per primer cop en 1992, quan es va veure que el gen peroxisomal acil-CoA oxidasa implicat en la β -oxidació dels àcids grassos en el peroxisoma, estava regulat per PPAR α (Dreyer *et al*, 1992). Des de llavors, s'han trobat nombrosos gens implicats en el catabolisme dels àcids grassos hepàtics regulats per els diferents PPARs i en concret per PPAR α . El catabolisme dels àcids grassos en el fetge consta de diferents etapes; en primer lloc, els àcids grassos lliures generats per la lipòlisi en el teixit adipòs són transportats pel corrent sanguini fins al fetge, un cop allà són activats donant lloc als seus derivats acil-CoA. La forma activada dels àcids grassos “*fatty acyl-CoAs*” són transportats a l'interior de la mitocondria o el peroxisoma per ésser degradats fins a acetil-CoA via β -oxidació.

Les diferències entre la β -oxidació de la mitocondria i el peroxisoma es troben bàsicament en la mida o llargada dels àcids grassos que oxiden, mentre que la mitocondria oxida àcids grassos de cadena curta, mitja i llarga, el peroxisoma oxida àcids grassos de cadena llarga i sobretot els de cadena molt llarga. Ambdues vies estan regulades per PPAR α .

El primer pas requerit en l'oxidació dels àcids grassos és el seu transport a través de la membrana cel·lular. S'ha demostrat que alguns gens que codifiquen per a diferents transportadors d'àcids grassos són dianes directes per PPAR α , via un PPRE en els seus promotors (Martin *et al*, 1997; Frohnert *et al*, 1999) com per exemple, el gen de la translocasa d'àcids grassos FAT/CD36 (Motojima *et al*, 1998). En la mitocondria l'oxidació dels àcids grassos comença amb la translocació dels àcids grassos de cadena llarga activats dintre de la matriu mitocondrial. Aquets transport es duu a terme per la carnitina palmitoiltransferasa tipus I i tipus II, cada un dels enzims s'encarrega del transport dels àcids grassos en els diferents compartiments mitocondrials, així doncs, la tipus I ho fa a través de la membrana externa i la tipus II a través de la membrana interna. Ambdós isotipus estan regulats per PPAR α a través d'un PPRE funcional (Brandt *et al*, 1998; Mascaro *et al*, 1998).

Els àcids grassos *per se* són molècules inactives que no poden ser metabolitzades sense passar obligatòriament a la seva forma activa com a acil-CoA. Aquest acte es pot donar en diverses localitzacions intracel·lulars sota el control de diverses Acil-CoA sintetases, la transcripció de les quals està controlada per el PPAR α i PPAR γ de manera teixit específica (Martin *et al*, 1997; Schoonjans *et al*, 1995).

El PPAR α també controla l'expressió dels gens involucrats en la β -oxidació en la mitocondria. Els gens de les “*short-, medium-, long- i very long chain acyl-CoA dehidrogenase*” codifiquen per quatre enzims diferents específics per la longitud de la cadena d'àcid gras que catalitzen, que és la primera etapa de la β -oxidació dels àcids grassos en la mitocondria. S'ha trobat per tots aquests gens una regulació basal dependent de PPAR α , tot i que fins ara només s'ha trobat un PPRE funcional en el gen de la MCAD (*medium-chain acyl-CoA dehidrogenase*) (Gulick *et al*, 1994).

La ω -hidroxilació és un procés que ocorre exclusivament en el reticle endoplasmàtic llis i representa la via menor del catabolisme dels àcids grassos en fetge sota condicions basals; en canvi en condicions fisiopatològiques com són la diabetis melitus o el dejú, la ω -hidroxilació augmenta i està governada per la subfamília dels citocroms P450 4A, 4B i 4F expressats

constitutivament en el ronyó i el fetge (Johnson *et al*, 1995). El PPAR α regula a l'alça l'expressió d'aquests citocroms en rosegadors a través o no d'un PPRE funcional (Aldridge *et al*, 1995; Kroetz *et al*, 1998).

El PPAR α , juga un paper important com a regulador i coordinador de l'oxidació dels àcids grassos en el peroxisoma, la mitocòndria i els microsomes; paper que exerceix d'una manera molt eficient.

El PPAR α juga un paper important en la cetogènesi. Durant un dejú prolongat, la síntesi de cossos cetònics en el fetge augmenta, en concert amb un increment en l'oxidació dels àcids grassos. El primer pas en la cetogènesi està catalitzat per la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (mHMG-CoAS) que condensa l'acetil-CoA i l'acetoacetil-CoA en la mitocòndria per formar HMG-CoA i CoA lliure. Es va identificar un PPRE funcional en el promotor d'aquest enzim a més, ocorre un altre fet destacat entre PPAR α i la mHMG-CoA sintasa, ja que les dos proteïnes interaccionen físicament potenciant la transcripció de la mHMG-CoA sintasa, es creu doncs que podria estimular la seva pròpia transcripció actuant com a coactivador de PPAR α (Meertens *et al*, 1998).

S'han identificat alguns gens implicats en la lipogènesi hepàtica que també són diana de PPAR α ; per exemple l'enzim màlic, conegut també com a malat NADP oxidoreductasa, catalitza la decarboxilació oxidativa del malat a piruvat generant NADPH que es requereix per la biosíntesi dels àcids grassos; aquest enzim presenta un PPRE en el seu promotor que respon als fibrats (Castelein *et al*, 1994).

A part de la importància del PPAR α en la regulació del metabolisme lipídic en general, també exerceixen la seva influència sobre molts altres gens implicats en altres processos biològics, com per exemple en el metabolisme de la glucosa, el gen piruvat dehidrogenasa quinasa 4 (PDK4) implicat en la glicòlisi s'ha identificat com a gen diana per a PPAR α en el cor, el ronyó i el múscul esquelètic (Sugden *et al*, 2001; Holness *et al*, 2002). Trobem a PPAR α implicat en el metabolisme dels aminoàcids, en els processos inflamatoris, en el cicle cel·lular i en l'eliminació

Taula 8. Gens regulats per PPAR α

Gen	Funció	Referència
Fetge		
ABCA-1/5/8	Transport del colesterol	Kok <i>et al</i> , 2001
Alanina aminotransferasa	Metabolisme dels aminoàcids	Edgar <i>et al</i> , 1998
Apolipoproteïna -AI/IV	Metabolisme de l'HDL	Yamazaki <i>et al</i> , 2002
Arginasa	Metabolisme dels aminoàcids	Kersten <i>et al</i> , 2001
11- β -HSD 1	Metabolisme dels esteroides	Yamazaki <i>et al</i> , 2002
c-myc	Cicle cel·lular	Anderson <i>et al</i> , 2002
Ciclina D1	"	"
CYP2C11	Hidroxilasa d'esteroides	Corton <i>et al</i> , 1998
CYP27A1	Metabolisme del colesterol	Post <i>et al</i> , 2001
Glutaminasa	Metabolisme dels aminoàcids	Kersten <i>et al</i> , 2001
Interleukina-6	Imflamació vascular	Anderson <i>et al</i> , 2002
I κ B α	Imflamació/Apoptosi	Delerive <i>et al</i> , 2002
Ronyó		
17- β -HSD IV	Metabolisme dels esteroides	Fan <i>et al</i> , 1998
PDK4 (<i>Pyruvate dehydrogenase kinase isoform-4</i>)	Oxidació de la glucosa	Sugden <i>et al</i> , 2001

El llistat de gens regulats per PPAR α en fetge és molt més ampli, aquí únicament es mostra una petita representació d'alguns gens implicats en alguns dels processos biològics diferents al metabolisme lipídic.

Adaptat i modificat de: Mandar *et al*, 2004.

de toxines, drogues i molts altres tipus de xenobiòtics. En la taula 8 es mostra una representació molt resumida d'alguns dels gens regulats per PPAR α implicats en els processos biològics descrits anteriorment, en el fetge i en el ronyó.

3.5.7 PPAR β/δ

El cDNA de PPAR β/δ humà es va clonar al voltant del 1990, seguidament es van clonar el de ratolí i el de rata (Schmidt *et al*, 1992; Kliewer *et al*, 1994; Mukherjee *et al*, 1994); és el més ubíquo a nivell d'expressió de les tres isoformes tot i que es troba en nivells d'expressió relativament alts en el cervell, el teixit adipós i la pell (Braissants *et al*, 1996; Amri *et al*, 1995). No s'ha identificat encara una funció biològica clara. S'ha vist però, que pot ser activat per alguns àcids grassos insaturats de cadena llarga i alguns prostanoides per tant se suposa que jugaria un paper en el metabolisme lipídic. El ratolí deficient en PPAR β/δ redueix l'emmagatzematge lipídic en el teixit adipós efecte relacionat amb l'alteració en l'intercanvi d'àcids grassos i l'increment de la lipòlisi (Peters *et al*, 2000).

S'ha descrit recentment un lligant sintètic exclusiu per PPAR β/δ que l'activa, anomenat L-16504, és capaç d'augmentar el colesterol en plasma en ratolins genèticament diabètics, suggerint l'ús d'aquest lligant per un benefici potencial en el tractament de l'enfermetat cardiovascular arterioscleròtica (Elbrecht *et al*, 1999).

4. LA MITOCÒNDRIA

4.1 Introducció

La mitocòndria ocupa una porció important dintre del volum citoplasmàtic de les cèl·lules eucariotes i ha estat essencial en l'evolució dels complexos animals. Sense la mitocòndria les cèl·lules animals haurien de dependre de la glicòlisi anaeròbica per obtenir el seu ATP. En la mitocòndria el metabolisme dels sucres és completa; el piruvat és importat dintre la mitocòndria, és oxidat per la molècula d'O₂ per donar CO₂ i H₂O; essent el sistema altament eficient ja que unes 36 molècules d'ATP són produïdes per cada molècula de glucosa que és oxidada, mentre que la glucòlisi, per sí mateixa, només produiria 2 molècules d'ATP.

En les mitocòndries la major part de l'energia s'utilitza per la conversió química d'ADP i P_i en ATP, però una gran part d'ella impulsa el transport de metabòlits específics dintre i fora de l'organel·la.

Està generalment acceptat que els orgànuls transformadors d'energia dels eucariotes -mitocòndries i cloroplasts- evolucionaren directament a partir de procariotes, que van ser capturats per cèl·lules eucariotes primitives i, que van desenvolupar una relació simbiòtica amb elles. Això explicaria perquè contenen el seu propi DNA, tot i que els aproximadament mil milions d'anys transcorreguts des que aparegueren les primeres cèl·lules eucariotes, les mitocòndries i els cloroplasts han perdut part del seu genoma depenent de proteïnes codificades pel genoma nuclear. De manera recíproca, ara la cèl·lula hoste depen d'aquests orgànuls per obtenir ATP necessari per portar a terme el treball constant de biosíntesi, bombeig d'ions i soluts i el mobi-

ment, que les manté vives.

La mitocòndria es representa sovint com a un cilindre allargat i rígid, presenta un diàmetre de 0.5 a 1 μM , semblant a un bacteri. En canvi la microcinematografia de cèl·lules vives, presenta unes mitocòndries remarcablement mòbils i plàstiques, canviant constantment la seva forma, fusionant-se amb altres mitocòndries i separant-se un altre cop. La mitocòndria es mou pel citoplasma i sovint apareix associada als microtúbuls, els quals determinen la única orientació i distribució de les mitocòndries en el citoplasma dels diferents tipus cel·lulars. Per tant en algunes cèl·lules les mitocòndries formen filaments llargs en moviment continu, i en d'altres cèl·lules permaneixen fixes en una posició proveint d'ATP directament a un lloc concret amb necessitat de molta energia, per exemple, adjacent a les miofibril·les en les cèl·lules del múscul cardíac, o densament agrupades al voltant del flagel en un espermatozou.

4.2 Estructura de les Mitocòndries

La mitocòndria està formada per dos membranes amb activitats molt especialitzades que juguen un paper crucial. Cada una de les dos bicapes lipídiques conté una colecció de proteïnes única; ambdues membranes rodegen i defineixen dos compartiments mitocondrials separats: la matriu mitocondrial i, un espai intermembranós més estret; veure figura 10.

En el fetge s'estima que un 67% del total de la proteïna mitocondrial està localitzada en la matriu, un 21% en la membrana mitocondrial interna, un 6% en la membrana mitocondrial externa i un 6% en l'espai intermembranós. Cada una d'aquestes quatre regions conté un conjunt diferent de proteïnes, específicament adaptades a les seves funcions.

La matriu mitocondrial conté una barreja altament concentrada de centenars d'enzims diferents, inclosos els necessaris per l'oxidació del piruvat i dels àcids grassos i, pel cicle de l'àcid cítric. També conté diverses còpies idèntiques del genoma de DNA mitocondrial, ribosomes mitocondrials especials -els mitorribosomes-, tRNAs i varis enzims necessaris per l'expressió gènica.

La membrana mitocondrial interna, està plegada en nombroses crestes que augmenten la seva superfície total essent quasi cinc vegades superior a l'àrea de la membrana mitocondrial externa i constitueix aproximadament un terç del de la membrana total de la cèl·lula.

El nombre de crestes varia segons el tipus cel·lular per exemple, el nombre de crestes és

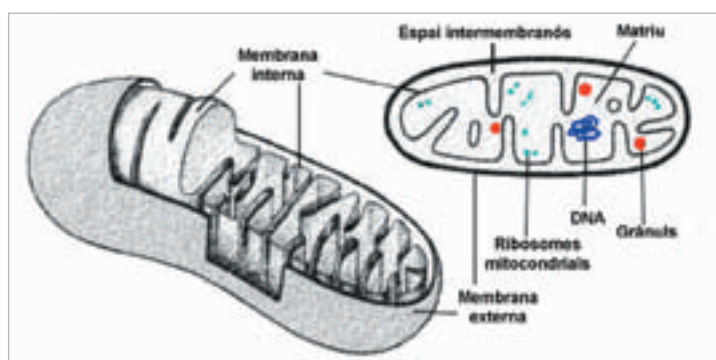


Fig. 10. Organització general d'una mitocòndria.

Cada una d'aquestes quatre regions conté un conjunt diferent de proteïnes, específicament adaptades a les seves funcions.

tres vegades superior en la mitocondria d'una cèl·lula de múscul cardíac que en la mitocondria d'una cèl·lula hepàtica, això reflexa possiblement una major demanda d'ATP en el teixit cardíac. Les crestes mitocondrials de diferents tipus cel·lulars mostren també diferències morfològiques patents, el significat de les quals es desconeix.

La membrana mitocondrial interna conté tres tipus principals de proteïnes; les que catalitzen les reaccions d'oxidació de la cadena respiratòria; un complex enzimàtic denominat ATP sintetasa que catalitza la producció d'ATP en la matriu i, unes proteïnes específiques de transport que regulen el pas de metabòlits cap a la matriu i cap a l'exterior. Entre els trets especialitzadors de la membrana mitocondrial interna es troba una proporció anormalment elevada de cardiolipina, fosfolípid que constitueix més del 10% del contingut lipídic de la membrana i que possiblement contribueix a que sigui extraordinàriament impermeable als ions.

L'espai intermembranós, conté varis enzims que utilitzen l'ATP que surt de la matriu per fosforilar altres nucleòtids.

La membrana mitocondrial externa, degut a que conté grans proteïnes formadores de canals, és permeable a totes les molècules de 10.000 Da o menys. Entre les proteïnes d'aquesta membrana es troben a més els enzims que catalitzen la transformació dels substractes lípidics en compostos.

4.3 Transport de les Proteïnes dins la Mitocondria

Tot i que la mitocondria conté el seu propi DNA, ribosomes i tota la maquinària necessària per la síntesi de proteïnes, moltes d'elles contingudes en la mitocondria, són codificades en el nucli cel·lular i importades des del citosol. Per tant aquestes proteïnes han de ser transportades successivament a través de les diferents membranes mitocondrials i finalment ubicades en el seu lloc apropiat. L'import de les proteïnes dins la mitocondria és el procés central en la biogènesi mitocondrial. Els estudis realitzats al llarg de la passada dècada han revelat que aquest procés està mediat per un sistema cel·lular molt elaborat que consisteix en components del citosol, de les membranes mitocondrials i dels compartiments aquosos de la mitocondria.

La missió d'aquest sistema és seleccionar un conjunt de proteïnes cel·lulars -entre 10-20%-destinades a la mitocondria i facilitar el seu pas del citosol a la mitocondria.

Les proteïnes importades dins la matriu mitocondrial són normalment segrestades del citosol en un minut o dos, o mentre estan sintetitzant-se en el poliribosoma. Les proteïnes precursors contenen un pèptid senyal d'entre 20-80 residus en posició N-terminal que es trenca ràpidament un cop dins la matriu per una proteasa (*signal peptidase*), inclús abans que hagi passat la proteïna complerta.

Experiments de genètica molecular reduïnt progressivament el pèptid senyal, han mostrat que una proteïna mitocondrial amb tants sols 12 aminoàcids en la seva posició N-terminal és suficient per ser transportada dins la mitocondria. Estudis físics realitzats amb la llargada complerta del pèptid senyal suggereixen que poden formar estructures alfa-helix amfipàtiques, on els residus amb càrrega positiva són alineats en un cantó de l'helix, mentres que els residus hidrofòbics sense càrrega es troben alineats de manera oposada en la mateixa hèlix (Alberts *et al*, 2002), veure figura 11. Aquesta configuració és reconeguda per receptors específics en la superfície de la mitocondria (Hoogenraad *et al*, 2002).

És necessari per la translocació de la proteïna a la mitocondria que el precursor estigui en

una conformació no plegada o estesa, per tant es necessari tot un conjunt de components citosòlics associats a les proteïnes precursorres que facilitin aquest fenomen, essent en la seva majoria chaperones i cochaperones que alhora són dianes per components receptors en la superfície mitocondrial (Hoogenraad *et al*, 2002).

La isoforma de la chaperona citosòlica Hsp70 (en llevats) o Hsc70 (en mamífers) és l'encarregada de mantindre a la proteïna precursora mitocondrial en un estat competent per ésser transportada (Sheffield *et al*, 1990). Es postula que la presència de la seqüència N-terminal en les proteïnes precursorres recent sintetitzades podria prevenir el seu plegament i prolongar l'associació de la proteïna a la chaperona Hsc70 (Lain *et al*, 1995). Un fracció petita de la Hsc70 està associada fortament amb la membrana externa mitocondrial, suggerint que hi pot haver un mecanisme d'anclatge de la Hsc70 per entregar els precursors protèics als receptors mitocondrials (Lithgow *et al*, 1993). L'Hsc70 realitza la seva funció com a chaperona en associació amb altres cochaperones com la DnaJ i les seves isoformes dj2 i dj3 i la GrpE (Hohfeld *et al*, 1997; Kanazawa *et al*, 1997; Terada *et al*, 1997; Terada *et al*, 2000).

La Hsc70 juga un paper important en l'import de les proteïnes mitocondrials, però no és essencial per l'entrega de tots els precursors a la mitocondria (Terada *et al*, 1996). Altres factors citosòlics hi estan implicats com per exemple, la proteïna PBF (*presequence binding factor*), una proteïna de 28 kDa que presenta afinitat pel pèptid senyal; o la proteïna MSF (*mitochondrial import stimulation factor*), un heterodímer de 66-kDa, aïllada a partir de fetge de rata (Murakami *et al* 1990, Murakami *et al* 1992).

Estudis realitzats en mitocondries de llevat, s'ha vist que la MSF entrega les proteïnes precursorres al receptor Tom70, i d'aquí poden passar als receptors Tom20 i Tom22 abans de ser translocades a través de la membrana externa (Hachiya *et al*, 1995; Komiyama *et al*, 1997).

El sistema TOM en mamífers

Els components translocadors de la membrana mitocondrial externa (TOM) inclouen els receptors Tom20, Tom22, Tom70 i la proteïna canal Tom40. Experiments de coimmunoprecipitació amb anticossos de Tom40 han identificat un nombre de proteïnes de pes molecular petit -de 10, 7.5 i 5kDa- que presenten homologia amb els Tom7, Tom6 i Tom5 de llevat.

La primera subunitat Tom identificada en humans va ser Tom20, presenta un pes molecular de 16.3kDa, la seva regió N-terminal es troba ancorada a la membrana formant un domini transmembrana hidrofòbic i presenta un domini receptor citosòlic de 13 kDa. S'ha comprovat que anticossos contra el domini soluble del receptor Tom20 humà inhibeixen l'import de les proteïnes mitocondrials *in vitro* (Seki *et al*, 1995; Gopichandran *et al*, 1995, Hanson *et al*, 1996).

Estudis estructurals per RMN revelen que la interacció entre Tom20 i el precursor protèic es dona entre la cara hidrofòbica del pèptid senyal anfipàtic de la proteïna precursora i un solc format per la unió de tres helix- α de Tom20 (Murakami *et al*, 1990). Treballs recents, mostren que la sobreexpressió de Tom20 humana en cèl·lules de mamífer causa una major disrupció en la morfologia i distribució de les mitocondries; resultant en una agregació perinuclear de



Fig.11. Seqüència de translocació a la mitocondria. Els primers 18 aminoàcids de la Citocrom oxidasa formen la seqüència de translocació de l'enzim a la mitocondria; quan el pèptid senyal es plega forma un α -helix on els residus positius (*en vermell*) es situen en el mateix cantó de l'hèlix, mentre que els residus apolars (*en groc*) es troben en el cantó oposat. Els pèptids senyals dels precursors protèics de la matriu mitocondrial sempre tenen el potencial de formar aquesta α -helix anfipàtica, que és reconeguda per una proteïna receptora específica, situada en la superfície mitocondrial. Alberts *et al*, TextBook *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York 2002.

les mitocondries (Yano *et al*, 1997). Aquest fet suggereix que Tom20 pot estar implicat en l'associació de la mitocondria amb el citoesquelet de les cèl·lules de mamífer i que el trastorn en l'estequiometria dels components Tom, interrompeix aquesta associació.

Els receptors Tom70 i Tom22 de mamífers també van ser identificats. El receptor Tom70 de llevat no roman associat al cor del complex Tom, en canvi Tom22 està fortament unit a Tom40 formant un complex entre 380 i 400 kDa. Tom20 de mamífer tampoc es troba directament associat al complex Tom en canvi si lleugerament lligat a Tom22 (Yano *et al*, 2000; Suzuki *et al*, 2000).

Tom22 conté un domini C-terminal intermembrana i un domini receptor N-terminal citosòlic fortament acídic, que interacciona amb les proteïnes precursors mitocondrials. Degut a aquesta "cadena acídica" es postula la hipòtesi de l'existència d'una via que implica la interacció electrostàtica que incrementa l'afinitat entre el pèptid senyal bàsic dels precursors amb destí la membrana mitocondrial interna i externa, i el domini àcidic del receptor (Yano *et al*, 2000).

Recentment s'han identificat Tom40 de rata i humà homòlegs al de llevat; Tom40 és la subunitat formadora del porus dins el complex TOM. En particular, la proteïna Tom40 purificada i reconstituïda exhibeix un lloc d'unió específic per les preseqüències mitocondrials (Suzuki *et al*, 2000; Abdul *et al*, 2000).

Tom40 presenta força similitud amb les porines que es troben en la membrana mitocondrial externa, el porus està format per un elevat nombre de estructures β formant un diàmetre d'aproximadament 20-22 Å (Suzuki *et al*, 2000).

Existeixen d'altres proteïnes associades a la membrana externa mitocondrial que també estan implicades en l'import de les proteïnes. Una d'elles és la metaxina que presenta homologia amb Tom37 del llevat. Tom37 està associada a Tom70 facilitant l'import mitocondrial (Gratzer *et al*, 1995). OM37 és una proteïna de la membrana externa mitocondrial de 37kDa identificada a partir de cèl·lules de mamífer, anticossos contra la proteïna inhibeixen l'import protèic a la mitocondria (Komiya *et al*, 1996). Tom34 parcialment homologa a Tom70 es troba en part associada al citosol i a la membrana externa mitocondrial, com una proteïna de membrana perifèrica (Nuttal *et al*, 1997; Chewawiwat *et al*, 1999).

El sistema TIM en mamífers

A diferència de la membrana externa mitocondrial que conté un sistema translocasa (TOM), la membrana interna conté dos components translocases TIM, incloent un conjunt petit de proteïnes TIM en l'espai intermembrana; el complex TIM23 i el complex TIM22.

EL complex TIM23 conté les subunitats Tim23, Tim17 i Tim44 implicats en l'import d'aquelles proteïnes precursors que contenen el típic pèptid senyal en posició N-terminal; inclou les proteïnes de la matriu mitocondrial i algunes proteïnes amb pèptids senyals hidrofòbics amb informació d'aturada en la membrana interna de la mitocondria (Pfanner *et al*, 2000).

La subunitat Tim44 de mamífer es va identificar perquè es trobava sobreexpressat en ratolins nounats diabètics en un increment fins a cinc cops respecte als normals (Wada *et al*, 1998). L'elevada concentració de glucosa que es dona en la diabetis augmenta l'expressió de Tim44, això faria que l'import d'enzims mitocondrials involucrats en fosforilació oxidativa codificats en el nucli fos més eficient.

El complex TIM22 en llevats està implicat en l'import de proteïnes integrals de membrana interna, com els transportadors de metabòlits. El complex TIM22 consisteix en tres subunitats

integrals de membrana, Tim22, Tim54 i Tim18, seguits d'un nombre de petits Tims que representen una nova família de proteïnes que contenen motius conservats de 4 cisteïnes formant un dit de zenc (Sirrenberg *et al*, 1998). Moltes d'aquestes actuen com a chaperones que porten les proteïnes precursors del complex Tom a través de l'espai intermembrana fins al complexe TIM22.

S'han pogut aïllar alguns dels homòlegs en mamífers d'aquestes proteïnes Tim; s'inclou el Tim22 humà així com nombroses proteïnes Tim petites -Tim8a (DDP1), Tim8b (DDP2), Tim9, Tim10a, Tim10b i Tim13- que juguen un paper molt similar al que fan en el llevat (Koehler *et al*, 1999; Bauer *et al*, 1999; Rothbauer *et al*, 2001).

En la figura 12 es representa de manera esquemàtica el transport d'una preproteïna dins la mitocondria mitjançant els sistemes TOM i TIM.

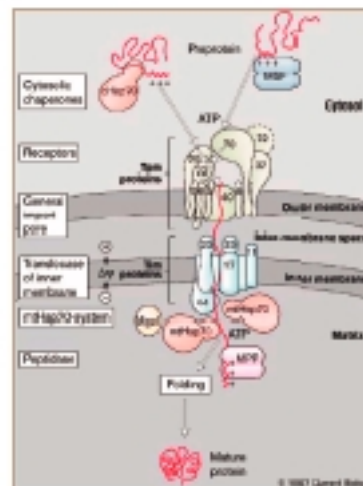


Fig. 12. Model esquemàtic de la translocació de la preproteïna a través de la membrana mitocondrial. Una preproteïna mitocondrial sintetitzada en el citosol amb una seqüència senyal carregada positivament s'uneix a chaperones citosòliques com Hsp70 o MSF que s'encarreguen de portar la preproteïna fins al complex de receptors TOM. La translocació de la preproteïna a través de la membrana mitocondrial interna requereix del sistema TIM. A mesura que la preproteïna va entrant interacciona amb diverses chaperones mitocondrials com la mtHsp70 que amb l'ajuda de l'ATP formaran el motor conductor en el transport. La MPP (*mitochondrial processing peptidase*) s'encarrega de trencar el pèptid senyal. La proteïna translocada finalment es plegarà correctament gràcies a l'assistència de diverses chaperones de la matriu mitocondrial. Adaptat de: Pfanner N and Meijer M, *Current Biology* 7:R100-R103, 1997.

4.3.1 Processament, Plegament de les Proteïnes Importades a la Mitocondria

S'han identificat un bon nombre de factors implicats en el processament, plegament i ensamblatge de les proteïnes importades dins la mitocondria. La isoforma mitocondrial de la Hsp70 funciona conjuntament amb Tim44 i la chaperona GrpE mitocondrial com un motor translocador. Aquestes proteïnes i el mecanisme pel qual actuen està molt ben caracteritzat en llevats, tot i que s'han identificat molts dels homòlegs en mamífer (Mizzen *et al*, 1989; Naylor *et al*, 1995; Ishihara *et al*, 1998; Bauer *et al*, 1999).

Hsp70 coopera amb les cochaperones mtGrpE i mtDnaJ en el plegament de les proteïnes en mamífer (Syken *et al*, 1999). Un cop en la matriu mitocondrial les proteïnes precursors perden el pèptid senyal o preseqüències, processades normalment per algunes peptidases. Aquestes proteases es van identificar per primer cop en teixits de rata; la MPP (*mitochondrial processing peptidase*) és una metaloproteasa que típicament requereix residus d'arginina com a punt de tall i la MIP (*mitochondrial intermediate peptidase*), metaloproteasa de zenc que reconeix octapèptids aminoterminals com a senyal de tall (Mori *et al*, 1980; Ou *et al*, 1989; Nüdome *et al*, 1994; Ogishima *et al*, 1995; Kalousek *et al*, 1992).

Un cop processada la proteïna ha de ser plegada, això es dona lloc gràcies a la feina de

tot un conjunt de proteïnes chaperones; entre elles es troba la Hsp70 (Ryan *et al*, 1994), la Hsp60 aïllada a partir de cèl·lules humanes (Jindal *et al*, 1989) i la Cpn10 purificada de fetge de rata (Hartman *et al*, 1992). Hi ha, però, poca informació de com contribueix la maquinària de les chaperones en el plegament de les noves proteïnes importades a la matriu mitocondrial en mamífers.

4.3.2 Regulació de l'Import i la Comuniació Nucli-Mitocòndria

La biogènesi mitocondrial ha d'estar sota una forma de control, un procés que presumiblement requereix una comunicació interorganel·la. Molts dels gens que regulen la funció de la mitocòndria es troben localitzats en el nucli, per tant aquesta comunicació ha de ser molt efectiva.

En les cèl·lules de mamífer, s'ha presentat una possible via de senyalització basada en l'alliberació de calci per part de la mitocòndria via la c1-Jun N-terminal quinasa (Biswas *et al*, 1999). Aquesta senyalització ocorre en resposta a la delecció parcial del mtDNA i l'estrès metabòlic causat pels inhibidors de la fosforilació oxidativa mitocondrial (Amuthan *et al*, 2001).

Es coneix molt poc sobre la regulació de l'expressió dels gens nuclears que codifiquen per les subunitats implicades en l'import mitocondrial. Mentre que els gens del TIM estan constitutivament expressats, sembla que l'expressió del gen que codifica per la Tom70 humana està, a més a més, regulada per l'hormona tiroïdea (Iwahashi *et al*, 1997). El tractament amb l'hormona tiroïdea resulta en l'increment del volum de les crestes mitocondrials i del volum mitocondrial en cèl·lules cardíques, mentre que l'hipertiroïdisme porta a un increment en la concentració del contingut proteïc mitocondrial (McCallister *et al*, 1973; Nishiki *et al*, 1978).

L'anàlisi de mitocòndries de cèl·lules tractades amb l'hormona tiroïdea presenten un increment en la quantitat de Tom20 i mtHsp70 seguit d'un increment en la velocitat d'importació de les proteïnes a la matriu mitocondrial (Craig *et al*, 1998). Aquest fet suggeriria que podria ser la pròpia cèl·lula la que regularia l'expressió de l'aparell d'importació de la mitocòndria segons les seves necessitats metabòliques.

4.4 Metabolisme Mitocondrial

En una visió de conjunt del procés de generació d'energia a partir de l'oxidació dels aliments en els organismes superiors es podria descriure segons Hans Krebs en tres etapes. En una primera etapa, les grans molècules dels aliments són fragmentades en unitats més petites; aminoàcids, sucres com la glucosa, el glicerol i els àcids grassos. En una segona etapa, aquestes molècules petites es degraden fins a unes poques unitats simples que juguen un paper important en el metabolisme, convertint-se moltes d'elles en un fragment acetil de l'acetil-CoA.

La tercera etapa consta del cicle de l'àcid cítric i la fosforilació oxidativa, l'acetil-CoA aporta fragments acetil a aquest cicle, on són completament oxidats fins a CO₂. Amb la fosforilació oxidativa s'obté ATP i H₂O. Més del 90% de l'ATP que es genera per la degradació dels aliments es forma en aquesta tercera etapa.

Està clar doncs que el metabolisme està format per una complexa xarxa d'infinat de reaccions independents que ha d'estar estrictament regulada i alhora ser flexible davant de qualsevol canvi extern. Existeixen tres punts concrets en la regulació metabòlica que són, la quantitat de

cada enzim, la seva activitat catalítica i, l'accessibilitat dels substractes. En la majoria dels enzims el seu nivell està controlat, en primera instància, mitjançant un canvi en la velocitat de transcripció del gen que el codifica. La transferència d'un substrate d'un compartiment a un altre de la cèl·lula també serveix com a mecanisme de control.

Un principi general del metabolisme és que les vies biosintètiques i les degradatives són generalment diferents, en els eucariotes es facilita augmentant la compartimentació, per exemple l'oxidació dels àcids grassos es produeix a la mitocondria, mentre que la síntesi es dona en el citosol.

4.4.1 Oxidació dels Àcids Grassos

En 1904 Franz Knoop va deduir que els àcids grassos eren degradats per oxidació en el carboni β i, en 1949 Eugene Kennedy i Albert Lehninger demostraren que aquests s'oxidaven en la mitocondria.

Activació dels Àcids Grassos

Treballs posteriors demostraren que els àcids grassos s'activaven abans d'entrar a la matriu mitocondrial. L'activació d'un àcid gras es dona per la unió d'un grup CoA a la cadena hidrocarbonada. Aquesta reacció impulsa l'ATP formant-se un enllaç tioèster entre el grup carboxílic de l'àcid gras i el grup sulfhidril del CoA. En el cas dels àcids grassos de cadena llarga aquest fet es dona en la membrana externa mitocondrial i, està catalitzada per l'enzim *Acil-CoA sintetasa*.

Paul Berg, va demostrar que l'activació d'un àcid gras té lloc en dos etapes. Primer, l'àcid gras reacciona amb l'ATP per formar un aciladenilat. En aquest anhidre mixte, el grup carboxilo d'un àcid gras està enllaçat al grup fosforil de l'AMP. Els altres dos grups fosforil de l'ATP substrate s'alliberen com a pirofosfat. El grup sulfhidril del CoA ataca l'aciladenilat que es troba fortament unit a l'enzim, per formar acil-CoA i AMP, veure figura 13.

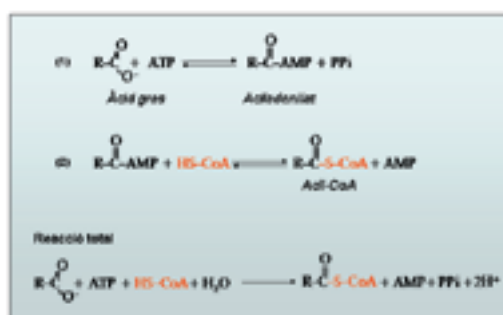


Fig 13. Reacció d'activació d'un àcid gras. Aquesta reacció es dona en dos etapes, 1) l'àcid gras reacciona amb l'ATP per formar un aciladenilat, 2) el grup sulfhidril del CoA ataca l'aciladenilat per formar un acil-CoA i AMP. El resultat és que es trenca un enllaç d'elevada energia (entre el P_{PPi} i l'AMP) i es forma un altre equivalent (enllaç tioèster de l'acil-CoA). Strayer *et al*, Textbook Biochemistry 4 art ed Reverté, 1995

Els enzims **Acil-CoA sintetases** són crucials en el metabolisme dels àcids grassos, faciliten i permeten el metabolisme intracel·lular dels lípids. Aquests enzims catalitzen la primera etapa

del metabolisme dels àcids grassos convertint els àcids grassos inactius en derivats acil-CoA. Un cop activats, aquests intermediaris poden ser utilitzats en les dos vies metabòliques, tant la via catabòlica, la β -oxidació, com l'anabòlica convertint els àcids grassos en lípids cel·lulars.

S'han identificat molts enzims acil-coenzima A sintetasa diferents, segons la seva especificitat de substrate. Es coneixen doncs, les acil-CoA sintetases per àcids grassos de cadena llarga (les *Long-chain acyl-CoA synthetase*), són proteïnes que es troben en la membrana externa mitocondrial, essent una proteïna transmembrana amb un domini d'unió al grup CoA en la cara citosòlica, són els enzims d'aquesta família més ben caracteritzats i; les acil-CoA sintetases per àcids grassos de cadena mitja i curta (les *Medium-chain Acyl-CoA synthetase* i les *Short-chain Acyl-CoA synthetase*) que es troben en la matriu mitocondrial i de les que es coneix molt poc.

Acil-CoA Sintetases per Àcids Grassos de Cadena Mitja (Medium-chain Acyl-CoA synthetase)

Les *medium-chain acyl-CoA synthetase* (MACS) mitocondrials es van identificar com a enzims encarregats de catalitzar la primera reacció de conjugació de la glicina i de molts compostos xenobiòtics (Kasuya *et al*, 1996), tot i que de seguida se li van atribuir com a substractes quantitat d'àcids grassos de cadena mitja, que podien venir de la dieta o com a productes resultants de l'oxidació dels àcids grassos de cadena llarga o molt llarga en els peroxisomes.

Es coneix molt poc sobre aquests enzims així com la importància bioquímica o fisiològica dels àcids grassos de cadena mitja, tot i que està molt ben caracteritzat l'enzim MCAD (*Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*) que catalitza el primer pas de la β -oxidació dels àcids grassos de cadena mitja en la mitocòndria.

Durant aquests darrers anys s'han identificat diversos MACS mitocondrials en diferents teixits de mamífers, entre ells es troben un MACS de fetge boví (Kasuya *et al*, 1998), aquest enzim presenta afinitat per varis substractes amb màxima activitat per l'àcid hexanoic, a més es va veure que no tant sols era específic per àcids grassos de cadena mitja no ramificats sinó també pels àcids aromàtics i els àcids arilacètics; presentava una elevada activitat per l'àcid benzoic amb grups metil, hetil i metoxi en posicions para- o meta- en l'anell benzènic. Van veure a més que l'àcid salicílic i els seus derivats actuaven com a potents inhibidors de l'activitat d'aquesta MACS.

Els mateixos autors un any més tard van identificar una altra MACS en ronyó de ratolí amb aproximadament les mateixes característiques que l'anterior, amb activitat específica per l'àcid hexanoic i l'àcid octanoic entre d'altres (Kasuya *et al*, 1999), veure figura 14.

S'han identificat MACS en mitocòndria de fetge humà (Vessey *et al*, 1999) i en l'epiteli olfactori de rata (Oka *et al*, 2003) encarregades d'activar àcids grassos de cadena mitja i curta així com diversos composts xenobiòtics. Malgrat tot no es coneix pràcticament res de la regulació

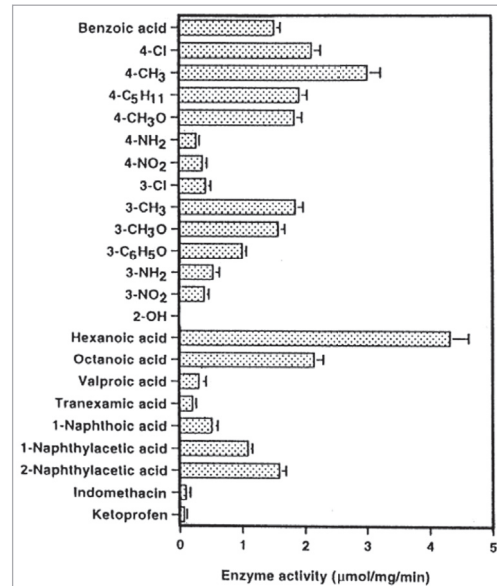


Fig 14. Especificitat de substrate per la *medium-chain acyl-CoA synthetase* mitocondrial de ronyó de ratolí (Kasuya F, et al, 1999)

d'aquests enzims. Es coneix però alguna cosa més dels seus substractes, els àcids grassos de cadena mitja.

En general és ben conegut que els àcids grassos o triglicèrids de cadena mitja (MCFA, *medium-chain fatty acids*) són molt diferents respecte als de cadena llarga (LCFA, *long-chain fatty acids*) en la seva absorció i metabolisme; els MCFA són absorbits i oxidats més ràpidament que els LCFA ja que no depenen del sistema de transport de la carnitina per entrar dins la mitocòndria a més tenen poca tendència a depositar-se com a greix corporal, encara que una dieta exclusiva de MCFA indueix a una deficiència en àcids grassos poliinsaturats essencials i provoca acidosi metabòlica (Geliebter *et al*, 1983; Metges *et al*, 1991; Schwabe *et al*, 1964; Pegorier *et al*, 1988; Crozier *et al*, 1988; Bach *et al*, 1996).

En aquests darrers anys s'ha intentat investigar l'efecte que exerceixen els MCFA en el teixit adipós tot i que l'emmagatzematge en l'adipòcit d'aquests àcids grassos és menys eficient que el dels LCFA; s'ha comprovat que l'alimentació amb triglicèrids de cadena mitja (MCT, *medium-chain triglycerides*) redueix el nombre i tamany dels adipòcits en ratolins i disminueix el volum de la massa de greix corporal en humans (Stubbs *et al*, 1998; Guo *et al*, 2000, Papamandjaris *et al*, 2000; Krotkiewski, 2001; St-Onge *et al*, 2003).

La línia cel·lular 3T3-L1 de preadipòcits tractada amb octanoat (carbohidrat de cadena mitja) acumula menys triglicèrids i presenta menys activitat de l'enzim glicerol-3-fosfat dehidrogenasa (GDPH) suggerint que l'octanoat podria inhibir la diferenciació adipocitària (Guo *et al*, 2000). Més tard es va demostrar que l'octanoat bloqueja la diferenciació de 3T3-L1 perquè inhibeix l'expressió de factors de transcripció adipogènics claus que inclouen, PPAR γ , C/EBP α i SREBP-1c. És especialment evident la reducció dels nivells de proteïna de PPAR γ en presència d'1mmol/L d'octanoat, bloquejant el pas de preadipòcit a adipòcit, diferenciació que pot ser restaurada amb un agonista sintètic de PPAR γ com el troglitazone (Han *et al*, 2002). Per una altra banda la sobreexpressió del subtipus PPAR γ 2 també restaura la diferenciació de les cèl·lules 3T3-L1 tractades amb octanoat.

L'activitat de l'enzim GDPH i, l'activitat de la leptina hormona adipòcit-específica, associada a l'increment de la massa de greix i la lipogènesi, es veuen dràsticament reduïdes en les cèl·lules 3T3-L1 en fase de diferenciació quan són tractades amb octanoat.

Els àcids grassos de cadena mitja no tant sols actuen a aquest nivell sinó que també afecten altres aspectes del metabolisme energètic, per exemple l'octanoat és capaç de suprimir l'oxidació de la glucosa i del palmitat endogen en cèl·lules 3T3-L1 (Guo *et al*, 2003), també suprimeix l'utilització del lactat en la síntesi lipídica. L'octanoat *down-regula* els nivells de mRNA d'alguns gens implicats en la síntesi de lípids com per exemple l'acil-CoA:1,2-diacilglicerol aciltransferasa (DGAT)i, l'acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Guo *et al*, 2003). Es creu que l'octanoil-CoA presenta certa afinitat per la DGAT de manera similiar a un CoA de cadena llarga, excercin una competència inhibidora per l'enzim.

Totes aquestes dades suporten la possibilitat que una dieta rica en MCTs podria ser una eina valiosa pel tractament de l'obesitat.

Entrada dels Àcids Grassos a la Mitocòndria

Donat que les molècules d'acil-CoA de cadena llarga no atravessen fàcilment la membrana mitocondrial interna, és necessari un mecanisme especial de transport. Els àcids grassos de ca-

dena llarga activats són transportats a través de la membrana interna conjugats amb la carnitina, un compost de caràcter zwitteriònic derivat de la lisina. El grup acil es transfereix desde l'àtom de sofre del CoA al grup hidroxil de la carnitina per formar acilcarnitina. Aquesta reacció està catalitzada per la *carnitina aciltransferasa I* localitzada en la cara citosòlica de la membrana interna mitocondrial.

La acilcarnitina actua com una llansadera a través de la membrana interna per l'acció d'una translocasa. El grup acil es transfereix a un CoA situat en la cara matriu d'aquesta membrana. Aquesta reacció està catalitzada per la *carnitina aciltransferasa II*, per últim, la carnitina torna al cantó citosòlic per la translocasa, intercanviant-se per una altra acilcarnitina que entra.

Els àcids grassos de cadena mitja i curta, però no necessiten d'aquest sistema per atravesar les membranes mitocondrials.

Via de la β -oxidació

Un cop a la mitocondria un acil-CoA saturat es degrada mitjançant una seqüència repetitiva de quatre reaccions: oxidació lligada a la flavina adenina dinucleòtid (FAD), hidratació, oxidació lligada a NAD^+ i tiòlisi per CoA. El resultat d'aquestes reaccions és l'escurçament de la cadena de l'àcid gras en dos àtoms de carboni generant-se FADH_2 , NADH i acetil-CoA.

David Green, Severo Ochoa i Feodor Lynen van contribuir de una forma molt important en la interpretació d'aquestes reaccions coneguda com a *via de la β -oxidació*, veure figura 15.

La primera reacció en cada cicle de degradació és l'oxidació de l'acil-CoA per una *Acil-CoA deshidrogenasa* per donar un enoil-CoA amb un doble enllaç *trans* entre els dos carbonis C_β i C_γ ; l'acceptor d'electrons és el FAD, en comptes del NAD^+ , degut a que l' ΔG d'aquesta reacció és insuficient per aconseguir la reducció del NAD^+ .

La següent etapa és la hidratació del doble enllaç entre C_β i C_γ per l'enzim *enoi-CoA hidratasa*, donant lloc a l'hidroxiacil-CoA que és oxidat per l'*hidroxil-CoA deshidrogenasa* convertint el grup hidroxil de C_γ en un grup ceto, generant-se NADH . L'etapa final és l'escissió

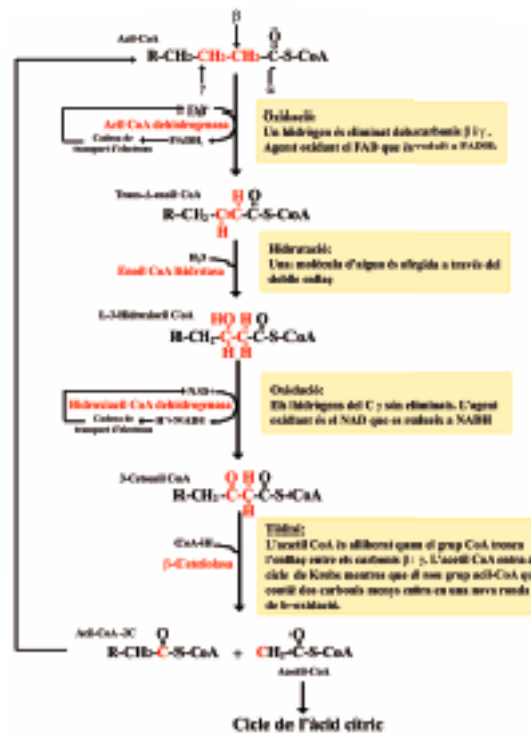


Fig 15. Via de la β -oxidació. Seqüència de reaccions en la degradació dels àcids grassos. Adaptat de Strayer *et al* TextBook Bioquímica Ed Reverte 4art ed 1995

del 3-cetoacil-CoA pel grup tiol d'una segona molècula de CoA, que produeix l'acetil-CoA i un acil-CoA amb dos àtoms de carboni menys. Aquesta esció tiolítica està catalitzada per la β -cetotiolasa. L'acil-CoA resultant experimenta després un altre cicle d'oxidació que s'inicia amb la reacció catalitzada per l'acil-CoA deshidrogenasa. Les cadenes d'àcids grassos que contenen de 12 a 18 àtoms de carboni són oxidades per les acil-CoA deshidrogenases de cadena llarga (LCAD, *long-chain acyl-CoA dehidrogenase*). L'acil-CoA deshidrogenasa de cadena mitja (MCAD, *medium-chain acyl-CoA dehidrogenase*) oxida als àcids grassos de 4 a 14 carbonis i l'acil-CoA deshidrogenasa (SCAD, *short-chain acyl-CoA dehidrogenase*) de cadena curta només actua sobre les cadenes de 4 a 6 carbonis. En canvi, la β -cetotiolasa, l'hidroxiacildeshidrogenasa i l'enoil-CoA hidratasa tenen una especificitat molt ampla respecte a la longitud del grup acil.

El cicle de l'àcid cítric, és la via final comú per l'oxidació de les molècules combustibles: aminoàcids, àcids grassos i sucres. La majoria de les molècules oxidables entren en el cicle com a acetil-CoA, aquesta unitat s'oxida completament fins a CO_2 per mitjà del cicle de l'àcid cítric també anomenat cicle dels àcids tricarbòxics o cicle de Krebs. Aquest cicle també suministra intermediaris per la biosíntesi. En eucariotes, les reaccions del cicle de l'àcid cítric es produeixen en la matriu mitocondrial.

Un model general del cicle es mostra en la figura 16. Un compost de quatre carbonis -oxalacetat- es condensa amb una unitat d'acetil de dos carbonis per donar lloc a un àcid tricarbòxic de sis carbonis -citrat-. Un isòmer del citrat es descarboxila donant lloc a un compost de cinc carbonis, l' α -cetoglutarat, que també es descarboxila oxidativament per produir un compost de quatre carbonis, el succinat. L'oxalacetat es regenera a partir del succinat. Per tant dos àtoms de carboni entren en el cicle com una unitat d'acetil i dos àtoms de carboni deixen el cicle en forma de dues molècules de CO_2 .

El grup acetil està més reduït que el CO_2 per tant és evident que han d'existir algunes reaccions d'oxidació-reducció en el cicle de l'àcid cítric. Es donen quatre reaccions d'aquest tipus; tres ions hidrur -sis electrons- són transferits a tres molècules de NAD^+ , mentre que un parell d'àtoms d'hidrogen -dos electrons- es transfereixen al FAD. Aquests transportadors d'electrons produeixen 9 molècules d'ATP quan són oxidats pel O_2 en la cadena de transport electrònic. A més es forma un enllaç fosfat d'elevada energia en cada volta del cicle de l'àcid cítric.

El NADH i el FADH_2 formats per la glicòlisi, per l'oxidació dels àcids grassos i en el cicle de l'àcid cítric són molècules riques en energia perquè contenen un parell d'electrons amb

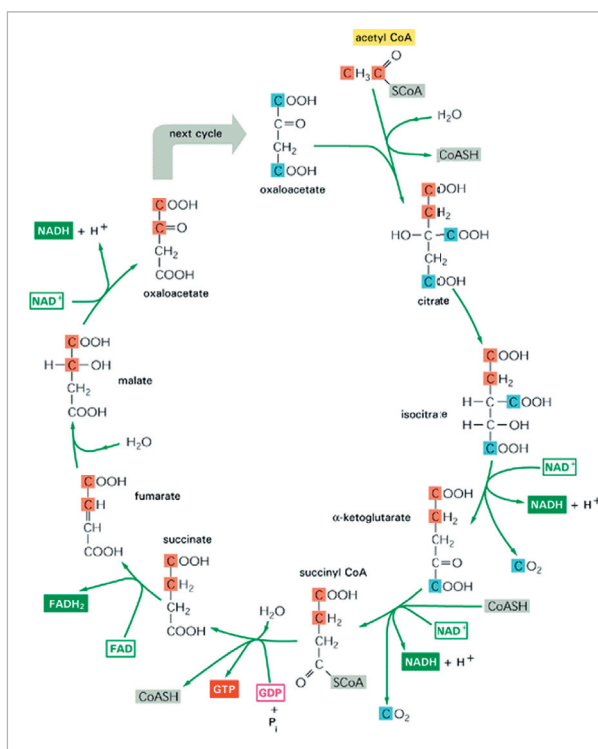


Fig 16. Cicle de l'àcid cítric. Alberts et al, TextBook Molecular Biology of the Cell 4th ed. New York, 2002

elevat potencial de transferència. Quan aquests electrons es transferèixen a l'oxigen molecular, es llibera una gran quantitat d'energia, que pot ser utilitzada per generar ATP. La **fosforilació oxidativa** és el procés pel qual es forma ATP com a resultat de la transferència dels electrons des del NADH o el FADH₂ a l'O₂ a través d'una sèrie de transportadors d'electrons. La fosforilació oxidativa té lloc en la membrana interna mitocondrial, al contrari que la major part de les reaccions del cicle de l'àcid cítric i de l'oxidació dels àcids grassos que té lloc en la matriu mitocondrial.

5. EL GEN S_A

5.1 Introducció

El gen S_A (*Subtractive clone A*) es va descriure per primera vegada en 1991 per Iwai i Inagami en un estudi d'hibridació diferencial amb el propòsit d'identificar gens que s'expressaven diferencialment en ronyons de rates genèticament hipertenses de la soca SHR (*spontaneously hypertensive rats*) i rates normotenses de la soca Wistar-Kyoto (WKY) (Iwai *et al*, 1991; Iwai *et al*, 1992; Iwai *et al*, 1992(2); Samani *et al*, 1993; Kaiser *et al*, 1994; Iwai *et al*, 1994; Samani *et al*, 1995). Per Northern blot van confirmar aquesta diferència ja que el mRNA de S_A estava expressat deu vegades més en les rates hipertenses que en les rates normotenses, a més l'administració de captopril un antihipertensiu a les rates SHR disminuïa l'expressió del gen tant en el fetge com en el ronyó (Iwai *et al*, 1991). Els mateixos autors van veure que en una altra soca de rates hipertenses com les rates Dahl salt-sensitive expressaven més el gen S_A que les rates Dahl salt-resistant (Harris *et al*, 1993).

S'han dut a terme molts estudis de cosegregació en diferents soques de rates per relacionar el genotip del gen S_A amb la pressió sanguínia. En treballs posteriors, alguns investigadors van mostrar que el locus del gen S_A cosegregava amb la pressió sanguínia i que estava localitzat en el *blood pressure quantitative trait locus (QTL)* en el cromosoma 1 de rata. A més, es va demostrar que un polimorfisme en el gen S_A i la seva expressió diferencial en ronyó de rata també cosegregava amb la pressió sanguínia (Lindpaintner *et al*, 1993). Es van portar a terme experiments amb rates congènites normotenses WKY, que portaven un fragment de QTL del cromosoma 1 de rates SHR, on es localitza el gen S_A, demostraren que aquestes rates mostraven una pressió sanguínia més elevada que les WKY que conservaven el seu cromosoma original (St Lezin *et al*, 1997; Frantz *et al*, 1998; Iwai *et al*, 1998).

El gen S_A esdevingué un molt bon candidat per l'estudi de la hipertensió, o al menys dels efectes que podria tenir aquesta regió del cromosoma 1 de rata en la pressió arterial, malgrat aquests resultats, treballs ulteriors amb la construcció de noves soques congènites utilitzant rates SHR i WKY van delimitar i definir molt més la regió QTL per la pressió sanguínia exclouent el gen S_A d'aquesta zona. Més tard, es va confirmar en les rates de la soca Dahl-salt sensitive que el gen S_A també quedava fora del QTL per la pressió sanguínia (Hübner *et al*, 1999; St Lezin *et al*, 2000; Clemitson *et al*, 2002).

Recentment, s'ha publicat la construcció i anàlisi d'un ratolí amb el gen S_A anul·lat; l'estratègia s'ha basat en eliminar els exons 2 i 3 del gen S_A, incloent l'inici de transcripció, codó

ATG, i els 65 primers aminoàcids de la proteïna. S'observa que es produeix un transcrit expressat en nivells menors comparats amb l'alel normal, però que no es produeix la proteïna S_A . Aquests animals presenten aparentment bona salut i no es veuen canvis obvis en el creixement i la conducta; tampoc es veu cap diferència en l'expressió testicular ni en la fertilitat així com en la supervivència dels fetus dels animals $S_A^{-/-}$ (Walsh *et al*, 2003). Utilitzant tècniques directes i indirectes per evaluar la pressió arterial van veure que la no presència de la proteïna S_A no tenia cap efecte sobre ella. L'absència de la proteïna S_A tampoc tenia cap conseqüència sobre els canvis en la pressió arterial deguda a canvis en l'homeòstasi del sodi, fenomen transcendent en el túbul proximal renal.

Els estudis de lligament entre polimorfismes del gen S_A i hipertensió en humans, han donat resultats contradictoris; mentre que en una població japonesa, un polimorfisme del gen està associat amb la hipertensió (Iwai *et al*, 1994), en tres poblacions occidentals no ho està (Nabika *et al*, 1995). En canvi, en estudis posteriors van veure que diferents alels del gen S_A estaven associats amb diferents factors com la hipertrigliceridèmia, la hipercolesterolèmia, l'obesitat i la hipertensió en humans (Iwai *et al*, 2002) i que un polimorfisme en el gen S_A estava relacionat amb la pressió sanguínia i el pronòstic de la funció renal en pacients amb nefropatia per la immunoglobulina A (Nabika *et al*, 2002).

En aquests moments i en estudis molt recents realitzats en humans, s'han relacionat diferents polimorfismes del gen S_A humà amb l'obesitat però no amb la hipertensió. En humans caucàsics el polimorfisme en la longitud del fragment de restricció donat per PstI del gen SAH està relacionat amb el pes corporal en individus amb hipertensió, la conclusió que es treu és que la variació en el gen SAH jugaria un paper significatiu en la predisposició al sobrepès en individus hipertensos (Benjafield *et al*, 2003).

Del gen S_A humà es coneix molt poc, se sap que conté 13 exons i que mapa en el cromosoma 16p13.11. S'ha demostrat a més que s'expressa al ronyó (Samani *et al*, 1994).

Bàsicament tots els treballs realitzats sobre el gen S_A s'han dut a terme en rata, com ja s'ha comentat el gen S_A de rata mapa en el cromosoma 1, conté 15 exons i l'ATG es troba en el tercer exò. Durant l'estudi de regulació del gen S_A es va observar que en el ronyó de rates WKY hi havien transcrits addicionals que no estaven presents ni en el ronyó ni en el fetge de les rates SHR, aquests transcrits presentaven repeticions en tandem de varis exons específics (Frantz *et al*, 1999). Aquests autors mitjançant la tècnica de RT-PCR, van obtenir dos transcrits, el transcrit A i el B que contenien l'exò 2 repetit en tandem i duplicacions dels exons 2-4, respectivament. El codó ATG es troba en l'exò 3 per tant, el transcrit A no altera la pauta de lectura en canvi el transcrit B resulta en una proteïna truncada de 157 aminoàcids; el significat d'això es desconeix ja que no se sap quina funció té la proteïna S_A . Les cèl·lules que expressaven les noves isoformes de mRNA de S_A en el ronyó de les rates WKY no presentaven cap mena de reorganització en el gen del S_A , suggerint que podria tractar-se d'un procés postgenètic (Frantz *et al*, 1999).

Els primers treballs realitzats respecte a la distribució tissular del gen S_A de rata mostraren que s'expressava exclusivament en el ronyó i el fetge, veure figura 17 (Yang *et al*, 1996),

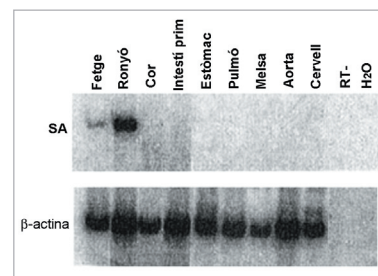


Fig. 17. Distribució tissular del mRNA de S_A en rates SD (*Sprague-Dawley*), mitjançant la tècnica de la RT-PCR. Adaptat i modificat de: Yang, *et al*, 1996.

més tard es va veure que també es localitzava en cervell i testicle.

El gen S_A s'expressa en el túbul proximal renal, aquesta expressió és específica de cada soca de rata. Per exemple, en la soca Sprague-Dawley (SD) s'expressa solament en la part convoluta del túbul, en SHR al llarg de tot el túbul i en WKY tant sols en la parts recta, veure figura 18 (Yang *et al*, 1996).

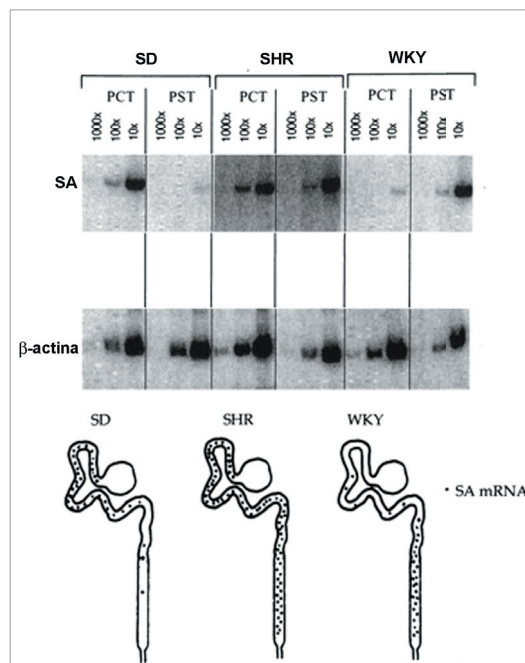


Fig. 18. Comparació de l'expressió del mRNA de S_A en el túbul proximal renal de diferents soques de rata, mitjançant la tècnica de PCR.

Abreviacions: PCT, túbul proximal contornejat; PST, pars recta del túbul proximal; SD, Sprague-Dawley; SHR, Spontaneously hypertensive rat; WKY, Wistar-Kyoto. Adaptat i modificat de: Yang *et al*, 1996.

5.2 El Gen S_A Murí

Per primer cop en el nostre laboratori es va identificar el cDNA de S_A de ratolí utilitzant la tècnica de *Representational difference analysis of cDNA* (RDAcDNA) en la identificació de gens diferencialment expressats per l'acció dels andrògens en ronyó de ratolí. Amb l'objectiu d'obtenir el cDNA complet del gen S_A murí, el fragment de 200 pb del cDNA de S_A obtingut pe cDNARDA, es va utilitzar com a sonda pel rastreig d'una llibreria d'expressió de ronyó de ratolí mascle construïda en el plàsmid pAD-GAL4.

El cDNA obtingut conté 2544 pb amb el codó d'inici ATG en posició 269, per davant del codó d'inici cap a 5' i per darrere del codó stop cap a 3' hi han varis fragments UTR que no es tradueixen, de 274 i 528 nucleòtids, respectivament; 16 pb per davant de la cua de poly(A) es troba la senyal de poliadenilació AATAAA; veure figura 19.

```

1 gcacgagactccgtccactttgatccaccaccaactaaagcagaggtgaaagacaaggaggttcaag
70 ctggatgatctcagagagttcaagatcaccgactcgtgaggttctcacacaggaagtggaacacccggag
140 ccgctggatttcaaatgcatccatttcatcagcatgatgcctagccaccagatccatctggattagctc
210 gcatggaaatccacatgccaaaacattcaacaacactgatgctagctagctctgtcatcactggtgatg
280 ttaactccgtgctaggtgttttcagcgcctagcaaatcctgatcctatgagagctctgtataaagattac
350 agaacagcgacccctcagaactttccaactatgagtcctgaacaagacttcaaaatagagattcca
420 gagtatttcaattttgcaaaagatgtcctggaccaatggaccaataggaaaaggctggaaagagactt
490 tccaatccagccttctgggtgagatgggaatggagaagagctgagatggagttttgaaagaacttggg
560 ttgttatccaggaatttgccaacatactcacagaagcctgctccctgcaaaaggagagacagagtaatg
630 gtgatactgccaaagatcccagagtggtggcttgcaaatgtggcctgtctcggaccagggacagtttca
700 attccaggaaccactcagctgacccagaagacatcctctatagactacaatctcaaaagctaaagtgc
770 attattaccgatgatactttggccccagcagtagtgccgtggcagctaaatgtgaaaatctccaactcc
840 aaattaatgtgtctcagcactccagagaaggctgggggaacctcaaggagatgatgaaatagccagt
910 gacagccacactgtgtggacacaaaacacgacgagatgatggccatctacttccaccagtggaacaact
980 gggcctcctaagatgattggacaccccacagcagctttgggttaggattgtctgtcaatggaaggttc
1050 tggctggatttgatagcctccgatgtgatgtggaatacttcagatacaggtgggcaagctgcatgg
1120 agtaggttttttccatggaccacaaggacatgtgtttttgcacactatttgccccgttttgaatca
1190 acttccatcttgcacaacctctccaagttccccaatcactgtctctgttctgcaccaactgcctaccgg
1260 atgcttgttcaaatgacatgagcagctataagttcaacagtttgaagcactgtgctcagtgctggagaa
1330 cctattaacctgaagtgatggaacaatggagaagaagcggcctagacatctatgaaagatattgga
1400 cagacagaacgggtgctgatctgtggaatccaaggggatgaaaattaaagccggctcaatgggaaag
1470 ccttctcctgcttttgatgtgaagatttttagatgaaaatggtgccactctcctcctggacaagaagg
1540 gatattgctctcaagttctcctgagcagcactttggccttttactcatatgtagataatccttcc
1610 aaaaaggcttcaactcagcagggagtttctacattactggggacagaggatattggatgaagatggc
1680 tatttctggtttggcagatcagatgatataatctctctggttaccgaatggacatttggc
1750 gtagaagtgccctcatagaacatccttccatcgcagagtcagctgtgtcagcagtcagaccatc
1820 agaggagaggtagtaaggcttttatgtcctgaatcctgattacaagtcctgatcaagagcaactg
1890 aaaaaggagatccaggagcagctggaagaagactacagcgccttacaatcccccagaaaaggtagaattt
1960 attgaagagctgccgaagactgtcagtggaaggtcaaaaagaatgaactgaggaagaaaggaatgggtc
2030 acaactggaactcctcccaactaatcactctgttagctataaacacagtgctcaacagctcgcaggaacc
2100 acagattatgtgggcagactcctttgaaactggattgaaagtattttgtagttatgacatcagagcctg
2170 aatctgaaatcaataatcattattgaaatcctctgcattcattgtcaatgctcctgtaattctgccaac
2240 ataaaaatgaatgtgcagagatgctgagatgtcttaaaatttattttaggagcagattctaaactaaatc
2310 tgtaccagggcattttcaaaacataactgaacaattctaatatgctaatatacaaatcagaacaatct
2380 tcaaaactttgaaagaaccttattttaaagaactgtcataatcttagaataatttacctaaaacttta
2450 ctagtcatatttttcaagtaatttaaaatagtttgaatgtttgaaaggtcaaaagtataagaga
2520 aagctgtcacattctgtggctagttataaaatttaacctaaataaacatgggtttgtaaaa

```

Fig. 19. Sequència nucleotídica del gen S_A de ratolí. Els codó d'inici i el codó d'stop estan en vermell. La senyal de poliadenilació es troba en negreta.

El gen S_A s'expressa en el ronyó del ratolí mascle però no en femelles ni en mascles castrats on es perd la seva expressió; l'administració de dosis farmacològiques de dihidrotestosterona (DHT) fa que es recuperi o que aparegui l'expressió del gen S_A en ratolins castrats i femelles, respectivament; veure figura 20A i B; l'administració de flutamida -antagonista androgènic que impedeix que el receptor d'andrògens transactivi els seus gens diana- fa disminuir els nivells d'expressió del gen S_A en ratolins femelles tractades amb DHT, veure figura 20C.

L'expressió dependent d'andrògens es dona exclusivament en ronyó, ja que en un anàlisi d'expressió tissular mitjançant Northern blot, amb teixits de ratolins femelles tractades o no amb DHT, únicament es veu expressió del gen S_A en el ronyó de femelles tractades amb DHT, veure figura 21.

El gen S_A murí s'expressa en el túbul proximal renal. Mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* amb seccions de ronyó de ratolins mascles castrats i mascles castrats tractats amb DHT, van evidenciar que el S_A no s'expressava en els animals sense andrògens i que l'hormona induïa l'expressió en les cèl·lules epitelials dels túbuls proximals de la zona cortical i de la medul·la externa, concretament en els segments del túbul proximal S1, S2 i S3, veure figura 22.

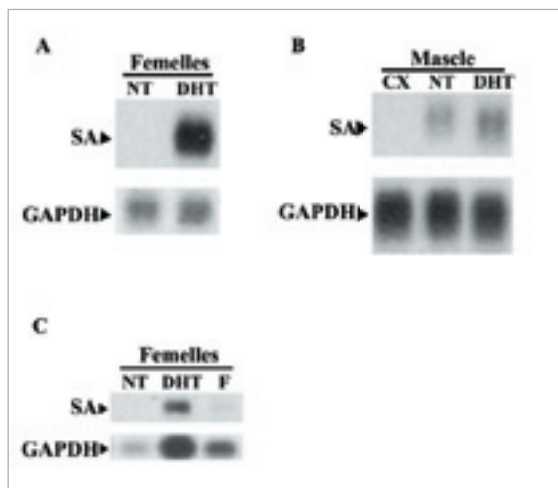


Fig. 20. Anàlisi per Northern blot de l'expressió del gen S_A murí. A. 3 μ g de mRNA de ronyó de ratolins femella tractades amb DHT (DHT) respecte als controls (NT). B. Nivells de mRNA de S_A a partir de ronyó de ratolins mascle control (NT), mascles castrats (Cx) i mascles castrats tractats amb DHT (DHT). C. Expressió del mRNA de S_A de ratolins femella control (NT), tractades amb DHT (DHT) i ratolins femella tractades amb DHT i flutamida (F). En tots els casos s'ha utilitzat com a control intern la GAPDH. Adaptat i modificat de: Melià *et al*, 1998

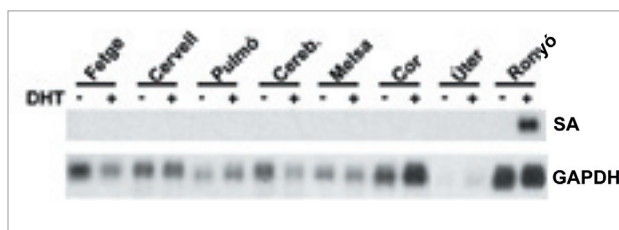


Fig.21. Control androgènica i distribució tissular del gen S_A en ratolins femella tractades amb DHT.

Adaptat i modificat de: Melià *et al*, 1998

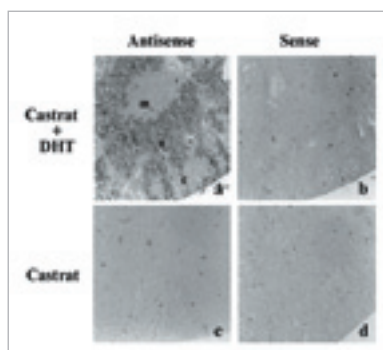


Fig. 22. Localització de l'expressió del gen S_A en ronyó de ratolí mitjançant hibridació *in situ*. Tesi doctoral de la Dra. M^aJesús Melià, 1999.

La Proteïna S_A Murina

La seqüència proteïca deduïda del cDNA aïllat, consisteix en 580 aminoàcids, amb un pes molecular de 65.6 kD i un punt isoelèctric de 7.17. Presenta un 94% d'identitat amb la proteïna S_A de rata i un 86% amb l'humana, es va veure que la proteïna de rata contenia una delecció de 34 aminoàcids en la posició 403 respecte a la de ratolí i la humana.

En la figura 23 es representa la seqüència aminoacídica de la proteïna S_A murina i la seva estructura secundària teòrica deduïda pel mètode GOR.



Fig. 23. Seqüència aminoacídica de la proteïna SA murina i la seva estructura secundària teòrica. La lletra e, en vermell, correspon a les làmines β , la h, en blau, les hèlix α i, la c, en verd, als bucles. Tesi doctoral de la Dra. M^aJesús Melià, 1999.

La proteïna S_A de ratolí presenta altres homologies significatives, per exemple amb la *Kidney-specific protein* (KS) de rata, un 55.9% d'identitat, i amb diverses acetil Coenzima A sintetases de moltes espècies bacterianes amb identitats entre el 27 i el 39%.

En la proteïna S_A s'han detectat altres grups potencialment funcionals, un lloc d'amidació, dos de glicosilació, quatre de miristilació i 22 de fosforilació, tres dels quals podrien ser diana per a proteïnes quinases depenents d'AMPc o GMPc, 10 per caseïna kinasa II, 8 per la proteïna kinasa C i 1 per tirosina kinasa.

El gen S_A representa una eina molt interessant per la investigació dels factors que determinen l'especificitat de la resposta androgènica en el ronyó de ratolí, dades que es van descriure per primera vegada en el nostre laboratori i, que va donar peu a continuar investigant sobre el gen S_A i la seva implicació en el ronyó de ratolí així com la seva transcendència en el conjunt global de l'acció androgènica.

Un altre aspecte interessant d'aquest gen és que la seva funció encara no estava caracteritzada, ja que la proteïna que codifica era de funció desconeguda; donades doncs, aquestes característiques d'especificitat d'expressió i regulació així com pel seu interès fisiològic, aquest treball està centrat en el gen S_A .