

---

# Potencial farmacológico de inhibidores de la *Jun N-Terminal Kinase* (JNK)

---

Alberto Muñoz<sup>a</sup> y Carme Caelles<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

<sup>b</sup>Unitat de Bioquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

## Introducción

---

Las células están constantemente adaptándose y respondiendo a los cambios que sufre su entorno, así como, en organismos pluricelulares, a mensajes procedentes de otras células. La transducción de señales es el proceso por el cual el estímulo, una vez ha sido percibido por la célula, es convertido en una señal intracelular y enviada a todos aquellos efectores cuya actividad es necesaria para que se produzca la respuesta celular apropiada. El avance en el conocimiento de las rutas de transducción de señales implicadas en procesos de proliferación y/o activación celular en los últimos años hace prever un aumento en el número de frentes sobre los cuales se puedan ejercer acciones dirigidas a controlar en este tipo de procesos. Fenómenos de proliferación celular anómala e inflamación acompañan, en ocasiones simultáneamente, a enfermedades muy diversas, algunas de ellas con una alta repercusión social como neoplasias, artritis reumatoide y diversas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, etc. Por esta razón, establecer estos potenciales frentes de acción, así como disponer de moléculas capaces de interferirlos específica y controladamente, tiene un claro interés farmacológico.

La *Jun N-Terminal Kinase* (JNK), también conocida como *Stress-Activated Protein Kinase* (SAPK), pertenece a la familia de *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) y constituye el eslabón final de una ruta de transducción de señales inicialmente implicada en la respuesta a citocinas y condiciones de estrés celular y, en consecuencia, potencial candidata a participar en la respuesta inflamatoria. La vía de la JNK

también ha sido involucrada en la regulación de otros procesos como la proliferación, la muerte celular programada (apoptosis) y la morfogénesis. Este repertorio funcional de la vía de transducción de señales de la JNK, conjuntamente con otros datos que se van a discutir en este artículo, la hacen especialmente indicada para la búsqueda de agentes de potencial interés terapéutico.

## La vía de transducción de señales de la JNK

Bajo la denominación de JNK se engloba un grupo de proteínas quinasas codificadas por tres genes: *jnk1*, *jnk2* y *jnk3*, a partir de los cuales, mediante procesamiento alternativo de los correspondientes transcritos, se generan un total de 10 isoformas, 4 de JNK1, 4 de JNK2 y 2 de JNK3, respectivamente<sup>1,2</sup>. Por una parte, este procesamiento alternativo produce las isoformas correspondientes a Mr 46.000 y 55.000, que hasta el momento no han presentado diferencias funcionales entre sí. Por otra parte, un segundo procesamiento alternativo produce dos tipos de isoformas, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , de los transcritos de los genes *jnk1* y *jnk2*, las cuales in vitro difieren en la especificidad de sustrato<sup>2</sup>.

Como rasgos comunes con el resto de MAPK, la JNK se activa por fosforilación dual en los residuos de tirosina y treonina de la secuencia Thr-Pro-Tyr localizada en el subdominio VIII, y constituye el último paso de una cascada de transducción de señales en la que los eslabones inmediatamente anteriores están constituidos por otras proteincinasas denominadas, de forma genérica, cinasa de la MAPK (MAPKK) y cinasa de la MAPKK (MAPKKK), respectivamente<sup>1,3</sup>. Una vez activada, la JNK se transloca al núcleo, donde se hallan algunos de sus sustratos (como se verá posteriormente).

Hasta el momento, se han caracterizado dos MAPKK responsables de la activación de la JNK por fosforilación dual, la SEK1/MKK4/JNKK1 y

---

Investigación financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Salud (SAF95-0738 y SAF98-0060). Los resultados que aparecen en este artículo han sido en parte publicados en la revista *Genes & Development* 1997; 11: 3.351-3.364.

la MKK7/JNKK2<sup>3,4</sup>. De ellas cabe resaltar que, mientras MKK7 es específica de JNK, MKK4 también puede activar a otro miembro de la familia de MAPK, la proteincinasa p38<sup>4</sup>. Además, en células deficientes en MKK4, la activación de JNK permanece refractaria únicamente frente a determinados estímulos, lo que indica que existe una especificidad de respuesta entre MKK4 y MKK7, y corrobora que JNK puede ser activada por ambas enzimas<sup>4,5</sup>. Se han descrito varias MAPKKK responsables de la activación de MKK4 y MKK7 o, incluso, capaces de activar la ruta de JNK de forma independiente a éstas<sup>6</sup>. Finalmente, el repertorio de moléculas implicadas en transducir la señal desde el estímulo extracelular a la cascada de fosforilación de la JNK es realmente amplio. En la actualidad se está dedicando un considerable esfuerzo a definir las moléculas que intervienen en la ruta de la JNK en condiciones fisiológicas<sup>4</sup>.

Se han descrito distintos mecanismos de inhibición de la actividad JNK. En primer lugar, y al igual que sucede con las otras MAPK, la JNK activada por fosforilación dual en Tyr y Thr puede inactivarse por acción de fosfatases de especificidad dual, recogidas bajo la denominación de Ser/Thr/Tyr *MAP Kinase Phosphatases* (MKP), cuya preferencia hacia las distintas MAPK depende de cada isoforma en particular<sup>7</sup>. La actividad JNK puede inhibirse, a diferencia de otras MAPK, por su interacción directa con otras proteínas como la *JNK Interacting Protein* (JIP)-1, que evita su translocación nuclear<sup>8</sup>, o el producto del gen *waf1/cip1*, la proteína p21, más conocida por su acción inhibidora de los complejos ciclina/*cyclin-dependent kinase* (CDK) del ciclo celular<sup>9</sup>.

### Regulación de la transcripción por la vía de la JNK

Está ampliamente aceptado que la vía de la JNK regula la expresión génica mediante la modulación de la actividad de distintos factores de transcripción que figuran entre los sustratos de la JNK<sup>10</sup>. Así, la JNK es capaz de regular la actividad de algunos miembros de las familias de activadores transcripcionales Jun, ATF y Ets (c-Jun, ATF2 y Elk-1, respectivamente) mediante la fosforilación de sus respectivos dominios de transactivación<sup>10</sup>. Esta fosforilación es un requisito para la interacción de estos activadores transcripcionales con otras moléculas coactivadoras, como la *CREB-binding protein* (CBP) o la p300, necesarias para activar la transcripción génica<sup>11</sup>. Estos coactivadores son

capaces de modificar la estructura de la cromatina in situ mediante la acetilación de las histonas, y/o de reclutar moléculas con dicha actividad histona-acetil-transferasa como P/CAF<sup>12</sup>. Alternativamente, la fosforilación por JNK puede modular la actividad de los factores de transcripción a través de otros mecanismos como la regulación de la estabilidad de la proteína<sup>13</sup> o del transporte al núcleo<sup>14</sup>. Finalmente, la ruta de la JNK puede regular la expresión génica también postranscripcionalmente, como es el caso de la traducción del ARN del factor necrosante de tumores de tipo alfa o *Tumor-Necrosis Factor* (TNF)- $\alpha$ <sup>15</sup>.

### Regulación de la actividad del complejo AP-1 por la ruta de la JNK

Sin duda, c-Jun es el activador transcripcional cuya regulación mediante fosforilación por JNK ha sido mejor estudiada. c-Jun es el principal componente del factor de transcripción AP-1, un complejo dimérico formado por homo o heterodímeros entre las proteínas codificadas por los distintos miembros de la familia del protooncogén *c-jun* (c-Jun, JunB y JunD) o por heterodímeros entre éstas y los productos de los miembros de la familia del protooncogén *c-fos* (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2)<sup>16</sup>. AP-1 es frecuentemente activado por estímulos que inducen la proliferación y/o activación celular como mitógenos, oncoproteínas, citocinas y condiciones de estrés<sup>16</sup>.

La actividad del complejo AP-1 puede inducirse mediante mecanismos tanto independientes como dependientes de la expresión génica. En ambos casos la actividad JNK desempeña un papel clave<sup>17</sup>. La inducción de la actividad AP-1 de manera independiente de transcripción transcurre a través de la modificación postransduccional de los componentes del complejo. En este sentido, uno de los mecanismos más relevantes es la fosforilación del dominio aminoterminal (N-terminal) de c-Jun, concretamente en los residuos de serina 63 y 73<sup>17,18</sup>. La proteincinasa responsable de esta fosforilación es la JNK. De hecho, esta fosforilación se produce en respuesta a algunos de los estímulos que inducen AP-1, como la irradiación con luz ultravioleta (UV) o TNF- $\alpha$ , los cuales, a su vez, son inductores de la ruta de JNK<sup>17,18</sup>.

El mecanismo de activación de AP-1 dependiente de transcripción generalmente implica un incremento neto de los componentes del complejo<sup>17</sup>. La participación de la ruta de JNK también en este mecanismo queda patente por

el hecho de que la activación transcripcional de los genes *c-jun* y *c-fos* depende, en gran medida, de la actividad de los factores de transcripción ATF2 y Elk-1, respectivamente<sup>17</sup>. Como ya se ha comentado en anteriormente, tanto ATF2 como Elk-1 son sustratos de la JNK<sup>10</sup>.

Actualmente existen evidencias directas de que la ruta de la JNK regula in vivo la actividad transcripcional del complejo AP-1. En células deficientes en MKK4, tanto JNK como AP-1 permanecen refractarios a la estimulación por agentes de estrés celular<sup>19</sup>. Por otra parte, ratones en los que se ha inactivado el gen *jnk3* carecen de actividad JNK en las neuronas del hipocampo y, a su vez, en estas células no se produce el incremento en la actividad AP-1 que sigue a su estimulación con agentes excitotóxicos<sup>20</sup>.

### La vía de JNK en procesos fisiológicos y patológicos

En la medida en que la vía de la JNK va siendo caracterizada y estudiada se amplía el abanico de procesos, tanto fisiológicos como patológicos, en los que es implicada. Por razones de espacio, comentaremos a continuación sólo algunos de ellos<sup>4</sup>.

La activación del complejo AP-1 es un acontecimiento que frecuentemente se ha vinculado a la transformación oncogénica<sup>16</sup>. En este contexto, la implicación de la JNK en dicha activación sugirió, desde un principio, que esta ruta podría estar asociada a transformación celular<sup>21</sup>. Aunque la actividad JNK es inducida por algunos oncogenes, actualmente este aspecto es tema de debate, en parte debido a su reciente implicación también en la inducción de apoptosis en determinados modelos celulares<sup>4,20</sup>.

Desde un principio, la activación de la ruta de la JNK por citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y condiciones de estrés celular sugirió su participación durante la respuesta inflamatoria<sup>22</sup>. De hecho, la actividad JNK se induce en la activación por coestimulación de células T<sup>23</sup> y contribuye a la producción y secreción de IL-2<sup>23,24</sup> y a la proliferación de timocitos<sup>24</sup>. Por otra parte, también participa en la secreción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , como ya se ha comentado<sup>15</sup>, y en la activación del gen de la E-selectina en respuesta a TNF- $\alpha$  en células endoteliales<sup>25</sup>.

La ruta de la JNK ha sido, así mismo, implicada en la regulación de procesos de supervi-

vencia y muerte celular. La supervivencia durante el desarrollo y la activación de células T necesita de la transducción de señales a través de MKK4<sup>5</sup>. En contraposición, tanto la actividad JNK como la de AP-1 participan en la apoptosis de las neuronas del hipocampo en respuesta a agentes que causan excitotoxicidad<sup>20</sup>.

### Antagonismo entre los receptores hormonales nucleares y el factor transcripcional AP-1

Los esteroides, retinoides y otras hormonas de naturaleza lipofílica ejercen la mayoría, si no todas, sus acciones a través de su interacción con sus receptores celulares, que constituyen la denominada superfamilia de los receptores hormonales nucleares (HR). Los HR actúan como factores de transcripción cuya actividad está modulada por la interacción con su ligando, y pueden regular la transcripción de forma positiva o negativa<sup>26</sup>. La activación de la expresión génica implica la unión de los receptores a secuencias específicas de nucleótidos, denominados elementos de respuesta hormonal, presentes en las regiones reguladoras (promotores) o en el interior (intrones o exones) de los genes diana. Curiosamente, el mecanismo de represión transcripcional en general no requiere la interacción del HR con secuencias de ADN específicas, sino que parece tener lugar a través de la interferencia con la actividad de otros factores de transcripción, por lo que recibe el nombre de transrepresión. Entre estos factores antagonizados por los HR se encuentra AP-1<sup>27</sup>.

El estudio del mecanismo por el que tiene lugar el fenómeno de transrepresión entre HR y AP-1 tiene un especial interés, ya que para el caso de glucocorticoides y retinoides esta propiedad se ha correlacionado con algunas de las acciones farmacológicas de estas hormonas, como son las antineoplásicas, inmunosupresoras y/o antiinflamatorias<sup>27,28</sup>. Por ejemplo, en relación a la actividad antiproliferativa, determinados tipos de retinoides capaces de actuar selectivamente la función de transrepresión del receptor del ácido retinoico inhiben la proliferación de aquellas líneas celulares con actividad AP-1 endógena (p. ej., las células HeLa), pero no así la de aquellas que carecen de esta actividad (como las células F9)<sup>29</sup>. Por otra parte, el efecto positivo de los glucocorticoides en el tratamiento de determinadas leucemias, linfomas y algunas enfermedades de naturaleza

autoinmune puede correlacionarse con la propiedad de estas hormonas de inducir apoptosis de células T, propiedad que requiere únicamente de la función de transrepresión del receptor hormonal activado, y que es independiente de la de transactivación<sup>30</sup>. Finalmente, y en relación con su actividad antiinflamatoria y antienvjecimiento de la piel, los retinoides son capaces de inhibir la inducción de AP-1 que sigue a la exposición prolongada al componente de ultravioleta de la luz solar, bloqueando con ello la inducción de metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular como colagenasas, estromalisina 1 y gelatinasas<sup>31</sup>.

El fenómeno de la transrepresión de los HR y AP-1 fue descrito a principios de esta década y, desde entonces, distintos mecanismos han sido propuestos para explicarlo a nivel molecular<sup>27,28</sup>. Recientemente se ha observado que los HR, al igual que el factor AP-1, requieren del coactivador transcripcional CBP para activar la transcripción génica. Este hecho ha llevado a proponer la competencia entre los HR y AP-1 por cantidades limitantes de CBP como mecanismo para explicar la transrepresión<sup>32</sup>. Es importante hacer notar que la interacción con CBP, tanto por parte de AP-1 como de los HR, requiere de un paso previo de activación, que es la fosforilación del dominio N-terminal de c-Jun y la unión del correspondiente ligando, respectivamente<sup>11,32</sup>. Recientemente, resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la activación de distintos HR como los de glucocorticoides, retinoides, hormona tiroidea y vitamina D inhiben la inducción de la ruta de la JNK en respuesta a distintos estímulos<sup>33</sup>. De acuerdo con el papel de la JNK en la activación de AP-1, la interferencia con esta ruta se correlaciona con la propiedad de estos HR de bloquear la fosforilación del dominio N-terminal de c-Jun y, en consecuencia, de inhibir la activación transcripcional dependiente de AP-1. Además, la inhibición por parte de los HR de la ruta de la JNK afecta también a la activación de otros factores de transcripción activados por JNK, como ATF2 y Elk-1. Es decir, mediante la inhibición de la ruta de la JNK, los HR inhiben la activación de AP-1 mediada tanto por mecanismos independientes de transcripción (fosforilación del dominio N-terminal de c-Jun) como dependientes de transcripción (expresión de los genes *c-jun* y *c-fos* mediada por ATF2 y Elk-1). En resumen, la interferencia con la ruta de la JNK representa un nuevo mecanismo a través del cual HR antagonizan a AP-1 y, en definitiva, un

mecanismo alternativo por el que hormonas como los glucocorticoides y retinoides pueden ejercer sus acciones farmacológicas<sup>33</sup>. De hecho, la inhibición de la JNK y/o ERK (otro miembro de la familia de MAPK frecuentemente implicado en proliferación celular) por parte de distintas hormonas lipofílicas como el glucocorticoide sintético dexametasona, ácido retinoico, estradiol y progesterona ha sido implicada en el mecanismo por el que estas hormonas son capaces de inhibir respectivamente la producción de TNF- $\alpha$ <sup>15</sup>, la expresión del gen *c-fos*<sup>34</sup> o de la endotelina 1 en respuesta a la angiotensina II<sup>35</sup>.

La ruta de la JNK participa en la transducción de señales implicadas tanto en procesos fisiológicos normales como en aquellos que se producen en respuesta a condiciones de estrés, como es la respuesta inflamatoria, por lo que es previsible que moléculas capaces de interferir con esta ruta sean candidatas a controlar estos procesos. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que moléculas que normalmente están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis celular como las hormonas esteroides, tiroideas y las vitaminas A y D y sus metabolitos actuando a través de sus receptores intracelulares son capaces de inhibir la activación de la ruta de la JNK, y esta propiedad se correlaciona con su habilidad de antagonizar la actividad del complejo AP-1. Al menos en el caso de glucocorticoides y retinoides, esta capacidad de transrepresión está íntimamente ligada a sus acciones antiproliferativas, inmunosupresoras y/o antiinflamatorias. Es, por tanto, razonable pensar que inhibidores de la vía de señalización de la JNK puedan tener utilidad farmacológica. Un posible mecanismo de acción de dichos inhibidores es la activación de los HR, pero aún más conveniente serían aquellos inhibidores que actúen independientemente de aquéllos, ya que esto evitaría los efectos secundarios de los tratamientos con glucocorticoides y retinoides, que son en gran medida consecuencia de la activación génica por estas hormonas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Davis JD. MAPKs: new JNK expands the group. TIBS 1994; 19: 470-473.
2. Gupta S, Barret T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoform with transcription factors. EMBO J 1996; 15: 2.760-2.770.

3. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-186.
4. Ip YT, Davis, RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 205-219.
5. Nishina H, Fischer KD, Radvanyi L, Shahinian A, Hakem R, Rubie EA et al. Stress-signalling kinase SEK1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 1997; 385: 350-353.
6. Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 67-74.
7. Neel BG, Toks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 193-204.
8. Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR et al. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997; 277: 693-696.
9. Shim J, Lee H, Park J, Kim H, Choi EJ. A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 1996; 381: 804-807.
10. Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 1995; 5: 747-757.
11. Nordheim A. CREB takes CBP to tango. *Nature* 1994; 370: 177-178.
12. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352.
13. Musti AM, Treier M, Bohmann D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 1997; 275: 400-402.
14. Chow CW, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT-4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997; 278: 1.638-1.641.
15. Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) translation: glucocorticoids inhibit TNF- $\alpha$  translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6.274-6.282.
16. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos, and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1.072: 129-157.
17. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 16.483-16.486.
18. Karin M, Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 240-246.
19. Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu TH, Xu J, Davis RJ et al. Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3.004-3.009.
20. Yang D, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ et al. Absence of excitotoxicity induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 1997; 389: 865-870.
21. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Dev* 1993; 7: 2.135-2.148.
22. Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 1996; 18: 567-577.
23. Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994; 77: 727-736.
24. Nishina H, Bachmann M, Oliviera-dos-Santos AJ, Koziarzki I, Fisher KD, Odermatt B et al. Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 186: 941-953.
25. Read MA, Whitely MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis DJ et al. TNF- $\alpha$  induced E-selectin expression is activated by the NF- $\kappa$ B and JNK/P38 MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 1997; 272: 2.753-2.761.
26. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schultz G, Umesono K et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835-839.
27. Saatcioglu F, Claret FX, Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* 1994; 5: 347-359.
28. Cato ACB, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BioEssays* 1996; 18: 371-378.
29. Fanjul A, Dawson MI, Hoobs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E et al. A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 1994; 372: 107-110.
30. Helmborg A, Auphan N, Caelles C, Karin M. Glucocorticoid induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1995; 14: 452-460.
31. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S et al. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996; 379: 335-339.
32. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 1996; 85: 403-414.

33. Caelles C, González-Sancho JM, Muñoz A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes & Dev* 1997; 11: 3.351-3.364.
34. Lee H-Y, Walsh GL, Dawson MI, Hong WK, Kurie JM. All-*trans*-retinoic acid inhibits Jun N-terminal kinase-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 1998; 273: 7.066-7.071.
35. Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER. Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J* 1998; 330: 1.097-1.105.

## DISCUSIÓN

R. BORGES: Mi primera pregunta está relacionada con el esquema que presentaste donde la hormona tiroidea y el ácido transretinoico se incorporaban en distintas dianas, pero me pareció entender que actuaban exactamente en el mismo sitio, cuando los efectos de estas sustancias son muy distintos. En segundo lugar, y dado que existe una diferencia en la potencia de los glucocorticoides que se utilizan en clínica, tal vez una forma correcta de iniciar el cribado podría ser probando otros glucocorticoides, no solamente dexametasona, a fin de comprobar si esta acción dual que has descrito se centra más en un lado que en otro, y podría explicar la distinta potencia de un glucocorticoide frente a otro.

A. MUÑOZ: Respondiendo a tu primera pregunta, en realidad no es como tú lo has descrito. El receptor de la hormona tiroidea o el de alguna vitamina D, forma un heterodímero con el receptor que se denomina RXR, que lo es del ácido 9-*cis*-retinoico. El receptor del *all-trans*-retinoico, que es el RAR también forma un heterodímero con la proteína RXR, de manera que el receptor de la hormona tiroidea y el receptor de *all-trans*retinoico no se pegan a los mismos sitios ni regulan los mismos genes obviamente, pero comparten la proteína con la que dimerizan, de manera que si se sobreexpresa uno, se inhibe por competencia con RXR la función de la otra hormona. Evidentemente, la vitamina A y la hormona tiroidea no hacen lo mismo. Respecto a tu segunda pregunta, próximamente pondremos a punto un sistema que pretendemos sea fácil, económico y cuantitativamente posible, para analizar sustancias que se fijen e inhiban JNK. De hecho, no estamos buscando más glucocorticoides con menos efectos secundarios ni moléculas que se unan a los receptores para evitar en lo posible los efectos secundarios, si no que buscamos inhibidores específicos de JNK, para posteriormente y con ayuda de alguna compañía farmacéutica, poder seleccionar los que no sean tóxicos.

F. VENTURA: ¿Los efectos de represión los habéis observado sólo con AP-1 o también con

otros sistemas que utilizan CBP, como por ejemplo, con factores miogénicos?

A. MUÑOZ: Se sabe y está publicado, que existe también con NFκ-B, aunque nosotros sólo lo hemos hecho con AP-1.

G. PONS: ¿Habéis estudiado si este efecto de inhibición de la JNK se produce sin necesidad de que el receptor penetre en el núcleo? Si así fuera, quedaría claro que no hay ningún efecto sobre transcripción.

A. MUÑOZ: En el caso de los glucocorticoides no hemos hecho experimentos de translocación al núcleo. Anteriormente publicamos los resultados de la cinética de inhibición donde apreciamos que prácticamente en 10 min la JNK está ya inhibida al 50%. Aunque no lo hayamos analizado directamente, esto permite predecir una buena correlación entre la cinética de paso al núcleo y la cinética de inhibición. Desde luego, necesariamente tiene que estar presente la hormona, con lo cual creemos que evidentemente es el complejo dentro del núcleo lo que inhibe. Sobre el último comentario, podemos afirmar que no se necesita transcripción. Lo hemos estudiado con un mutante de GR, el LS-7, que es defectivo en actividad transcripcional, y lo hemos hecho también con inhibidores, de manera que es un efecto independiente de la activación génica, requiere el receptor muy posiblemente dentro del núcleo, ligado a su hormona respectiva, y es dependiente de la concentración de receptor.

M. PALACÍN: En relación con el efecto de transrepresión, ¿habéis visto si existe una interacción física directa entre el receptor ocupado y JNK, o alguna de las cinasas que le preceden?

A. MUÑOZ: Es exactamente lo que estamos estudiando actualmente, además de si existe interacción directa. A continuación pretendemos esclarecer si es posible que lo que estén haciendo estos receptores hormonales es, en lugar de inhibir per se la actividad cinásica de la JNK, sencillamente activar su desfosforilación. El problema es que hay muchas fosfatases, y son mal conocidas. Recientemente



se han publicado dos artículos en *Science* sobre la regulación de la ERK y la calcio-calmodulin-cinasa-4 dentro del núcleo por una fosfatasa que está unida a ella. De manera que la desensibilización natural fisiológica de todas estas cinasas será porque ellas mismas activan a la fosfatasa que está unida y que las inhiben. Podría ser que la acción se produjese por activar antes de tiempo esta fosfatasa, que al parecer, está siempre unida a la cinasa.

A. CELADA: Me parece muy interesante el mecanismo de las JNK, particularmente cuando se recuerdan los artículos que se publicaron en *Cell* en el año 1991, de los cuales incluso se derivaron algunos hechos éticamente cuestionables. Fui uno de los que demostró la interacción entre el MHC de clase II con los corticoides y también intenté rehacer lo que los otros autores habían realizado para demostrar que las dos proteínas se unían. Pero el sistema me pareció tan sumamente artificial que nunca creí en él. Es posible que haya otro mecanismo, y quizás el único problema de vuestra teoría es que no entiendo cómo, por ejemplo, las moléculas de clase II del MHC son fosforiladas por la JNK. Es muy posible que además haya otro mecanismo mucho más sencillo, que es el mecanismo de captura y de interacción proteína-proteína. Entiendo el mundo de los factores de transcripción como una balanza entre activadores e inhibidores, y entre ellos pueden establecerse interacciones proteína-proteína y puede ser que inhiban la unión a los promotores. Esto lo hemos demostrado en otros sistemas y quizá también sea el caso de los glucocorticoides.

A. MUÑOZ: Creo que estás proponiendo una unión de receptores hormonales activados por su hormona, con algunos de los factores transcripcionales que se inhiben. Sabes mejor que yo la gran cantidad de bibliografía publicada al respecto, aunque hay un artículo en el que la adición de glucocorticoides no afectaba el *foot-printing* in vivo de AP-1. Siempre hay que tener cuidado entre lo que uno observa en una co-inmunoprecipitación o en un *gel-shift* in vitro, y lo que ocurre de verdad in vivo. La única excepción se produciría con promotores como la proliferina, en que los sitios están solapantes. Hay también promotores en los que, sin inhibir la unión a ADN de AP-1, sin embargo la transcripción está inhibida por el receptor. Proponemos que sea porque está inhibiendo la fosforilación de c-Jun por la JNK.

A. CELADA: Todo esto es muy sencillo. Si a una proteína que está unida al ADN le pegas otra proteína, la ARN polimerasa no puede actuar y no se produce transcripción. Creo que esto no es ningún problema. En este caso, el promotor puede estar ocupado in vivo por los factores de transcripción. Es posible que vuestra teoría, que es muy atractiva, sea cierta pero creo que también deben considerarse otras opciones.

A. MUÑOZ: El problema es que muchas veces no se dispone de suficientes herramientas para avanzar como, por ejemplo, para poder detectar qué factor de transcripción ocupa el promotor. Por tanto, no siempre resulta tan fácil como pudiera parecer. Evidentemente, se trata de una teoría con la que pretendemos seguir trabajando.