

Tesis de Posgrado

Inducción y activación de Nurr77 y Nurr1 por CRH e IL-1 en corticotrofos : rol sobre la regulación del gen de POMC y vías de transducción de señales involucradas

Kovalovsky, Damián

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kovalovsky, Damián. (2002). Inducción y activación de Nurr77 y Nurr1 por CRH e IL-1 en corticotrofos : rol sobre la regulación del gen de POMC y vías de transducción de señales involucradas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3476_Kovalovsky.pdf

Cita tipo Chicago:

Kovalovsky, Damián. "Inducción y activación de Nurr77 y Nurr1 por CRH e IL-1 en corticotrofos : rol sobre la regulación del gen de POMC y vías de transducción de señales involucradas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3476_Kovalovsky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

Tesis Doctoral

**Inducción y activación de Nur77 y
Nurr1 por CRH e IL-1 en corticotrofos:
rol sobre la regulación del gen de POMC y
vías de transducción de señales involucradas**

Autor: **Damián Kovalovsky**

Director: **Dr. Eduardo Arzt**

LABORATORIO DE FISIOLOGÍA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR
FCEN-UBA

2002

3476

Este trabajo va dedicado a mi familia: a mis padres, siempre me enseñaron que uno debe seguir sus instintos y me apoyaron en cada una de mis decisiones; a mis hermanos Gustavo y Judith.

A mi hija Mariana, pitufa desde que llegaste a mi vida la cambiaste completamente. Saber que están siempre presentes me permitió y permite seguir adelante, muchas gracias.

Agradecimientos

Esta parte de la tesis, es a mi entender la mas placentera, porque el trabajo duro ya terminó y uno empieza a rememorar todas aquellas personas que la hicieron posible o contribuyeron de alguna forma.

Por sobre todo tengo que agradecer a mi director de tesis el Dr. Eduardo Arzt. Estuviste siempre presente, siempre me apoyaste y tuviste plena confianza en mí, aún en los tiempos difíciles, que ocurren en toda tesis doctoral. Siempre me diste ese empujoncito necesario que me permitió salir adelante.

Gracias a los directores del LFBM, Dr. Alberto Kornblihtt, Dr. Osvaldo Uchitel, Dr. Norberto Iusem y Dr. Eduardo Arzt. Hoy en día puedo decir con gran orgullo que fui partícipe de la inauguración del LFBM y tengo que agradecerles el gran esfuerzo personal que hicieron y realizan constantemente para brindar el ambiente adecuado con todas las facilidades necesarias para realizar los proyectos de investigación. Estas facilidades fueron extremadamente importantes para la realización de esta tesis.

Gracias a mis compañeritos del laboratorio: a Carolina Perez Castro, desde el primer día me enseñaste el funcionamiento del laboratorio y siempre me mostraste la correcta forma de hacer las cosas; a Alberto Carbia Nagashima y a Damiana Giacomini, es verdad el dicho de que la unión hace la fuerza y acudí a ustedes cada vez que la necesitaba; a Damián Refojo, con tu constante preocupación por las cosas me mostraste que siempre hay alguien en peor situación que yo. Ser parte de un grupo de trabajo en pleno funcionamiento requiere de un gran esfuerzo y colaboración de cada uno de los integrantes, me alegra el haber compartido este período con ustedes.

Gracias a los demás integrantes del LFBM, los doctores Omar Coso, Lidia Szcupak, Susana Rossi, y Anabella Srebrow, a los becarios, tanto los actuales como los que pasaron por el LFBM. Gracias a los ARKs, que supieron ponerle música al trabajo cotidiano, los Iusem, en especial a Laura Maskin por el apoyo constante y los Uchitels. Todos estuvieron siempre bien dispuestos.

Gracias al Dr. Omar Adrián Coso y al Lic. Daniel Hochbaum por su colaboración en los experimentos de quinasas.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por brindarme la oportunidad de realizar mi doctorado en esta institución y al CONICET por las becas otorgadas.

A todos Ustedes,

Muchas Gracias

Resumen

En este trabajo de tesis abordamos el estudio de la función corticotrofa normal y tumoral focalizándonos en tres temas fundamentales: a) los eventos moleculares involucrados en la regulación de los factores de transcripción Nur y sus consecuencias en la activación del gen de proopiomelanocortina (POMC) por la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y AMP cíclico (cAMP), b) la implicancia de los factores Nur en la regulación corticotrofa por interleuquina-1 (IL-1) y c) la de interacción entre IL-1, CRH y glucocorticoides.

Demostramos en células corticotrofas AtT20 que la entrada por canales de calcio tipo L es esencial para la inducción de los mRNAs de Nur77 y Nurr1 y la estimulación de la actividad Nur por CRH a través de la actividad de CAMKII. La entrada de calcio es suficiente para producir la estimulación. El tratamiento con cAMP estimula Nur77 también independientemente del calcio entrante. Existe una vía de MAPK (Rap1/B-Raf/MEK1,2/ERK1,2) funcional en corticotrofos que estimula la fosforilación y actividad transcripcional de Nur77 y que es activada por CRH y cAMP en forma calcio-dependiente y calcio-independiente. La regulación por estas vías de señalización sobre la actividad Nur correlaciona con la regulación sobre el promotor de POMC.

Demostramos también que Nur77 media la acción estimuladora de IL-1 sobre el promotor de POMC: IL-1 estimula la actividad Nur sobre el sitio NurRE; produce la inducción del mRNA de Nur77 y no de Nurr1, un efecto transcripcional a nivel del promotor de Nur77; estos efectos dependen de la actividad de la proteína quinasa p38; una línea que sobreexpresa una mutante dominante negativa de Nur77 es insensible a la estimulación por IL-1 de la secreción de ACTH, la actividad Nur y la inducción de POMC. La activación del factor de transcripción NFkB ejerce un efecto negativo en la estimulación de la actividad Nur y la inducción de POMC por IL-1.

Demostramos que la potenciación entre IL-1 y CRH sobre la secreción de ACTH se observa también sobre la actividad Nur. El tratamiento con IL-1 aumenta la sensibilidad a la inhibición de la secreción de ACTH por glucocorticoides, tanto en la línea celular AtT20 como en cultivos primarios de adenomas corticotrofos humanos. Este efecto no es consecuencia de la inhibición del mRNA de POMC sino un efecto a nivel de la secreción y no es consecuencia de una diferencia en la afinidad de GR por los glucocorticoides ni una diferencia en el número de GR.

En conclusión, en este trabajo de tesis caracterizamos por primera vez las vías de señalización involucradas en la regulación de la actividad Nur y la función corticotrofa por IL-1, CRH, glucocorticoides y sus interacciones, demostrando que la regulación de la expresión de POMC y ACTH en corticotrofos involucra: la existencia de una vía de MAPK funcional, la actividad fundamental de Nur tanto para CRH como para IL-1 y la interacción funcional de IL-1 con CRH (sinergismo) y con glucocorticoides (aumento de la sensibilidad a la inhibición).

Abstract

In this thesis work we studied the normal and tumoral corticotrophic function focusing on three fundamental points: a) the molecular events involved in Nur regulation and its consequences on proopiomelanocortin (POMC) gene regulation by corticotrophic releasing hormone (CRH), cyclic AMP (cAMP), b) the impicance of Nur factors in corticotrophic regulation by interleukin-1 (IL-1) and c) the interaction among IL-1, CRH and glucocorticoids.

We demonstrate that calcium entry through L type channels is crucial for Nur77 and Nurr1 mRNA induction and increased activity by CRH treatment involving CAMKII function. Calcium entry is sufficient to produce this stimulation. Treatment with cAMP stimulates Nur77 also independently of calcium. There is a functional MAPK (Rap1/B-Raf/MEK1,2/ERK1,2) pathway in corticotrophs that stimulates Nur77 phosphorylation and transcriptional activity and it is activated by CRH and cAMP treatments involving calcium-dependent and –independent signals. POMC regulation by this pathways correlates with Nur activity.

We also demonstrate that Nur77 is involved in the stimulation of POMC by IL-1: IL-1 stimulates Nur activity on the NurRE site; induces Nur77 and not Nurr1 mRNAs, a transcriptional effect on the Nur77 promoter; these effects depend on p38 protein kinase activity; a cell line that overexpresses a dominant negative mutant of Nur77 is insensitive to IL-1 stimulation of ACTH secretion, Nur activity and POMC induction. NFkB activity exerts a negative effect on Nur activity and POMC mRNA induction by IL-1.

We demonstrate that the synergism between CRH and IL-1 on ACTH secretion is also observed on Nur activity. IL-1 treatment increases the inhibitory effect of glucocorticoids on ACTH secretion, in the corticotrophic AtT20 cell line and in corticotroph human adenomas primary cultures. This effect is not a consequence of inhibition of POMC mRNA but an effect at the level of secretion and it is not due to different affinity of glucocorticoid receptor (GR) for glucocorticoids nor to different GR number.

In conclusion, in this thesis work we characterized for the first time the signaling pathways involved in the regulation of Nur activity and the corticotrophic function by IL-1, CRH, glucocorticoids and its interactions, demostrating that the regulation of POMC mRNA expression and ACTH in corticotrophs involves: the existence of a functional MAPK pathway, the instrumental activity of Nur for CRH and IL-1 actions and the functional interaction of IL-1 with CRH (synergism) and with glucocorticoids (increased sensitivity to inhibition).

ÍNDICE

I) INTRODUCCIÓN	1
1. EL EJE HIPOTÁLAMO- PITUITARIO - ADRENAL (HPA)	2
1.1. Organización del eje HPA	2
1.2. Características del corticotrofo	4
1.2.1. El gen de POMC y la hormona ACTH	5
1.2.2. Caminos secretorios en el corticotrofo	6
1.3. Regulación del eje HPA	7
1.3.1. Integración sensorial en el SNC	8
1.4. Regulación funcional del corticotrofo	9
1.4.1. Por péptidos hipotalámicos	9
1.4.1.1. Estudios <i>in vivo</i>	9
1.4.1.2. Estudios <i>in vitro</i>	10
1.4.2. Regulación por glucocorticoides	11
1.4.2.1. Regulación rápida	11
1.4.2.2. Regulación intermedia	12
1.4.2.3. Regulación tardía	13
2. REGULACIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE EL EJE HPA Y LAS CITOQUINAS	14
2.1. Regulación del eje HPA por citoquinas	15
2.1.1. Regulación del eje HPA por IL-1	16
2.1.1.1. Regulación a nivel del hipotálamo	16
2.1.1.2. Regulación a nivel de la hipófisis	17
2.1.1.2.1. Expresión de receptores de IL-1 en células hipofisarias	17
2.1.1.3. Regulación a nivel de la corteza adrenal	19
2.1.2. Regulación del eje HPA por otras citoquinas	19

3. EL PROMOTOR DE POMC	22
3.1. Elementos Respondedores y factores de transcripción involucrados en la regulación del promotor de POMC	23
4. SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES	26
4.1. Subfamilia de Receptores Nucleares Huérfanos Nur77/Nurr1/NOR1	27
4.1.1. Regulación de la actividad transcripcional de Nur77	29
4.1.1.1. por fosforilación	29
4.1.1.2. por heterodimerización con receptores esteroideos	30
4.1.2. La subfamilia de factores Nur en la regulación del eje HPA y en la inducción de POMC	31
5. RECEPTORES Y TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL	33
5.1. El Receptor de CRH	33
5.1.1. Señalización por CRH	34
5.2. Receptor de IL-1 y transducción de la señal	35
6. LA CASCADA DE MAPK	36
6.1. Cascadas de activación	37
6.1.1. La cascada de ERK1 y ERK2	39
6.1.1.1. MEK1 y MEK2	40
6.1.1.2. Isoformas de Raf	40
6.1.1.2.1. Regulación de Raf por Ras y Rap1	41

6.2. Regulación de la actividad de MAPK	42
6.2.1. Regulación por cAMP	42
6.2.2. Activación de Rap1	43
6.2.2.1. Mecanismos de la activación de Rap1	44
6.3. Regulación de la transcripción por MAPK	45
6.4. MAPK en la hipófisis	46
 II) OBJETIVOS	 48
1. OBJETIVOS GENERALES	48
1.1. Objetivos particulares	49
A) Acción de CRH	49
B) Acción de IL-1	49
C) Interacción de IL-1 con CRH y glucocorticoides	49
 2. MODELO EXPERIMENTAL	 50
 III) MATERIALES Y MÉTODOS	 51
1. MATERIALES Y REACTIVOS	51
1.1. Estímulos Utilizados	51
 2. MÉTODOS CELULARES	 52
2.1. Mantención de la línea celular AtT20	52
2.2. Cultivos primarios de adenomas hipofisarios	53
2.3. Tranfecciones transientes por el método de Lipofectamina	54
2.4. Tranfecciones estables y obtención de clones	55
 3. MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	 56
3.1. Plásmidos utilizados	56
3.1.1. Plásmidos Reporteros	56

3.1.2. Vectores de expresión	57
3.1.3. Plásmidos para la obtención de cDNA	58
3.2. Uso de la proteína quimérica Gal4	58
3.2.1. Uso de los vectores de expresión para proteínas quiméricas Gal4 para medición de la estimulación o inhibición de la transactivación.	58
3.2.2. Construcción del vector de expresión para la proteína quimérica Gal4-Nur77.	59
3.3. Amplificación de plásmidos, aislamiento, purificación y marcación de fragmentos	60
3.3.1. Preparación de bacterias competentes	60
3.3.2. Transformación bacteriana	60
3.3.3. Purificación de fragmentos de ADN	61
3.3.4. Marcación de Sondas: Método de extensión del primer	62
3.3.5. Marcación de sondas: método de transcripción <i>in vitro</i>	63
3.4. Ensayo de Northern-blot. Medición del mRNA celular	63
3.4.1. Extracción del mRNA	63
3.4.2. Electroforesis del RNA por el método de glioxal	64
3.4.3. Transferencia del RNA a una membrana de Nylon	65
3.4.4. Hibridación con sondas radiactivas	65
3.4.5. Lavado de las membranas de nylon para su reutilización posterior	66
4. METODOS BIOQUIMICOS	66
4.1. Análisis de las tranfecciones	66
4.1.1. Obtención de los extractos celulares	66
4.1.2. Medición de la actividad Luciferasa (LUC)	66
4.1.3. Medición de la actividad Cloranfenicol Acetil Tranferasa (CAT)	67
4.1.4. Medición de la actividad β -galactosidasa (β -gal)	68
4.2. Determinación de ACTH por radioinmunoensayo	68

4.3. Ensayos de unión al receptor de glucocorticoides GR (Scatchard)	69
4.4. Ensayo de quinasas y Western-blot	69
4.4.1. Obtención de los extractos	69
4.4.2. Inmunoprecipitación y reacción de quinasas (ERK2)	70
4.4.3. Corrida electroforética	71
4.4.4. Detección de la fosforilación de Nur77 <i>in vitro</i>	71
4.4.5. Western blot	72
5. ANALISIS DE DATOS	73
5.1. Análisis por densitometría	73
5.2. Análisis estadístico	73
IV) RESULTADOS	74
1. Eventos moleculares involucrados en la regulación de POMC por CRH.	74
1.1. Rol del Calcio en la regulación por CRH, NA y cAMP sobre la expresión de los factores de transcripción Nur77 y Nurr1 y su actividad transcripcional.	74
1.1.1. Efectos sobre el promotor de POMC y la actividad Nur (Nur77/Nurr1)	74
1.1.2. Efectos sobre los niveles de mRNA de Nur77 y Nurr1	77
1.1.3. Efectos sobre el promotor de Nur77	77
1.2. Dependencia de las protein quinasas en la expresión de Nur77 y Nurr1 y la regulación de su actividad transcripcional sobre el sitio NurRE	79
1.2.1 Dependencia de PKA, Calmodulin quinasa II (CAMKII) y Adenilato ciclase en la regulación de la actividad Nur.	79

1.2.2. Dependencia de PKA y Calmodulin quinasa II (CAMKII) sobre la expresión de Nur77 y Nurr1	81
1.3. Rol de las MAPK en la regulación de la actividad transcripcional sobre el sitio NurRE	82
1.4. Caracterización de la cascada de señalización por MAPK en corticotrofos y su activación por CRH y cAMP	84
1.4.1. Efectos sobre Gal4-Elk1 y rol de B-Raf	84
1.4.2. Efectos sobre la actividad de ERK2.	86
1.4.3. Efectos sobre la activación de ERK1/2	86
1.4.4. Influencia de Rap1 en la activación por CRH y cAMP de la transcripción mediada por NurRE (actividad de Nur)	87
1.4.5. Dependencia del calcio, CAMKII y PKA en la activación de la vía de MAPK en corticotrofos	88
1.5. Las MAPK regulan la actividad Nur mediante un aumento en la transactivación de Nur77	89
1.5.1. Efectos sobre el mRNA de Nur77 y Nurr1	89
1.5.2. La actividad de MAPK es necesaria para la transactivación de Nur77	90
1.5.3. Fosforilación de Nur77 por ERK2 <i>in vitro</i> .	90
1.6. Rol del calcio, PKA y MAPK en la regulación del promotor de POMC	92
2. Eventos moleculares involucrados en la regulación de POMC por IL-1	94
2.1. Activación e inducción de Nur77 por IL-1	94
2.1.1. Efectos sobre la transcripción de los sitios NurRE y NBRE	94
2.1.2. Efectos sobre la expresión de Nur77 y Nurr1	95
2.1.3. Regulación sobre el promotor de Nur77	96
2.2. Dependencia de protein quinasas en los efectos de IL-1 sobre la inducción y actividad de Nur77	97
2.2.1. Efectos en la actividad de Nur77	97

2.2.2. Efectos sobre la expresión de Nur77	98
2.3. Análisis de la dependencia de Nur77 y el sitio NurRE en la regulación de POMC y secreción de ACTH por IL-1.	98
2.3.1. Relevancia de NurRE en la estimulación del promotor POMC por IL-1	99
2.3.2. Respuesta a IL-1 de una línea celular que sobreexpresa una mutante dominante negativa de Nur77 (AtT20N77)	100
2.3.2.1. Generación de los clones estables	100
2.3.2.2. Testeo de la funcionalidad de Nur77 DN en el clon AtT20N77	101
2.3.2.3. Respuesta a IL-1 de la línea celular AtT20N77 sobre la expresión de POMC.	103
2.3.2.4. Respuesta a IL-1 de la línea celular AtT20N77 sobre la secreción de ACTH	103
2.4. Rol de NFkB en la activación de Nur77 e inducción de POMC por IL-1	104
2.4.1. Efectos sobre el promotor de POMC	104
2.4.2. Efectos sobre la actividad Nur	105
3. Efectos moduladores de IL-1 sobre la estimulación por CRH y la inhibición por glucocorticoides de POMC y ACTH.	106
3.1. Sinergismo entre IL-1 y CRH en la actividad de Nur77	106
3.2. Efecto sensibilizador de IL-1 sobre la acción de los glucocorticoides.	107
3.2.1. Efectos sobre la secreción de ACTH	108
3.2.2. Efectos sobre el mRNA de POMC	108
3.2.3. Efectos sobre adenomas hipofisarios obtenidos de pacientes con la enfermedad de Cushing	109
3.2.4. Efectos de IL-1 sobre el receptor de GR	110

V) DISCUSIÓN	112
1. Mecanismos Moleculares involucrados en la inducción y activación de los factores Nur por CRH y cAMP	113
2. Relevancia y dependencia de la actividad de Nur en la inducción de POMC por IL-1.	122
3. Efectos moduladores de IL-1 sobre la estimulación por CRH y la inhibición por glucocorticoides de POMC y ACTH	125
VI) CONCLUSIONES	129
VII) REFERENCIAS	131

ABREVIATURAS

ACTH	corticotrofina
AP1	proteína activada 1 "activated protein 1"
APS	persulfato de amonio
AVP	arginina/vasopresina
BSA	seroalbúmina bovina
CAMKII	calmodulín quinasa II
cAMP	AMP cíclico
CAT	cloranfenicol-acetil-transferasa
CHO	células de ovario de hamster
CMV	promotor de citomegalovirus
CRH	hormona liberadora de corticotrofina
CRH-R	receptor de CRH
DBD	dominio de unión al DNA
DG	diacilglicerol
DN	dominante negativo
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EM	eminencia media
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
-gal	galactosidasa
GEF	factor intercambiador de GTP
GH	hormona de crecimiento
GF	factor de crecimiento
GR	receptor a glucocorticoides
GRE	elemento respondedor a glucocorticoides
HPA	hipotálamo-pituitario-adrenal
icv.	intra-cerebro-ventricular
IKK	IKB quinasa
IL-	interleuquina
IL-1R	receptor de IL-1
IL-1RacP	proteína asociada al IL-1R
IL-2R	receptor de IL-2
IP3	inositol trifosfato

JNK	Jun quinasa
KCl	cloruro de potasio
LBD	dominio de unión a ligando
LUC	luciferasa
MAPK	quinasa activada por mitógenos
MBP	proteína básica de mielina
MEK	MAPK/ERK quinasa
MEKK	quinasa que fosforila a MEK
min	minutos
mNPV	región magnocelular del núcleo paraventricular
mRNA	RNA mensajero
NA	noradrenalina
NFkB	factor nuclear kB
NGF	factor de crecimiento neuronal
nGRE	elemento respondedor negativo a glucocorticoides
NIF	nifedipina
NPV	núcleo paraventricular
NSO	núcleo supraóptico
NTS	núcleo del tracto solitario
OVLT	órgano vascularis de la lámina terminal
PACAP	péptido activador de la adenilato ciclasa
PKC	proteín quinasa C
PKC	proteín quinasa C
PLC	fosfolipasa C
pNPV	región parvocelular del núcleo paraventricular
POMC	proopiomelanocortina
PrRP	péptido liberador de prolactina
RSV	promotor de virus de sarcoma
SFO	órgano subfornical
SNC	sistema nervioso central
SRE	elemento respondedor a suero
TCF	factores de complejos terciarios
TNF-	factor de necrosis tumoral
TPA	ésteres de forbol

TRAF

factores asociados al receptor de TNF

TSH

tirotrofina

VIP

péptido vasointestinal

I) INTRODUCCIÓN

El eje Hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), controla la respuesta al estrés mediante la secreción de glucocorticoides al aparato circulatorio, modificando de esta manera al organismo para adaptarse a esta nueva situación.

El corticotrofo se encuentra localizado en la hipófisis, (adenohipófisis o hipófisis anterior) y cumple un rol fundamental como parte integral del eje HPA. Es un tipo celular altamente especializado en la producción y secreción de la corticotrofina (ACTH) la cual por el sistema circulatorio, llega hasta la corteza adrenal donde produce la liberación de glucocorticoides a la circulación. A su vez los glucocorticoides inhiben por retroalimentación negativa (feedback) al eje HPA controlando su respuesta.

El corticotrofo es un punto central de regulación del eje HPA, ya que es afectado por la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) de origen hipotalámico y también es el blanco de acción de los glucocorticoides plasmáticos. Por lo tanto el control en la producción y liberación de ACTH depende de la presencia de factores liberadores hipotalámicos y glucocorticoides que afectan al corticotrofo en forma diferencial.

La función del corticotrofo también es regulada por citoquinas provenientes del sistema inmune. Luego de una inflamación se produce un pico de citoquinas proinflamatorias en plasma; el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-1 (IL-1) son producidos principalmente por monocitos y macrófagos pertenecientes al sistema inmune. Entre ellas, IL-1 activa al corticotrofo y estimula la producción de ACTH. El pico en los niveles de glucocorticoides producido por la activación del eje HPA inhibe la acción en exceso de las citoquinas inflamatorias evitando efectos tóxicos para el organismo.

Esta tesis se centra en la caracterización de los mecanismos moleculares en el corticotrofo involucrados en la activación / inhibición génica y transducción de

señales, por sus reguladores fisiológicos más importantes, CRH, glucocorticoides e IL-1.

Luego de introducir los mecanismos generales de regulación y acción del corticotrofo y del eje HPA en su conjunto, nos centraremos en los mecanismos moleculares involucrados en la función corticotrofa.

1. EL EJE HIPOTÁLAMO- PITUITARIO - ADRENAL

1.1. Organización del eje HPA

El eje HPA posee una organización compleja (Figura 1) y una importancia fundamental en el montaje de la respuesta al estrés.

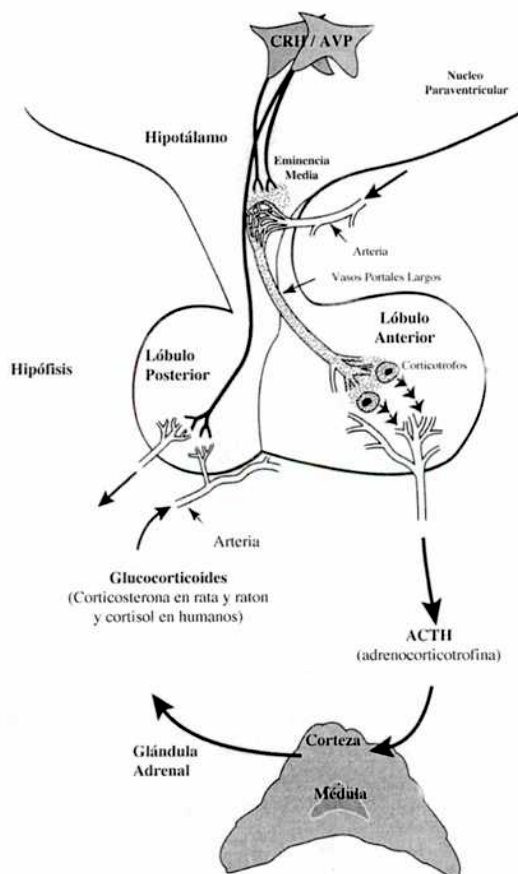


Figura 1. Figura representativa del eje HPA.

Se muestra el hipotálamo, la hipófisis, la glándula adrenal, las vías de comunicación entre ellos y los productos secretados; Arginina-Vasopresina (AVP); Hormona liberadora de corticotrofina (CRH), ACTH y glucocorticoides. (Turnbull & Rivier. 1999)

El núcleo principal del sistema nervioso central involucrado en la regulación del eje HPA es el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo. Este núcleo es la

fuelle principal de CRH, péptido de 41 aminoácidos que es el regulador fisiológico de la secreción de ACTH en la hipófisis (Rivier & Plotsky. 1986).

Las neuronas del NPV proyectan sus prolongaciones hacia la zona externa de la eminencia media (EM) y liberan CRH y otros péptidos a una red especializada de capilares. La hipófisis anterior (o adenohipófisis) se encuentra vascularizada por vasos que provienen de los senos capilares en la EM (Figura 1).

El NPV posee una topografía discreta pero su organización funcional y fenotípica posee solapamientos. Está compuesto por dos subdivisiones neurosecretorias mayores, la región magnocelular (mNPV) y la región parvocelular (pNPV). También se encuentra una región que contiene un grupo de células localizado en la región mas caudal, de la cual se originan proyecciones a estructuras autonómicas cerebrales (Sawchenko *et al.* 1996).

El mNPV junto con el núcleo supraóptico (NSO) constituyen las neuronas magnocelulares, las cuales son la fuente mayor de arginina-vasopresina (AVP) y oxitocina, liberadas a la circulación general por terminaciones en la hipófisis posterior.

La región de pNPV mas medial es la mayor fuente de neuronas liberadoras de CRH, las cuales liberan CRH a la circulación hipofisaria portal. Los grupos celulares que se proyectan a las estructuras autonómicas contienen los tres péptidos (CRH, AVP y oxitocina).

Aunque estas subdivisiones del NPV son anatómicamente discretas, este núcleo presenta una plasticidad fenotípica en cuanto a los péptidos que secreta. Por ejemplo, las neuronas del hipotálamo que proyectan a la EM también secretan péptidos adicionales además de CRH, más notablemente AVP (Sawchenko *et al.* 1984, Tilders *et al.* 1993).

No solo CRH, sino también AVP y oxitocina, entre otros péptidos hipotalámicos regulan la función del corticotrofo, como veremos más adelante.

La hipófisis está conformada por la neurohipófisis y la adenohipófisis. Esta última está compuesta por distintos tipos celulares, células estrelladas, que dan el soporte estructural a la hipófisis, y células endocrinas diferenciales que provienen de una célula progenitora común: las células tirotróficas, que secretan la hormona tirotrófina (TSH); las somatotróficas, que secretan la hormona de crecimiento (GH); las lactotróficas, que secretan prolactina y las corticotróficas, que secretan ACTH.

1.2. Características del corticotrofo

El corticotrofo es un tipo celular altamente especializado cuya función principal es la producción y secreción de ACTH al torrente sanguíneo y es el tipo celular involucrado en la regulación del eje HPA. Es el punto de regulación fina del eje ya que es afectado por señales hipotalámicas y glucocorticoides provenientes de la corteza adrenal. En el corticotrofo se integran las distintas señales estimuladoras e inhibitorias modulando la expresión del gen de proopiomelanocortina (POMC), precursor de ACTH, y la secreción hormonal (Figura 2).

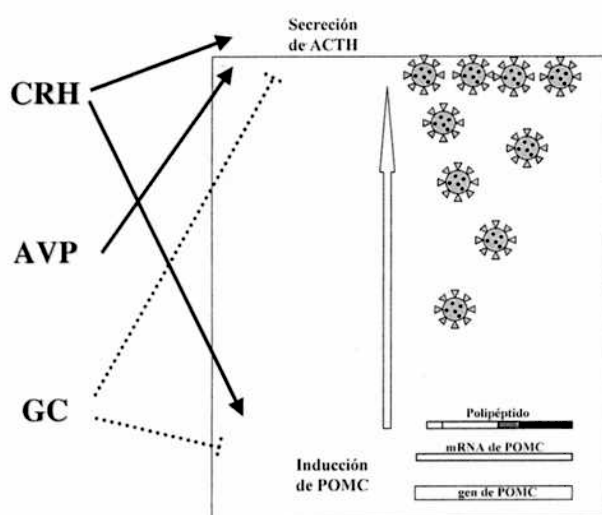


Figura 2. Figura representativa de la regulación del corticotrofo por CRH, AVP y glucocorticoides respecto a la producción y secreción de ACTH.

Para identificar los mecanismos moleculares de la función corticotrofa tanto en la secreción de ACTH como en la regulación del gen de POMC, se ha utilizado rutinariamente una línea celular corticotrofa AtT20 que conserva muchas características regulatorias de los corticotrofos normales.

1.2.1. El gen de POMC y la hormona ACTH

El gen de POMC es sintetizado como un polipéptido único que por procesamiento diferencial genera una amplia variedad de hormonas. Este polipéptido inicial es procesado diferencialmente por los lóbulos neuro-intermedio y anterior de la hipófisis (Figura 3). Así en la hipófisis anterior predominan como productos finales un fragmento amino-terminal de 16KD glicosilado, ACTH y β -lipotrofina (β -LPH), también se producen γ -LPH y β -endorfina pero en menores cantidades. En la hipófisis neuro-intermedia el procesamiento es mayor y se obtienen los productos mas pequeños.

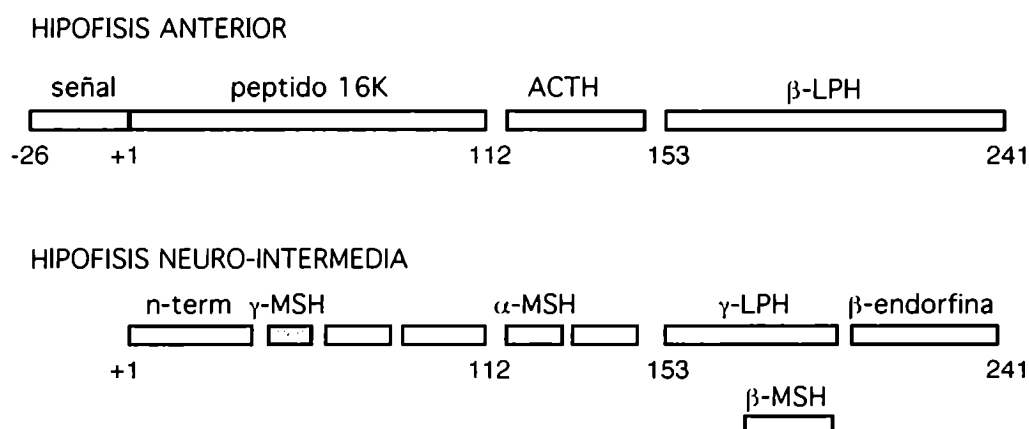


Figura 3. Procesamiento diferencial de POMC.

Esquema representativo de los productos diferenciales que se obtienen en los lóbulos anterior e intermedios de la hipófisis. Siendo los productos principales en la hipófisis anterior ACTH y β -LPH y en la neurohipófisis intermedia β -endorfina α , β y γ -MSH.

El gen de POMC posee zonas altamente conservadas entre especies. La porción codificante del gen posee sitios de alta homología entre ellos. Las distintas isoformas de melanocortina (α , β y γ -MSH) se encuentran en su región

codificante y se cree que fueron originadas por duplicación de un fragmento común (Whitfeld *et al.* 1982). En el corticotrofo la maduración se produce durante el tráfico vesicular y por clivaje final en las vesículas secretorias se obtienen ACTH y β -LPH o β -endorfina dentro de una misma vesícula.

1.2.2. Caminos secretorios en el corticotrofo

El corticotrofo posee dos tipos distintos de caminos secretorios (Arvan *et al.* 1991, Burgess & Kelly. 1987). El camino constitutivo que es el camino clásico de exportación de proteínas extracelulares presente en todas las células eucariotas y que también se encarga de llevar proteínas integrales de membrana a la membrana plasmática. Este camino secretorio es el camino por "default", no es regulado y no es utilizado por el corticotrofo para la secreción hormonal (Matsuuchi & Kelly. 1991, Moore *et al.* 1983).

Por el contrario, existe otro camino vesicular que forma parte del mecanismo de secreción regulada y posee características similares a la secreción vesicular en sinapsis neuronales. En este camino, las vesículas secretorias poseen una cubierta de clatrina y llegan hasta la membrana plasmática donde quedan ancladas al aparato secretor. Una característica distintiva de los gránulos secretorios es la alta densidad al microscopio electrónico, consecuencia de su alta concentración hormonal que es aproximadamente unas 200 veces más concentrado en relación al contenido en el retículo endoplásmico. Además el contenido en las vesículas secretorias puede almacenarse por largos periodos dando lugar a una gran especialización celular en secretar una u otra hormona (Burgess & Kelly. 1987). En el corticotrofo, estas vesículas quedan cargadas con ACTH.

El estímulo secretor, que en general es un pico en la concentración del calcio intracelular, produce la fusión de las membranas con la concomitante liberación hormonal al medio extracelular (Clark & Kemppainen. 1994).

Profundizaremos acerca de los mecanismos moleculares de regulación del corticotrofo luego de introducir primero las distintas vías de regulación que afectan la actividad del eje HPA en su conjunto.

1.3. Regulación del eje HPA

La regulación del eje HPA es de gran importancia ya que de ella dependen los niveles de glucocorticoides circulantes. La secreción basal de glucocorticoides es necesaria para el funcionamiento normal de la mayoría de los tejidos, e incluso pequeñas desviaciones en los niveles normales circulantes de estos esteroides producen cambios en una amplia variedad de respuestas y parámetros bioquímicos.

Los glucocorticoides actúan sobre múltiples tejidos blancos para aumentar o inhibir diversas respuestas con el objetivo de proveer al metabolismo (el sistema endocrino, nervioso, cardiovascular, e inmune) los cambios necesarios para la supervivencia.

Existe un ritmo circadiano de secreción de glucocorticoides con el pico de secreción en el momento de despertar y los niveles más bajos de glucocorticoides en sangre durante las primeras horas de sueño. Este control circadiano está regulado por interacciones entre el sistema endocrino y el sistema nervioso central (SNC).

Además de la regulación circadiana de los niveles basales de glucocorticoides en sangre, estos pueden ser incrementados ante cualquier estímulo que sea considerado como una amenaza al organismo (de naturaleza fisiológica o psicológica).

Estas señales estimuladoras son integradas a los tres niveles del eje, el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal.

El mecanismo de regulación negativa que ejercen los glucocorticoides sobre el eje HPA es altamente complejo e involucra tanto al SNC como a la hipófisis (Keller-Wood & Dallman. 1984, Young *et al.* 1986).

Además de la inhibición que ejerce el pico de glucocorticoides sobre el eje HPA, existe una inhibición tónica ejercida por las variaciones circadianas en la actividad del eje HPA. La sensibilidad a esta inhibición cambia según el estadio

del ciclo (Dallman *et al.* 1987). Esta inhibición por glucocorticoides es ejercida en forma directa sobre el hipotálamo e hipófisis y en forma indirecta, la que es mediada por otras regiones cerebrales (Jacobson & Sapolsky. 1991).

En el hipotálamo los glucocorticoides actúan directamente inhibiendo la transcripción de preproCRH (el precursor de CRH) ya que el contenido de CRH hipotalámico se ve incrementado por adrenalectomía en ratas (Suda *et al.* 1983). Los niveles del mRNA de preproCRH se ven incrementados en el hipotálamo en un 50% una semana posterior a la adrenalectomía (Jingami *et al.* 1985), y la administración posterior de dexametasona disminuye estos niveles elevados, pero solamente a un 100% (Jingami *et al.* 1985). Contrariamente a esta leve regulación por los glucocorticoides sobre la expresión de CRH en el hipotálamo, los niveles del mRNA de POMC en la hipófisis son regulados más estrictamente ya que la adrenalectomía incrementa el mRNA de POMC en un 950% y el tratamiento con dexametasona inhibe la expresión por debajo de un 19% (Jingami *et al.* 1985).

Estos resultados demuestran que el sitio de regulación principal por glucocorticoides de la actividad del eje HPA es la hipófisis.

1.3.1. Integración sensorial en el SNC

Consistentemente con la gran diversidad de estímulos estresantes que dan lugar a la activación del eje HPA, el pNPV recibe distintas señales provenientes de diferentes regiones cerebrales que involucran información de zonas viscerales, somatosensoriales, auditivas, visuales y también de regiones límbicas involucradas en la integración de influencias cognitivas y emocionales (Sawchenko *et al.* 1996). Estas señales incluyen proyecciones de otros núcleos dentro del hipotálamo (Ej. Zona preóptica anterior hipotalámica). Señales extrahipotalámicas incluyen áreas dentro y fuera de la barrera hematoencefálica, las áreas que se encuentran dentro incluyen al núcleo del tracto solitario (NTS) y otros grupos celulares catecolaminérgicos (que secretan catecolaminas). Las zonas que se encuentran fuera de la barrera son el

órgano vascularis de la lámina terminal (OVLT) y el órgano subfornical (SFO) (Sawchenko *et al.* 1996).

Existen entonces múltiples niveles hipotalámicos en los cuales la actividad del eje HPA puede ser modulada.

1.4. Regulación funcional del corticotrofo

1.4.1. Por péptidos hipotalámicos

1.4.1.1. Estudios *in vivo*

Como ya mencionamos anteriormente, ante un estímulo estresante las neuronas del NPV secretan CRH, entre otros péptidos, a la circulación portal, produciendo la activación del eje HPA.

En la hipófisis CRH interacciona con receptores específicos acoplados a proteína G (CRH-R) que se encuentran en la superficie de células corticotrofas, resultando en un aumento de la expresión de POMC y de la secreción de ACTH y otros péptidos derivados a la circulación periférica (Turnbull & Rivier. 1997, Vale *et al.* 1981) (Figura 1).

Sin embargo, aunque el consenso general es que la CRH proveniente de mNPV en el hipotálamo es el principal secretor de ACTH en la hipófisis, esto no es absoluto ya que la secreción de AVP y oxitocina, provenientes de pNPV y neuronas magnocelulares contribuyen a la secreción de ACTH en la hipófisis en una magnitud que depende de la naturaleza del estrés. Estas neuronas actúan sinérgicamente con CRH para estimular la secreción de ACTH (Rivier & Vale. 1983) y su actividad se ve incrementada durante la activación del eje HPA (Sawchenko *et al.* 1996).

Además, AVP y oxitocina provenientes de otras fuentes distintas del pNPV pueden contribuir al pool de péptidos hipotalámicos en la circulación portal hipofisaria (Antoni *et al.* 1990, Plotsky & Sawchenko. 1987) .

Un ejemplo de activación del eje HPA por AVP es en respuesta a hipoglucemia. El tratamiento agudo con insulina produce un aumento en la secreción de ACTH, efecto que es bloqueado por pretratamiento con anticuerpos anti-CRH y por antagonistas β -adrenérgicos. Sin embargo el aumento en los niveles de ACTH correlaciona con niveles elevados de AVP y no de CRH en el sistema portal (Plotsky *et al.* 1985). En este modelo, los niveles de CRH en el sistema portal son necesarios para la secreción de ACTH pero su regulación está dada por variaciones en los niveles de AVP y adrenalina (plasmática).

Por otra parte, se describieron efectos estimulatorios de otros péptidos hipotalámicos sobre la secreción de ACTH, como por ejemplo el péptido vasointestinal (VIP), el péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) y norepinefrina (NA) (Aoki *et al.* 1997, Plotsky *et al.* 1985).

1.4.1.2. Estudios *in vitro*

Por el año 1983 se observó que el tratamiento prolongado de cultivos primarios de adenohipófisis con CRH, a diferencia de un tratamiento breve (1 h), no solo aumentaba los niveles de ACTH liberado sino que también elevaba el contenido intracelular de ACTH (Vale *et al.* 1983). Esto implica que CRH además de estimular la secreción de ACTH aumenta su producción. Más adelante se observó que CRH estimulaba al mRNA de POMC en células AtT20 en cultivo en tiempos más largos (6 y 24 hs) que los necesarios para su efecto secretor. Este efecto era mimificado por el tratamiento con análogos permeables de cAMP o por ésteres de forbol (TPA), indicando que distintas vías de activación están involucradas en la regulación de la actividad transcripcional sobre el gen de POMC (Affolter & Reisine. 1985).

Previamente se había observado un efecto potenciador de AVP, oxitocina, epinefrina, NA y angiotensina II sobre la secreción de ACTH por CRH en cultivos primarios de hipófisis (Vale *et al.* 1983). Al analizar si un efecto similar de potenciación ocurría sobre la actividad transcripcional en el promotor de POMC, CRH como adrenalina, esta última vía receptores β -adrenérgicos, estimulaban al promotor de POMC tempranamente (3-5hs) y el tratamiento

conjunto producía un efecto sinérgico en la estimulación. Este sinergismo es mediado por la actividad de PKA. Contrariamente AVP y angiotensina II producen efectos mínimos sobre el promotor de POMC indicando que la regulación en la producción de ACTH esta dada principalmente a otro nivel (Aoki *et al.* 1997).

PACAP y VIP producen generalmente sus efectos mediante un aumento en los niveles intracelulares de cAMP y como se mencionó anteriormente se ha descrito su función reguladora sobre la secreción hormonal en corticotrofos. Ambos péptidos hipotalámicos estimulan al promotor de POMC y actúan sinérgicamente con CRH (Aoki *et al.* 1997). Sin embargo el efecto activador de ambos es independiente de la actividad de PKA ya que la estimulación no es bloqueada por tratamiento con el inhibidor H89 (Aoki *et al.* 1997).

1.4.2. Regulación por glucocorticoides

Existen tres niveles de inhibición ejercido por los glucocorticoides sobre el corticotrofo, clasificados según su temporalidad; rápido, intermedio y tardío (Keller-Wood & Dallman. 1984).

1.4.2.1. Regulación rápida

Los esteroides, por su capacidad liposoluble, pueden atravesar la membrana plasmática e interactuar con receptores intracelulares. Estos receptores son a su vez factores de transcripción y ejercen su acción a través de la regulación de la expresión génica (Se detallará este mecanismo mas adelante en la introducción). Sin embargo, recientemente se identificaron otros mecanismos de acción para los esteroides que podrían explicar efectos independientes de la activación a nivel transcripcional.

Algunos autores observaron que el tratamiento con dexametasona produce una disminución en la entrada de calcio y en la secreción de ACTH (30 min.) estimulada por CRH en cultivos primarios de hipófisis. Aparentemente este efecto sería independiente de la actividad transcripcional ya que no es inhibido

por cicloheximida ni actinomicina D y es consecuencia de una hiperpolarización celular provocada por la inhibición de una corriente no selectiva catiónica por los glucocorticoides (Takano *et al.* 1998). Por otro lado la inyección de prednisolona endovenosa (un agonista del receptor de glucocorticoides (GR)) en ratas disminuye el pico de secreción de corticosterona por estrés 30 min. después de la inyección (Andrews *et al.* 1998). En células AtT20 el tratamiento con dexametasona inhibe la generación de cAMP y la secreción de ACTH, efecto que se da aún en presencia de actinomicina D. Este efecto es bloqueado por la toxina de pertussis implicando la dependencia de proteínas G en la inhibición temprana por glucocorticoides y receptores de membrana acoplados a proteína G (Iwasaki *et al.* 1997).

El mecanismo de inhibición rápida por glucocorticoides no está claro, pero probablemente involucre la activación a nivel de la membrana plasmática ya que sus efectos son independientes de la síntesis proteica y se dan aproximadamente en tiempos menores a 30 min. Aunque se identificaron receptores de membrana para una variedad de hormonas esteroideas (Wehling. 1997), los mecanismos de acción del receptor de glucocorticoides no fueron ampliamente caracterizados aún.

1.4.2.2. Regulación intermedia

Otros autores observaron en células AtT20 que los glucocorticoides producen una inhibición de la secreción de ACTH (3-4 hs) estimulada por extractos hipotalámicos o análogos de cAMP (Phillips & Tashjian. 1982). Contrariamente al efecto de inhibición temprana, que se observa a los 30 min., este mecanismo de inhibición depende de la síntesis de nuevas proteínas, ya que es inhibido por tratamiento con cicloheximida (Phillips & Tashjian. 1982). Los niveles intracelulares de ACTH y β -endorfina no se encuentran alterados después de 6 hs de tratamiento con dexametasona, implicando que la inhibición esta dada a nivel de la fusión de las vesículas secretorias con la membrana plasmática (exocitosis vesicular) y no por una variación en la cantidad de vesículas

cargadas como consecuencia de una menor producción hormonal (Phillips & Tashjian. 1982).

Sin embargo respecto al punto preciso de inhibición en la exocitosis existen algunas controversias. Algunos autores no observaron una inhibición por glucocorticoides en la secreción de ACTH estimulada por la entrada de calcio a la célula mediante despolarización con cloruro de potasio (KCl) (Phillips & Tashjian. 1982). Sin embargo otros autores si observaron inhibición en la secreción de ACTH por los glucocorticoides en células AtT20 despolarizadas con KCl (Woods *et al.* 1992). El tratamiento con glucocorticoides no afecta la entrada de calcio por tratamiento con CRH (Clark & Kemppainen. 1994). Por lo tanto el efecto inhibitorio que ejercen los glucocorticoides sobre la secreción de ACTH por CRH probablemente sea ejercida en un instante posterior al pico de entrada del calcio extracelular.

1.4.2.3. Regulación tardía

Luego de la adrenalectomía en ratas, los niveles de ACTH se incrementan drásticamente a las 4 hs para caer nuevamente a las 8 hs. Este efecto es dependiente de la inhibición intermedia que mencionamos anteriormente. Sin embargo los niveles plasmáticos de ACTH comienzan a incrementar continuamente en el transcurso de días. Este efecto es debido a la inhibición tardía que ejercen los glucocorticoides sobre la hipófisis y es acompañado por la inducción del mRNA de POMC en la hipófisis anterior llegando a una inducción de 20 veces a los 18 días post-adrenalectomía (Birnberg *et al.* 1983). Este efecto es revertido por el tratamiento crónico con dexametasona (Birnberg *et al.* 1983).

A diferencia de la regulación rápida e intermedia que afectan principalmente el mecanismo de exocitosis de vesículas cargadas en el corticotrofo, la regulación tardía ocurre en períodos mas largos y se da como consecuencia de variaciones en la actividad transcripcional del gen de POMC y como consecuencia en los niveles de ACTH disponibles para ser secretados.

La regulación del gen de POMC fue ampliamente estudiada y se demostró la inhibición por glucocorticoides del mRNA de POMC tanto en cultivos primarios hipofisarios (Suda *et al.* 1988) como en la línea celular AtT20 (Philips *et al.* 1997b, Roberts *et al.* 1979). Los mecanismos moleculares involucrados en la inhibición del promotor de POMC por glucocorticoides serán desarrollados mas adelante en esta introducción.

La regulación por glucocorticoides se encuentra alterada en adenomas corticotrofos hipofisarios, que secretan grandes cantidades de ACTH a la circulación produciendo elevados niveles de glucocorticoides plasmáticos, que se evidencian como el síndrome de Cushing. Estos adenomas tienen disminuida la sensibilidad a la inhibición por glucocorticoides (Newell-Price *et al.* 1998) y esta ausencia de sensibilidad correlaciona con una menor expresión del mRNA de GR α (Mu *et al.* 1998).

2. REGULACIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE EL EJE HPA Y LAS CITOQUINAS

La regulación del sistema inmune por la glándula adrenal fue observada a principios y mediados del siglo 19 cuando Thomas Addison documentó que un paciente con insuficiencia adrenal tenía un exceso de linfocitos circulantes (Addison. 1855). Concordantemente con esta observación la extirpación de la glándula adrenal en la rata producía hipertrofia del timo (órgano responsable de la maduración linfocitaria) (Jaffe. 1924). El agrandamiento de la glándula adrenal y la involución tímica fue asociada al estrés independientemente del tipo de estrés producido (Selye. 1936). Estos estudios sugerían por primera vez una asociación entre la actividad del sistema inmune y la actividad adrenal. En los años 40 Kendall y Reichstein identificaron que los glucocorticoides poseían esta acción inmunosupresora (Hench *et al.* 1949).

Sin embargo no fue hasta fines de la década del 70 que se identificó que los niveles fisiológicos de glucocorticoides son importantes como reguladores de la respuesta inmunológica preservando la especificidad y controlando la duración de la respuesta inmune (Besedovsky *et al.* 1979, del Rey *et al.* 1984).

Así como los glucocorticoides son reguladores de la respuesta inmune, el eje HPA es regulado recíprocamente por el sistema inmune (Besedovsky *et al.* 1975). Experimentos importantes demostraron que la inyección de glóbulos rojos de carnero desencadena, además de la respuesta inmune al antígeno foráneo, un pico en los niveles de glucocorticoides plasmáticos (Besedovsky *et al.* 1975). Además la inyección de sobrenadantes provenientes de células inmunes tratadas con concanavalina A *in vitro*, produce un incremento en los niveles de glucocorticoides plasmáticos (Besedovsky *et al.* 1981), siendo este efecto anulado por la hipofisectomía (Besedovsky *et al.* 1985).

Sin embargo la identificación de los factores provenientes del sistema inmune involucrados en la activación del eje HPA no fue descubierta hasta principios de la década del 80. Se demostró que la inyección de IL-1 recombinante (mediador de señales entre células inmunes) activa al eje HPA aumentando los niveles de ACTH y glucocorticoides plasmáticos en ratas normales (Besedovsky & Sorkin. 1977). Además la inmunoneutralización de IL-1 bloquea la activación del eje HPA por una infección viral (NDV) en ratas (Besedovsky *et al.* 1986).

Se estableció entonces un modelo de regulación mutua donde el sistema inmune estimulaba al eje HPA, mediante la secreción de moléculas solubles (citoquinas), con el fin de controlar su propia respuesta por un aumento en los niveles de glucocorticoides plasmáticos.

2.1. Regulación del eje HPA por citoquinas

El punto principal de regulación del eje HPA por las citoquinas, especialmente por IL-1, fue un tema de debate por varios años. Los trabajos pioneros en mostrar la regulación del eje por citoquinas simultáneamente demostraban la regulación a nivel central y a nivel hipofisario. Algunos autores sugerían que la acción principal de IL-1 era actuando directamente sobre la hipófisis, ya que el tratamiento de cultivos primarios de hipófisis con IL-1 estimula la secreción de ACTH (Bernton *et al.* 1987). Por otro lado otros grupos no encontraban

estimulación de cultivos de hipófisis *in vitro* por IL-1 a pesar de que el tratamiento *in vivo* produce un aumento en los niveles de glucocorticoides y las neuronas productoras de CRH se activan por tratamiento con IL-1 (Berkenbosch *et al.* 1987).

Hoy en día se sabe que las citoquinas regulan la actividad del eje HPA actuando a los tres niveles, el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal.

2.1.1. Regulación del eje HPA por IL-1

2.1.1.1. Regulación a nivel del hipotálamo.

La IL-1 ejerce su acción actuando directamente sobre el hipotálamo ya que la inyección intracerebroventricular (icv) de IL-1 produce *in vivo* un aumento en los niveles de ACTH y glucocorticoides plasmáticos y este efecto es mediado por la secreción de CRH hipotalámica ya que la inmunoneutralización de CRH bloquea la estimulación (Sapolsky *et al.* 1987, Sundar *et al.* 1989).

Algunos autores afirman que el efecto central de IL-1 es mediado por prostaglandinas y óxido nítrico (Sandi & Guaza. 1995, Watanobe *et al.* 1995). Sin embargo la relevancia de las prostaglandinas es controversial porque la administración de indometacina, que bloquea la síntesis de prostaglandinas y el efecto pirógeno de IL-1, no inhibe la secreción de CRH por IL-1 *in vivo* (Sapolsky *et al.* 1987). El aumento de la secreción de CRH y ACTH es consecuencia de una mayor inducción de ambos mRNAs a nivel del hipotálamo y la hipófisis respectivamente (Suda *et al.* 1990) y estaría mediado por la acción directa de IL-1 sobre el hipotálamo ya que IL-1 estimula la secreción de CRH en hipotálamos perfundidos *in vitro* (Tsagarakis *et al.* 1989).

Se creía entonces que los efectos centrales de IL-1 podrían estar mediando la activación del eje HPA por la inyección de IL-1 periférica y que esta llegaba al SNC para ejercer su acción a nivel hipotalámico. Aunque no podía explicarse la vía de entrada de esta citoquina a través de la barrera hematoencefálica.

Trabajos posteriores demostraron la existencia de un sistema de IL-1 funcional en el SNC (Keane *et al.* 1995, Nett *et al.* 1992). Entonces la síntesis de IL-1 central podría explicar la activación del eje *in vivo* mediada por el hipotálamo, en respuesta a niveles elevados de IL-1 en plasma.

2.1.1.2. Regulación a nivel de la hipófisis

IL-1 actúa también directamente sobre la hipófisis, ya que en cultivos primarios de rata y en líneas celulares produce un aumento en la secreción de ACTH, aunque los tiempos de incubación necesarios son mayores a los observados *in vivo* (Fagarasan *et al.* 1989, Woloski *et al.* 1985). Esto podría explicar los dos picos de estimulación del mRNA de POMC que se obtienen por tratamiento crónico con IL-1 *in vivo*, uno rápido (<30 min) y otro lento (4hs) (Melik Parsadaniantz *et al.* 1994, Parsadaniantz *et al.* 1995). El efecto rápido sería dependiente del hipotálamo y el efecto lento sería por acción directa a nivel hipofisario. IL-1 produce también un pico en la secreción de ACTH en hipófisis perfundidas *in vitro* de una manera dosis dependiente (Cambroner *et al.* 1992). El efecto estimulador de IL-1 sobre la secreción de ACTH en cultivos primarios de rata sería independiente de la producción de óxido nítrico (NO) ya que no es afectado por un inhibidor de la NO sintetasa (NOS) (Hashimoto *et al.* 1995).

En la línea celular corticotrofa AtT20 transfectada establemente con una construcción que posee el promotor de POMC unido al gen reportero de luciferasa (POMC-LUC) se identificó la acción estimuladora de IL-1. Así se identificó un efecto estimulador bifásico de IL-1 (a las 2hs y a las 12-16hs) (Katahira *et al.* 1998).

2.1.1.2.1. Expresión de receptores de IL-1 en células hipofisarias

En concordancia con la acción directa a nivel hipofisario, se identificaron sitios de unión a IL-1 en el hipotálamo y la hipófisis *in vivo* (Marquette *et al.* 1995). Se mapeó la localización de los receptores en el SNC (Ban *et al.* 1991) y en el eje HPA (DeSouza *et al.* 1989). También se identificó la expresión del mRNA de

IL-1R en la línea celular corticotrofa AtT20 (Bristulf *et al.* 1991). Posteriormente se identificó en la hipófisis la presencia de dos tipos de receptores de IL-1, el receptor tipo I (IL-1RI) y el receptor tipo II (IL-1RII) (Parnet *et al.* 1993). Estos receptores hipofisarios son idénticos a los que se habían caracterizado previamente en linfocitos T pertenecientes al sistema inmune. La expresión del mRNA para ambos receptores se observó también en la línea celular corticotrofa AtT20 (Parnet *et al.* 1993). Profundizaremos acerca de los mecanismos de señalización por IL-1RI e IL-1RII más adelante en esta introducción.

IL-1 no solo posee un efecto directo secretor sobre la hipófisis, sino que coopera con CRH a nivel de la regulación de los receptores de IL-1. En ratas se observó que CRH sensibilizaba la hipófisis a la secreción de ACTH por IL-1 (Payne *et al.* 1994), efecto debido a un incremento en el número de receptores a IL-1 (Webster *et al.* 1991). Concordantemente, el estrés produce un aumento en los niveles de IL-1RI hipofisarios (Takao *et al.* 1996). En células AtT20 en cultivo el tratamiento con neuromediadores del estrés como CRH o catecolaminas, producen un aumento en los niveles de IL-1RI (Takao *et al.* 1995a). Este efecto es mediado por un aumento en los niveles intracelulares de cAMP (Takao *et al.* 1994). Paralelamente, el tratamiento con somatostatina de células AtT20, que disminuye los niveles intracelulares de cAMP, produce una disminución en el número de receptores (Takao *et al.* 1994).

El tratamiento con glucocorticoides regula también los niveles de IL-1RI en la hipófisis, inhibiendo la regulación positiva por CRH. La inyección intraperitoneal de CRH en ratas produce un aumento en la cantidad de sitios de unión de IL-1 en la hipófisis y los glucocorticoides revierten este efecto (Takao *et al.* 1995b). Esta inhibición por los glucocorticoides se observa también en la línea celular AtT20 estimulada por CRH (Takao *et al.* 1994).

Así como CRH aumenta la sensibilidad a la IL-1 en la hipófisis por un aumento del número de IL-1R, recíprocamente el pretratamiento con IL-1 aumenta la sensibilidad de secreción de ACTH y β -endorfina por CRH, VIP, NA, y TPA (Fagarasan *et al.* 1989).

2.1.1.3. Regulación a nivel de la corteza adrenal

Además de actuar directamente sobre el hipotálamo y la hipófisis, IL-1 actúa directamente sobre la corteza adrenal, ya que estimula la secreción de glucocorticoides en glándulas perfundidas *in vitro* (Roh *et al.* 1987) y en cultivos primarios de células adrenocorticales (Whitcomb *et al.* 1988). Este efecto es mediado por la síntesis de prostaglandinas (Tominaga *et al.* 1991, Winter *et al.* 1990) y catecolaminas (Gwosdow *et al.* 1992).

2.1.2. Regulación del eje HPA por otras citoquinas

Estudios más recientes mostraron que alteraciones en la secreción neuroendocrina son producidas no solo por IL-1 sino también por otras citoquinas provenientes del sistema inmune. Siendo el eje HPA el modelo endocrino más estudiado.

Así como IL-1 ejerce un efecto directo en la secreción de ACTH hipofisaria, la inyección de IL-6 estimula la secreción de ACTH en ratas normales (Naitoh *et al.* 1988) y niveles subóptimos de IL-6 e IL-1 α sinergizan en la inducción temprana (30 min.) de los niveles de ACTH en ratones (Perlstein *et al.* 1991). En concordancia con este sinergismo el tratamiento con anticuerpos anti-IL-6 bloquea el incremento en los niveles plasmáticos de ACTH por inyección con IL-1 (Neta *et al.* 1992). IL-1 e IL-6 actúan en forma diferencial, mientras que IL-1 activa tanto la hipófisis como el hipotálamo *in vivo* (un aumento en la expresión de c-Fos, como señal de activación), IL-6 solamente induce la expresión en la hipófisis (Callahan & Piekut. 1997). Sin embargo otros autores, no observaron un aumento en los niveles del RNA mensajero de POMC en la hipófisis por inyección intraperitoneal de IL-6 (Neta *et al.* 1992).

En hipófisis perfundidas *in vitro* IL-6 estimula la secreción de ACTH y GH (Lyson & McCann. 1991), demostrando el efecto directo de IL-6 sobre la hipófisis.

Células corticotrofas tumorales humanas secretan IL-6 en cultivo, esta secreción está involucrada en los elevados niveles de expresión del mRNA de POMC y la secreción de ACTH por adenomas hipofisarios (Paez Pereda *et al.* 2000).

Otras citoquinas pertenecientes a la familia de IL-6; LIF, IL-11, oncostatina M (OSM) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), que comparten un transductor común, la glicoproteína 130 (gp130) también actúan sobre el eje HPA. LIF e IL-11 son las citoquinas pertenecientes a esta familia que poseen un rol preponderante en la regulación de la función corticotrofa.

Ratones deficientes en el gen de LIF (knock out) presentan defectos en la activación del eje HPA. En estos ratones los niveles de ACTH se encuentran muy reducidos ante un estímulo estresante y se recupera la funcionalidad del eje HPA por la restauración de los niveles de LIF mediante la implantación subcutánea con bombas osmóticas (Akita *et al.* 1996).

LIF induce la transcripción de POMC en cultivos primarios hipofisarios y en la línea celular corticotrofa AtT20 (Akita *et al.* 1995, Stefana *et al.* 1996), potencia además la activación por CRH (Auernhammer & Melmed. 1999).

Otra citoquina perteneciente a la familia gp130, IL-11, estimula también directamente a la hipófisis ya que aumenta los niveles de mRNA de POMC y la secreción de ACTH en cultivos primarios y en la línea celular corticotrofa AtT20 (Auernhammer & Melmed. 1999). IL-11 a su vez, potencia el efecto estimulador de análogos de cAMP sobre el promotor de POMC (Auernhammer & Melmed. 1999).

La inyección de IL-2 estimula también la expresión del gen de POMC en hipófisis de rata sin que se observen cambios en los niveles de expresión de CRH en el hipotálamo (Harbuz *et al.* 1992). El tratamiento con IL-2 de ratas normales o ratas que poseen transplantes de hipófisis también incrementa la secreción de ACTH y β -endorfina (Naito *et al.* 1989, Zakarian *et al.* 1989).

IL-2 estimula la secreción de ACTH en cultivos primarios de hipófisis normales (Karanth & McCann. 1991). Se encontró la expresión de la cadena α del receptor a IL-2 (IL-2R α) en cultivos primarios de hipófisis (Smith *et al.* 1989) y por inmunofluorescencia en cultivos primarios de hipófisis se detectó la colocación del IL-2R con ACTH (Arzt *et al.* 1992). En células AtT20 la estimulación con CRH o TPA, al igual que en cultivos de adenomas corticotrofos humanos, incrementa los niveles del mRNA del IL-2R α (Arzt *et al.* 1992).

TNF- α en altas dosis, IFN- γ e IFN- α también estimulan al eje HPA (Holsboer *et al.* 1988, Krishnan *et al.* 1987, Tracey *et al.* 1986). Sin embargo, existen controversias acerca del efecto directo de estas citoquinas sobre la hipófisis.

El tratamiento con TNF- α de cultivos hipofisarios inhibe la secreción de ACTH y otras hormonas estimuladas por factores hipotalámicos (Gaillard *et al.* 1990). Contrariamente, el tratamiento de mitades de hipófisis en cultivo con TNF- α estimula la secreción hormonal de ACTH, GH y TSH en forma dosis dependiente (Milenkovic *et al.* 1989).

A diferencia del efecto estimulador sobre el eje HPA de IFN- γ , el tratamiento con esta citoquina de cultivos primarios de hipófisis reduce la secreción de ACTH, GH y prolactina (Vankelecom *et al.* 1990).

Previamente reportamos que existe una interacción entre citoquinas y GR. El pretratamiento con dosis mínimas de TNF- α sobre células fibroblásticas aumenta la sensibilidad de éstas a la acción inhibitoria que ejercen los glucocorticoides sobre la apoptosis inducida por una segunda dosis citotóxica de TNF- α (Costas *et al.* 1996). Este efecto es mediado por una mayor actividad transcripcional del GR actuando sobre sus elementos respondedores (GRE). Este efecto también se observó al tratar con IL-1 células corticotrofas en cultivo.

Las citoquinas no solo provienen del sistema inmune y regulan la función hipofisaria, sino que son producidas también por la propia hipófisis ejerciendo

un rol auto-paracrino (revisado en Arzt *et al.* 1999).

La producción de IL-1 en la hipófisis también fue demostrada. La detección de IL-1 y su mRNA son estimulados por el tratamiento de ratas con LPS (Koenig *et al.* 1990, Takao *et al.* 1993). Cultivos de adenomas hipofisarios humanos expresan el mRNA de IL-1 (Green *et al.* 1996). La hipófisis expresa también el antagonista endógeno de IL-1 (IL-1ra) (Gatti & Bartfai. 1993) y su expresión es incrementada por el tratamiento con LPS tanto en la hipófisis como en otros tejidos (Gabellec *et al.* 1995).

La producción de IL-6 y LIF, fue demostrada en la hipófisis así como la presencia de su mRNA (Spangelo *et al.* 1990b, Watanobe & Suda. 2000). La expresión de IL-6 es incrementada por una diversidad de compuestos: IL-1, LPS, VIP, forskolina, interferones, PACAP y TNF- α (Spangelo *et al.* 1990b, Tatsuno *et al.* 1991). Esta amplia regulación es debida a que la expresión de IL-6 es incrementada tanto por activación de la vía de PKA como la de PKC. Los glucocorticoides inhiben la estimulación por estos factores (Spangelo *et al.* 1990a).

En la hipófisis, especialmente en corticotrofos y somatotrofos se produce LIF y sus receptores (Hanisch *et al.* 2000). El tratamiento con LPS aumenta la expresión de LIF en la hipófisis (Watanobe & Suda. 2000). LIF es a su vez secretada por células foliculares hipofisarias en cultivo (Ferrara *et al.* 1992). Siendo LIF un importante regulador auto-paracrino de la función corticotrofa.

Se detectó también la expresión de otras citoquinas en la hipófisis; como por ejemplo IL-2 y TNF- α en cultivos de adenomas hipofisarios y en la línea celular AtT20 (Arzt *et al.* 1992, Todd *et al.* 1995).

3. EL PROMOTOR DE POMC

En general los factores secretorios a su vez inducen al gen de POMC generando así la producción de nuevas vesículas cargadas, pero esta relación no es siempre directa. Por ejemplo CRH produce ambos efectos, estimula la

secreción hormonal y la inducción de POMC. Por otro lado AVP es un buen secretor pero un débil inductor de POMC per se y sus efectos sobre el gen son moduladores de la acción de CRH (Vale *et al.* 1978).

El nivel transcripcional de POMC es el regulador general de la respuesta corticotrofa mediante la disponibilidad de vesículas cargadas que puedan ser liberadas ante un posterior evento secretor.

De esta forma la medición de los niveles de mRNA del gen de POMC ha sido una herramienta de estudio del nivel de activación corticotrofa por diversos factores y el estudio de los elementos respondedores en el promotor de POMC es de gran importancia para el entendimiento de las interacciones a nivel molecular entre las distintas señales estimulatorias e inhibitorias que regulan su expresión.

3.1. Elementos Respondedores y factores de transcripción involucrados en la regulación del promotor de POMC

El promotor de POMC es altamente complejo y es blanco de regulación por factores hipotalámicos, citoquinas y glucocorticoides (Figura 4).

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular y el uso de vectores reporteros para el análisis de promotores, se identificaron distintos sitios de regulación en el gen de POMC y sus factores de transcripción involucrados.

Aunque se identificaron distintos sitios consenso en el promotor de POMC. No se han identificado hasta recientemente los elementos respondedores responsables de su regulación.

Por ejemplo, se identificaron zonas características que son esenciales para la expresión de POMC, confiriendo la expresión diferencial en corticotrofos y no en los otros tipos celulares de la adenohipófisis (Liu *et al.* 1995). Por ensayos de "footprinting" se identificaron distintas regiones que cooperativamente confieren la expresión tejido específica en corticotrofos y melanotrofos (Liu *et al.* 1992, Rubinstein *et al.* 1993). La dependencia de T-pit/Tbx19 fue demostrada ya que en ratones transgénicos para T-pit se expresa el mRNA de

POMC en células que normalmente no lo expresan (Lamolet *et al.* 2001). Siendo entonces un factor esencial para la expresión tejido específica de POMC.

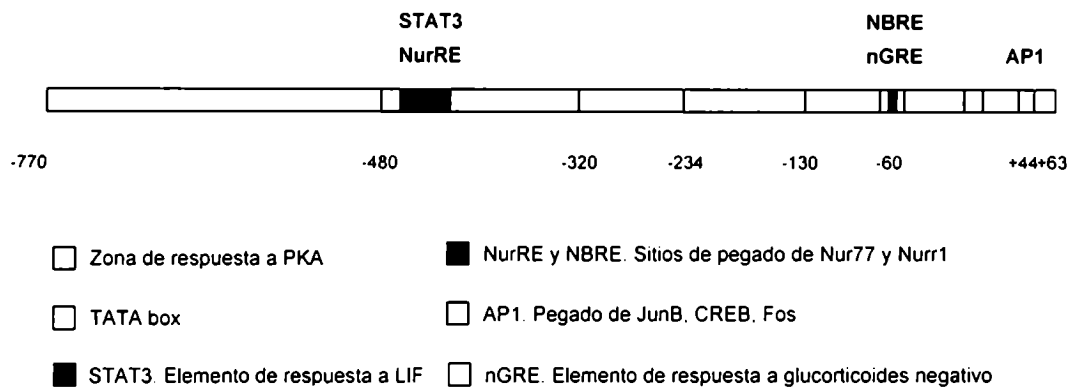


Figura 4. Sitios consenso en el promotor de POMC de rata.

Se observan los sitios caracterizados consenso en el promotor (AP1), que une a los factores de transcripción c-Fos/c-jun y CREB, nGRE que une al receptor de glucocorticoides (GR), (NBRE) que une a Nur77, Nurr1 o NOR1 como monómeros y (NurRE) que une a hetero u homodímeros de los factores Nur77/Nurr1/NOR1. También se muestran las zonas identificadas como respondedoras a PKA y los elementos respondedores a (STAT3) que se activan por estimulación con LIF.

Además de conferir la capacidad de expresión de POMC a los corticotrofos, T-pit/Tbx19 controla la diferenciación a corticotrofos. La expresión de T-pit/Tbx19 ocurre mas tempranamente en el desarrollo que la de otros factores que determinan la diferenciación hacia otros tipos celulares de la adenohipófisis (Scully & Rosenfeld. 2002). De esta manera los corticotrofos son una rama diferenciada mas tempranamente que el resto de las células secretoras de hormonas en la hipófisis. Se han identificado una serie de factores reguladores que determinan la diferenciación terminal a uno u otro tipo celular en la adenohipófisis. Por ejemplo la expresión de Pit-1 determina el posterior linaje a lactotrofos, somatotrofos y tirotrofos (Scully & Rosenfeld. 2002) y la expresión de GATA-2 determina la diferenciación a gonadotrofos y tirotrofos (Scully & Rosenfeld. 2002).

A su vez se identificaron sitios AP1 que son regulados por el factor de transcripción c-fos, gen que es inducido por tratamiento por CRH o forzando la

entrada de calcio (Boutillier *et al.* 1995, Boutillier *et al.* 1991), pero existen controversias acerca del papel preponderante de este factor de transcripción en la regulación de POMC por CRH (Philips *et al.* 1997a).

También se identificó el sitio que confiere la regulación negativa por glucocorticoides en el promotor de POMC (nGRE). Este sitio, a diferencia de los elementos respondedores al receptor de glucocorticoides (GRE), que activan la transcripción del gen, permite la unión del receptor pero en vez de activar la transcripción, la reprime funcionando entonces como un elemento negativo de regulación (Charron & Drouin. 1986). En un principio se pensó que esta inhibición estaba dada por competencia por el sitio de pegado con un factor de transcripción llamado COUP, ya que se identificó que podía unirse al sitio nGRE de POMC con alta afinidad en experimentos de retardo de la movilidad electroforética en gel (Hwung *et al.* 1988).

En los últimos años se identificaron dos elementos respondedores a una subfamilia de receptores nucleares esteroideos huérfanos como responsables de la activación del gen de POMC por CRH en corticotrofos. Esta subfamilia está compuesta por Nur77/Nurr1/NOR1 y se unen a secuencias consenso (NurRE y NBRE) en el promotor de POMC confiriéndole específicamente la respuesta a CRH.

Profundizaremos sobre los aspectos de regulación por Nur77, Nurr1 y GR, así como su regulación mutua una vez introducidos los mecanismos de acción de los receptores esteroideos.

Recientemente se identificaron los sitios responsables de la inducción del promotor de POMC por LIF. Esta citoquina vía gp130 activa la cascada de JAK/STAT, siendo STAT 3 y STAT1 los factores de transcripción activados y responsables de la inducción de POMC (Ray *et al.* 1996). En el promotor de POMC se encontraron elementos respondedores consenso a estos factores de transcripción (Bousquet *et al.* 2000).

Aunque se ha avanzado mucho respecto a los caminos de regulación de POMC por LIF y sus mecanismos moleculares, no se identificaron hasta la fecha los sitios en promotor de POMC responsables de la inducción por IL-1 ni los factores de transcripción intervinientes. Este punto se desarrollará en esta tesis doctoral.

4. SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares, entre los que se encuentran la subfamilia de Nur77/Nurr1/NOR1 y GR, poseen una estructura particular conformada por tres dominios bien caracterizados: dominio de unión a ligando (LBD), dominio de unión al DNA (DBD) y dominio de transactivación (Figura 5), aunque las funciones de cada uno de los dominios en general excede su clasificación inicial ya que se identificaron sitios secundarios de transactivación o dimerización en ellos.

El DBD está compuesto por dedos de zinc altamente conservados que distingue a los receptores nucleares de otras proteínas con capacidad de unirse al DNA (Berg. 1989, Klug & Schwabe. 1995). En la región carboxiterminal se encuentra el LBD, que posee la propiedad de reconocimiento hormonal y asegura la especificidad y selectividad de la respuesta fisiológica. La unión del ligando al LBD produce un cambio conformacional en el receptor pasando a su estado activado. Se desconoce si estos dominios evolucionaron independientemente cada uno o si los primeros miembros de la familia eran factores de transcripción con actividad constitutiva que luego adquirieron la regulación por ligando.

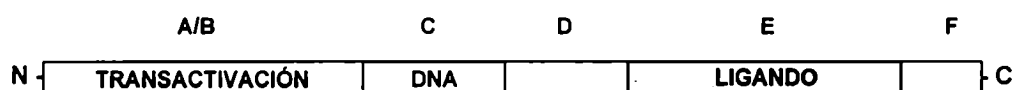


Figura 5. Estructura de los receptores nucleares.

Se muestra la estructura de un receptor nuclear típica con sus tres dominios, transactivación, unión al DNA y unión a ligando. Las regiones A/B (transactivación), D (visagra) y F son altamente variables y las regiones C (que confiere la unión al DNA) y E (que confiere la unión a ligando) son altamente conservadas en miembros de una subfamilia de receptores.

La superfamilia de receptores nucleares puede dividirse en cuatro clases basándose en su capacidad de dimerización y unión al DNA (Mangelsdorf *et al.* 1995). Los receptores Clase I que incluyen a los receptores esteroideos, funcionan como homodímeros cuando reconocen al ligando y cada monómero reconoce en el DNA la mitad de la secuencia consenso de repeticiones invertidas (Figura 6). Los receptores Clase II heterodimerizan con el receptor de ácido retinoico (RXR) y reconocen repeticiones directas en el DNA, este grupo incluye a todos los receptores nucleares restantes dependientes de ligando (Figura 6). Los receptores Clase III se unen a repeticiones directas en el DNA como homodímeros (Figura 6). Por último los receptores de Clase IV reconocen una secuencia en el DNA extendida y se unen como monómeros (Figura 6).

La mayoría de los receptores huérfanos, en los cuales se desconoce el ligando (en algunos casos puede que este sea inexistente) pertenecen a las Clases III o IV (Mangelsdorf & Evans. 1995).

4.1. Subfamilia de Receptores Nucleares Huérfanos Nur77/Nurr1/NOR1

Nur77 (llamado previamente NGFI-B), Nurr1 y NOR1 pertenecen a la subfamilia de receptores nucleares huérfanos y por lo tanto aunque están compuestos por los tres dominios característicos de receptores nucleares no se conoce aún ligando conocido y posiblemente no exista o sea un ligando intracelular. Estos tres receptores poseen alta homología de secuencia en el dominio de unión al DNA e interactúan con la misma secuencia en el DNA en promotores (Maruyama *et al.* 1995, Nakai *et al.* 1990), aunque se describieron efectos independientes y específicos para cada uno de estos factores (Castro *et al.* 1999, Maira *et al.* 1999) y pueden ser regulados diferencialmente (Maruyama *et al.* 1997). Nur77 es una proteína de 61 Kda en la cual la transactivación es mediada principalmente por la región amino-terminal mientras que la región carboxi-terminal controla la transactivación y la localización subcelular. La señal de localización nuclear está ubicada en la región carboxi-terminal al motivo de dedos de zinc. Estos receptores pueden

unirse al DNA como monómeros, homo o heterodímeros entre cada uno de sus componentes (Philips *et al.* 1997a).

Los patrones de expresión en la rata, ratón y humano son altamente restringidos, aunque existen zonas de solapamiento y redundancia en sus funciones. La expresión de Nurr1 esta restringida al tejido neuronal en el desarrollo y el adulto, por el contrario la expresión de Nur77 y NOR1 se observa además en otros tejidos periféricos (Drouin *et al.* 1998, Iyer *et al.* 1999). Nur77 se expresa en testículos, ovarios y músculo (Drouin *et al.* 1998), mientras que la expresión de NOR-1 se observa en timo, riñón y bazo (Iyer *et al.* 1999).

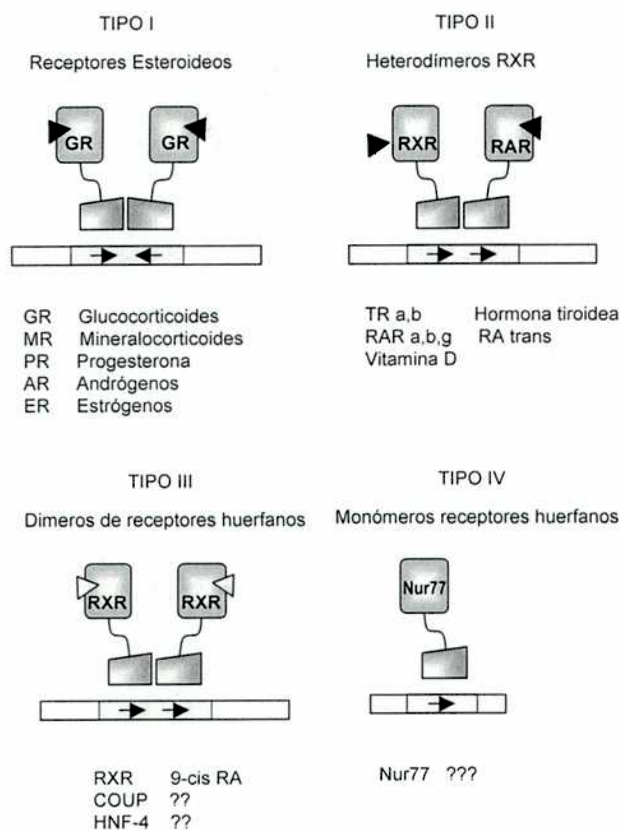


Figura 6. Tipos de receptores nucleares según la capacidad de unión a ligando, unión al DNA y heterodimerización. Se muestran los receptores representativos de cada grupo, el ligando que reconocen y la capacidad de reconocer secuencias directas o invertidas en el DNA. GR (receptor a glucocorticoides); MR (receptor a mineralocorticoides); PR (receptor a progesterona); AR (receptor a andrógenos); ER (receptor a estrógenos); TR (receptor a hormona tiroidea); RAR (receptor a ácido retinoico all-trans); RXR (receptor a ácido retinoico 9-cis); RA (ácido retinoico); ??? (ligando desconocido).

4.1.1. Regulación de la actividad transcripcional de Nur77

Se conocen dos tipos distintos de regulación de la actividad transcripcional de Nur77.

a) por fosforilación

b) por heterodimerización con otros receptores nucleares

4.1.1.1. por fosforilación

Se han descrito varios sitios de fosforilación en Nur77 dependiendo el estímulo responsable, así en una línea celular de origen neuronal PC12 la estimulación de Nur77 por el factor de crecimiento neuronal (NGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) afecta diferencialmente la fosforilación de Nur77 (Fahrner *et al.* 1990, Hazel *et al.* 1991). Nur77 es fosforilado *in vitro* por PKA y extractos de células PC12 estimuladas previamente con NGF, y esta fosforilación se produce dentro del dominio DBD, en serina 340 y 350 afectando la unión a los sitios NBRE y por lo tanto la actividad transcripcional (Hirata *et al.* 1993). Se ha identificado a la quinasa responsable de la fosforilación en serina 350 por NGF y se la denominó NGFI-B quinasa I (Hirata *et al.* 1995). La serina en posición 350 es la mas importante en la unión a los sitios NBRE, ya que se encuentra en la región A box, dentro de DBD, la cual es esencial para que pueda formarse una unión estable de Nur77 como monómero a los sitios NBRE.

Esta serina 350 se encuentra dentro de un sitio consenso que puede ser fosforilado por calmodulin quinasa II (CAMKII) RXXXXSX y por lo tanto la regulación negativa de la unión puede darse por la activación de esta protein quinasa (Hirata *et al.* 1993).

Por otro lado distintos estímulos producen la inducción y/o fosforilación de Nur77 regulando así su actividad. En células PC12 el factor de crecimiento epidérmico (EGF), TPA y el ionóforo de calcio A23187 estimulan la inducción de Nur77 pero no su fosforilación, dando un nivel de activación mayor y mas duradero que la estimulación por NGF y FGF (Fahrner *et al.* 1990). Además la despolarización produce un nivel de activación diferencial respecto a NGF en

células PC12 (Katagiri *et al.* 1997).

Esta serina 350 es también blanco de fosforilación por la vía de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y tanto *in vitro* como en células fibroblásticas 293 y NIH 3T3 se produce la fosforilación específica con la consecuente regulación negativa de la unión y la actividad transcripcional sobre sitios NBRE (Pekarsky *et al.* 2001). Esta serina puede ser fosforilada además *in vitro* por pp90RSK, una protein quinasa que es sustrato de ERK1/2 (Nguyen *et al.* 1993) y por lo tanto puede ser activada por el camino de las MAPK (Davis *et al.* 1993).

Si bien se han descrito varios sitios de fosforilación en Nur77, solo se ha relacionado la fosforilación en el DBD con una menor afinidad por los elementos respondedores y menor actividad transcripcional. No se han identificado hasta el momento la función de otros sitios de fosforilación que se encuentran fuera de este dominio.

4.1.1.2. por heterodimerización con receptores esteroideos

GR posee la capacidad de transactivar e inducir genes que contengan GRE. Sin embargo sus funciones inmunosupresoras son mediadas por un mecanismo distinto de regulación génica llamado transrepresión. El mecanismo de transrepresión consiste en la formación de heterodímeros con otros factores de transcripción secuestrándolos en complejos incapaces de interactuar con el DNA. Generalmente las funciones inmunosupresoras de GR están mediadas por la interacción con los factores de la familia de AP-1 (Karin & Chang. 2001, Yang-Yen *et al.* 1990) y NFkB (McKay & Cidlowski. 1998, Scheinman *et al.* 1995), estos fueron los primeros casos reportados que dieron lugar al concepto de transrepresión. Este mecanismo tiene la característica de ser mutuo, es decir por ejemplo que AP-1 bloquea la actividad transcripcional de GR y viceversa. Sin embargo con la creciente identificación de nuevos receptores nucleares las posibilidades de interacciones se hizo mas compleja (Mangelsdorf *et al.* 1995). Nur77 además de dimerizar con Nur77, Nur1 y NOR1, puede hacerlo con GR siendo su actividad transcripcional inhibida por transrepresión (Philips *et al.* 1997b). Nur77 puede interaccionar con COUP-TF inhibiendo la capacidad de este de interactuar con RXR (Wu *et al.* 1997),

dependiendo entonces del balance entre Nur77 y COUP-TF la actividad transcripcional por ácido retinoico. Además Nur77 y Nurr1 pueden interaccionar con RXR aumentando la actividad transcripcional en respuesta a ácido retinoico en sus sitios respondedores (Perlmann & Jansson. 1995).

4.1.2. La subfamilia de factores Nur en la regulación del eje HPA y en la inducción de POMC

Los factores Nur son particularmente importantes en la regulación del eje HPA actuando a los tres niveles. Se ha visto que en el NPV del hipotálamo Nurr1 se expresa constitutivamente (Saucedo-Cardenas & Conneely. 1996) y su mRNA es inducido rápidamente en respuesta a estrés (Honkaniemi *et al.* 1994) o IL-1 β (Chan *et al.* 1993), controlando así la estimulación en la secreción de CRH. En la hipófisis se expresan ambos Nur77 y Nurr1 (Philips *et al.* 1997b, Saucedo-Cardenas & Conneely. 1996). En la corteza adrenal Nur77 y Nurr1 son inducidos en respuesta al estrés (Davis & Lau. 1994). Esta inducción está implicada en un aumento de una enzima esteroideogénica (steroid-21 α -hidroxylasa), la cual es el paso limitante en la síntesis de glucocorticoides (Wilson *et al.* 1993).

Sorpresivamente el ratón deficiente (knock-out) para Nur77 posee un fenotipo normal en la funcionalidad del eje HPA (Crawford *et al.* 1995). Sin embargo en estos ratones se observó un aumento en los niveles de expresión de Nurr1 atribuyéndose esta ausencia de efectos a un evento compensatorio de Nurr1 (Crawford *et al.* 1995).

En la hipófisis, Nur77 y Nurr1 están involucrados en la inducción del gen de POMC por CRH, y ejercen este efecto actuando en dos sitios independientes en el promotor de POMC: el sitio NBRE (Figura 7) que puede unir solo uno de estos factores como monómero y el sitio NurRE (Figura 7), que puede unir homodímeros Nur77/Nur77 o Nurr1/Nurr1 o heterodímeros entre los factores Nur (Maira *et al.* 1999). El sitio NurRE de POMC (gTGATATTTacctccAAATGC CA) es una copia invertida de dos sitios NBRE (AAAGGTCA) cada uno con dos

mutaciones puntuales y separados por 6 pares de bases (Figura 7). NOR-1, el tercer miembro de la subfamilia Nur, aunque puede interactuar con los sitios consenso NurRE y NBRE, solo puede unirse al sitio NurRE y activar la transcripción como heterodímeros con Nur77 (Maira *et al.* 1999).

Aunque ambos sitios NurRE y NBRE poseen la capacidad de unir a los factores Nur y activar la transcripción. Se demostró que el sitio responsable de la activación del promotor de POMC por CRH es NurRE y no NBRE, ya que mutaciones puntuales que afectan el pegado de Nur77 a este sitio bloquean completamente la activación por CRH (Philips *et al.* 1997a). Sin embargo mutaciones que afectan el pegado de Nur77 a NBRE no afectan la activación del promotor por CRH (Philips *et al.* 1997a). Además el sitio NurRE acoplado en tandem a un promotor mínimo confiere la activación por CRH con una potencia 10 veces superior a un vector de reportero que contiene igual numero de copias en tandem del sitio NBRE. Aunque el sitio NBRE puede activarse por CRH y cAMP en menor intensidad, no es el responsable de la activación en el contexto del promotor de POMC (Philips *et al.* 1997a).

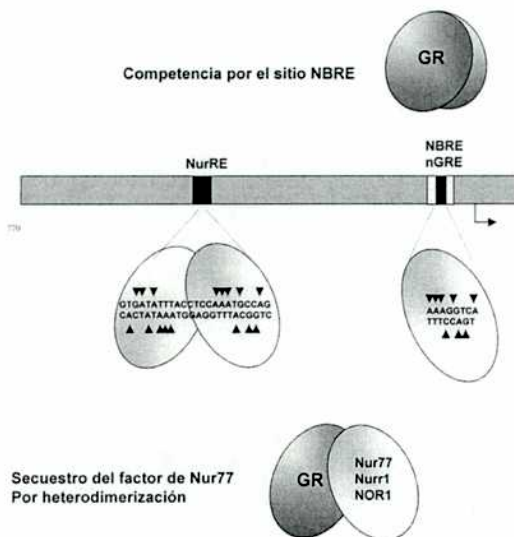


Figura 7. Esquema representativo de los sitios de unión a Nur77/Nurr1 y NOR1 en el promotor de POMC. Se muestran los sitios NurRE y NBRE, las bases indicadas con una flecha corresponden a los sitios de interacción con Nur77. Se muestra también los mecanismos inhibitorios por el receptor de glucocorticoides (GR). Competencia por el sitio NBRE mediante la unión al sitio nGRE y heterodimerización con Nur77.

Se describieron entonces dos modelos independientes de inhibición por glucocorticoides de la inducción por CRH:

- a) El sitio nGRE incluye en su interior al sitio NBRE. De esta forma el pegado de GR impide el pegado de Nur77 al sitio NBRE (Okabe *et al.* 1998) (Figura 7).
- b) La heterodimerización entre GR y Nur77 (ambos receptores nucleares) que explicaría la inhibición mutua sobre la inducción de POMC, actuando sobre el sitio NurRE (Philips *et al.* 1997b) (Figura 7).

Dada la mayor importancia fisiológica del sitio NurRE en la activación del promotor de POMC por CRH. El mecanismo de inhibición por glucocorticoides preponderante sería por heterodimerización con Nur77.

Aunque se identificaron los factores pertenecientes a la familia de Nur, como los responsables de la inducción de POMC por CRH, no se caracterizaron las vías de transducción de señales involucradas en su inducción y activación. Este punto será uno de los objetivos centrales de esta tesis doctoral

5. RECEPTORES Y TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL

5.1. El Receptor de CRH

El receptor de CRH (CRH-R) esta conformado por una proteína de membrana con siete dominios transmembrana acoplado a la proteína Gs y Gq. En general estos tipos de receptores desencadenan la transducción de la señal aumentando los niveles intracelulares de cAMP y activando la fosfolipasa C (PLC), con el consiguiente aumento en los niveles de fosfoinositidos (IP3).

Los CRH-R de rata, ratón y humano fueron clonados y sus características específicas identificadas.

Fueron identificadas dos isoformas del CRH-R, tipo 1 y tipo 2 en humanos, rata, y pollo (Qi *et al.* 1997). CRH-R2 existen tres variantes por splicing alternativo CRH-R2 α , CRH-R2 β , CRH-R2 γ (Chang *et al.* 1993, Kishimoto *et al.* 1995, Lovenberg *et al.* 1995). Estos receptores, como los receptores β -adrenérgicos, poseen seis cisteínas en el dominio extracelular que son esenciales para la interacción con el ligando (Assil *et al.* 2001).

Además de encontrarse localizados en la hipófisis anterior y la neurohipófisis intermedia (De Souza. 1995), se localizan en una gran variedad de regiones como el cerebelo, la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, la amígdala y el bazo (De Souza. 1987, De Souza *et al.* 1986, Webster *et al.* 1990), implicando una amplia gama de efectos independientes de la regulación del eje HPA. La amplia distribución de los CRH-R1 y CRH-R2 α en el sistema nervioso central es consistente con el rol neuromodulatorio de CRH además del control de la respuesta endocrina. Recientemente se demostró que CRH-R1 es el responsable de la activación del eje HPA en respuesta al estrés, ya que ratones deficientes de este tienen atrofiadas la médula y corteza adrenal, y reducida la secreción de ACTH y glucocorticoides por un estímulo estresante (Timpl *et al.* 1998), aunque los niveles plasmáticos de ACTH en condiciones basales son normales como consecuencia de un evento compensatorio de una mayor secreción de AVP (Muller *et al.* 2000).

5.1.1. Señalización por CRH

En células corticotrofas la señalización vía Gs y la activación de PKA por un aumento en los niveles de cAMP (Schechterson & Mcknight. 1991) no es la única desencadenada por CRH. Paralelamente con esta señalización se producen otros eventos de transducción como por ejemplo la activación de canales de calcio voltaje dependientes tipo L en la membrana plasmática con el consiguiente aumento en los niveles de calcio intracelulares (Lee & Tse. 1997, Luini *et al.* 1985). El pico de entrada de calcio se produce a los cinco minutos luego de la estimulación y es el gatillo secretor de las vesículas ancladas a la membrana plasmática (Clark & Kemppainen. 1994).

Se ha descrito también que el receptor de CRH puede estar acoplado a la proteína Gq y como consecuencia aumentar los niveles intracelulares de IP3 (Kiang. 1997, Xiong *et al.* 1995), produciendo la liberación de reservorios intracelulares de calcio (Kiang. 1997) que en conjunto con la producción de diacilglicerol puede activar la PKC. Los elevados niveles del calcio intracelular tanto proveniente del calcio externo como de reservorios intracelulares pueden activar la calcio/calmodulin quinasa II (CAMKII).

En células CHO transfectadas transientemente con CRH-R1 y CRH-R2 α el agonista del receptor de CRH sauvagina produce la estimulación de la vía de ERK1,2 y no de JNK, un efecto dependiente de la movilización de los reservorios de calcio intracelulares y la activación de PKC (Rossant *et al.* 1999). Sin embargo la existencia y relevancia de este camino de señalización en corticotrofos no ha sido estudiada.

Aunque el evento de señalización por calcio fue altamente estudiado por su relevancia en la secreción hormonal regulada, no se conocen en detalle las vías de transducción involucradas en los efectos de señalización por CRH sobre la inducción de POMC.

Otros factores hipotalámicos y plasmáticos como PACAP, VIP y adrenalina, estimulan, como CRH, la actividad de la adenilato ciclasa con el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de cAMP y activación de la vía de PKA (Plotsky *et al.* 1985). Aunque en menor potencia que CRH en células corticotrofas, sus efectos son similares a CRH tanto en la secreción de ACTH como en la regulación del gen de POMC .

5.2. Receptor de IL-1 y transducción de la señal

Existen dos formas de IL-1 con acciones proinflamatorias IL-1 α y IL-1 β . Ambas citoquinas interactúan con el mismo receptor IL-1R tipo I con afinidades similares (Dinarello. 1994).

IL-1RI posee dos sitios de interacción con su ligando llamados sitio A y sitio B. La transducción de la señal depende de la interacción con el sitio B (Dinarello. 1994). En células inmunes existe también el receptor de IL-1 tipo II que no posee dominio intracelular y es incapaz de transducir la señal, actuando como un falso blanco e inhibiendo la estimulación por IL-1 (Attur *et al.* 2002).

El IL-1RI se encuentra tanto en hipófisis como en el sistema inmune y posee 4 dominios tipo Inmunoglobulinas en su región extracelular y a diferencia de los receptores a factores de crecimiento no posee actividad tirosin quinasa. En un principio la estimulación por IL-1 fue asociada con diversos caminos de transducción de señales como la activación de PKC, activación de proteínas G

sin un aumento en los niveles de cAMP plasmáticos y la activación de PLC para mencionar algunos. Pero recientemente se identificaron los caminos de transducción de la señal mas claramente con la identificación de proteínas con actividad tirosin quinasa que interactúan con el receptor y son las responsables de transducir la señal. Ellas son la proteína accesoria de IL-1R (IL-1RacP) y factores asociados al receptor de TNF- α (TRAF) (Baud *et al.* 1999, Yamada *et al.* 2001).

La activación de IL-1R lleva a la activación de las protein quinasas asociadas al estrés (SAPK) p38 y Jun quinasa (JNK) ambas son subgrupos de las MAPK, e IKB quinasa (IKK) (Dinarello. 1994). Estas protein quinasas son las responsables de la transducción de la señal que regulará la activación de genes específicos.

6. LA CASCADA DE MAPK

Las protein quinasas y otras vías de segundos mensajeros forman complejos altamente interactivos que integradamente coordinan las funciones celulares en un organismo. Dentro del repertorio de las moléculas de señalización se encuentra una familia de protein quinasas llamadas protein quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas cascadas contienen al menos tres protein quinasas cada una en serie que culmina con la activación de una MAPK con características multifuncionales (Pearson *et al.* 2001) (Figura 8).

Las MAPK controlan múltiples procesos celulares como embriogénesis, diferenciación, proliferación y apoptosis celular entre otras (Pearson *et al.* 2001).

Las MAPK fueron descubiertas como sustratos de tirosin quinasas estimulados por mitógenos a principios de los 80'y al igual que las quinasas dependientes de ciclinas (cdks) fosforilan en residuos de serinas o treoninas seguidos en su secuencia por prolinas (Pearson *et al.* 2001).

Las MAPK no poseen subunidad regulatoria y son activadas directamente por fosforilación. En general poseen dos residuos que deben ser fosforilados para su activación en su dominio de activación, una tirosina y una treonina (Pearson *et al.* 2001).

6.1. Cascadas de activación

Las MAPK son reguladas por cascadas de fosforilación. Dos protein quinasas río arriba activadas en serie llevan a la activación de las MAPK. En algunos casos una quinasa adicional puede ser requerida para la activación de este modulo de tres protein quinasas. La quinasa inmediatamente río arriba de la MAPK, MAPK/ERK quinasa (MEK o MKK) es una protein quinasa con capacidad de fosforilación dual, fosforila en serina o treonina y tirosina (Crews *et al.* 1992, Kosako *et al.* 1992).

A pesar de la capacidad que poseen de fosforilar en el lado alifático o aromático de la cadena polipeptídica, su especificidad es muy estricta. Un tipo de MEK fosforila a una o solo algunas MAPKs (Figura 8).

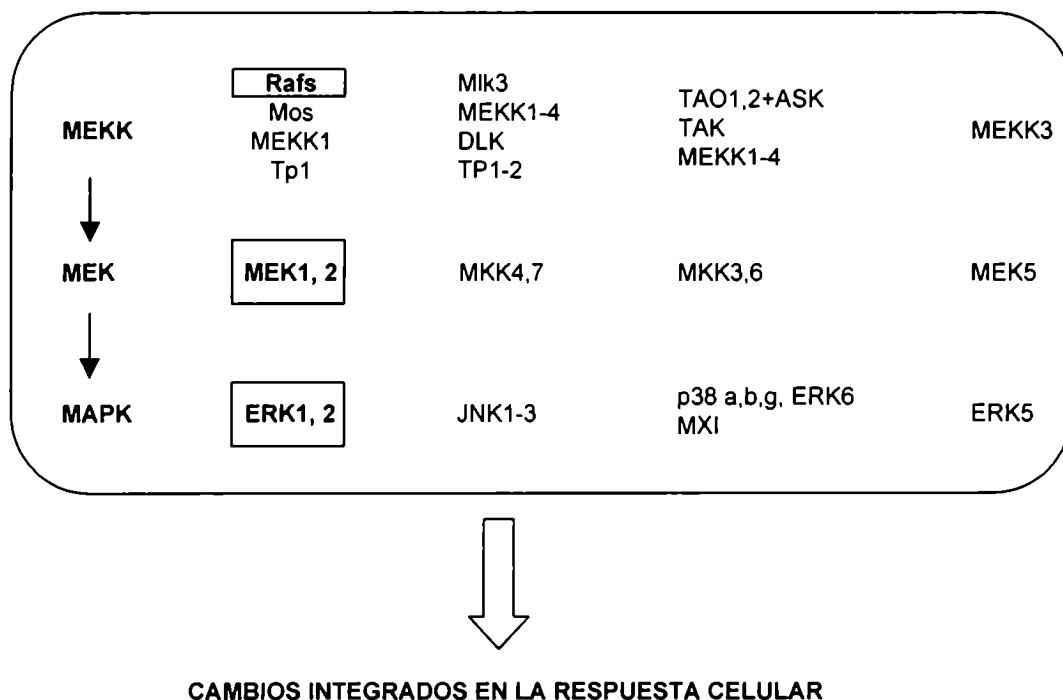


Figura 8. Esquema representativo de la familia de MAPK.

Se muestran las distintas protein quinasas caracterizadas para cada cascada de señalización.

Se encuentran recuadradas las protein quinasas (Raf-MEK1,2-ERK1,2), pertenecientes a la cascada que se estudia en esta tesis.

El hecho de que esta vía de transducción esté dada por una cascada de señalización a través de protein quinasas secuenciales en vez de la activación

directa de una única protein quinasa le confiere al sistema características particulares.

Estas son:

- a) Capacidad de amplificación de la señal inicial
- b) Alta integración con otras vías de señalización

La amplificación de la señal puede darse si cada una de las protein quinasas sucesivas es mas abundante que su regulador. Este efecto puede darse en uno o mas de los pasos dentro de los módulos de MAPK. En el caso de la activación de los caminos de ERK1 y ERK2 esta amplificación se da en el paso Raf-MEK, porque MEK1 es mucho mas abundante que Raf. Sin embargo este paso de amplificación no se da en el paso MEK-ERK, porque sus cantidades son equivalentes (Ferrell. 1996, Huang & Ferrell. 1996).

La alta integración con otros caminos de señales esta dada por la activación o supresión de la actividad de los intermediarios, ya que son los puntos regulados por otras vías de señalización (Frost *et al.* 1997, Schonwasser *et al.* 1998).

Las MAPK en un principio son fosforiladas en tirosina, esta fosforilación estimula la agregación y al acumularse recién pueden ser fosforiladas en treonina y activarse. Este mecanismo secuencial de fosforilación y la doble funcionalidad de las MEKs provee una alta especificidad de activación.

Las MEKs también deben activarse por fosforilación de dos residuos en sus regiones de activación, en los residuos serina o treonina (Alessi *et al.* 1994, Sheng & Guan. 1994). En el caso de MEK1 la fosforilación de cualquiera de estos residuos incrementa su actividad, aunque existe un efecto sinérgico cuando se fosforilan ambos residuos (Ferrell & Machleder. 1998).

Las protein quinasas que fosforilan MEKs (MEKKs) son muchas y muy diversas, por lo tanto son pocas las generalizaciones que se pueden hacer

respecto a ellas, excepto que son el punto de regulación e interacción con otros estímulos regulatorios. En general estas MEKKs no son abundantes sugiriendo que el paso MEKKs-MEK es un importante paso de amplificación de la señal.

La interacción entre las cascadas ocurre en diversas formas para integrar las respuestas celulares. Una de las características de las MAPK es que poseen especificidad de sustratos que se yuxtaponen. Entonces la activación de un determinado sustrato puede ser la consecuencia final de diferentes cascadas de activación.

Sin embargo en la célula existen proteínas de anclaje que acercan los distintos componentes de la cascada de MAPK entre si, brindando especificidad a los distintos módulos de activación. Además la regulación de la formación de estos complejos provee un mecanismo adicional de integración por otros mecanismos de transducción de señales (Frost *et al.* 1997, Mansour *et al.* 1994, Rossomando *et al.* 1994).

6.1.1. La cascada de ERK1 y ERK2

ERK1 y ERK2 son proteínas de 43 y 41 Kda con un 85% de identidad de secuencia, siendo las regiones mas conservadas las involucradas en la unión al sustrato (Boulton *et al.* 1991, Boulton *et al.* 1990). Los dos sitios fosfoaceptores tirosina y treonina están separados por un residuo de glutamato en ambas, dando un motivo TEY en la región de activación (Payne *et al.* 1991). Ambas proteínas son expresadas ubicuitamente aunque la abundancia relativa de una u otra isoforma varía según el tejido. Por ejemplo en células del sistema inmune ERK2 es predominante, mientras que en tejidos neuroendocrinos son expresadas en iguales cantidades.

Los estímulos que producen la activación de ERK1 y 2 son muy diversos y tejido específicos (Lewis *et al.* 1998). Por ejemplo en fibroblastos son activados por suero, factores de crecimiento, citoquinas, algunos tipos de estrés y receptores acoplados a proteína G, para mencionar algunos. En neuronas están involucradas en el efecto potenciador a largo termino (LTP) (English & Sweatt. 1996).

6.1.1.1. MEK1 y MEK2

ERK1 Y ERK2 son activados por MEK1 y 2. Ambos fosforilan *in vitro* completamente a ERK1 y 2 (Robinson *et al.* 1996a, Zheng & Guan. 1993) aumentando la actividad de ERK1 y 2 unas 1000 veces. Esta activación parece ser debida a un aumento en Vmax y no por cambios en el Km por los sustratos (Prowse *et al.* 2000, Robinson *et al.* 1996b).

La fosforilación de MEK1 en sus dos residuos aumenta su actividad mas de 7000 veces, debido a un aumento en Vmax y Km.

La sustitución de estos residuos por aminoácidos ácidos aumenta su actividad, así como la delección de la región amino-terminal. Mediante estas modificaciones *in vitro* se pueden obtener formas activas constitutivamente con igual actividad que MEK1,2 endógeno en su estado fosforilado.

6.1.1.2. Isoformas de Raf

De todas las MEKKs descritas, las isoformas de Raf y Mos son las únicas conocidas que fosforilan a MEK directamente. Aparentemente fosforilan únicamente a MEK1 y MEK2, ubicándose entonces en la cascada ERK1/2 (Dent *et al.* 1992, kyriakis *et al.* 1992).

La familia de protein quinasas Raf está compuesta por A-Raf, B-Raf y Raf-1 o c-Raf (Hagemann & Rapp. 1999, Morrison & Cutler. 1997). Cada isoforma contiene tres dominios conservados llamados CR1, CR2 y CR3. Los dos primeros situados en la región amino-terminal regulan la actividad catalítica de Raf, ya que la delección de esta porción en Raf-1 genera una enzima constitutivamente activa en ausencia de activación por Ras (Leevers *et al.* 1994, Whitehurst *et al.* 1995). El dominio quinasa esta localizado en la región CR3.

Raf-1 se expresa en todos los tejidos, mientras que la expresión de B-Raf es abundante en tejido neuronal y testículos, por el contrario A-Raf se expresa en el tejido urogenital.

Raf-1 posee distintos grados de activación y está regulada por interacciones proteína-proteína, fosforilación en serina, treonina y tirosina y su localización celular (Morrison & Cutler. 1997).

Raf-1 y B-Raf existen como un complejo multiproteico formado por la proteína de shock térmico 90 (hsp90), p50 y un número indeterminado de proteínas 14-3-3, que son proteínas que se unen al complejo multiproteico y al igual que hsp90 lo estabilizan (Freed *et al.* 1994, Jaiswal *et al.* 1996, Stancato *et al.* 1997). Aparentemente 14-3-3 estabiliza a Raf-1 tanto en su estado de alta y baja actividad dependiendo de su estado de activación y la interacción con Ras. Agentes farmacológicos como geldanamycina o dexametasona que rompen la interacción de hsp90-p50 con Raf bloquean la activación por Ras (Schulte *et al.* 1995, Stancato *et al.* 1997).

6.1.1.2.1. Regulación de Raf por Ras y Rap1

Existen diferencias significativas en la regulación de las distintas isoformas de Raf. Una diferencia notable entre Raf-1 y B-Raf es la regulación diferencial por las pequeñas proteínas G Ras y Rap-1 (Awartkruis *et al.* 1998, Seidel *et al.* 1999, Vossler *et al.* 1997a). Por un lado Raf-1 es activado por N-Ras, H-Ras o K-Ras (Hamilton & Wolfman. 1998). Aunque Raf-1 interactúa también con Rap1 este produce una inhibición de la activación por Ras (Bos. 1998). Por el contrario B-Raf es activado por Rap1 y Ras.

Esta diferencia de activación o inhibición de Raf-1 y B-raf por Rap ha sido atribuida a un dominio rico en cisteína en ambas proteínas (CRDs). El intercambio de estos dominios entre Raf-1 y B-Raf permite la activación de Raf-1 por Rap (Okada *et al.* 1999).

El estado de fosforilación de Raf-1 es influenciado por múltiples proteínas quinasas, incluyendo Src, PKC y Akt (o PKB). Siendo un punto de interacción entre distintos caminos de señalización.

6.2. Regulación de la actividad de MAPK

El camino mejor caracterizado de activación de ERK1 y ERK2 desde la membrana plasmática celular es mediante la activación de receptores con actividad tirosin quinasa (Hunter. 1995, Pawson & Scott. 1997). La estimulación de estos receptores por su ligando específico resulta en un incremento en la actividad catalítica del receptor con la subsecuente autofosforilación en residuos en tirosina. Esta fosforilación controla la agregación de complejos multiproteicos con la consiguiente transducción de la señal. En general este evento de transducción involucra la activación de la proteína G Ras. Esta activación depende del reclutamiento de proteínas adaptadoras como Shc y Grb2 al receptor por interacción entre dominios SH2 y residuos de fosfotirosinas.

Las proteínas intercambiadoras de GTP (GEFs) intercambian el GDP de Ras por GTP aumentando así su actividad. Ras-GTP interactúa con Raf-1 en la membrana plasmática. Este reclutamiento de Raf-1 a la membrana plasmática permite que sea sustrato a activación por diversos caminos de señalización como Src, PKC y PAK como se describió anteriormente (Chaudhary *et al.* 2000, Dent *et al.* 1995, Diaz *et al.* 1997, Fabian *et al.* 1993, Kolch *et al.* 1993).

La señalización por receptores de membrana acoplados a proteína G también involucra la modulación en la actividad de Raf-1, sin embargo los mecanismos utilizados por estos receptores son muy diversos (Cobb. 1999). La existencia de múltiples clases de proteínas G, la capacidad de algunos receptores de activar mas de una clase de proteína G y los mecanismos tejido específicos le dan gran variabilidad a esta forma de activación.

6.2.1. Regulación por cAMP

La señalización transmitida por receptores a través de G α s son muy diversas, consistente con una amplia gama de efectos sobre la actividad ERK evocada por un aumento en los niveles intracelulares de cAMP.

PKA se ha descrito que inhibe la actividad de Raf-1 por fosforilación directa en la serina 43 y 621 en algunas situaciones (Hafner *et al.* 1994, Mischak *et al.*

1996, Wu *et al.* 1993). Por otro lado PKA también puede fosforilar a Rap1 que puede influenciar positivamente la activación de ERK a través de la activación de B-Raf en células de origen neuronal (Grewal *et al.* 2000b, Vossler *et al.* 1997b) (Figura 9). Sin embargo en otros tipos celulares, que no expresan B-Raf, se ha descrito un efecto inhibitorio que ejerce Rap 1 sobre Raf-1, ya que secuestra a Raf-1 en un complejo inactivo. Produciéndose entonces una inhibición de la cascada ERK (de Rooij *et al.* 1998, Kawasaki *et al.* 1998) (Figura 9). El nivel de activación de ERK producido por cAMP y Rap1 depende del nivel de expresión de B-Raf (Daaka *et al.* 1997).

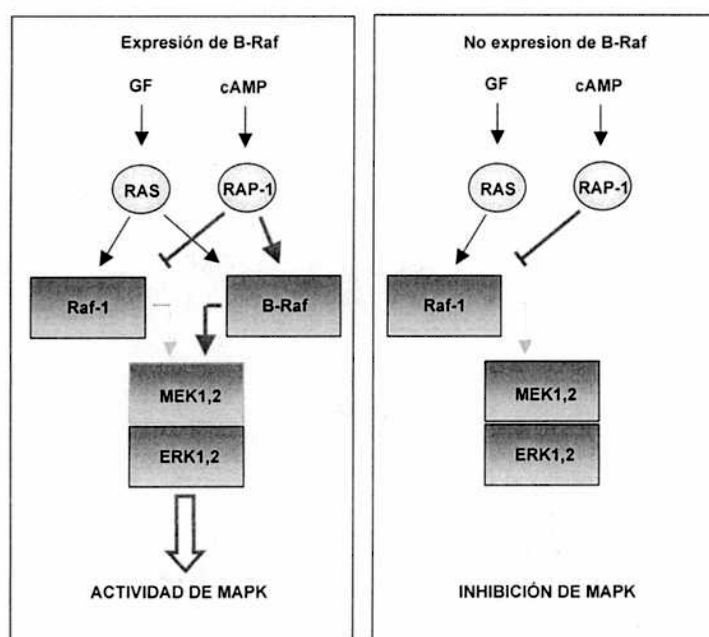


Figura 9. Esquema de la inhibición o estimulación de la vía de MAPK tejido específica. Se muestra la cascada de señalización a partir de Ras o Rap1 y se ve como la presencia o ausencia de B-Raf determina el efecto neto al aumento de cAMP. Por abreviaciones ver texto.

6.2.2. Activación de Rap1

El mecanismo de activación de Rap1 es generalmente a través de cAMP y PKA. Por ejemplo en plaquetas Rap1 es fosforilado por PKA (Bos *et al.* 1997). También en otros tipos celulares la activación de PKA resulta en la fosforilación de una serina adyacente o cercana al motivo CAAX en el carboxi-terminal (Ser 180 de Rap1a o Ser 179 de Rap1b) (Altschuler & Lapetina. 1993). El sitio de fosforilación sugiere que puede afectar la localización celular de membrana o el procesamiento de la proteína.

En varios tipos celulares se observó la activación de Rap1 por diferentes estímulos, así en plaquetas por trombina y tromboxano A2 (Franke *et al.* 1997), en linfocitos por activación del receptor T o B (Boussiotis *et al.* 1997, McLeod *et al.* 1998), en fibroblastos por PDGF, endotelina y LPA pero no por ejemplo por insulina (Zwartkruis *et al.* 1998).

La activación de Rap1 es rápida y en plaquetas puede ser mediada por PLC, al igual que en linfocitos. Sin embargo el tratamiento con inhibidores farmacológicos de PLC no bloquean la activación por cAMP (Bos. 1998), evidenciando que en un tipo celular pueden existir distintas vías de activación que convergen en Rap1.

En plaquetas el incremento de los niveles de calcio y Diacilglicerol (DG) produce la activación de Rap1 (Franke *et al.* 1997).

En resumen existen al menos tres distintos segundos mensajeros que regulan la activación de Rap1, calcio, DG, cAMP.

La activación de Rap1 es un efecto mas común de lo que se creía, ejerce un rol central en la transducción de la señales y su efecto final en la activación o inhibición de la cascada ERK depende del tipo celular.

6.2.2.1. Mecanismos de la activación de Rap1

Al igual que la activación de Ras es controlada por factores intercambiadores de GTP (GEFs), Rap1 posee sus GEFs específicos que pueden ser activados por distintos caminos de transducción de señales.

Además de la activación por protein quinasas y en analogía con RasGEFs existen RapGEFs que pueden ser activados directamente por calcio y DG (Ebinu *et al.* 1998, Fam *et al.* 1997, Farnsworth *et al.* 1995). En algunos casos la activación por TPA no es inhibida por tratamiento con inhibidores farmacológicos de PKC (M'Rabet *et al.* 1998). También se ha reportado la existencia de EPAC, un Rap1-GEF que es activado directamente por cAMP en forma independiente de PKA (de Rooij *et al.* 1998).

Son muchos los caminos de activación de la vía de MAPK, y la regulación por segundos mensajeros es altamente compleja. Siendo Rap, Ras y Raf los puntos regulatorios de la cascada ERK.

6.3. Regulación de la transcripción por MAPK

Las MAPK controlan una gran variedad de procesos celulares y los sustratos regulados por ellas pueden clasificarse en protein quinasas, proteínas de membrana o citoplasmáticas y sustratos nucleares.

Las MAPK poseen la capacidad de regular la actividad transcripcional de factores de transcripción por fosforilación directa o activación de otras protein quinasas intermediarias (Rsk, Mnk), las cuales fosforilan luego proteínas involucradas en la expresión génica. Rsk2 y Msk1 fosforilan la histona H3 y HMG-4 respectivamente, ambas involucradas en la regulación del empaquetamiento de la cromatina y la regulación de la actividad transcripcional (Thomson *et al.* 1999, Whitmarsh & Davis. 2000). Recientemente se ha descrito que ERK2 fosforila al coactivador de receptores esteroideos SRC-1 que posee actividad acetiltransferasa aumentando la actividad transcripcional por receptores esteroideos (Rowan *et al.* 2000).

Además las MAPK poseen la capacidad de translocar al núcleo y fosforilar factores de transcripción directamente regulando su actividad.

ERK1,2 fosforilan *in vitro* a factores de la familia de AP1 como c-jun (Derijard *et al.* 1994, Hibi *et al.* 1993), c-fos (Chen *et al.* 1993, Chen *et al.* 1996) y ATF-2, aunque su relevancia en la célula no ha sido comprobada (Gupta *et al.* 1995).

Otra clase de factores de transcripción regulados por MAPK son los factores de complejos terciarios (TCFs). Las proteínas que contienen dominios ETS, como Elk1 son sustratos *in vivo* de ERK1,2 y median la transcripción por elementos respondedores a suero (SREs), que se encuentran en una variedad de promotores como c-Fos y otros genes inducidos por suero. Los TCFs SAP-1 y SAP-2 son también sustratos de ERK1,2 *in vivo* (Price *et al.* 1996, Price *et al.* 1995, Strahl *et al.* 1996).

Muchos factores de transcripción se han identificado como sustratos de MAPK demostrando que las MAPK son cruciales en la regulación fina de la expresión génica.

6.4. MAPK en la hipófisis

Las MAPK regulan la transducción de señales en células hipofisarias y la regulación hormonal. En células gonadotrofas la biosíntesis de LH y FSH estimulada por GnRH es dependiente de la activación de las MAPK (Raf-MEK1,2-ERK1,2) (Sundaresan *et al.* 1996). GnRH produce un pico de activación en la actividad de ERK1,2 a los 5 min. que se extiende hasta los 60 min. Este efecto se observa sobre una línea celular gonadotrofa (α T3-1) y en cultivos primarios de hipófisis. En este caso el receptor de GnRH está acoplado a proteína Gq (Hsieh & Martin. 1992), la producción de IP3 y DA, el aumento de los niveles de calcio intracelular y la activación de PKC (Conn *et al.* 1987, Stojilkovic *et al.* 1994) son los responsables de esta activación (Qian *et al.* 1993, Sundaresan *et al.* 1996). Siendo la entrada de calcio a través de canales de calcio voltaje dependientes esencial para la activación de ERK por GnRH (Mulvaney & Roberson. 2000). GnRH también estimula la vía de Jun quinasa (JNK) en células α T3-1 independientemente de PKC y el calcio intracelular (Mulvaney & Roberson. 2000). El nivel y duración de la actividad de las MAPK en gonadotrofos *in vivo* es dependiente del tipo de estimulación (crónico o pulsátil). La administración endovenosa crónica con GnRH produce una estimulación en 300% de la actividad de MAPK con una duración de 2hs, sin embargo la administración pulsátil repetitiva con GnRH produce un aumento de similar magnitud con una duración de 8hs (Haisenleder *et al.* 1998).

En adenomas lactotrofos, que secretan cantidades abundantes de prolactina, se identificó la presencia de el oncogén Ha-Ras (Langer *et al.* 1992), y la presencia de este oncogén activa al promotor de prolactina (Davis. 1993) a través de la activación de la vía Raf/MAPK (Marshall. 1995). En este caso c-ETS-1 interactúa con el factor tejido específico Pit-1 mediando la regulación del promotor de prolactina por MAPK (Bradford *et al.* 1995). La activación de

ERK1,2 en lactotrofos es independiente de la acción de PKC o los niveles del calcio intracelular (Kimura *et al.* 2000). El péptido liberador de prolactina (PrRP) en la línea celular GH3 y en cultivos primarios de hipófisis de rata, produce también la estimulación de JNK, la cual contribuye a la regulación del promotor de prolactina (Kimura *et al.* 2000). En células GH3 niveles elevados de cAMP pueden estimular la vía de MAPK (Howard & Maurer. 1994) y esta activación es necesaria para la inducción del gen de prolactina (Kievit *et al.* 2001). En cultivos primarios de hipófisis la administración de LhRH produce un aumento en los niveles de activación de las MAPK y este efecto es mimificado por tratamiento con TPA y no por aumento de los niveles intracelulares de calcio con ionomicina (Mitchell *et al.* 1994).

Se ha descrito la implicancia de la vía de las MAPK en la regulación de células gonadotrofas y lactotrofas, sin embargo la existencia de esta vía de señalización en corticotrofos y su implicancia en la regulación hormonal no ha sido caracterizada hasta el momento.

II) OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES

La hipófisis juega un rol crucial como punto de interacción entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune y se encuentra bajo una compleja regulación por factores hipotalámicos, citoquinas provenientes del sistema inmune y glucocorticoides. Siendo los reguladores mas importantes la CRH hipotalámica, la IL-1 y los glucocorticoides

Sin embargo se desconocen las vías de transducción de señales y factores de transcripción ya demostrados en otros sistemas celulares. Por lo cual nos planteamos el siguiente objetivo general:

Caracterizar la señalización y los factores de transcripción involucrados en la regulación de POMC por estos factores.

Este objetivo general se subdivide en tres categorías:

Caracterizar los eventos moleculares intervinientes en la regulación del gen de POMC por CRH, enfatizando las vías de señalización y factores de transcripción involucrados.

Caracterizar las vías de señalización y factores de transcripción involucrados en el efecto regulador de IL-1 sobre el gen de POMC.

Caracterizar como interactúan IL-1 y CRH e IL-1 y los glucocorticoides en la regulación de la función corticotrofa.

1.1. Objetivos particulares

A) Acción de CRH

1. Caracterizar el rol del Calcio y cAMP en la inducción y actividad de los factores de transcripción Nur77 y Nurr1 por CRH.
2. Caracterizar las protein quinasas intervinientes en dichos efectos.
3. Caracterizar de la existencia de una vía MAPK activa en corticotrofos. Su regulación por CRH, cAMP y calcio; su importancia en inducción y actividad de los factores Nur (Nur77/Nurr1) y su relevancia en la inducción de POMC.

B) Acción de IL-1

4. Identificar la dependencia de Nur77/Nurr1 como mediadores de los efectos estimulatorios de IL-1 sobre POMC.
5. Identificar las vías de señalización involucradas en los efectos de IL-1.
6. Identificar si existe un rol del factor de transcripción NFkB en la regulación de Nur77/Nurr1 y POMC en corticotrofos.

C) Interacción de IL-1 con CRH y glucocorticoides

7. Caracterizar la existencia de un efecto potenciador de la IL-1 sobre la activación por CRH de Nur77/Nurr1 en corticotrofos.
8. Caracterizar la existencia de un efecto sensibilizador sobre la actividad inhibitoria de los glucocorticoides en la regulación de POMC y la secreción de ACTH en la línea celular AtT20.

9. Dada la potencial implicancia fisiopatológica de un aumento en la sensibilidad a glucocorticoides se testeó también esta regulación en cultivos primarios de adenomas humanos provenientes de pacientes con la enfermedad de Cushing.

2. MODELO EXPERIMENTAL

Como modelo experimental para la investigación de los eventos moleculares intervinientes, se utilizó una línea celular corticotrofa murina AtT20. Esta línea celular posee los mecanismos regulatorios característicos de los corticotrofos normales (regulación por factores hipotalámicos, citoquinas, glucocorticoides, etc.) y es la herramienta fundamental en estudios de regulación génica y señalización en corticotrofos. En estas células se analizó el efecto de CRH, cAMP, citoquinas y glucocorticoides sobre la activación de promotores específicos utilizando técnicas moleculares (transfecciones transientes y estables con vectores reporteros y de expresión, Northern-blot y Western-blot) y celulares (medición de la secreción de ACTH). Se analizaron las vías de transducción de señales involucradas mediante dominantes negativos e inhibidores farmacológicos de diversas protein quinasas. Se midió la actividad de protein quinasas *in vitro* y se caracterizaron los parámetros cinéticos de GR por la técnica de Scatchard. Se utilizaron también cultivos primarios de adenomas corticotrofos humanos para corroborar los resultados obtenidos en la línea celular respecto a la interacción de CRH, IL-1 y glucocorticoides.

III) MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES Y REACTIVOS

Se utilizaron materiales de las siguientes compañías Seromed (Berlín, Alemania), Life Technologies (NY, USA), Flow (Meckenheim, Alemania), Falcon (Heidelberg, Alemania), Nunc (Wiesbaden, Alemania) y Sigma (St Louis, MO, USA).

Si un producto utilizado no pertenece a estas compañías estará indicada su procedencia en el texto.

1.1. Estímulos Utilizados

Las células fueron estimuladas como se detalla en cada experimento con CRH recombinante humana/rata (20 o 100nM), NA (1 μ M) (Bachem, Heidelberg, Alemania), análogo permeable de cAMP (500 μ M) (CPT-cAMP), KCl (36mM) mas el agonista de canales de calcio tipo L FPL64176 (2 μ M) (RBI, Natick, MA, USA). Las siguientes citoquinas: IL-1 β recombinante humana (100U/ml) y IL-1 β recombinante ratón (100U/ml) (R&D-Systems Inc., Minneapolis, USA), IL-11 (10ng/ml), IL-6 (2000U/ml) y LIF (20ng/ml) recombinantes de ratón (R&D-Systems Inc., Minneapolis, USA). Los inhibidores de protein quinasas: MDL 12330 (10 μ M) (RBI, Natick, MA, USA), KN-62 (10 μ M) (RBI, Natick, MA, USA), H89 (10 μ M) (Calbiochem, San Diego, CA, USA), UO126 (10-20 μ M) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) y PD98059 (50 μ M) (Calbiochem, San Diego, CA, USA), Bisindolilmaleimida-1 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), SB203580 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) y el antagonista de canales de calcio Nifedipina (NIF) (1 μ M). Cuando se utilizaron inhibidores estos fueron agregados 15 min antes del estímulo.

2. MÉTODOS CELULARES

2.1. Mantención de la línea celular AtT20

Se utilizó una línea celular corticotrofa de ratón AtT20, obtenida de la Colección Americana de Cultivos (Rockville, MD, USA) (Arzt *et al.* 1992). Fueron cultivadas como se detalla mas adelante en el texto.

Las células AtT20 fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (pH 7.3) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), y Penicilina-Estreptomicina en botellas o placas de cultivo de 10 cm. Cada 4 días, cuando llegaban a una confluencia del 80 % se las repicó a una dilución de 1 en 4-5. Para ello se las lavó previamente con PBS 1x con el fin de eliminar restos de suero que puedan interferir con la actividad enzimática de la tripsina. Luego se las sometió al tratamiento enzimático con tripsina (300 µl por placa) hasta que se despegaran del plástico. Luego se agregó 10 ml de DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos y se las sometió a disgregación mecánica con la pipeta de plástico. Una vez obtenidas las células en suspensión se procedió a realizar la dilución de la suspensión celular en la cantidad de botellas necesarias para el experimento o se las contó para sembrar las placas experimentales.

Para las determinaciones hormonales se utilizó DMEM suplementado con antibióticos en ausencia SFB en el caso de AtT20. En el caso de cultivos primarios de adenomas hipofisarios se utilizó DMEM con los aditivos antes mencionados para el cultivo celular en ausencia de SFB y con 0.5% de seroalbúmina bovina (BSA).

En todos los ensayos hormonales, tanto en la línea celular como en los cultivos de adenomas hipofisarios se las dejó 18 hs en DMEM en ausencia de SFB previo a la estimulación.

2.2. Cultivos primarios de adenomas hipofisarios

Las biopsias de adenomas de hipófisis humanos fueron obtenidas de pacientes que presentaban la enfermedad de Cushing, la cual fue diagnosticada por elevados niveles de ACTH plasmática, e imágenes de resonancia nuclear como se describió previamente (Arzt *et al.* 1992). Las muestras fueron obtenidas por cirugía transfenoidal y fueron luego analizadas por inmunohistoquímica para corroborar la producción elevada de ACTH, confirmando que los síntomas clínicos son consecuencia de la producción de ACTH por el adenoma hipofisario. También se midió la secreción de ACTH secretado al medio de cultivo desde la operación hasta el comienzo del experimento para confirmar la producción hormonal por el adenoma.

Los explantes fueron cortados en condiciones de esterilidad en pequeños pedazos y sometidos a dispersión mecánica y enzimática con el fin de obtener la dispersión celular. Se utilizó una solución buffer conteniendo: colagenasa (4 g/l), DNAsa (10 mg/l), hialuronidasa (1 g/l) e inhibidor de tripsina (0.1 g/l). Los fragmentos del adenoma se incubaron por un tiempo total de 20 min a 37°C. Durante esta incubación se ayudó a la digestión enzimática mediante la digestión mecánica utilizando una pipeta pasteur de vidrio siliconada. Una vez que se observó la disgregación del tejido se recuperaron las células mediante centrifugación. Luego se resuspendieron en medio DMEM suplementado con 10% SFB una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (10000 U/ml) además se adicionaron los siguientes aditivos: NaHCO₃ (2.2 g/l), HEPES (10 mM), vitaminas (2mM), insulina (5 mg/l), selenito (20 mg/l), transferrina (5 mg/l), T₃-triiodotironina (30 pm), conteniendo 10% SFB y 10000 U/ml penicilina-estreptomicina. De esta resuspensión se extrajo una alícuota con el fin de realizar el conteo celular utilizando una cámara de Neubauer y medir la viabilidad por el método de tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de etidio. El método consiste en resuspender las células al medio en una solución conteniendo 250µg/ml de naranja de acridina y 1µg/ml de bromuro de etidio. Las células viables se observan verdes al microscopio de fluorescencia y las muertas rojas. Luego del conteo se sembraron las células en el medio utilizado

anteriormente para resuspenderlas (DMEM mas los aditivos) en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Luego de la adhesión por 48-72 hs se realizaron lavados con PBS 1x para eliminar los detritos celulares y se las colocó en el medio de cultivo adecuado para la determinación de la secreción hormonal, como se detallará más adelante.

2.3. Transfecciones transientes por el método de Lipofectamina

Dos días antes de la transfección se plaquearon las células en una densidad de 3×10^4 células/ml en D-MEM suplementado con 10% SFB y antibióticos en placas de 6 pocillos de 35 mm de diámetro. A los dos días, a la monocapa celular (crecida a una densidad del 50-60%), se le agregaron los complejos de DNA y liposomas obtenidos de la siguiente manera. Por cada pocillo a transfectar se mezcló el DNA (2µg totales) disuelto en 100 µl de OptiMEM (Gibco BRL Life Technologies, NY, USA) por un lado (se lo dejó reposar 10 min), con 8 µl de LipofectAMINE Reagent (Lípidos catiónicos) (Gibco BRL Life Technologies, NY, USA) disueltos en 100µl de OptiMEM por otro. Para esto se utilizaron tubos de polipropileno de 6 ml. Luego de mezclar el DNA con la LipofectAMINE se lo dejó reposar 45 min a temperatura ambiente con el objetivo de que se formen los complejos. Mientras tanto se aspiró el medio de cultivo de las placas de 6 pocillos, se las lavó con PBS y se colocó 800 µl de OptiMEM por pocillo. Al cumplirse los 45 min de incubación se agregaron los complejos a la monocapa celular (200µl /pocillo) y se dejó transfectando a las células durante 5-6 hs en la estufa de cultivo a 37°C. Transcurrido este tiempo se les cambió el medio de cultivo nuevamente con OptiMEM con el fin de remover los complejos y se las dejó durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron los estímulos indicados en cada experimento por 6 hs o el tiempo indicado en D-MEM en ausencia de SFB.

Luego de la estimulación se cosecharon las células y se obtuvieron los extractos celulares estos extractos se guardaron a -80°C para la medición de la actividad de LUC, Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) o β-galactosidasa (β-gal) según corresponda, como se detallará mas adelante.

2.4. Transfecciones estables y obtención de clones

Se obtuvieron clones derivados de las células AtT20 que sobreexpresaban establemente una forma mutante de Nur77 dominante negativa (Nur77 DN) o se utilizó el vector de expresión vacío para obtener líneas controles (pcDNA3). Brevemente, se transfectaron por el método de lipofectamina antes descripto las células AtT20. Luego de la transfección se agregó D-MEM suplementado con SFB 10% y antibióticos por 48hs para que las células que no incorporaron el plásmido al DNA lo pierdan en ausencia de selección. Luego de este tiempo se trataron las células con D-MEM SFB10% conteniendo el antibiótico G418 (400µg/ml) (Gibco BRL Life Technologies, NY, USA) por 2 días. Este antibiótico mata las células sensibles a neomicina, las células que incorporaron el plásmido al DNA son resistentes a este antibiótico ya que la resistencia se encuentra codificada en los vectores utilizados. Luego se repicaron las células y se sembraron en placas de 96 pocillos con D-MEM SFB10% y G418 con el objetivo de obtener colonias aisladas derivadas de los clones resistentes. El medio se cambió cada 2 días. Luego de 2 semanas de incubación las colonias resistentes, que se observaban a simple vista, fueron aisladas mediante el tratamiento con 5µl de tripsina y las células transferidas, dispersadas y cultivadas en una placa de 24 pocillos. Se siguió el crecimiento en presencia de G418 y cuando se obtuvieron cantidades celulares suficientes se procedió a la realización de los chequeos de expresión del transgén.

3. MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.1. PLÁSMIDOS UTILIZADOS

3.1.1. Plásmidos Reporteros

Se utilizaron los siguientes plásmidos reporteros:

NurRE-LUC: contiene repetida en tandem tres copias de los sitios NurRE (gTGATATTacctccAAATGCCA) acoplados al promotor mínimo de POMC que se extiende desde las posiciones (-34/+63) (Philips *et al.* 1997a).

POMC-LUC: contiene la región del promotor de POMC que se extiende desde las posiciones (-770/+63) (Liu *et al.* 1995).

POMC(mutNurRE)-LUC: contiene la región del promotor de POMC que se extiende desde las posiciones (-770/+63) con una mutación que afecta el pegado de Nur77 al sitio NurRE. Este fragmento se extiende desde la posición -406 hasta la posición -397 y contiene la siguiente secuencia de bases (CATCGATGAG) (Philips *et al.* 1997a).

NBRE-LUC: contiene repetida en tandem tres copias de los sitios NBRE (AAAGGTCA) acoplados al promotor mínimo de POMC que se extiende desde las posiciones (-34/+63) (Philips *et al.* 1997a).

Nur77-CAT: contiene el promotor de Nur77 (-480/+87) (Woronicz *et al.* 1995).

KB-LUC: contiene en tandem 3 sitios consenso KB de reconocimiento por relA (p65/p55) (McKean *et al.* 1995).

PG5-LUC: contiene en tandem 3 repeticiones del sitio de reconocimiento para la proteína de levadura Gal4 (Promega, Madison, WI), este plásmido será utilizado para la medición de la actividad transcripcional de proteínas quiméricas.

3.1.2. Vectores de expresión

Se utilizaron los siguientes plásmidos de expresión:

pCMX-Nur77: expresa Nur77 de ratón bajo el promotor fuerte de Citomegalovirus (CMV) (Philips *et al.* 1997a).

pHbNur77ZnCT (Nurr77 DN): expresa una mutante de Nur77 que carece la región amino-terminal se pega a los sitios NBRE y no activa la transcripción (Woronicz *et al.* 1994).

Gal4-Elk1: expresa la proteína quimérica Gal4-Elk1 bajo el promotor de CMV (clonado en pcDNA3), esta contiene el dominio de unión al DNA (DBD) de Gal4 unido al cDNA de Elk1 (Vossler *et al.* 1997b).

B-Raf: Expresa la proteína B-Raf bajo el promotor de CMV (clonado en pcDNA3) (Vossler *et al.* 1997b).

RapN17 y RapG12V: Expresa las mutantes de Rap1 (RapN17 es un dominante negativo y RapG12V es un constitutivamente activo) bajo el promotor de CMV (clonado en pcDNA3) (Peterson *et al.* 1996).

RasN17: Expresa la mutante de Ras (dominante negativo) bajo el promotor de CMV (clonado en pcDNA3) (Coso *et al.* 1995).

MEK-EE: Expresa la forma mutante de MEK1 (constitutivamente activa) bajo el promotor de CMV (clonado en pcDNA3) (Coso *et al.* 1995).

PMt-REV-PKA (PKA DN): Expresa la subunidad regulatoria mutada de PKA que no puede unir cAMP (dominante negativo), de esta forma no puede activarse y secuestra la subunidad catalítica endógena. (Clegg *et al.* 1992).

MEK DN: Expresa una forma mutante de MEK1 (dominante negativo) bajo el promotor de CMV (clonado en pcDNA3).

pBIND: vector vacío que expresa el dominio de unión al DNA de Gal4 (bajo el promotor de CMV) para realizar construcciones de proteínas quiméricas (Promega, Madison, WI, USA).

RSV- β gal: Expresa la proteína β gal bajo el promotor del fago RSV, se utiliza como control de transfección.

3.1.3. Plásmidos para la obtención de cDNA

Nurr1: Vector de expresión de Nurr1, se utilizó una porción del cDNA como sonda para el ensayo de Northern-blot (Ohkura *et al.* 1999).

POMC: Plásmido utilizado para obtener el cRNA de POMC como sonda para el ensayo de Northern-blot (Erllichman *et al.* 1984).

β -actina: Plásmido utilizado para obtener la sonda de DNA de β -actina para el ensayo de Northern-blot (Antaraki *et al.* 1997).

pCMX-Nur77: Se utilizó como fuente de cDNA de Nur77 (Philips *et al.* 1997a).

B-Raf: Se utilizó como fuente del cDNA de B-Raf (Vossler *et al.* 1997b).

3.2. Uso de la proteína quimérica Gal4

3.2.1. Uso de los vectores de expresión para proteínas quiméricas Gal4 para medición de la estimulación o inhibición de la transactivación.

El método de medición de la actividad transcripcional de proteínas mediante la transfección de proteínas quiméricas consiste en transfectar las células con un vector reportero que contiene un promotor mínimo acoplado al gen de LUC y rio arriba del promotor mínimo 3 copias en tandem de los elementos respondedores a la proteína de levadura Gal4 (pG5-LUC).

Se cotransfecta un vector de expresión para una proteína quimérica bajo un promotor constitutivo (CMV) que contiene el dominio de unión al DNA de Gal4 acoplado al cDNA de la proteína que se quiere estudiar. De esta forma ninguna proteína endógena de células eucariotas posee la capacidad de interaccionar y activar la transcripción del gen reportero y solo lo hace la proteína quimérica.

Entonces cualquier modificación en la actividad transcripcional de la proteína quimérica se debe a una variación en su actividad.

Se utilizó esta técnica para medir la actividad de ERK endógeno mediante la transfección de Gal4-Elk1 que es sustrato de la enzima y se realizó una proteína quimérica Gal4-Nur77, como se detallará, para medir variaciones en la actividad transcripcional por las distintas vías de señales.

3.2.2. Construcción del vector de expresión para la proteína quimérica Gal4-Nur77

El vector de expresión de la proteína quimérica Gal4-Nur77 fue construido como se detalla a continuación:

Se utilizó el cDNA de pCMX-Nur77 como molde y se liberó el fragmento correspondiente al cDNA de Nur77 cortando con Nco1 (que deja extremos romos) y Kpn-I (que deja extremos cohesivos). El fragmento fue purificado por gel (low melting) y luego el cDNA de Nur77 se mezcló con el vector pBIND previamente cortado con EcoRV (extremos romos) y Kpn-1 (extremos cohesivos) y se realizó la reacción de ligación. La correcta inserción fue verificada posteriormente por secuenciación. (Figura 10). Las reacción de ligación se realizó a 20°C durante 18 hs, en 20 µl de buffer de ligación conteniendo Tris-HCl (50mM) ph:7.5; MgCl₂ (7mM); DTT (1mM), en presencia de rATP (500µM) y DNA ligasa del fago T4 (1U) (Stratagene, Heidelberg, Alemania). La confirmación mediante secuenciación fue realizada por el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Cornell (Bioservice, Lewisville, TX, USA).

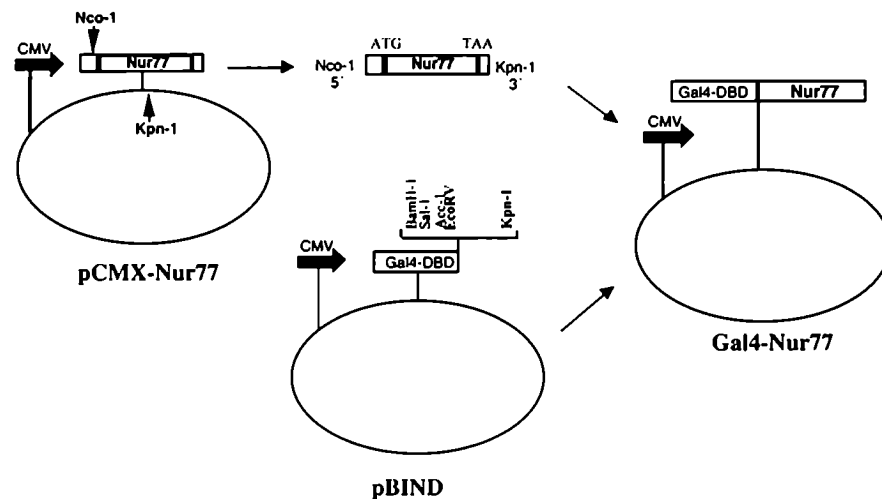


Figura 10. Esquema representativo de la construcción del vector de expresión Gal4-Nur77

3.3. Amplificación de plásmidos, aislamiento, purificación y marcación de fragmentos

3.3.1. Preparación de bacterias competentes

Se utilizó el método descrito por Hanahan (Hanahan. 1983). Brevemente, se utilizan bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α . De una placa de LB-Agar se pica una colonia de bacterias y se crece en 5 ml de medio completo LB (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l; NaCl 5g/l, pH:7) sin antibiótico. Se lo crece a 37°C hasta alcanzar una DO 550 nm: 0.3 (aproximadamente 2 horas). Posteriormente, se diluye el cultivo 1:20 en 100ml y se lo deja crecer hasta una DO: 0.48. Luego se centrifugan las bacterias a 1000g por 10 min y se resuspenden en el buffer Tfb1 estéril (KacO 30nM, RbCl₂ 100mM, CaCl₂ 10mM, MnCl₂ 50mM, Glicerol 15%, pH:5.8) manteniéndolas a 4°C durante 5 min. Luego se repite la centrifugación y se resuspende el pellet bacteriano en 4 ml de la solución TfbII estéril (MOPS 10mM, CaCl₂ 75mM, RbCl₂ 10mM, Glicerol 15%, pH: 6.5) a 4°C. Luego se alicuotaron las bacterias cada 50 μ l, se guardaron a -80°C y posteriormente se midió la eficiencia de transformación utilizando un plásmido de concentración conocida como se detalla a continuación.

3.3.2. Transformación bacteriana

Se mezclan aproximadamente 50-100 μ l de bacterias competentes (en hielo) con 50-100 ng de DNA plasmídico (5-30 μ l) resuspendido en agua. Se agita el tubo suavemente y se incuba por 30 min en hielo, luego se les da un shock térmico a 42°C por 3 min para permitir la entrada de los plásmidos en las bacterias. Luego se agrega 800 μ l de medio LB sin antibiótico y se incuba por un período de 1 h a 37°C con el objetivo de que las bacterias expresen la resistencia al antibiótico codificada en el plásmido. Luego se plaquean las bacterias en placas LB agar (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l; NaCl 5g/l; agar 15g/l) con ampicilina.

Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C y luego se repica una

colonia y se crece durante la noche a 37°C en 5ml de LB con el antibiótico para comprobar la transformación con el plásmido correcto. Una alícuota de esta preparación es congelada a -80°C con 15% de glicerol como reserva de bacterias transformadas.

3.3.3. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos obtenidos por la digestión enzimática de plásmidos son separados mediante la purificación por gel. Para ello se corre electroforéticamente el producto de la digestión en un gel conteniendo 1-1,5% agarosa de bajo punto de fusión (low melting point) disuelta en buffer TBE (Tris-HCl 25mM, Borato 100mM; EDTA 10mM, pH: 8.0) conteniendo bromuro de etidio a 80V. Para identificar el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb. Las muestras se siembran en un buffer conteniendo un 20% de Glicerol y Azul de Bromofenol como colorante indicativo del frente de la corrida. Las bandas se visualizan utilizando luz ultravioleta de 254nm. Los fragmentos de agarosa conteniendo las bandas de interés se recortan utilizando un bisturí y se transfieren a un tubo eppendorf. Luego se calienta a 70°C por 20 min. A la agarosa derretida se le agrega un volumen de fenol y un décimo del volumen de cloroformo. Se enfría rápidamente en hielo por 15 min y se centrifuga a 10000g por 15 min, el sobrenadante se transvasa a otro eppendorf y luego de dos lavados con cloroformo, se precipita con un volumen de isopropanol y un décimo de acetato de sodio (3M), luego de la centrifugación a 10000 g el precipitado se lava con etanol, se vuelve a precipitar por centrifugación, se seca con aire caliente y se resuspende en agua. Una alícuota del DNA fue luego cuantificado utilizando un espectofotómetro y se guardó a -20°C para su posterior utilización.

Por este método se obtuvo el fragmento de 1800pb correspondiente al cDNA de Nur77 para su clonado en pBIND como se detalló anteriormente y las sondas de DNA utilizadas para la detección de la expresión específica por la técnica de Northern-blot.

Estas sondas son:

Fragmento de 1Kb proveniente de la digestión con Pst-1 del plásmido de β -actina

Fragmento de 1,4 Kb proveniente de pCMX-Nur77 cortado con Pvu-II

Fragmento de 640 pb producto de la liberación del cDNA del vector de expresión de B-Raf

Fragmento de 500 pb producto de liberación con HindIII y Pst-1 de vector de expresión de Nur1.

3.3.4. Marcación de Sondas: Método de extensión del primer

Las marcaciones de los fragmentos se realizaron el método de random-primer y extensión con un kit de marcación Boehringer (Ingelheim, Alemania).

Para esto se desnaturalizan 50ng del fragmento a marcar disuelto en agua mediante calentamiento a 100°C por 10 min y enfriamiento rápido a 4°C. Luego se le agrega el buffer de reacción 10X (2 μ l) conteniendo hexanucleótidos, 3 μ l de una mezcla de dNTP (conteniendo 0.5M de dATP, dTTP, dGTP) y 5 μ l de α -³²P-dCTP (10 μ Ci/ml, 3000Ci/mol). Se le agrega luego el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (2U) y se incuba a 37°C por 1h. Los hexanucleótidos contenidos en el buffer funcionan como primers inespecíficos y mediante la extensión de la cadena por la enzima se incorpora el nucleótido marcado radiactivamente.

Se obtienen entonces productos marcados radiactivamente de tamaños diversos complementarios al DNA utilizado como molde. Para separar los productos de mayor tamaño de los de menor tamaño (que pueden dar señales mas inespecíficas) se utilizó el método de cromatografía por centrifugación. Para esto se realizaron columnas conteniendo sefadex G50 en buffer TES (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM, pH:7) en jeringas de 1ml y se cargó el producto de la marcación disuelto en buffer TES. Luego de la centrifugación se obtiene una primera fracción (con los productos grandes) que será la utilizada en la reacción de hibridación. La eficiencia de la marcación se determina mediante el contéo de la radiactividad incorporada al DNA utilizando un contador β Beckman (Beckman Coulter Inc, Fullerton, USA) que debe ser

$2-4 \times 10^8$ cpm/ μ g DNA y por la relación entre la primera y una segunda fracción obtenida por una segunda centrifugación luego de cargar la columna con buffer TES la cual debe ser igual o mayor a 10. La sonda marcada se guarda luego a -20°C para su posterior utilización.

3.3.5. Marcación de sondas: método de transcripción *in vitro*

Se obtuvieron sondas de RNA para detectar el mRNA de POMC mediante hibridación de membranas conteniendo el RNA fijado.

El método se realizó de la siguiente manera. Se incubaron a 37°C por 1 h 100ng de DNA; 0.5 μ l de inhibidor de RNAsa; 5 μ l de buffer 5X; 3 μ l de rATP+rGTP+rTTP 2.5mM, 1 μ l de DTT 1M, 10 μ l de agua, 1 μ l de enzima DNA polimerasa del fago T3 y 5 μ l de $\alpha^{32}\text{P}$ -rUTP (50 μ Ci).

La purificación de la sonda marcada se realizó mediante columnas de sefadex G50 como ya se describió anteriormente para la separación de sondas marcadas por el método de random priming.

3.4. Ensayo de Northern-blot. Medición del mRNA celular

3.4.1. Extracción del mRNA

Se utilizó el método de isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo (Arzt *et al.* 1992, Chomczynski & Sacchi. 1987). Una vez terminado el tiempo de estimulación de las células en cultivo se les agrega 500 μ l de solución D (tiocianato de guanidina 4M; citrato de sodio 25mM , pH 7; N-lauril-sarcosil 0.5%; 2-mercaptoetanol 0.1M) por pocillo, que es un buffer de lisis que protege al RNA liberado de la acción de las RNAsas celulares. El lisado se transfiere luego a un tubo eppendorf y se le agregan sucesivamente 50 μ l de acetato de sodio 2M (pH:4), 500 μ l de fenol y 100 μ l de cloroformo-isoamílico (49:1). Se mezclan utilizando un vortex durante 15 min, manteniendo la mezcla en hielo. Luego se centrifuga por 20 min a 10000rpm utilizando una centrifuga refrigerada. Se toma luego la fase acuosa superior conteniendo al RNA total y se precipita luego con un volumen de isopropanol por un mínimo de 2 hs a

-20°C. Se centrifuga nuevamente por 30 min a 10.000 rpm y el precipitado de RNA se resuspende en 300 µl de solución D mas 300µl de isopropanol, se incuba nuevamente a -20°C por un mínimo de 2 hs y luego de una nueva centrifugación el precipitado se lava con 300µl de etanol al 75%; se lo seca y resuspende en 25µl de agua previamente liberada de las RNAsas por autoclavado en presencia de dietilpirocarbonato (DEPC). El RNA resuspendido en agua puede guardarse a -20°C.

Para la cuantificación del RNA se utiliza una dilución 1/100 de la muestra en agua (DEPC) y se mide la absorbancia a 260 y 280nm. La pureza de las muestras se determina mediante el índice de absorbancia a 260/280nm. Una relación de 1,8 -2 de este índice es indicativo de una alta pureza del RNA obtenido.

3.4.2. Electroforesis del RNA por el método de glioxal

Se utilizó el método de glioxalización de las muestras que consiste en incorporar a la cadena de RNA covalentemente pequeñas moléculas de glioxal, de esta forma la corrida electroforética puede realizarse en condiciones no desnaturalizantes (en ausencia de formaldehído).

Para esto 20µg del RNA (llevados a 18µl con agua DEPC) se incuba con 8µl de una solución de glioxal (127µl de glioxal deionizado; 8µl de buffer fosfato de sodio 1M) y 24 µl de DMSO a 50°C por 1h. Luego se le agregan 4 µl de buffer de siembra (azul de bromo fenol 0.25%; xilen-cianol 0.25%, Glicerol 50%). Estas muestras se siembran en un gel 1,2% de agarosa en buffer fosfato (fosfato de sodio 10mM). La corrida electroforética se realiza a 130 V y 80-120 mA por 4-6 hs en buffer de corrida fosfato de sodio 10mM pH 6.5. Durante la corrida el buffer se hace recircular mediante una bomba con el fin de mantener las condiciones de corridas homogéneas. Cuando el frente de corrida (azul de bromo fenol) llega al borde del gel se procede a realizar la transferencia.

3.4.3. Transferencia del RNA a una membrana de Nylon

Al finalizar la electroforesis, el RNA es transferido a una membrana de nylon (Hybond-N; Amersham Life Science, Freiburg, Alemania). Para ello se coloca el gel en contacto con la membrana de nylon previamente hidratada se utiliza la transferencia por capilaridad durante 18 hs utilizando una solución 20x SSC (NaCl 3M; citrato de sodio 0.3M). Luego las membranas transferidas se fijan por calor a 80°C durante 2 hs y se tratan con ácido acético por 15 min. Luego se visualiza la integridad de RNA por tinción con azul de metileno en una solución de acético 0.04% y posterior lavado con agua. La visualización de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S se utiliza como indicativo de la integridad del RNA total corrido. Luego las membranas son guardadas a 4°C para la posterior detección por hibridación con sondas radiactivas de la expresión de genes específicos.

3.4.4. Hibridación con sondas radiactivas

Para la detección en las membranas de nylon los niveles de expresión de genes específicos se utiliza la hibridación por complementaridad utilizando para ello las sondas radiactivas. Las membranas son prehibridadas por un mínimo de 2 hs a 42°C, en una solución de prehibridación para bloquear los sitios inespecíficos (SSPE 5x, formamida 50%, Denhardt's 5x, DNA de espermatozoos de salmón sonificado y desnaturalizado 0.1mg/ml y SDS 0.1%, SSPE 20x, NaCl 3.6M, buffer fosfato de sodio 0.2M, EDTA 20mM, Denhardt 100x, albúmina bovina (BSA) 2%, Ficoll 2%, Polivinilpirrolidona 2%). Se agrega luego la sonda marcada previamente 10.000cpm/cm² de membrana y se hibrida durante toda la noche 42°C.

Finalizada la hibridación se procede a realizar lavados sucesivos en condiciones de astringencia cada vez mayores con el objetivo de liberar la radiactividad incorporada inespecíficamente en la membrana. Los lavados son: 2 de 15 min a temperatura ambiente (2x SSC, SDS 0.1%); 30 min a 42°C (1 x SSC, SDS 0.1%), 15-30 min a 42-60°C (0.1 x SSC, SDS 0.1%), dependiendo de la sonda utilizada. Los filtros se exponen con placas intensificadoras en

cuarto oscuro a la película autorradiográfica (Kodak-XOMAT, Sigma, MO, USA). La exposición es realizada a -80°C por el tiempo necesario para tener una señal apreciable.

3.4.5. Lavado de las membranas de nylon para su reutilización posterior

Luego de que una membrana fue utilizada, esta puede ser vuelta a hibridar con otra sonda distinta luego de que se le despegue la sonda anterior.

Para esto se utiliza una solución conteniendo (Denhardt 5x, Tris-HCl 20mM, EDTA 20mM pH: 8.0) y se incuba la membrana durante 2 hs a 80°C . Se comprueba luego el correcto lavado de la sonda por autoradiografía. Las membranas pueden ser reutilizadas luego para la hibridación con una segunda sonda y así sucesivamente.

4. METODOS BIOQUIMICOS

4.1. Análisis de las transfecciones

4.1.1. Obtención de los extractos celulares

Una vez terminado el tiempo de estimulación, a las células se le aspiró el medio de cultivo y se agregó 100 μl del buffer de lisis (Promega, Madison, WI, USA). Se las incubó durante 10 min y luego se recogieron los extractos ayudándose con un rubber para despegar los detritos celulares. Estos extractos se centrifugaron a 10.000g y los sobrenadantes se transvasaron a otro eppendorf para eliminar los detritos celulares. Luego se los guardó a -80°C para la posterior determinación de las distintas actividades enzimáticas según corresponda.

4.1.2. Medición de la actividad LUC

La medición de la actividad LUC se realizó utilizando un kit (Promega, Madison, WI, USA) y un luminómetro Junior (Berthold, Bad Wildbad, Alemania). Se

colocaron 20µl de los extractos celulares en tubos de ensayo de polipropileno y se les agregó 100µl de la mezcla del kit conteniendo luciferina y rATP y se midió inmediatamente la actividad por 15 segundos. Como blanco se utilizó el buffer de lisis en vez de los extractos celulares.

4.1.3. Medición de la actividad CAT

El ensayo de la actividad CAT se realizó como se ha descrito previamente (Costas *et al.* 1996) con algunas modificaciones. Brevemente, se incubaron 20µl de los extractos celulares en 100µl de buffer de reacción (250mM Tris-HCl, EDTA 5mM pH:8) conteniendo 20µl de acetil coenzima A 20mM y 3µl de cloranfenicol ¹⁴C, por 5 hs a 37°C. Luego de este tiempo se procedió a extraer los productos de cloranfenicol acetilados mediante extracciones con acetato de etilo. Para ello se agregaron 500µl de acetato de etilo a cada tubo, se mezcló con vortex durante 15 segundos y luego de centrifugar se extrajo la fase superior conteniendo el acetato de etilo. Se repitió este procedimiento agregando nuevamente 500µl de acetato de etilo y transfiriendo la fase superior al mismo tubo que anteriormente.

La fase orgánica extraída conteniendo los productos y sustratos de la reacción se secaron mediante centrifugación al vacío con una centrífuga de vacío (speedvac plus sc210A, Savant, NY, USA). La identificación de los productos fue realizada luego mediante cromatografía de capa delgada. Brevemente, a los tubos provenientes de la centrífuga speedvac ya secos se les agregaron 20µl de acetato de etilo y se sembraron hojas de TLC para la cromatografía. La corrida se realizó en buffer conteniendo Cloroformo:Metanol en una proporción 95:5 por aproximadamente 2 hs.

Luego las hojas se secaron con aire caliente y se expusieron a temperatura ambiente a una película autoradiográfica (Kodak-XOMAT, Sigma, MO, USA) por dos días aproximadamente.

4.1.4. Medición de la actividad β -gal

Se utilizaron placas de 96 pocillos y se pipetearon 20 μ l de extractos celulares en cada pocillo. Luego se les agregó 100 μ l del buffer β -gal 1x por pocillo conteniendo: Na₂PO₄ (0,1M, pH 7,4); MgCl₂ (1mM); (β -mercaptoetanol 0,05M); Orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG) (0,66mg/ml), este último es el sustrato que da un color amarillo por la acción de la β -gal. Se incubaron las placas a 37°C hasta la obtención de un color amarillo 2-4 hs y la reacción colorimétrica se detuvo con el agregado de 100 μ l de Na₂CO₃ (1M) por pocillo. Luego se midió la absorbancia a 415nm en espectrofotómetro (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

4.2. Determinación de ACTH por radioinmunoensayo

Para la determinación de los niveles de secreción de ACTH al medio de cultivo se utilizó la técnica de radioinmunoensayo (RIA) como se describió previamente (Arzt *et al.* 1992). Brevemente; Se realizó una curva estándar utilizando ACTH pura y anticuerpos específicos anti-ACTH en un rango de concentraciones desde 20 hasta 10000 pg/ml. La hormona fue marcada radiactivamente con I¹²⁵ y se utilizaron diluciones de las muestras a medir desde 1/20 hasta 1/100.

Para realizar la curva patrón se incubaron 100 μ l de la hormona estándar (en distintas concentraciones) con el anticuerpo por 2 hs a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en presencia de la hormona marcada.

Se establecieron los niveles de unión inespecífica incubando en ausencia de anticuerpo y los valores de unión máxima en ausencia de hormona fría. Los complejos de unión hormona-anticuerpo se separaron de la hormona libre mediante la inmunoprecipitación con un segundo anticuerpo. Luego de centrifugar los complejos se aspiró el sobrenadante y se determinaron los valores de hormona unida por medición de la radiactividad en el precipitado y la hormona libre en el sobrenadante. Para esto se utilizó un contador gamma (Berkman, Fullerton, CA, USA).

4.3. Ensayos de unión a GR (Scatchard)

Se partieron de placas de 10 cm² con células AtT20 que fueron estimuladas o no por 18 hs con IL-1 en DMEM en ausencia de suero. Las células se levantaron en PBS 1x con un rubber policeman. Se concentraron las células por centrifugación y el pellet celular se homogeneizó en buffer conteniendo (0.1M Tris, 10mM EDTA, 25% glicerol, 10mM β -mercaptoetanol, 20mM molibdato de sodio, 0.1mM PMSF, pH:7.4). Los homogenatos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 min y el sobrenadante fue utilizado como fuente de GR. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford.

Las incubaciones se realizaron con 10nM de ³H-DEX (440mCi/mmol) y con 6mg de proteína/ml durante 12 hs a 4°C, en presencia de cantidades crecientes de hormona no radiactiva con el objetivo de desplazar la marca de la hormona marcada por competencia y evaluar así las afinidades relativas.

Luego se procedió a separar la hormona libre de la unida al receptor mediante el agregado de un volumen de carbón activado-dextrano (2%:0.2%). Luego se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm y se tomó el sobrenadante para contar la radiactividad en líquido de centelleo. El carbón activado se une a la hormona libre quedando en el sobrenadante la hormona unida a GR.

Las relaciones de hormona fría y marcada fueron 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 1000. Los valores de unión obtenidos con 1000 de hormona fría corresponden al unido inespecífico y fueron descontados de todas las mediciones realizadas, como 100% de unión se consideró la unión en ausencia de hormona fría.

4.4. Ensayo de quinasas y Western-blot

4.4.1. Obtención de los extractos

Las células AtT20 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos en DMEM 10%SFB suplementado con antibióticos y glutamina. 24 hs después se lavó la monocapa con PBS 1x y se incubaron por otras 24 hs en DMEM sin SFB. Se estimularon los cultivos celulares por los tiempos indicados. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación se colocaron las placas en hielo e inmediatamente se lavaron

las células con PBS 1x y se agregaron 100µl del buffer de lisis por pocillo para el ensayo de quinasas conteniendo (Hepes 20mM pH7,5; EGTA 10mM; β-glicerofosfato 40mM; NP-40 1%; MgCl₂ 2,5mM; Ortovanadato 2mM; PMSF 1mM; DTT 1mM; Leupeptina 20µg/ml). Se levantaron los extractos celulares por disgregación mecánica utilizando un rubber a 4°C y se colocaron en tubos eppendorf. Luego se centrifugaron los extractos a 10.000 rpm con el objetivo de eliminar los detritos celulares, el sobrenadante se transvasó a otro tubo, se separaron alícuotas para realizar el ensayo de western-blot y se guardaron los extractos a -80°C para la posterior determinación de la actividad de las protein quinasas.

4.4.2. Inmunoprecipitación y reacción de quinasas (ERK2)

Los extractos fueron inmunoprecipitados y el ensayo de quinasas se realizó como se describió anteriormente (Crespo *et al.* 1994). Brevemente, los sobrenadantes fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ERK2 (Santa Cruz, CA, USA). Para esto se agrego 1µl del anticuerpo (0.2µg/0.5ml) por tubo y se incubó a 4°C por 90 min para que se produzca la interacción. Luego de este tiempo se agregaron 30µl de bolitas de A/G agarosa-plus (Santa Cruz, CA, USA) y se dejó en agitación por 30 min a 4°C. Luego mediante centrifugación por 10 seg a 10.000 rpm se obtuvieron precipitados de A/G agarosa conteniendo los complejos de anticuerpos. Este precipitado se lavó sucesivamente con las siguientes soluciones con el fin de eliminar el pegado inespecífico a las bolitas de agarosa:

1° lavado: tres veces con 500µl de PBS; NP40 1%; Vanadato 2 mM

2° lavado: una vez con 500µl de Tris-HCl 100 mM pH 7,5; LiCl 0,5 M

3° lavado: una vez con el buffer de reacción (MOPS 4,2mM; β-glicerofosfato 4,2mM; MgCl₂ 2mM; EGTA 0,2mM; Fluoruro de sodio 0,2mM; Vanadato 0,2mM).

Cada precipitado se incubó luego con 30ml del buffer del buffer de reacción y γ³²ATP (10µCu), proteína básica de mielina (MBP) (10µg), DTT (3 mM) y rATP a 37°C por 30 min. Luego se agregó 10ml de buffer de craqueo (Tris-HCl

100mM pH 6.8; DTT 200mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20%) y se calentaron las muestras a 100°C por 10 min con el objetivo de desnaturalizar el sustrato fosforilado para la posterior corrida electroforética.

4.4.3. Corrida electroforética

La corrida electroforética se realizó en poliacrilamida 15% y un gel concentrador (stacking) de 5%. El gel de corrida se preparó con 5.4ml de acrilamida:bisacrilamida (30:1); 5ml de buffer Tris-HCl pH:8,8; 100µl de SDS10%; 100ml de persulfato de amonio (APS)10%; 4.6ml de agua y 7µl de TEMED. Una vez gelificado se agregó el gel concentrador sobre el. El gel stacking se realizó al 5% de acrilamida conteniendo 850µl de acrilamida-bis; 620µl de Tris-HCl pH:6.8; 50µl de SDS10%; 50µl de APS10%; 3.4ml de agua y 5µl de TEMED.

Una vez gelificado se sembraron los productos de la reacción de quinasas y se corrió durante 4 hs aproximadamente a 100V utilizando un buffer de corrida conteniendo (Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 0,1X).

Cuando el colorante azul de bromofenol llegó al borde del gel, se cortó la corrida y se secaron 2 hs a 80°C utilizando una secadora de geles por calor y vacío y el gel se expuso a una placa autoradiográfica Kodak-XOMAT -80°C con películas intensificadoras por 6 hs -4 días.

4.4.4. Detección de la fosforilación de Nur77 *in vitro*

Para la fosforilación *in vitro* de Nur77 se realizó el ensayo como se detalla a continuación:

Las células AtT20 fueron transfectadas transientemente con 500ng de vector Gal4-Nur77 como se describió previamente. Luego de 48 hs de crecimiento en DMEM 10%SFB suplementado con antibióticos y glutamina se trataron con 50µM PD98059 por 4 hs con el objetivo de inhibir la fosforilación por las MAPK endógenas. Se obtuvieron luego los extractos celulares como se describió previamente para el ensayo de quinasas y se inmunoprecipitó la proteína quimérica utilizando un anticuerpo anti la porción carboxi-terminal de Nur77 IgG

de cobayo (Santa Cruz, CA). El inmunoprecipitado purificado fue utilizado como sustrato para la reacción de quinasa (como se describió previamente) para la detección de la fosforilación in vitro de Nur77 por ERK2 proveniente de células AtT20 en distintas condiciones.

4.4.5. Western blot

La fracción alicuotada y guardada a -20°C fue corrida en geles de poliacrilamida 10% desnaturalizante en buffer tris-glicina-SDS 1x (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192 mM, 0.1% SDS). Se utilizó para la identificación de los tamaños moleculares el marcador de peso molecular "Broad Precision Marker" (Bio-Rad, CA). Una vez realizada la corrida electroforética se realizó la electrotransferencia a 100V por 1 h utilizando una membrana de nitrocelulosa y un buffer de transferencia (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192 mM, 0.05% SDS, 20% metanol).

Una vez obtenidas las membranas y previamente a la reacción de detección se bloquearon los sitios inespecíficos de las membranas incubando durante 2 hs en agitación con una solución conteniendo (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, 0.1% SDS, 5% BSA, 0.05X Tween20). Luego se agregó el primer anticuerpo en una dilución 1:500 y se los incubó a temperatura ambiente por 1h en agitación. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo antiNur77 policlonal en cobayo para la detección de Nur77 que reconoce la porción carboxiterminal (Santa Cruz, CA, USA).

Para la detección de los niveles totales de ERK2 o los fosforilados se utilizó un anticuerpo anti-ERK2 o anti-ERK2 fosforilado respectivamente (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo anti ERK2 fosforilado produce reacción cruzada con ERK1 fosforilado por lo que se detectan ambos productos.

Luego se realizaron 2 lavados sucesivos por 5 min cada uno con una solución conteniendo (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, 0.1% SDS, 0.1X Tween20) y se procedió a incubar con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa o fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 por 1 h a temperatura ambiente en agitación.

Las bandas fueron reveladas mediante la utilización de un kit de detección de

quimioluminiscencia para el caso del anticuerpo anti-fosfoERK2 (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) o de un sustrato cromogénico para la fosfatasa alcalina conteniendo (sal de 5-bromo-4-chloro-3-indoly phosphate p-Toluidine (BCIP) y nitroblue tetrazolium chloride (NBT)) (GibcoBRL Life Technologies, NY, USA) para la detección de ERK2 total o Gal4-Nur77.

5. ANALISIS DE DATOS

5.1. Análisis por densitometría

Las placas autorradiográficas resultantes de la hibridación de los Northern blots y de la actividad CAT fueron digitalizadas y se midió la intensidad de cada banda. El análisis se realiza utilizando el programa de análisis de geles NIH image. En el caso de los Northern-blots los datos resultantes de la hibridación con las distintas sondas de los genes de interés, son normalizados con respecto a la banda de β -actina y expresados como unidades densitométricas relativas. En el caso de la actividad CAT las bandas específicas obtenidas son digitalizadas y relativizadas a los valores de β -galactosidasa.

5.2. Análisis estadístico

En los casos de medición de la secreción hormonal de ACTH. La estadística fue analizada mediante análisis de la varianza (ANOVA) en combinación con el test de Scheffe. Los datos son mostrados como el valor medio $\pm$ error estándar.

IV) RESULTADOS

1. Eventos moleculares involucrados en la regulación de POMC por CRH.

1.1. Rol del Calcio en la regulación por CRH, NA y cAMP sobre la expresión de los factores de transcripción Nur77 y Nurr1 y su actividad transcripcional.

1.1.1. Efectos sobre el promotor de POMC y la actividad Nur (Nur77/Nurr1)

A pesar de la extensa caracterización de la movilización del calcio intracelular en corticotrofos y su implicancia en la secreción de ACTH, no existe un estudio exhaustivo del rol del calcio como segundo mensajero para la regulación transcripcional del gen de POMC.

Nos preguntamos si la entrada de calcio es necesaria para la inducción del gen de POMC por CRH en corticotrofos. Para esto tratamos a cultivos de células AtT20, previamente transfectadas en forma transiente con una construcción conteniendo al promotor de POMC unido al gen de LUC (POMC-LUC), con CRH en presencia o en ausencia de NIF, un antagonista específico de los canales de calcio tipo L. Pudimos observar que la entrada de calcio es necesaria para la activación transcripcional de POMC por CRH (Figura 11), ya que NIF bloquea esta estimulación.

Este resultado concuerda con la dependencia del calcio en la regulación del mRNA de POMC en cultivos primarios de hipófisis anterior de rata (Von Dreden *et al.* 1988).

Dada la reciente caracterización de los factores Nur (Nur77 y Nurr1) como mediadores centrales en la regulación de la expresión del gen de POMC por CRH, nos preguntamos si la dependencia del calcio en la regulación del promotor de POMC es consecuencia de la acción del calcio sobre la actividad de los factores Nur.

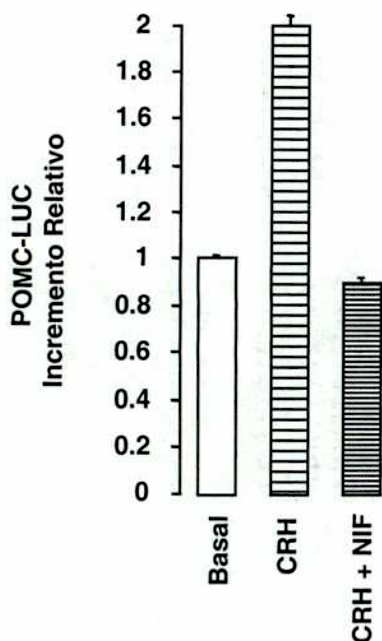


Figura 11. La estimulación del promotor de POMC por CRH depende de la entrada de calcio por canales voltaje dependientes tipo L.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido POMC-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con 100nM de CRH o con CRH y 1mM de Nifedipina (NIF) por 6 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar ($n=4$) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

Utilizamos entonces una construcción que posee el sitio de unión NurRE (presente en el promotor de POMC) acoplado al gen de LUC (NurRE-LUC) y tratamos a las células transfectadas con CRH en presencia o ausencia de NIF. En forma comparativa con CRH utilizamos NA que produce un incremento en los niveles de cAMP y un análogo permeable de cAMP. Observamos que la estimulación provocada por CRH o NA es completamente inhibida en presencia de NIF, no así la estimulación provocada por CRH y NA en forma conjunta o por cAMP que son bloqueadas solo parcialmente (Figura 12).

Nos planteamos entonces estudiar luego si la entrada de calcio era suficiente para estimular la actividad Nur aún en ausencia de otro estímulo externo. Para ello forzamos la entrada de calcio a las células mediante la despolarización con KCl en ausencia o en presencia de un agonista de los canales tipo L (FPL64176) y medimos la actividad Nur en las células transfectadas. Observamos que la entrada de calcio es suficiente para estimular la actividad Nur y este efecto correlaciona con la proporción de calcio entrante, ya que en presencia del agonista tipo L, la estimulación es de mayor magnitud (Figura12).

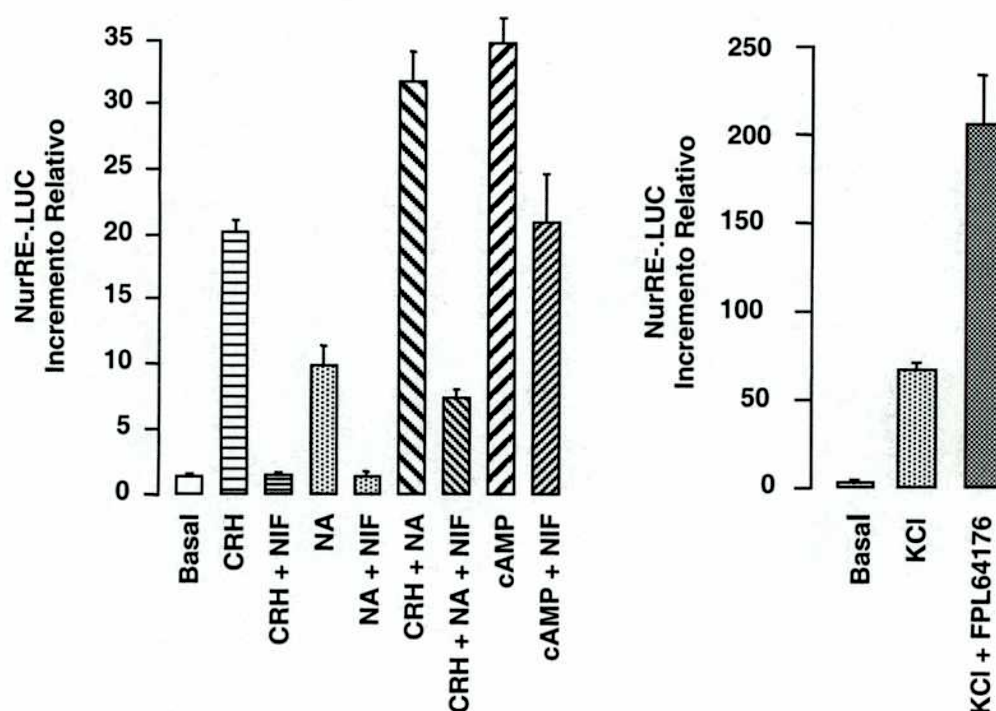


Figura 12. La entrada de calcio está involucrada en el efecto de CRH, Noradrenalina (NA) y cAMP sobre la estimulación sobre el sitio NurRE en el promotor de POMC.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NurRE-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con 100nM CRH; 500 μ M cAMP; 1 μ M Noradrenalina (NA); 36mM KCl o KCl mas 2 μ M del agonista del canal de calcio tipo L FPL64176; combinaciones, según se indica en presencia o ausencia de 1 μ M de Nifedipina (NIF) por 6 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar (n=4) y se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares. El agregado de NIF fue realizado 15 min antes de la estimulación por CRH, NA o cAMP.

Estos resultados demuestran que existen dos vías de señalización independientes en la estimulación de la actividad Nur por CRH. Una que depende del calcio entrante y es necesaria en la estimulación por CRH o NA y otra que es independiente de la entrada de calcio, que se evidencia solo ante un estímulo de mayor magnitud como el tratamiento conjunto con CRH y NA o con cAMP.

Además demostramos que la entrada de calcio es suficiente para la estimulación de la actividad Nur.

1.1.2. Efectos sobre los niveles de mRNA de Nur77 y Nurr1

Con el objetivo de dilucidar si los efectos mediados por calcio sobre la actividad de los factores Nur son consecuencia de una diferente expresión de Nur77 y/o Nurr1, realizamos experimentos de Northern-blot en presencia o ausencia de NIF. Observamos una buena correlación entre la expresión y la actividad transcripcional de los factores Nur. La estimulación por CRH de Nur77 es completamente bloqueada por el tratamiento con NIF, la estimulación de Nurr1 por CRH es inhibida pero no completamente y la estimulación por cAMP de Nur77 y Nurr1 es levemente inhibida. KCl y KCl en presencia de FPL64176 producen un aumento en los niveles de mRNA de Nur77 y en menor medida sobre la expresión de Nurr1 (Figura 13).

Estos resultados demuestran que la regulación de la expresión de Nur77 correlaciona exactamente con la actividad transcripcional de Nur77/Nurr1 sobre el sitio NurRE y probablemente la regulación por el calcio este dada a este nivel.

1.1.3. Efectos sobre el promotor de Nur77

Dado el rol preponderante de Nur77, en relación a Nurr1, sobre la regulación del promotor de POMC, nos preguntamos si la variación en los niveles de mRNA de Nur77 estaban dados por variaciones de actividad transcripcional sobre el promotor de Nur77. Para esto realizamos transfecciones transientes con una construcción que posee el promotor de Nur77 acoplado al gen de CAT y estudiamos su regulación por calcio, CRH y cAMP.

Observamos que el patrón obtenido en los niveles de mRNA de Nur77 correlaciona con la actividad transcripcional del promotor de Nur77. NIF bloquea completamente la estimulación por CRH y solo parcialmente la estimulación por cAMP (Figura 14).

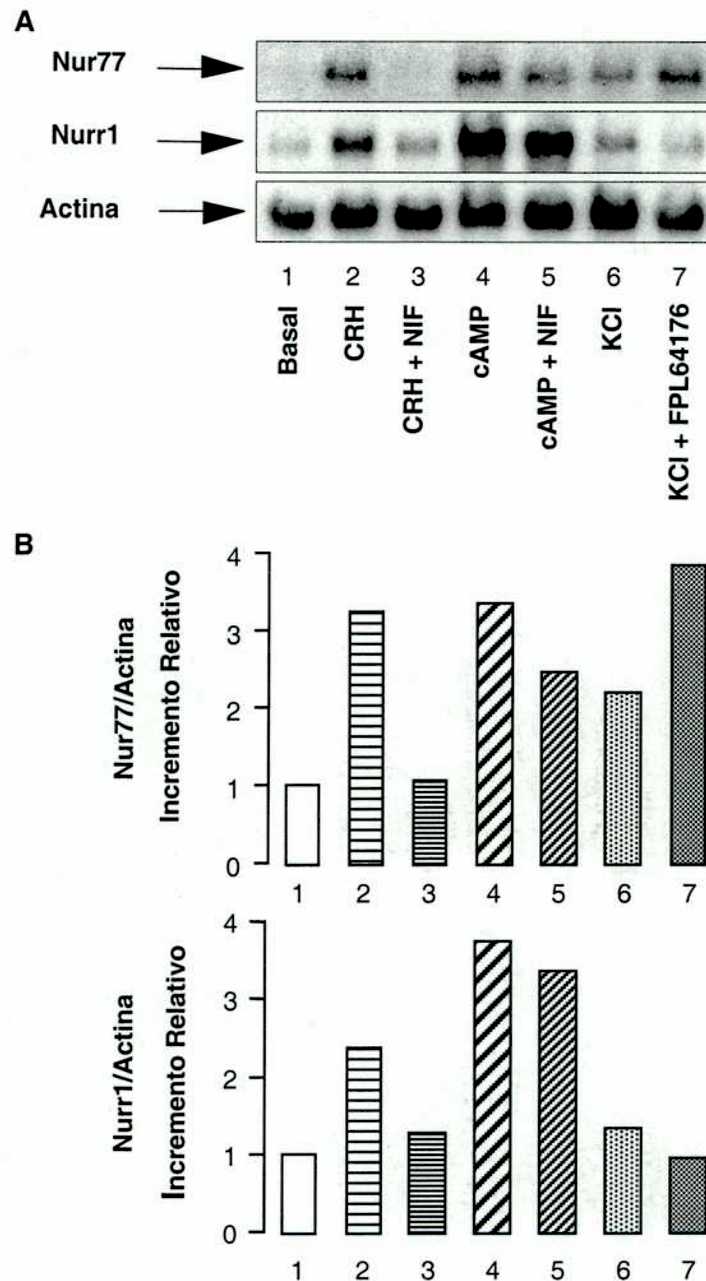


Figura 13. Estimulación calcio dependiente e independiente de los mRNAs de Nur77 y Nurr1 por CRH y cAMP.

A. Análisis de Northern-blot de los mRNAs de Nur77, Nurr1 y Actina bajo diferentes condiciones de estimulación: basal; 100nM CRH; CRH mas 1 μ M Nifedipina (NIF); 500 μ M cAMP; cAMP mas 1 μ M NIF (agregados 15 min antes que CRH o cAMP); 36 mM KCl; o KCl mas 2 μ M del agonista de canales de calcio FPL64176. Despues de 1h de estimulación, se extrajo el mRNA total y se realizó el ensayo de Northern-blot. Se obtuvieron bandas únicas para Nur77, Nurr1 y β -actina, se muestra uno de tres experimentos con resultados similares.

B. Las bandas obtenidas en A fueron cuantificadas por análisis densitométrico como se detalla en Materiales y Métodos y relativizadas según los valores del mRNA de β -actina.

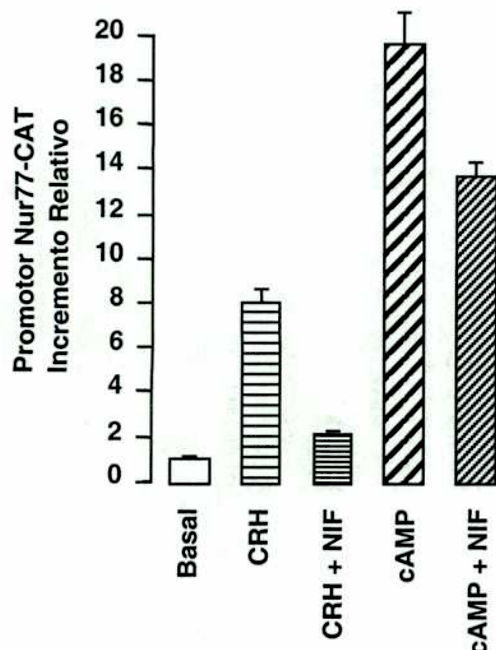


Figura 14. Estimulación calcio dependiente e independiente del promotor de Nur77 por CRH y cAMP.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido que contiene el promotor de Nur77 acoplado al gen de la cloranfenicol-acetil-transferasa (Nur77-CAT) y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con 100nM CRH ; CRH mas 1 μ M Nifedipina (NIF); 500 μ M cAMP o cAMP mas 1 μ M NIF por 6hs. Cada valor de actividad CAT fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4) y se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

1.2. Dependencia de las protein quinasas en la expresión de Nur77 y Nurrl y la regulación de su actividad transcripcional sobre el sitio NurRE

1.2.1 Dependencia de PKA, Calmodulin quinasa II (CAMKII) y Adenilato ciclase en la regulación de la actividad Nur.

Con el objetivo de caracterizar las vías de señales involucradas en la regulación de la actividad Nur por CRH y cAMP, analizamos el efecto de distintos inhibidores farmacológicos de proteín quinasas: KN62 (inhibidor de CAMKII); H89 (inhibidor de PKA); MDL12330A (inhibidor de Adenilato ciclase) sobre la estimulación por CRH y cAMP de la actividad transcripcional sobre el sitio NurRE. Observamos que la estimulación por CRH es inhibida por los tres compuestos (Figura 15A), sin embargo la estimulación por cAMP es inhibida completamente por H89 pero solo parcialmente por KN62, NIF o KN62+NIF, los cuales producen el mismo nivel parcial de inhibición (Figura 15B). La ausencia de efectos sinérgicos o aditivos entre NIF y KN62 evidencia que el calcio entrante ejerce su efecto a través de CAMKII. Por otro lado, la inhibición total producida por H89 indica que las dos vías de estimulación (calcio-dependiente y calcio-independiente) de la actividad Nur se encuentran abajo en la cascada de la estimulación por PKA.

Para verificar la dependencia de PKA por métodos no farmacológicos, cotransfectamos las células con un vector de expresión que codifica para una forma mutante de la subunidad reguladora de PKA, esta mutante no posee la capacidad de unirse a cAMP y liberar a la subunidad catalítica para que esta ejerza su efecto. De esta forma actúa como un dominante negativo de la acción de PKA. Observamos que la sobreexpresión de este dominante negativo (PKA DN) inhibe la estimulación provocada por CRH y cAMP sobre la actividad Nur (Figura 15A y B).

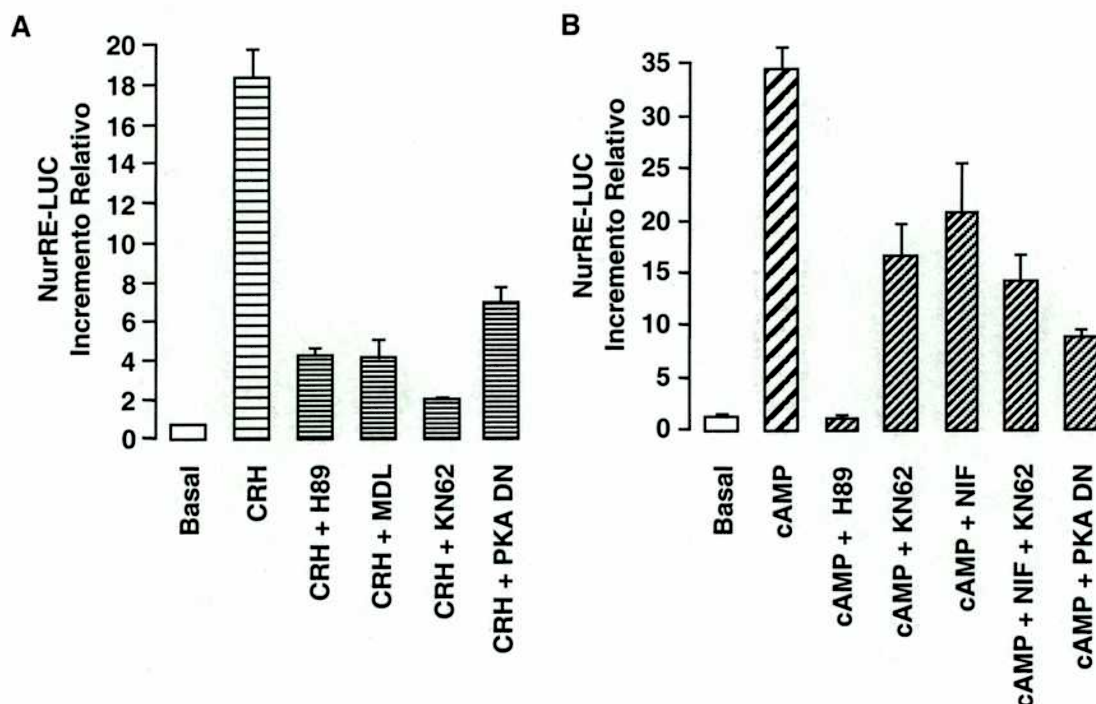


Figure 15. Dependencia del calcio, PKA, CAMKII en la estimulación de NurRE por CRH y cAMP.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido POMC-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero fueron tratadas con 10 μ M del inhibidor de PKA, H89; 10 μ M del inhibidor de adenilato ciclasa, MDL; 10 μ M del inhibidor de calmodulin quinasa, KN62, 1 μ M Nifedipina (NIF) o combinaciones. Después de 15 min se las estimuló con 100nM de CRH (panel A) o 500 μ M de cAMP (panel B) por 6 hs. Donde se indica las células fueron transfectadas con una mutante dominante negativa de PKA (PKA DN). Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar (n=4) y se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

1.2.2. Dependencia de PKA y Calmodulin quinasa II (CAMKII) sobre la expresión de Nur77 y Nurr1

Concordantemente con los efectos mencionados sobre la actividad transcripcional, cuando analizamos la expresión de los mRNAs de Nur77 y Nurr1, observamos que la inducción de Nur77 por CRH es inhibida por KN62 (inhibidor de CAMKII) y H89 (inhibidor de PKA) mientras que la de Nurr1 es inhibida por KN62. Contrariamente, la inducción por cAMP de Nur77 y Nurr1 son bloqueadas por H89 y parcialmente por KN62 (Figura 16).

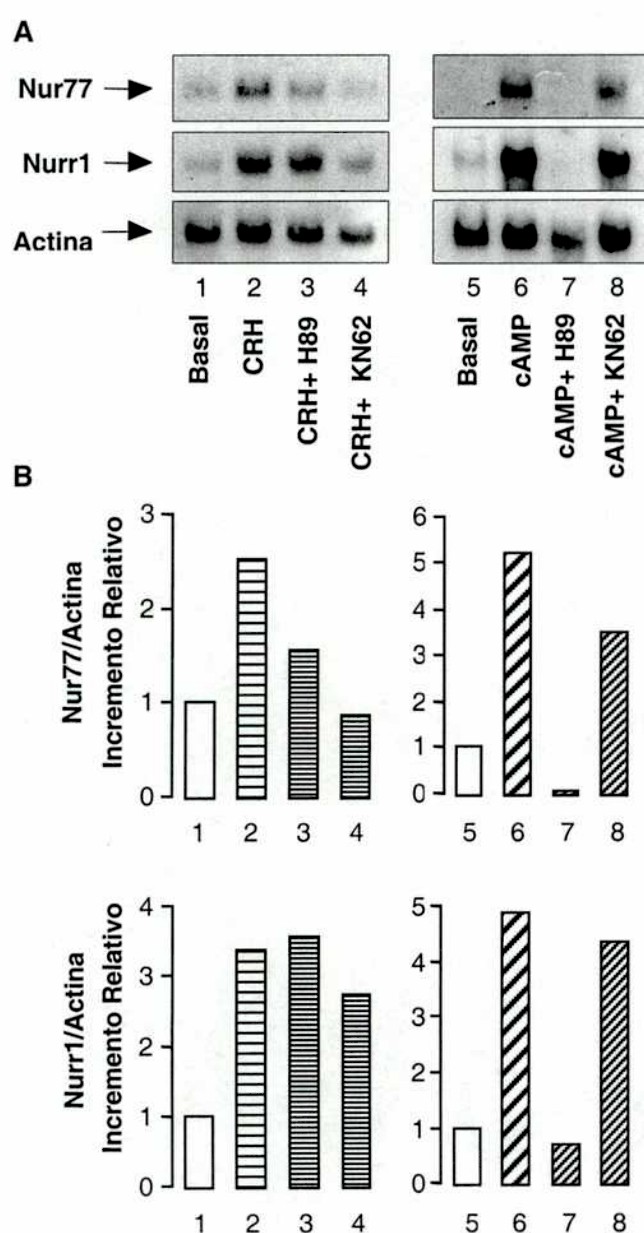


Figura 16. Dependencia del calcio, PKA, CAMKII en la estimulación de los mRNAs de Nur77 y Nurr1.

A. Análisis de Northern-blot de los mRNA de Nur77 y Nurr1 en células AtT20 después de 1h de estimulación con: 100 nM CRH; CRH mas 10 μ M del inhibidor de PKA, H89; CRH mas 10 μ M del inhibidor de calmodulin quinasa II, KN62; 500 μ M cAMP; cAMP mas 10 μ M del inhibidor de PKA, H89; cAMP mas 10 μ M inhibidor de calmodulin quinasa II, KN62. Luego de la estimulación se extrajo el mRNA total y se lo sometió a análisis de Northern-blot. Se observan las bandas correspondientes a Nur77, Nurr1 y β -actina, se muestra uno de cuatro experimentos con resultados similares.

B. Las bandas obtenidas en A fueron cuantificadas por análisis densitométrico como se detalla en Materiales y Métodos y relativizadas según los valores del mRNA de β -actina.

1.3. Rol de las MAPK en la regulación de la actividad transcripcional sobre el sitio NurRE

Además de regular la actividad de la PKA directamente, cAMP puede modular la activación del camino de transducción de señales de las MAPK: dependiendo del tipo celular, cAMP puede estimular o inhibir a las MAPK. Aunque no se había caracterizado la existencia de esta vía de señalización en células corticotrofas, supusimos por su complejidad y la gran diversidad de efectos regulados por ellas que podrían estar presentes y ejerciendo un rol sobre la regulación de POMC.

Entonces analizamos la dependencia de MAPK sobre la actividad Nur en células tratadas con cAMP o CRH. Tratamos las células transfectadas con la construcción NurRE-LUC con PD98059 o UO126, dos inhibidores farmacológicos de MEK1 y analizamos la estimulación por CRH o cAMP. Observamos que ambos inhibidores ejercen un efecto inhibitorio parcial tanto sobre la estimulación por CRH como la estimulación por cAMP (Figura 17).

Quisimos luego averiguar si la actividad de MAPK era la involucrada en el efecto estimulador del cAMP calcio-independiente. Tratamos entonces las células con NIF+PD98059 esperando tener una reversión total del efecto estimulador por cAMP. Sin embargo aunque el tratamiento con NIF+PD98059 logra un mayor grado de inhibición que NIF o PD98059 por su cuenta, no produce una inhibición total (Figura 17).

Para confirmar los resultados obtenidos previamente utilizamos vectores de expresión de mutantes dominantes negativos, cotransfectamos las células con un vector de expresión de una mutante inactiva de MEK (MEK DN), que actúa como un dominante negativo, bloqueando así la activación de las MAPK por MEK endógeno.

La sobreexpresión de esta mutante inhibe la estimulación por CRH y cAMP sobre la actividad Nur en igual proporción que los agentes farmacológicos, confirmando la especificidad de los efectos observados (Figura 17).

Para verificar si la activación de las MAPK es suficiente para producir una estimulación en la actividad Nur en ausencia de un estímulo externo. Cotransfectamos las células con un vector de expresión para Nur77, con el fin

de aumentar los niveles de Nur77 intracelulares. en ausencia o en presencia de un vector de expresión para una forma mutante de MEK que es activa constitutivamente (MEK-EE). Observamos que la activación de las MAPK en presencia de Nur77 produce un aumento en la actividad Nur (Figura 17).

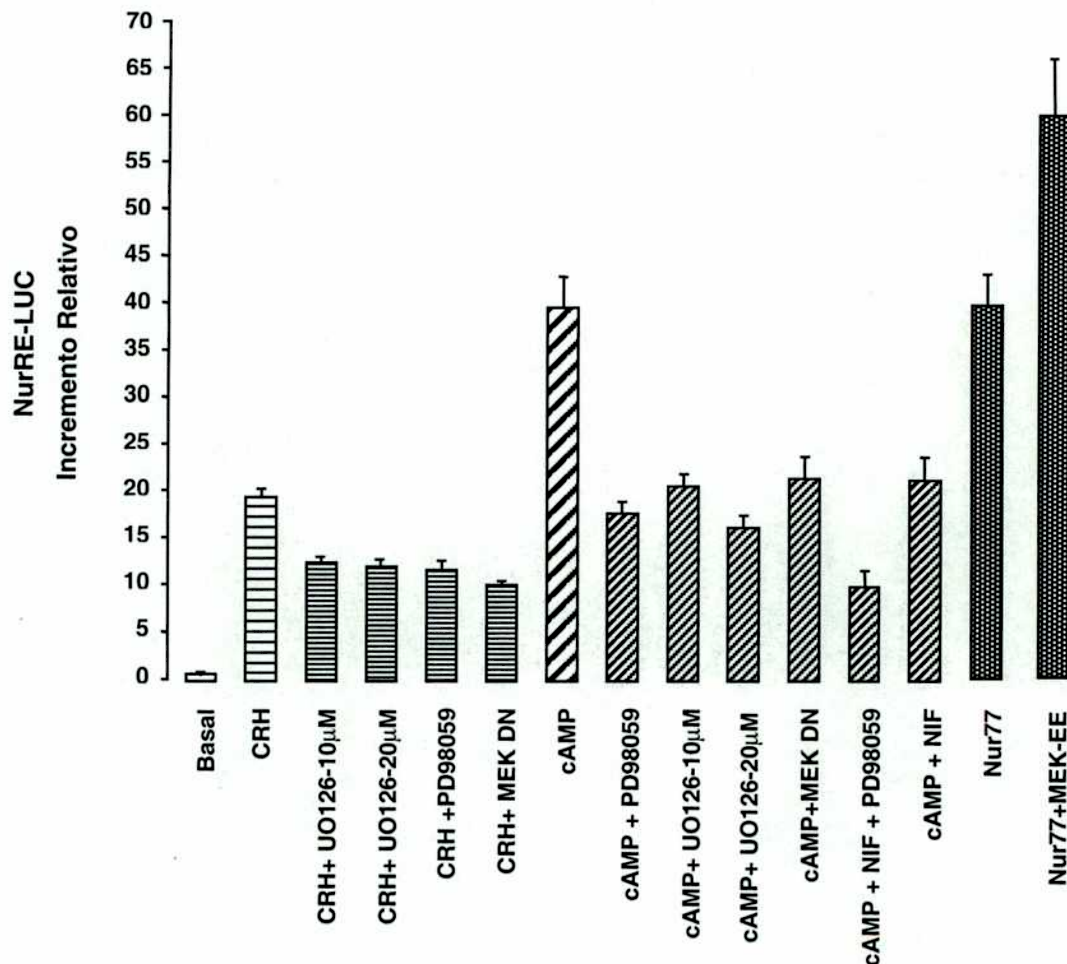


Figura 17. Dependencia de las MAPK en la estimulación de NurRE por CRH y cAMP.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido POMC-LUC y 200ng del vector de expresión RSV-βgalactosidasa (β-gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero fueron tratadas con los inhibidores de MEK, 50µM PD98059 o 10µM UO126 ; 1µM Nifedipina (NIF) o combinaciones de ellos. Después de 15 min las células fueron estimuladas con 100nM CRH o 500µM cAMP por 6hs. Donde se indica las células fueron transfectadas con 300 ng de una mutante dominante negativa de MEK (MEK DN) o el vector de expresión de Nur77 (Nur77) o 30 ng del vector de expresión de una mutante constitutiva de MEK (MEK-EE). El tratamiento solo con MEK-EE no aumentó la actividad NurRE (no mostrado). Cada valor fue normalizado a la actividad de β-gal. Los resultados están expresados como la media ± error estándar (n=4) y se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

De estos resultados podemos concluir que debe existir un camino de señalización de MAPK en corticotrofos y que este ejerce un rol estimulador sobre la actividad Nur.

1.4. Caracterización de la cascada de señalización por MAPK en corticotrofos y su activación por CRH y cAMP

1.4.1. Efectos sobre Gal4-Elk1 y rol de B-Raf

Basándonos en la caracterización de las distintas vías de MAPK descritas en otros tipos celulares nos propusimos caracterizar esta cascada de señalización identificando a cada uno de sus componentes en corticotrofos. Para ello como primera medida utilizamos la conocida capacidad de ERK, última protein quinasa de la cascada, de fosforilar a un factor de transcripción (Elk1) y estimular su actividad transcripcional. Para independizarnos de la posible variación en las cantidades de Elk1 endógeno en corticotrofos utilizamos el método de transfección con Gal4-Elk1 ya descrito en la sección de materiales y metodos.

Dado que Elk1 es también blanco de la acción de ERK5, la especificidad fue testeada mediante tratamientos con inhibidores específicos de MEK1, enzima que fosforila a ERK específicamente

CRH y cAMP estimulan la actividad de Elk1 y este efecto es inhibido por los inhibidores farmacológicos de MEK1 (PD98059 y UO126). Al coexpresar el dominante negativo de MEK1 (DN MEK) o un dominante negativo para Rap1 (RapN17), también se bloquea la estimulación (Figura 18). Por el contrario al sobreexpresar una mutante de Rap1 constitutivamente activa (RapG12V) se produce la activación de la vía (Figura 18).

Estos resultados demuestran que existe una vía de MAPK activa que involucra a Rap1, MEK y ERK y que esta vía es estimulada por CRH o cAMP. Sin embargo el rol estimulador de cAMP sobre la cascada de MAPK depende de la presencia de una protein quinasa intermediaria, B-Raf. Así en células que carecen B-Raf el cAMP ejerce un rol inhibitorio y en las que poseen niveles de esta proteína la activación de Rap1 por cAMP conlleva a una activación de la vía.

Entonces nos preguntamos si podía detectarse la expresión de B-Raf en corticotrofos. Utilizamos la técnica de Northern-blot y detectamos la expresión constitutiva de B-Raf (Figura 18, inserto). En concordancia con el rol de B-Raf descrito para otras líneas celulares, como la línea de neuroblastoma PC12, la sobreexpresión de esta proteína potencia el efecto estimulador de CRH sobre la actividad transcripcional por Elk1 (Figura 18).

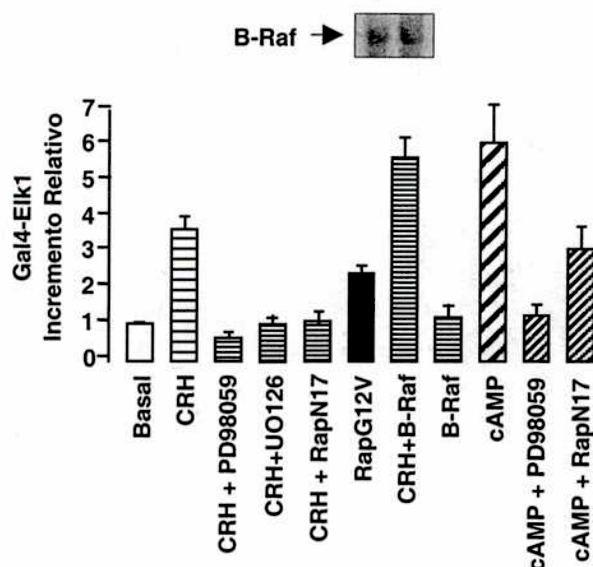


Figura 18. CRH y cAMP estimulan la vía de las MAPK en células AtT20. Medición de la actividad transcripcional de Gal4-Elk1.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng de un vector que posee los elementos respondedores a Gal4 acoplados al gen de la luciferasa (pG5-LUC), 300 ng de una proteína quimérica que posee el dominio de unión al DNA de Gal4 río arriba de la proteína Elk1 (Gal4-Elk1), mas 200ng de RSV- β galactosidasa (β gal). Donde se indica, las células fueron cotransfectadas con los siguientes vectores de expresión: 300ng de un dominante negativo de Rap1 (RapN17), una forma constitutivamente activa de Rap1 (RapG12V), un dominante negativo de MEK (MEK DN) o B-Raf. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero fueron dejadas sin tratar o tratadas con 100nM CRH o 500 μ M cAMP en ausencia o presencia (15 min antes) de los inhibidores de MEK, 50 μ M PD98059 o 10 μ M UO126, por 6hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4) y se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

Inserto: Análisis de Northern-blot para el mRNA de B-Raf en células AtT20 no estimuladas. Las células AtT20 fueron incubadas en medio mínimo (D-MEM) sin suero fetal bovino por 18 hs y el mRNA total extraído y analizado mediante la técnica de Northern-blot para detectar la expresión basal de B-Raf.

1.4.2. Efectos sobre la actividad de ERK2

Para verificar si CRH y cAMP producían un aumento en la actividad de ERK1,2 como primera medida realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando como sustrato la proteína básica de mielina (MBP) y ERK2 purificado por inmunoprecipitación de células tratadas con CRH o cAMP por distintos tiempos o con KCl+FPL64176 por 10 min, como control positivo. Observamos que la capacidad de ERK2 de fosforilar a MBP *in vitro* aumenta en todos los tiempos tanto por tratamiento con CRH como con cAMP, aunque a los 5 min cAMP produce una activación menor (Figura 19). Una cinética similar para el tratamiento con cAMP se observó previamente en células somatotrofas (GH3) (Kievit *et al.* 2001).

1.4.3. Efectos sobre la activación de ERK1/2

MEK1 y MEK2 activan por fosforilación a ERK1 y ERK2. Dado que existen anticuerpos específicos para las formas fosforiladas de ERK1,2 se puede detectar su activación por la técnica de Western-blot detectando la proteína fosforilada. Concordantemente con los resultados de actividad de ERK2 observamos la fosforilación de ERK1 y ERK2 en todos los tiempos analizados. Niveles similares de ERK2 total se obtuvieron en todas las condiciones (Figura 19).

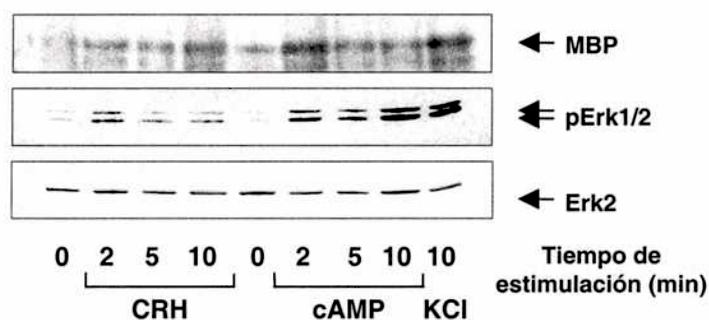


Figura 19. CRH y cAMP estimulan la vía de las MAPK en células AtT20.

Detección de la fosforilación de ERK y su actividad quinasa *in vitro*.

Las células AtT20 fueron estimuladas con 100nM CRH, 500μM cAMP o KCl mas 2μM del agonista de canales de calcio tipo L FPL64176 por distintos tiempos como se indica. Los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Erk2 y se realizó el ensayo de quinasa detallado en Materiales y Métodos. La fosforilación *in vitro* de la proteína básica de mielina (MBP), utilizada como sustrato, se muestra en cada condición. Se muestran los niveles de las proteínas Erk1 y Erk2 fosforilado (pErk1/2) y Erk2 total mediante la técnica de Western-blot para cada condición. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

Podemos entonces afirmar que existe una vía de MAPK que involucra a Rap1/B-Raf/MEK/ERK en corticotrofos y es activada por cAMP y CRH.

1.4.4. Influencia de Rap1 en la activación por CRH y cAMP de la transcripción mediada por NurRE (actividad de Nur)

Para establecer si el aumento de la actividad Nur por MAPK involucra la activación de Rap1 por CRH y cAMP. Transfectamos las células con el vector NurRE-LUC en presencia de RapN17 o RapG12V. La expresión de RapN17 inhibe la actividad Nur estimulada por CRH y cAMP, mientras que RapG12V potencia la estimulación por CRH y no por cAMP (Figura 20). Este resultado concuerda con la menor activación de las MAPK ejercida por CRH respecto a cAMP (Figuras 18 y 19), ante un menor nivel de activación de las MAPK, RapG12V puede incrementar el estímulo porque el camino de transducción no está activado en su totalidad.

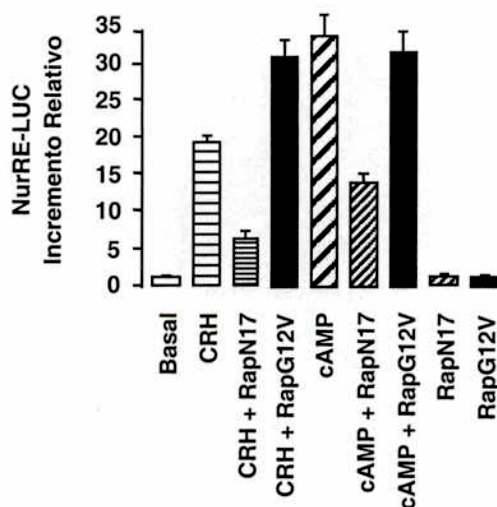


Figura 20. Regulación de la estimulación de NurRE por Rap1

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NurRE-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Cuando se indica se cotransfectó con 300ng de RapN17 o RapG12V. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las dejó sin estimular o se las trató con 100nM de CRH o 500 μ M de cAMP por 6 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar ($n=4$) y se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares

Los efectos de RapN17 y RapG12V son altamente específicos porque: 1) estos plásmidos no afectan los niveles basales o la inducción por IL-1 de un vector no relacionado que contiene elementos de respuesta a NF κ B acoplados al gen de LUC (KB-LUC) (no mostrado), descartando posibles efectos inespecíficos o tóxicos; 2) La sobreexpresión de una proteína no relacionada, dominante negativo de CREB (CREBS133A) no afecta la estimulación sobre el sitio NurRE

por CRH o cAMP (no mostrado), confirmando la especificidad de acción de RapN17.

Estos resultados demuestran que la activación de Rap1 está involucrada en el camino de MAPK que lleva a la activación de Nur en corticotrofos.

1.4.5. Dependencia del calcio, CAMKII y PKA en la activación de la vía de MAPK en corticotrofos

Aunque en un principio la activación de Rap1 y sus efectos sobre MAPK fue atribuída a la actividad de PKA, luego se descubrieron otras vías de activación en otros tipos celulares, a saber; activación por cAMP independiente de PKA, activación por PKC o activación por calcio y CAMKII.

Con el fin de dilucidar que vía es la responsable de su activación en corticotrofos transfectamos las células con la contrucción Gal4-Elk1 y pG5-LUC y medimos la activación de las MAPK en presencia de distintos inhibidores. H89 bloquea completamente la estimulación por cAMP pero KN62 y NIF producen una inhibición parcial, como es el caso sobre la actividad Nur (Figura 21). Por el contrario la estimulación por CRH es casi completamente bloqueada por los tres inhibidores (Figura 21).

Estos resultados demuestran que la actividad de MAPK es completamente dependiente de la acción de PKA, que el calcio entrante contribuye a la activación de ERK y que cAMP estimula la vía también independientemente de la entrada de calcio.

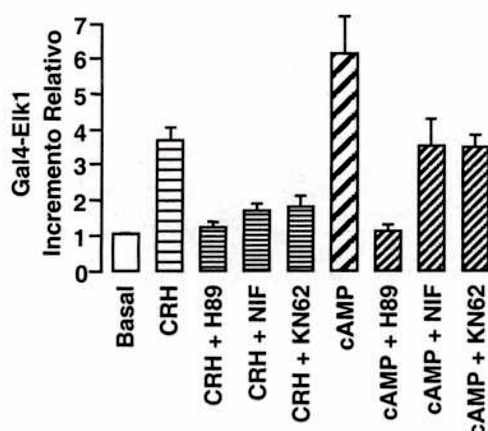


Figura 21. Dependencia del calcio, CAMKII y PKA en la activación de la vía MAPK en corticotrofos.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng de un pG5-LUC, 300 ng Gal4-Elk1 mas 200ng de RSV- β galactosidasa (β -gal). Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con 1 μ M de Nifedipina (NIF); 10 μ M del inhibidor de PKA, H89; 10 μ M del inhibidor de CAMKII, KN62. Después de 15 min fueron estimuladas con 100nM de CRH o 500 μ M de cAMP por 6 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares

1.5. Las MAPK regulan la actividad Nur mediante un aumento en la transactivación de Nur77

1.5.1. Efectos sobre el mRNA de Nur77 y Nurr1

Como primera medida nos preguntamos si la regulación ejercida por las MAPK era consecuencia de una variación en los niveles de los factores Nur77 y Nurr1. Realizamos experimentos de Northern-blot para estos factores en presencia del inhibidor de MEK1 (PD98059). Observamos que la inducción de Nur77 y Nurr1 por CRH y cAMP no es bloqueada por PD98059 (Figura 22). Entonces la regulación por MAPK probablemente se deba a una modificación post-traducciona de la proteína.

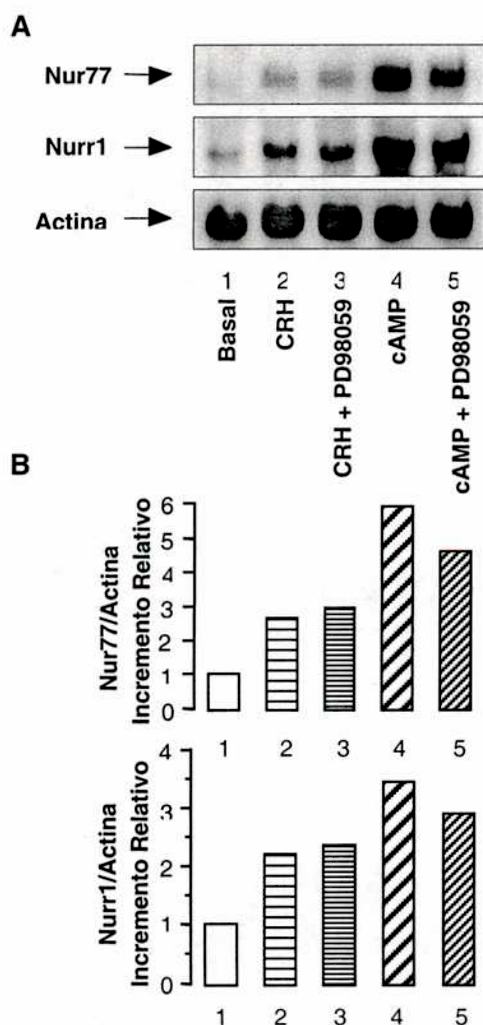


Figura 22. Las MAPK no modifican la expresión de los mRNAs de Nur77 y Nurr1.

A. Análisis de Northern-blot para los mRNAs de Nur77 y Nurr1 en células AtT20: basal; 100nM CRH; CRH mas 50 μ M del inhibidor de MEK, PD98059; 500 μ M cAMP; cAMP mas 50 μ M PD98059. Luego de 1h de estimulación se extrajo el RNA total y se sometió a la técnica de Northern-blot para detectar Nur77, Nurr1 y β -actina. Se muestran uno de tres experimentos independientes con resultados similares. Resultados similares se obtuvieron con el inhibidor de MEK UO126 (10 μ M o 20 μ M).

B. Las bandas obtenidas en A fueron cuantificadas por análisis densitométrico como se detalla en Materiales y Métodos y relativizadas según los valores del mRNA de β -actina.

1.5.2. La actividad de MAPK es necesaria para la transactivación de Nur77

Con el objetivo de evaluar si las MAPK podían modificar la actividad transcripcional de Nur77, desarrollamos un vector de expresión para una proteína quimérica que posee el dominio de unión al DNA de Gal4 acoplado a la región codificante de Nur77 (Gal4-Nur77) y cotransfectamos las células con el reporter Gal4-LUC como se describe en materiales y métodos. Mediante este método nos independizamos de las variaciones de expresión de Nur77 y Nur77 endógenos, ya que estos no pueden activar la transcripción sobre el reporter Gal4-LUC, y de esta forma poder medir efectos postraduccionales de regulación.

Observamos que tanto CRH como cAMP aumentan la actividad transcripcional de Nur77. La inhibición de MEK severamente reduce la actividad transcripcional basal y bloquea la estimulación por CRH y cAMP (Figura 23A). Este es un efecto específico ya que el inhibidor no produce variaciones en los niveles de expresión de un vector constitutivo para β -gal (no mostrado) ni produce variaciones en los niveles de mRNA de Nur77/Nur77 o actina (Figura 22).

Podemos concluir entonces que la regulación por las MAPK se debe a una modificación de la actividad transcripcional de Nur77

1.5.3. Fosforilación de Nur77 por ERK2 *in vitro*.

Dado que las MAPK regulan la actividad transcripcional directamente por fosforilación de diferentes factores de transcripción (ej. JNK/c-Jun, p38/ATF-2, ERK/Elk1, ERK/SAP1), nos preguntamos si esta modificación de la actividad transcripcional de Nur77 ejercida por las MAPK era un efecto directo de fosforilación de Nur77 por ERK2 o podría involucrar otros intermediarios.

Para esto realizamos ensayos de fosforilación de Nur77 *in vitro*. Utilizamos como sustrato Nur77 inmunoprecipitado de células AtT20 que sobreexpresan la proteína y medimos su fosforilación por ERK2 inmunoprecipitado de otro pool de células AtT20 estimuladas con cAMP o cAMP+PD98059 (inhibidor de MEK). Observamos que ERK2 *in vitro* fosforila a Nur77 (pNur77) y esta actividad es bloqueada por el tratamiento con PD98059 (Figura 23B), confirmando la

regulación directa por MAPK de la actividad transcripcional de Nur77 mediante fosforilación.

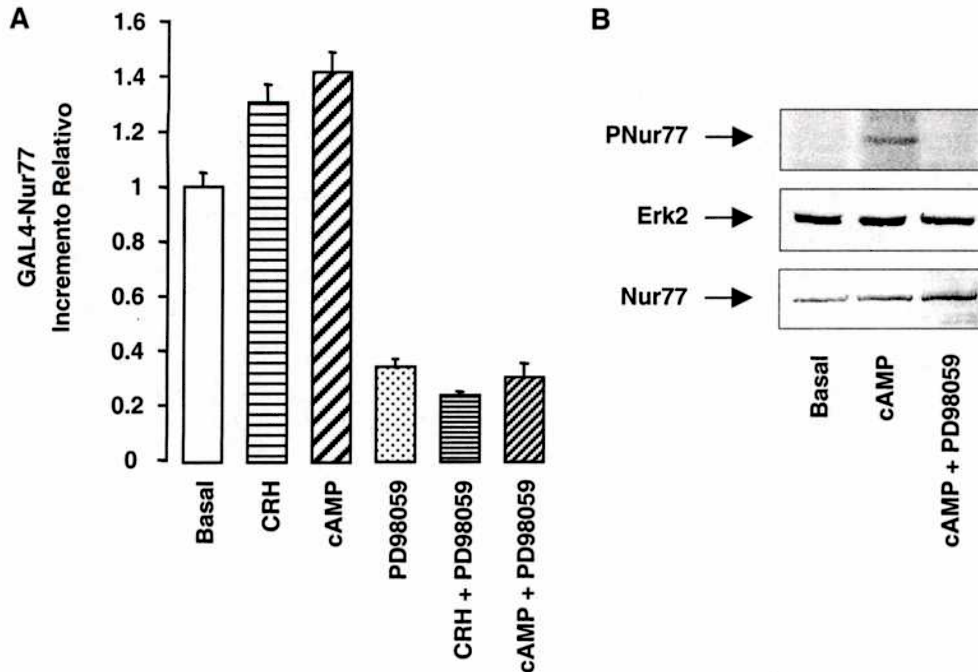


Figura 23. La actividad de MAPK es necesaria para la transactivación y fosforilación de Nur77.

A. Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng de un pG5-LUC, 300 ng Gal4-Nur77 mas 200ng de RSV- β galactosidasa (β -gal). Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con 100nM de CRH o 500 μ M de cAMP en ausencia o presencia (15 min antes) de 50 μ M del inhibidor de MEK PD98059. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4). Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

B. Las células AtT20 fueron no estimuladas o estimuladas con 500 μ M de cAMP o 500 μ M de cAMP mas 50 mM PD98059 por 10 min. Los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Erk2 y se realizó el ensayo de quinasa para la fosforilación *in vitro* de Nur77 (PNur77), utilizando como sustrato a Nur77 inmunoprecipitado de extractos celulares que sobreexpresan Gal4-Nur77 como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestran los niveles de las proteínas Gal4-Nur77 y Erk2 total mediante la técnica de Western-blot para cada condición. No se observó banda de PNur77 cuando no se transfectó con Gal4-Elk1 o cuando se utilizó el vector vacío en su lugar, que expresa solo Gal4 (sin Nur77). Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

1.6. Rol del calcio, PKA y MAPK en la regulación del promotor de POMC

Luego nos preguntamos si la regulación observada era un correlato sobre el promotor de POMC. Para esto transfectamos las células con una construcción que posee el promotor de POMC acoplado al gen de LUC (POMC-LUC) e investigamos el rol de distintos inhibidores de protein quinasas farmacológicos y dominantes negativos sobre la estimulación por CRH y cAMP. Similar a los efectos obtenidos al utilizar la construcción NurRE-LUC, H89 (inhibidor de PKA) y KN62 (inhibidor de CAMKII) bloquean la estimulación por CRH, mientras que los inhibidores de MEK1 producen una inhibición parcial (Figura 24A). La estimulación por cAMP es totalmente bloqueada por H89 y parcialmente inhibida por los inhibidores de CAMK y MAPK, aunque la inhibición por el primero es mucho mayor que la ejercida por los inhibidores de MAPK (Figura 24B). La sobreexpresión del dominante negativo de MEK1 (DN MEK) o Rap1 (RapN17) inhiben tanto la estimulación por CRH como por cAMP (Figura 24A y B). Además la forma constitutivamente activa de Rap1 (RapG12V) o la forma constitutivamente activa de MEK (MEK-EE) aumentan la estimulación de POMC por sobreexpresión de Nur77, confirmando la relevancia funcional del camino de MAPK en la regulación de POMC (Figura 24B).

Estos resultados confirman un estricto paralelismo entre la regulación de POMC por PKA, CAMKII y MAPK y la expresión y activación de Nur77/Nurr1 en corticotrofos.

En resumen estos resultados demuestran que la inducción y actividad de Nur77/Nurr1 y entonces la inducción de POMC por CRH involucra la activación de PKA, CAMKII (inducción y activación de Nur) y la activación de las MAPK por vías calcio-dependientes y calcio-independientes (fosforilación y activación de Nur).

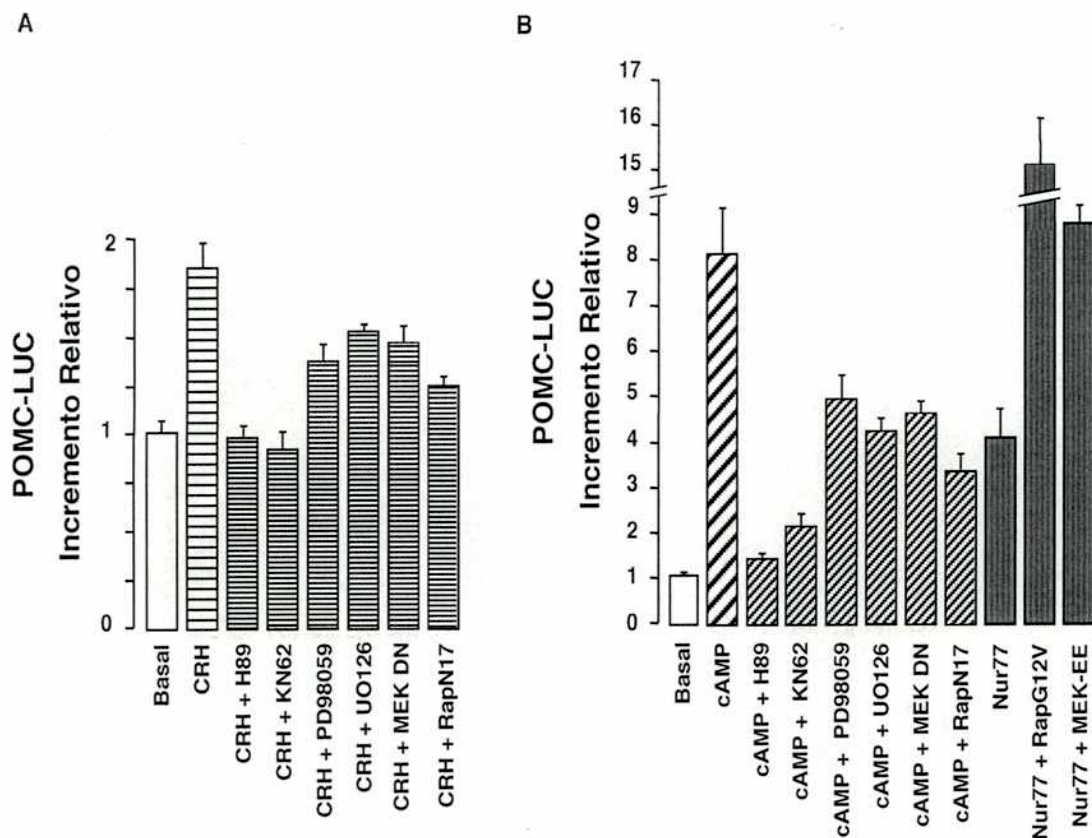


Figura 24. Rol del calcio, PKA y MAPK en la regulación del promotor de POMC.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido POMC-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Donde se indica las células fueron transfectadas con 300 ng de una mutante dominante negativa de MEK (MEK DN), RapN17, RapG12V o el vector de expresión de Nur77 (Nur77) o 30 ng del vector de expresión de una mutante constitutiva de MEK (MEK-EE). Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero fueron tratadas con 10 μ M del inhibidor de CAMKII, KN62; 10 μ M del inhibidor de PKA, H89 o los inhibidores de MEK, 50 μ M PD98059 o 10 μ M UO126 como se indica. Después de 15 min las células fueron estimuladas con 100nM CRH (Panel A) o 500 μ M cAMP (Panel B) por 6hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4) y se muestra uno de cinco experimentos independientes con resultados similares.

2. Eventos moleculares involucrados en la regulación de POMC por IL-1

2.1. Activación e inducción de Nur77 por IL-1

2.1.1. Efectos sobre la transcripción de los sitios NurRE y NBRE

Varias citoquinas estimulan la secreción de ACTH en corticotrofos como consecuencia de la inducción del promotor de POMC, entre estas citoquinas se encuentran IL-1, LIF, IL-6 e IL-11. Sin embargo los mecanismos moleculares y los elementos respondedores responsables en el promotor de POMC son desconocidos. Con el objetivo de investigar si alguna de estas citoquinas ejercía su efecto como consecuencia de la estimulación de la actividad Nur sobre el sitio NurRE en el promotor de POMC, como lo hace CRH, realizamos transfecciones transientes con la construcción NurRE-LUC y estimulamos con las distintas citoquinas. IL-1 pero no IL-6, IL-11 o LIF estimula la transcripción mediada por NurRE (Figura 25A).

El promotor de POMC posee además del sitio NurRE, el sitio NBRE con capacidad de unión a los factores Nur77/Nurr1 como monómeros. Aunque se ha descrito que este elemento respondedor es estimulado por CRH, su relevancia fisiológica en el contexto del promotor de POMC es menor (Philips *et al.* 1997a).

Nos preguntamos entonces si IL-1 podría actuar diferencialmente sobre NBRE. Para esto transfectamos con una construcción que posee tres copias en tandem de NBRE acoplado al gen de LUC (NBRE-LUC) y analizamos la respuesta a IL-1 y CRH (como control positivo). Observamos que IL-1, a diferencia de CRH, no es capaz de activar la transcripción sobre el sitio NBRE (Figura 25B) confirmando que la activación de Nur por IL-1 actúa sobre el sitio NurRE en el promotor de POMC.

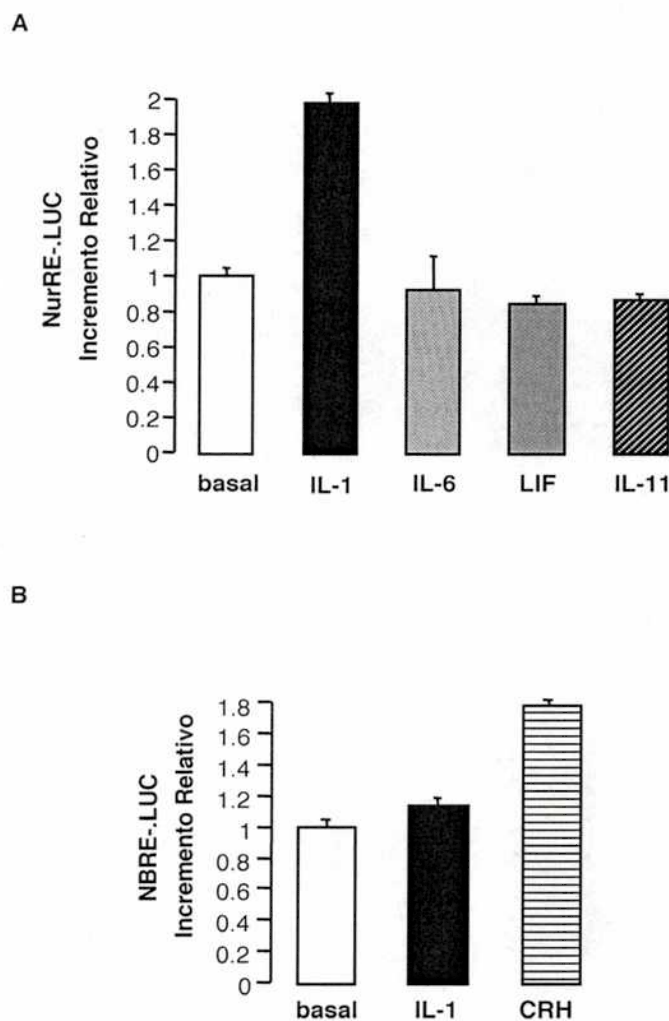


Figura 25. IL-1, y no citoquinas de la familia gp130, estimula la transcripción sobre los sitios NurRE pero no NBRE.

A. Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NurRE-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con IL-1(100U/ml), IL-6 (2000U/ml), LIF (20ng/ml) o IL-11 (10 ng/ml) por 6 hs.

B. Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NBRE-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con IL-1(100U/ml) o CRH (100nM) por 6 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar ($n=4$) y se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

2.1.2. Efectos sobre la expresión de Nur77 y Nurr1

Para evaluar si el aumento de la actividad Nur sobre el sitio NurRE corresponde con la inducción de los factores de transcripción Nur77 y/o Nurr1, realizamos experimentos de Northern-blot de células tratadas por distintos

tiempos con IL-1. Observamos una cinética temprana de inducción del mRNA de Nur77 y no de Nurr1, siendo el pico máximo de expresión a la hora post-estímulo y volviendo a los niveles basales a las 2 hs (Figura 26). De acuerdo a estos resultados Nur77 y no Nurr1 sería el responsable del aumento en la actividad Nur observada anteriormente.

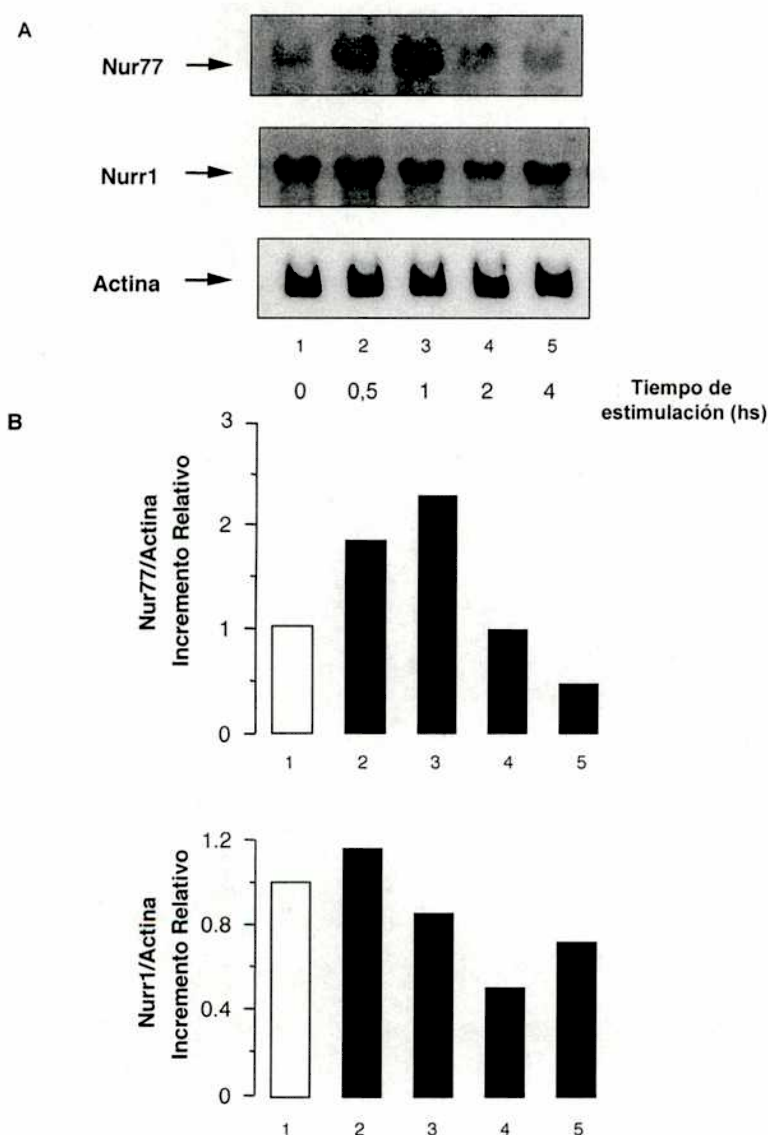


Figura 26. IL-1 induce el mRNA de Nur77 pero no de Nurr1.

A. Las células AtT20 fueron tratadas por los tiempos indicados con IL-1 (100U/ml) y se realizó el ensayo de Northern-blot como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

B. Las bandas obtenidas en A fueron cuantificadas por análisis densitométrico como se detalla en Materiales y Métodos y relativizadas según los valores del mRNA de β -actina.

2.1.3. Regulación sobre el promotor de Nur77

Nos preguntamos entonces si esta diferencia en los niveles de mRNA de Nur77 era debida a un efecto sobre el promotor de Nur77. Para esto transfectamos las células con la construcción Nur77-CAT y estimulamos con IL-1. IL-1 produce un aumento en la transcripción mediada por el promotor de Nur77 (Figura 27),

confirmando que los efectos de IL-1 son consecuencia de una regulación a nivel del promotor.

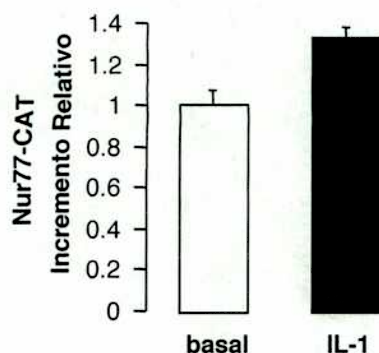


Figura 27. IL-1 estimula al promotor de Nur77

Las células AtT20 fueron transfectadas con un 500ng de un vector reporter que contiene al promotor de Nur77 acoplado al gen de cloranfenicol acetil transferasa (Nur77-CAT) y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con IL-1(100U/ml) por 6 hs. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4) y se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

2.2. Dependencia de protein quinasas en los efectos de IL-1 sobre la inducción y actividad de Nur77

2.2.1. Efectos en la actividad de Nur77

Aunque el receptor de IL-1 no posee actividad tirosin quinasa, a este se le asocian proteínas accesorias con actividad enzimática involucradas en la transducción de la señal. De esta forma se activan diversas cascadas de señales, entre ellas las pertenecientes a la vía de las "stress activated protein kinases" p38, Jun quinasa (JNK) y PKC.

Para identificar las protein quinasas intervinientes medimos la estimulación de la actividad Nur por IL-1 en presencia de Bisindolilmaleimida (BSM-1) un inhibidor de PKC o en presencia de SB203580, un inhibidor de p38. El tratamiento con SB203580 inhibe la estimulación por IL-1 implicando la actividad de p38 en el efecto estimulador de IL-1 (Figura 28).

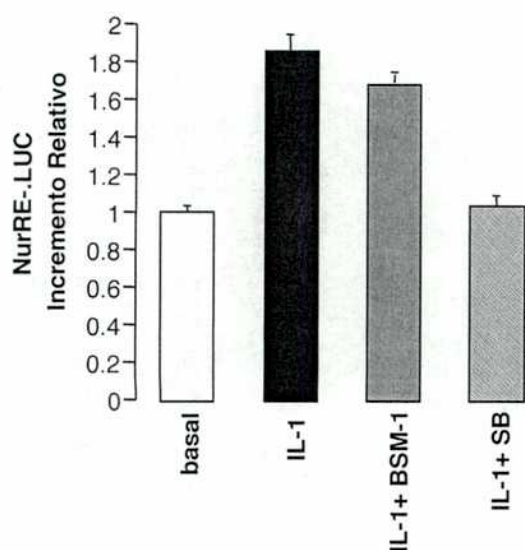


Figura 28. Participación de las protein quinasas PKC y p38 sobre la transcripción en sitios NurRE estimulada por IL-1.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NurRE-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero se las estimuló con IL-1(100U/ml) en presencia o ausencia del inhibidor de PKC, Bisindolylmaleimida-1 (BSM-1) (10 μ M) o el inhibidor de p38 SB203580 (SB) (10 μ M). Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=3) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

2.2.2. Efectos sobre la expresión de Nur77

Nos preguntamos entonces si esta regulación por p38 era ejercida a nivel del mRNA de Nur77. Realizamos experimentos de Northern-blot y observamos que el inhibidor de p38 inhibe la inducción de Nur77 por IL-1 (Figura 29). Confirmando que la regulación es ejercida a este nivel.

2.3. Análisis de la dependencia de Nur77 y el sitio NurRE en la regulación de POMC y secreción de ACTH por IL-1.

Para confirmar la dependencia de la inducción y activación de Nur77 por IL-1 en la regulación del promotor de POMC, por un lado generamos una línea estable que sobreexpresa una mutante dominante negativa de Nur77 y analizamos la respuesta a IL-1. Por el otro analizamos la dependencia del sitio NurRE a la estimulación de POMC por IL-1.

2.3.1. Relevancia de NurRE en la estimulación del promotor POMC por IL-1

Con el objetivo de saber si el sitio NurRE es esencial para la estimulación de POMC por IL-1, como primera medida transfectamos las células AtT20 con una construcción POMC-LUC o una construcción que posee el sitio NurRE alterado (POMC (mutNurRE)-LUC) y es incapaz de unir a Nur77 (Philips *et al.* 1997a) y analizamos luego la respuesta a IL-1. Concordantemente con un rol esencial del sitio NurRE en la estimulación de POMC por IL-1, el vector POMC (mutNurRE)-LUC no es estimulado por IL-1 a diferencia del promotor de POMC salvaje (Figura 30).

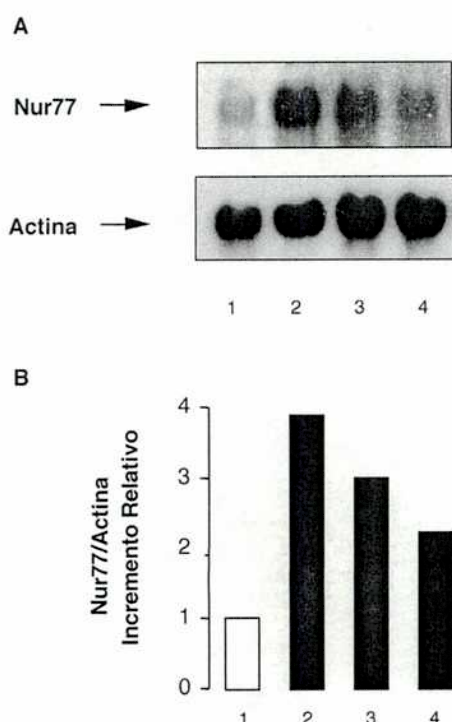


Figura 29 Participación de las protein quinasas PKC y p38 sobre los niveles de mRNA de Nur77.

A. Las células AtT20 fueron tratadas por 1h con IL-1 (100U/ml) en ausencia o presencia del inhibidor de PKC, Bisindolilmaleimida-1 (BSM-1) (10 μ M) o el inhibidor de p38 SB203580 (SB) (10 μ M) y se realizó el ensayo de Northern-blot como se detalla en Materiales y Metodos. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

B. Las bandas obtenidas en A fueron cuantificadas por análisis densitométrico como se detalla en Materiales y Métodos y relativizadas según los valores del mRNA de β -actina.

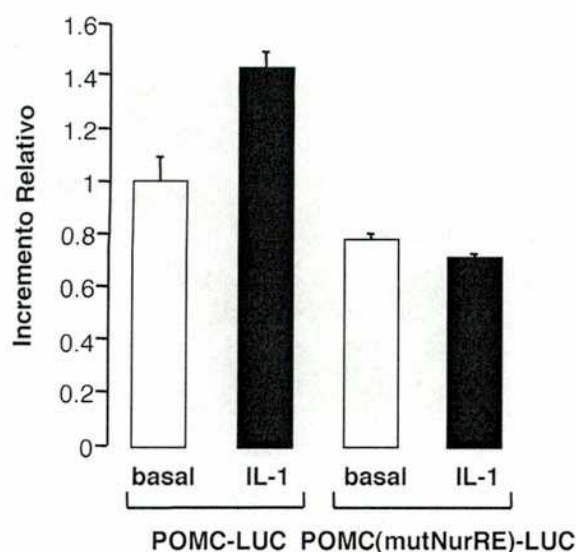


Figura 30. El sitio NurRE es esencial para la inducción del promotor de POMC por IL-1.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido POMC-LUC o el promotor de POMC que contiene una mutación en el sitio NurRE (POMC(mutNurRE)-LUC) y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 16 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero, fueron estimuladas con IL-1 (100U/ml) por 2 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar ($n=3$) y se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

2.3.2. Respuesta a IL-1 de una línea celular que sobreexpresa una mutante dominante negativa de Nur77 (AtT20N77)

Con el fin de estudiar la dependencia de Nur77 sobre la inducción de POMC por IL-1, como primera medida generamos por transfección estable distintos clones celulares que sobreexpresan una forma mutante de Nur77 que no posee el dominio de transactivación y se une a los mismos sitios en el DNA que la forma salvaje, actuando como un dominante negativo

2.3.2.1. Generación de los clones estables

Uno de siete clones expresa constitutivamente niveles detectables del mRNA del dominante negativo de Nur77 (Nur77 DN) (Figura 31A), a este clon lo llamamos AtT20N77. Al estimular células AtT20N77 con CRH observamos simultáneamente la inducción del gen de Nur77 endógeno y la expresión constitutiva del dominante negativo (Figura 31B)

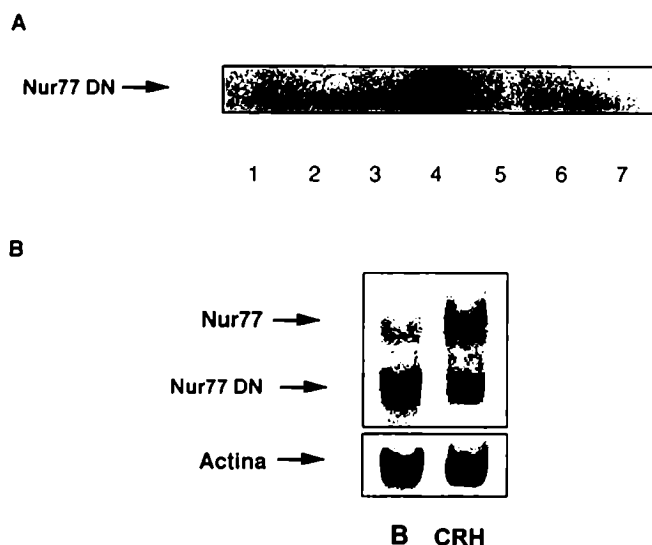


Figura 31. Generación de una línea celular (AtT20N77) derivada de AtT20 que sobreexpresa a una mutante dominante negativa de Nur77 (Nur77 DN)

A. Análisis de Northern-blot de los clones 1 a 7 de AtT20 transfectados establemente con un vector de expresión para una mutante dominante negativa de Nur77(AtT20 DN). Se observa la expresión de la proteína mutante en cada uno de los clones. El clon número 4 fue denominado AtT20N77.

B. Análisis de Northern-blot para la detección de Nur77 y Nur77 DN en el clon AtT20N77. Las células AtT20 fueron tratadas o no por 1h con CRH (100U/ml) y se realizó el ensayo de Northern-blot como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

2.3.2.2. Testeo de la funcionalidad de Nur77 DN en el clon AtT20N77

Para verificar la correcta inhibición de la actividad Nur por Nur77 DN, transfectamos las células AtT20 y AtT20N77 con el vector NurRE-LUC y estimulamos con IL-1 o CRH. Observamos que en las células AtT20N77 la inducción de la actividad Nur por IL-1 es completamente bloqueada y la estimulación por CRH severamente disminuida (de 25 a 5 veces de estimulación) (Figura 32).

Para corroborar que este efecto de inhibición era específico para Nur y no un efecto inespecífico sobre la vía de señalización de IL-1. Analizamos si la actividad NFkB, factor de transcripción activado por IL-1, estaba afectada en la línea AtT20N77. El tratamiento con IL-1 produce una estimulación de magnitud similar en la línea AtT20 y AtT20N77 (Figura 33), confirmando así la

funcionalidad y especificidad de la proteína mutante en bloquear los efectos de Nur77.

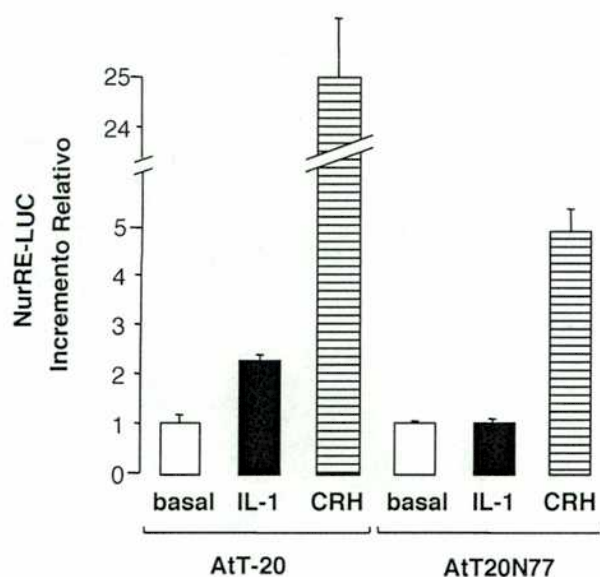


Figura 32. La línea celular AtT20N77 no responde a la estimulación del sitio NurRE por IL-1.

Las células AtT20 y AtT20N77 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NurRE-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero, fueron estimuladas o no con IL-1 (100U/ml) o CRH (100nM) por 6hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=3) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

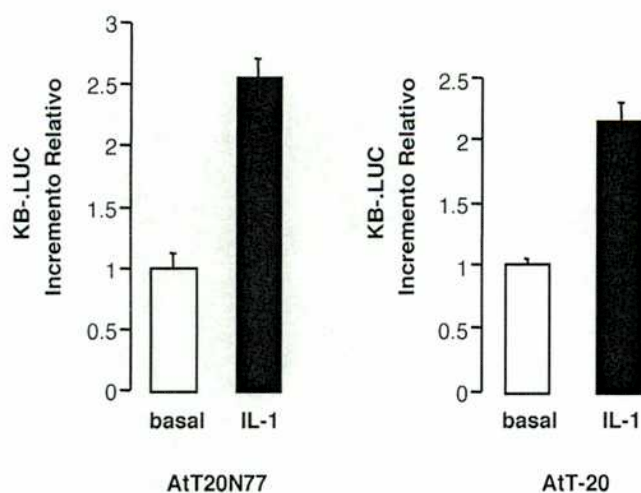


Figura 33. La línea celular AtT20N77 responde a IL-1 en la estimulación de NFkB como la línea celular original AtT20.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido KB-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 18 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero, fueron estimuladas o no con IL-1 (100U/ml) por 6hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=3) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

2.3.2.3. Respuesta a IL-1 de la línea celular AtT20N77 sobre la expresión de POMC.

Con el objetivo de comprobar si los resultados obtenidos utilizando construcciones plasmídicas y transfecciones transientes eran un correlato de la regulación a nivel del mRNA de POMC, realizamos la técnica de Northern-blot sobre la línea celular AtT20 y AtT20N77 en condiciones basales y bajo estimulación con IL-1. En células AtT20 IL-1 induce al mRNA de POMC en un 100%, por el contrario la línea celular AtT20N77 no responde a la estimulación por IL-1 (Figura 34). Confirmando la necesidad de la actividad de Nur77 en la inducción de POMC por IL-1.

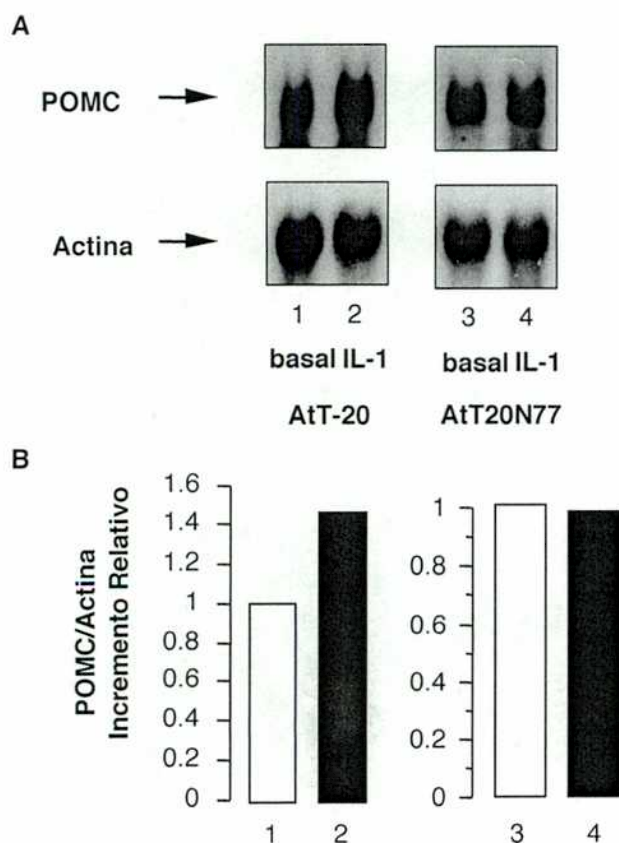


Figura 34. Nur77 es esencial para la inducción del mRNA de POMC por IL-1.

A. Las células AtT20 o AtT20N77 fueron estimuladas por 18 hs con IL-1 (100U/ml) y se realizó el ensayo de Northern-blot para la detección del mRNA de POMC como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

B. Las bandas obtenidas en A fueron cuantificadas por análisis densitométrico como se detalla en Materiales y Métodos y relativizadas según los valores del mRNA de β -actina.

2.3.2.4. Respuesta a IL-1 de la línea celular AtT20N77 sobre la secreción de ACTH

Cuando analizamos la secreción de ACTH en células AtT20N77 observamos que estas no son estimuladas por tratamiento con IL-1, a diferencia de las

células AtT20 en las cuales la IL-1 produce un aumento significativo en la ACTH secretada. Confirmando así la necesidad de la actividad de Nur77 en la inducción por IL-1 y en la secreción de ACTH (Figura 35). Estos resultados demuestran que la inducción de POMC y secreción de ACTH por IL-1 es mediada por la inducción y actividad de Nur77 en células corticotrofas.

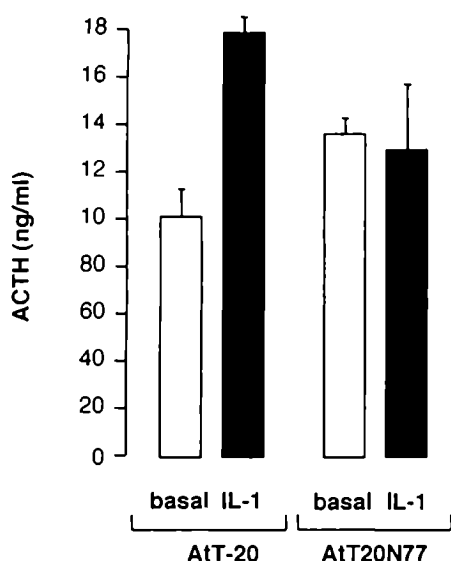


Figura 35. Nur77 es esencial para la estimulación en la secreción de ACTH por IL-1. Secreción de ACTH en células AtT20 y AtT20N77. Las células fueron estimuladas en medio mínimo D-MEM libre de suero por 16hs con o sin IL-1 (100U/ml). Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar (n=4, *p<0.01 con respecto al basal, ANOVA con el test de Scheffe) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

2.4. Rol de NFkB en la activación de Nur77 e inducción de POMC por IL-1

Los efectos proinflamatorios de IL-1 son atribuidos a la actividad de una familia de factores de transcripción NFkB (p65/p55) sobre sitios kB en promotores de diversos genes. Sin embargo no ha sido reportada la presencia de esta familia de factores de transcripción ni su rol en células corticotrofas.

2.4.1. Efectos sobre el promotor de POMC

Para dilucidar un posible rol de NFkB en la estimulación de POMC por IL-1 realizamos transfecciones transientes de AtT20 con el reporter POMC-LUC en presencia de un vector de expresión para una mutante dominante negativa de IKB (IKBs). Contrariamente a lo esperado, el tratamiento con IKBs aumenta la sensibilidad de POMC-LUC a la estimulación por IL-1 (Figura 36).

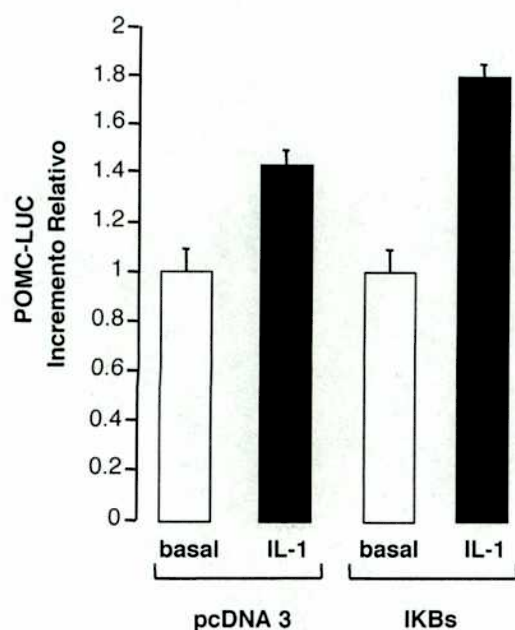


Figura 36. Rol de NFkB en la estimulación del promotor de POMC por IL-1.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido POMC-LUC, 200ng de pcDNA3 o un vector de expresión para el superrepressor de IKK (IKBs) y 200ng del vector de expresión RSV-βgalactosidasa (β-gal) por 6hs. Luego de 16 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero, fueron estimuladas con IL-1 (100U/ml) por 2 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β-gal. Los resultados están expresados como la media ± error estándar (n=3) y se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

2.4.2. Efectos sobre la actividad Nur

Nos preguntamos luego si este efecto también se observaba al analizar la actividad transcripcional sobre la construcción NurRE-LUC. La sobreexpresión de IKBs aumenta la magnitud de la respuesta a IL-1 confirmando la especificidad del efecto sobre la actividad Nur (Figura 37). Según estos resultados NFkB estaría ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la actividad Nur. Para confirmar esta hipótesis tratamos los cultivos con sulfazalasina (un inhibidor farmacológico de la acción de NFkB) o cotransfectamos las células con un vector de expresión para relA (p65/NFkB). Observamos que el tratamiento con sulfazalasina aumenta la actividad de Nur y la sobreexpresión de relA bloquea la estimulación por IL-1 (Figura 37). Estos resultados confirman el rol inhibitorio que ejerce la activación de NFkB sobre la actividad Nur.

En resumen estos resultados demuestran que la acción estimuladora de IL-1 sobre POMC y la secreción de ACTH involucra la activación de p38 y depende de la inducción y actividad de Nur77. Además la activación de NFkB por IL-1 tiene lugar en corticotrofos y afecta negativamente la inducción de POMC.

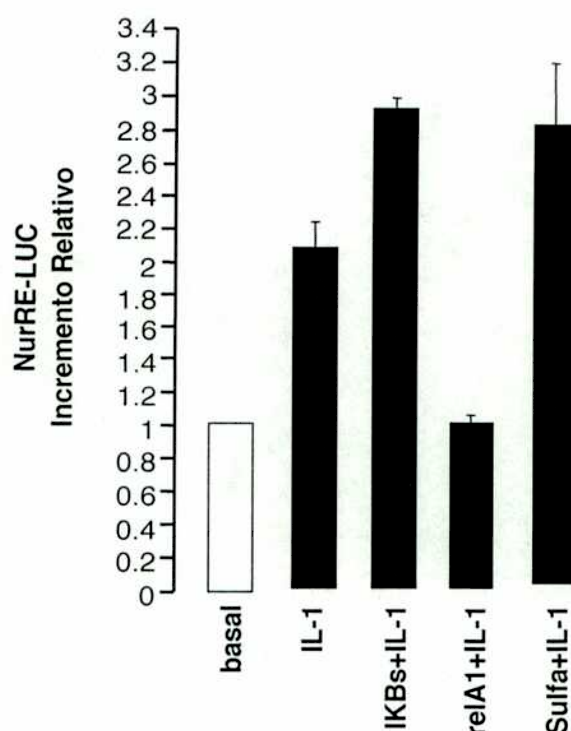


Figura 37. Rol de NFkB en la estimulación sobre el sitio NurRE por IL-1.

Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NurRE-LUC, 200ng de pcDNA3 o un vector de expresión para el superrepressor de IKB (IKBs) o para relA (relA) y 200ng del vector de expresión RSV-βgalactosidasa (β-gal) por 6hs. Luego de 16 hs en medio mínimo D-MEM libre de suero, fueron estimuladas con IL-1 (100U/ml) en presencia o ausencia de Sulfazalasina (Sulfa) según se indica por 6 hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β-gal. Los resultados están expresados como la media ± error estandar (n=3) y se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

3. Efectos moduladores de IL-1 sobre la estimulación por CRH y la inhibición por glucocorticoides de POMC y ACTH.

3.1. Sinergismo entre IL-1 y CRH en la actividad de Nur77

Además de los efectos estimulatorios de IL-1 sobre la secreción de ACTH y la inducción de POMC. IL-1 y CRH poseen un efecto sinérgico sobre la activación de POMC y la secreción de ACTH.

Decidimos entonces evaluar si este efecto podría involucrar a Nur77. En efecto, al medir la actividad de Nur77 observamos que IL-1 potencia la estimulación por CRH (Figura 38A), y este sinergismo correlaciona con el sinergismo sobre la secreción de ACTH (Figura 38B).

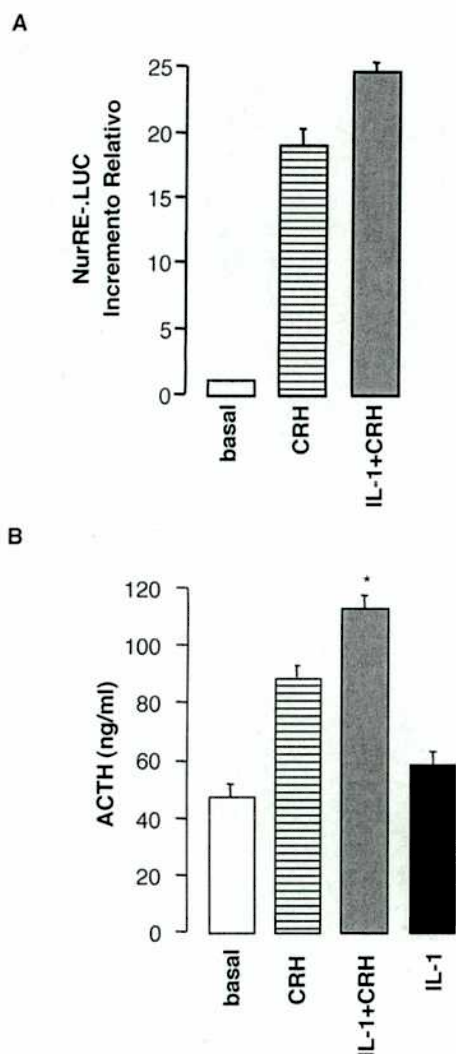


Figura 38. IL-1 y CRH sinergizan en la actividad transcripcional de Nur77 y en la secreción de ACTH.

A. Las células AtT20 fueron transfectadas con 500ng del plásmido NurRE-LUC y 200ng del vector de expresión RSV- β galactosidasa (β -gal) por 6hs. Luego de 16 hs de pretratamiento con o sin IL-1(100U/ml). Se lavaron las células en medio mínimo D-MEM libre de suero y fueron estimuladas o no con CRH (100nM) por 6hs. Cada valor fue normalizado a la actividad de β -gal. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=3) y se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

B. Secreción de ACTH en células AtT20. Luego de 16hs de pretratamiento con o sin IL-1 (100U/ml). Se lavaron las células en medio mínimo D-MEM libre de suero y fueron estimuladas o no con CRH (100nM) por 1hs. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4, *p<0.05 con respecto al tratamiento con CRH, ANOVA con el test de Scheffe) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

3.2. Efecto sensibilizador de IL-1 sobre la acción de los glucocorticoides.

El eje HPA es activado ante una respuesta inflamatoria con el objetivo de controlarla y resetear al monocito para que este sea capaz de responder ante un nuevo estímulo inflamatorio. A su vez los glucocorticoides inhiben la actividad del eje HPA, especialmente a nivel de la hipófisis inhibiendo la transcripción del gen de POMC y la secreción de ACTH.

Previamente nuestro laboratorio demostró, como se detalla en la introducción, en otro modelo experimental que existe un evento sensibilizador a la acción de los glucocorticoides por pretratamiento con IL-1, y este evento es dependiente de una mayor unión y actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides a sus elementos respondedores GRE en promotores.

Nos preguntamos entonces si un evento similar podría existir en los corticotrofos sobre la regulación del mRNA de POMC y la secreción de ACTH.

3.2.1. Efectos sobre la secreción de ACTH

Células AtT20 fueron pretratadas con distintas dosis de IL-1 por 18 hs, luego se lavo el medio y fueron estimuladas con CRH o CRH y Dexametasona por 2 hs. Observamos que en ausencia de pretratamiento con IL-1 los glucocorticoides (en dosis subóptimas, que normalmente no inhiben la secreción de ACTH) no inhiben la secreción de ACTH al medio estimulada por CRH, por el contrario cuando los corticotrofos se pretratan con IL-1, los glucocorticoides producen una inhibición total de la estimulación por CRH (Figura 39).

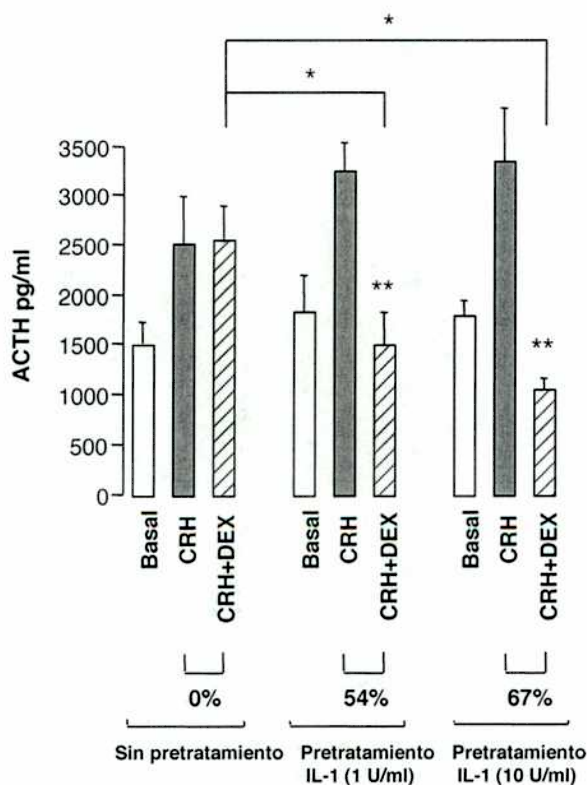


Figura 39. El pretratamiento con IL-1 potencia el efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la secreción de ACTH.

Las células AtT20 fueron o no pretratadas en medio mínimo D-MEM libre de suero por 18hs con IL-1 (100U/ml o 10U/ml) como se indica. Luego se les cambio el medio por D-MEM libre de suero, fueron estimuladas con CRH (20nM) o CRH mas Dexametasona (10nM) (CRH+DEX) por 2 hs. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4, *p<0.05 con respecto a CRH+DEX sin pretratamiento; **p<0.01 con respecto al correspondiente CRH, ANOVA con el test de Scheffe) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

3.2.2. Efectos sobre el mRNA de POMC

Nos preguntamos si este efecto potenciador era dado a nivel de la expresión del mRNA de POMC. Realizamos entonces experimentos de Northern-blot bajo

las mismas condiciones. Sin embargo no observamos inhibición por glucocorticoides en ausencia o presencia de pretratamiento con IL-1 (Figura 40).

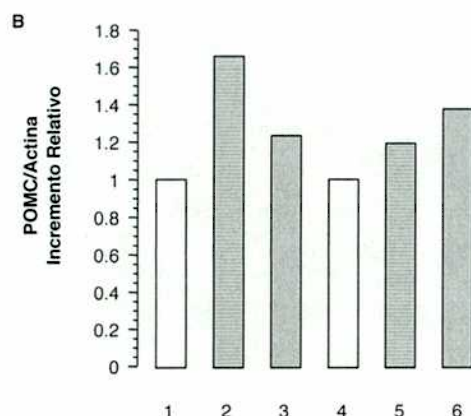
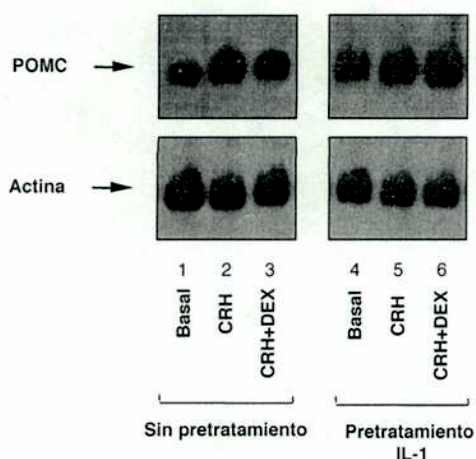


Figura 40. El pretratamiento con IL-1 no afecta la sensibilidad a los glucocorticoides en la inhibición del mRNA de POMC.

A. Las células AtT20 fueron pretratadas o no por 18 hs con IL-1 (100U/ml). Luego se les cambió el medio por D-MEM libre de suero y fueron estimuladas con CRH (20nM) o CRH mas Dexametasona (10nM) (CRH+DEX) por 18 hs. Se realizó el ensayo de Northern-blot para la detección del mRNA de POMC como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

B. Las bandas obtenidas en A fueron cuantificadas por análisis densitométrico como se detalla en Materiales y Métodos y relativizadas según los valores del mRNA de β -actina.

3.2.3. Efectos sobre adenomas hipofisarios obtenidos de pacientes con la enfermedad de Cushing

Para ver si los efectos obtenidos en la línea celular corticotrofa tienen un correlato en adenomas humanos, realizamos cultivos primarios de adenomas hipofisarios extraídos de pacientes con la enfermedad de Cushing y utilizamos un protocolo de secreción de ACTH similar al realizado sobre la línea celular AtT20. Observamos que aunque existe una tendencia no significativa a la inhibición por glucocorticoides en la secreción por CRH, el pretratamiento con IL-1 de los cultivos aumenta el grado de esta inhibición pasando de 22% a 34 %, siendo esta inhibición significativa (Figura 41).

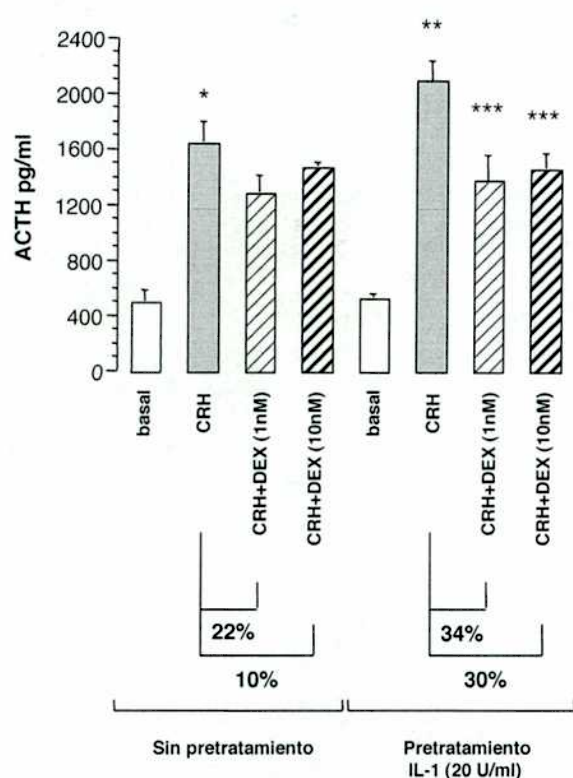


Figura 41. El pretratamiento con IL-1 potencia el efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la secreción de ACTH en cultivos primarios de tumores hipofisarios Cushing.

Cultivos primarios de adenomas hipofisarios fueron o no pretratados en medio mínimo D-MEM libre de suero por 15hs con IL-1 (20U/ml) como se indica. Luego se les cambió el medio por D-MEM libre de suero, fueron estimuladas con CRH (20nM) o CRH mas Dexametasona (10nM) (CRH+DEX) por 3 hs. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estandar (n=4, *p<0.05 con respecto al tratamiento basal, **p<0.01 con respecto al tratamiento basal con pretratamiento, ***p<0.05 con respecto al tratamiento con pretratamiento, ANOVA con el test de Scheffe) y se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

3.2.4. Efectos de IL-1 sobre GR

Nos preguntamos luego si esta diferencia en la sensibilidad de los corticotrofos a los glucocorticoides es debida a un cambio en la afinidad o cantidad de sus receptores (GR).

Para esto realizamos la técnica de Scatchard sobre células AtT20 sin tratar o tratadas con IL-1 por 16hs. Observamos que el tratamiento con IL-1 no modifica la cantidad o afinidad de GR a su ligando (Figura 42).

De estos resultados podemos concluir que existe un efecto sensibilizador de IL-1 a la posterior acción de los glucocorticoides, que se evidencia en la secreción de ACTH en cultivos de la línea celular AtT-20 y en cultivos primarios de adenomas hipofisarios. Este efecto no es consecuencia de una diferente regulación del mRNA de POMC ni tampoco se debe a un cambio en las características farmacológicas de GR.

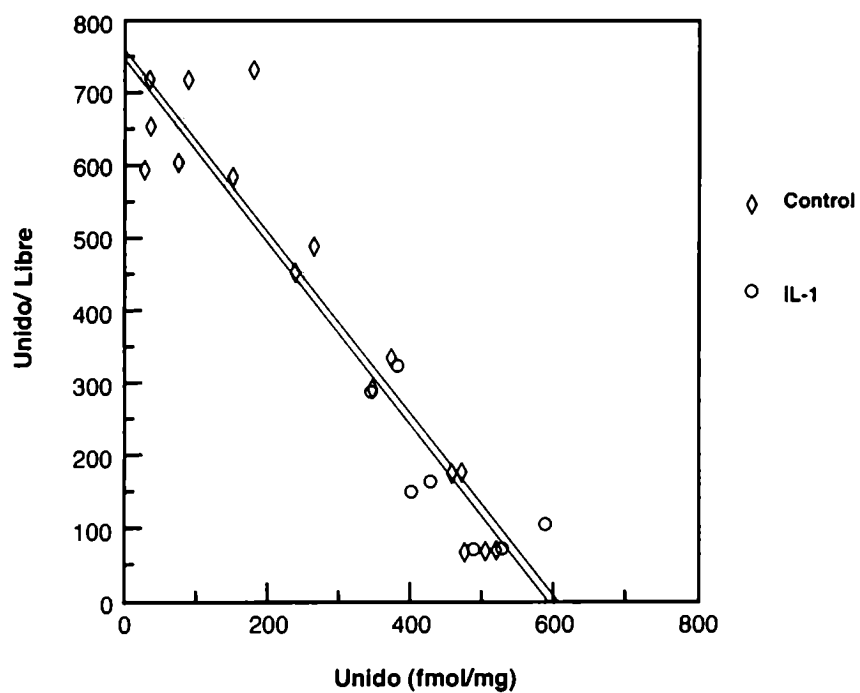


Figura 42. Efectos de IL-1 sobre el receptor de glucocorticoides (GR).

Células AtT20 fueron estimuladas o no con IL-1 (100U/ml) por 16 hs. Luego se realizó e análisis de Scatchard como se describe en Materiales y Metodos para la caracterización de receptor de glucocorticoides (GR).

V) DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis abordamos el estudio de la función corticotrofa normal y tumoral focalizándonos en tres temas fundamentales: los eventos moleculares involucrados en la regulación de los factores de transcripción Nur en la función corticotrofa por CRH y cAMP, la implicancia de los factores Nur en la regulación corticotrofa por IL-1 y los efectos de interacción entre IL-1, CRH y glucocorticoides.

Hemos caracterizado los mecanismos de señalización por CRH y cAMP. Encontramos que disparan una serie de eventos de transducción de señales dependientes e independientes del calcio entrante, que involucran la activación de las MAPK y regulan la función corticotrofa mediante la inducción y fosforilación/activación de los factores Nur. Identificamos la presencia de un camino de MAPK funcional en corticotrofos y el mecanismo de regulación que este ejerce sobre la actividad de los factores Nur y por ende sobre la respuesta corticotrofa a la acción de CRH. Discutiremos en un primer capítulo estos hallazgos.

Estudiamos de que forma IL-1 estimula al corticotrofo y encontramos que también IL-1 ejerce su acción estimuladora mediante la inducción y activación de Nur77 y no de Nur1 o NFkB. Aunque se había identificado previamente la activación del corticotrofo por IL-1, el mecanismo de inducción de POMC por esta citoquina era completamente desconocido, así como los caminos de transducción de señales involucrados. En este trabajo identificamos por primera vez que Nur77 es el factor de transcripción involucrado en la estimulación de POMC por IL-1.

Estos resultados evidencian por primera vez un mecanismo común de activación de POMC por CRH e IL-1 ya que comparten la inducción y actividad de Nur77, aunque las señales de transducción disparada por cada uno de ellos es completamente distinta. Estas vías serán discutidas en un segundo apartado.

El mecanismo involucrado en el efecto sinérgico que ocurre entre CRH e IL-1 sobre la estimulación de la secreción de ACTH involucra un efecto sinérgico a nivel de la actividad de los factores Nur. Implicando que la potenciación ocurre por interacción entre los distintos caminos de transducción de señales, que conlleva a una mayor actividad Nur e inducción de POMC. El tratamiento con IL-1 de adenomas corticotrofos humanos en cultivo produce un aumento a la sensibilidad de inhibición por glucocorticoides. Este resultado es de gran relevancia para el tratamiento de pacientes que sufren el síndrome de Cushing. Estas interacciones funcionales las discutiremos en último término.

Se discutirá a continuación cada uno de los capítulos presentados en esta tesis.

1. Mecanismos Moleculares involucrados en la inducción y activación de los factores Nur por CRH y cAMP

Los resultados muestran que en células corticotrofas AtT20 existen dos caminos de señalización que están involucrados río abajo en la cascada de señalización por PKA estimulada por cAMP y CRH (Figura 43).

Uno de estos caminos es dependiente de la entrada de calcio por canales voltaje dependientes tipo L en la membrana plasmática. El calcio entrante activa a la protein quinasa CAMKII y regula la inducción y activación de Nur77 y Nurr1.

El otro camino es independiente de CAMKII y se hace evidente solo por estimulación conjunta con CRH y NA o por análogos permeables de cAMP (CPT-cAMP), es dependiente de PKA y también produce la inducción y activación de Nur77 y Nurr1, con la consiguiente estimulación de la MAPK ERK1, 2. Ambas vías involucran la activación de la proteína G pequeña Rap1 y la protein quinasa B-Raf. La activación de las MAPK estimula al promotor de POMC mediante un aumento en la transactivación de Nur77 y no mediante su inducción.

En células endocrinas, las acciones de cAMP pueden ser dependientes o independientes de PKA (Richards. 2001). Nosotros mostramos que en células AtT20, la señalización por cAMP y CRH sobre Nur77 y la expresión de POMC, incluyendo la activación del camino de MAPK son dependientes de la acción de PKA, ya que los efectos de CRH y cAMP son bloqueados por el inhibidor de PKA H89, o cuando se sobreexpresa una forma mutante de la subunidad regulatoria de PKA que no puede unir cAMP y liberar la subunidad catalítica para que ejerza su acción.

Demostramos además que la inducción de Nur77 y la activación del promotor de POMC por CRH depende de la entrada de calcio por canales voltaje dependientes tipo L en la membrana plasmática. Este efecto es ejercido a nivel del promotor de Nur77. El promotor de Nur77 no posee sitios consenso respondedores a cAMP (CRE) que puedan ser responsables de la inducción ejercida por cAMP-PKA o niveles elevados del calcio intracelular vía CAMKII.

La regulación del promotor de Nur77 fue estrictamente estudiada en células T del sistema inmune, ya que la inducción de Nur77 estimula la apoptosis de linfocitos T asociada a la delección clonal intratímica (Calnan *et al.* 1995). En linfocitos T se identificaron dos zonas que pueden ser reguladas por calcio en el promotor de Nur77 en las cuales interactúa MEF2 (posiciones -295 y -255) (Blaeser *et al.* 2000, Woronicz *et al.* 1995, Youn *et al.* 1999), además se identificó un sitio consenso para el pegado de NFAT, factor involucrado en la activación de linfocitos T, el cual es activado por desfosforilación por la calcineurina, que es una proteína fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina. Sin embargo la regulación del promotor de Nur77 independiente del calcio también fue descrita e involucra diferentes posiciones del promotor. Por ejemplo, en fibroblastos factores de crecimiento presentes en SFB estimulan la expresión de Nur77 en forma inmediata que es independiente de la síntesis proteica (como por ejemplo de c-fos) y retardada, que depende de la síntesis de nuevas proteínas. Los elementos responsables de la inducción rápida están localizados entre las posiciones -86 y -126 e incluye a un elemento respondedor CArG, común entre los factores estimulados por suero. Por el contrario, la estimulación tardía depende de sitios "AP-1 like" y probablemente de la inducción de c-fos o Zif268, otro gen de expresión temprana (Williams &

Lau. 1993). En células AtT20 la inducción de Nur77 por CRH tiene una cinética de expresión temprana, el pico de mRNA se produce a la hora post-estimulación y decae a niveles basales a las 2 hs (Philips *et al.* 1997a). Observamos además que esta inducción se produce aún en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica como cicloheximida (no mostrado). Aunque no estudiamos los elementos responsables de la inducción de Nur77 por calcio y cAMP en corticotrofos probablemente involucre dos sitios AP1 localizados entre las posiciones -70 y -35 en el promotor. Estos sitios son un buen candidato para conferir la respuesta a calcio y a cAMP, ya que se ha descrito que el factor de transcripción respondedor a cAMP (CREB) puede interaccionar con el sitio AP1 y activar la transcripción (Nagamoto-Combs *et al.* 1997). Sin embargo son necesarios más estudios para confirmar el o los sitios de acción involucrados en las vías del calcio y cAMP sobre el promotor de Nur77.

Contrariamente, el promotor de Nurr1 contiene secuencias consenso CRE (Castillo *et al.* 1997), que puede conferir tanto la respuesta a cAMP como al calcio.

De los resultados obtenidos en los experimentos de Northern-blot para Nur77 y Nurr1 puede extrapolarse una mayor preponderancia del calcio en la regulación de Nur77 que la regulación de Nurr1, ya que el tratamiento de las células AtT20 con el agonista de los canales de calcio tipo L, tiene un efecto mayoritario sobre la inducción del mRNA de Nur77 que sobre el de Nurr1 (Figura 4). La vía dependiente de la entrada de calcio es necesaria y suficiente para la actividad e inducción de Nur77 y Nurr1, y esta vía es la que actúa bajo tratamiento con CRH. Sin embargo cuando el cAMP intracelular es elevado a niveles mayores que los obtenidos por tratamiento con CRH, como por ejemplo por tratamiento con un análogo permeable de cAMP, se hace evidente una vía de señalización que es independiente de la entrada de calcio a la célula. El tratamiento conjunto de CRH y NA evidencia también esta vía de señalización.

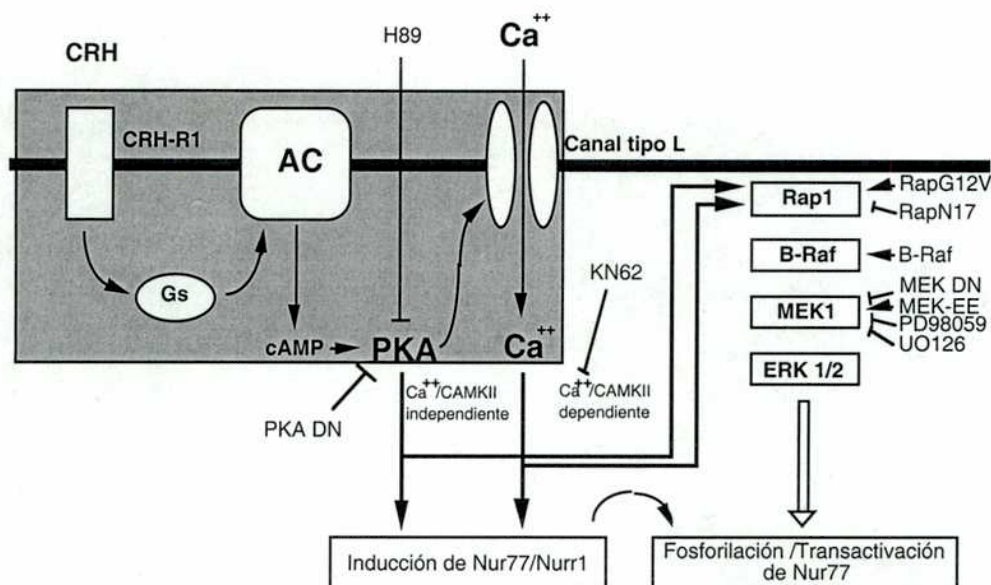


Figure 43. Caminos de señalización involucrados en la inducción y activación de los factores Nur y la expresión de POMC por CRH y cAMP.

La activación de PKA por CRH y cAMP involucra dos caminos de transducción de señales principales: uno que depende de la entrada de calcio e involucra la actividad de CAMKII; el otro es independiente del calcio entrante. El camino de MAPK es también activado por CRH y cAMP por caminos dependientes e independientes del calcio e involucra la actividad de Rap1; B-Raf; MEK y ERK. Estos caminos de transducción de señales regulan la expresión de POMC por diferentes mecanismos: a) inducción de Nur77 y Nurr1 por caminos dependientes e independientes del calcio entrante, que no involucran la actividad de MAPK b) La estimulación de la fosforilación y actividad transcripcional de Nur77 por la actividad de MAPK.

Se indican los agentes inhibidores y estimuladores utilizados en esta tesis doctoral.

El area sombreada corresponde a los caminos de señales previamente descritos. El area no sombreada corresponde a los nuevos caminos descritos en este trabajo para la estimulación de los factores Nur por CRH y cAMP.

El hecho de que los niveles de cAMP sean elevados solo al doble por el tratamiento con CRH y en forma temporaria (Antaraki *et al.* 1997) puede ser la causa de que estos niveles de cAMP no sean suficientes para la estimulación del promotor de POMC y la activación de Nur77/Nurr1 en ausencia del calcio. El tratamiento con NA y CRH en conjunto puede producir mayores niveles intracelulares de cAMP o mas duraderos que hagan evidente la vía de estimulación independiente del calcio. Además se ha descrito un efecto sinérgico entre cAMP y elevados niveles intracelulares del calcio en varios modelos celulares como células β -pancreáticas, astrocitos y células

pertenecientes al sistema inmune para mencionar algunos (Ogata *et al.* 1996, Regenhard *et al.* 2001, Yaekura *et al.* 1996), Un efecto potenciador entre ambas vías puede estar ocurriendo en los efectos observados en células AtT20.

En efecto, acciones dependientes e independientes del calcio fueron demostradas mediante el uso de inhibidores específicos de protein fosfatasas en células AtT20 (Antaraki *et al.* 1997). Además las células AtT20 poseen dos isoformas de la subunidad regulatoria de PKA, la tipo I y la tipo II, siendo la más abundante la tipo II. Se ha demostrado que CRH, a diferencia de cAMP, estimula solo a la isoforma tipo I, mientras que el tratamiento con cAMP estimula ambas isoformas en células AtT20 (Erlichman *et al.* 1984, Litvin *et al.* 1984). Una hipótesis que se desprende de esto es que tal vez la activación de la isoforma I no es suficiente para producir la inducción/activación de los factores Nur y la inducción del promotor de POMC en ausencia del calcio. Sin embargo niveles mas elevados de cAMP por tratamiento con NA y CRH o por análogos de cAMP como CPT-cAMP logran una mayor activación de PKA, que es independiente del calcio para sus efectos.

Además, demostramos que existe una vía de MAPK funcional en células corticotrofas y que está involucrada en la inducción de POMC mediante la activación sobre el sitio NurRE. Se utilizaron mutantes dominantes negativas y mutantes constitutivamente activos de Rap1 o MEK, inhibidores farmacológicos de MEK1 como PD98059 y UO126, así como la expresión de B-Raf salvaje para mostrar la relación estimulatoria en la vía de MAPK ejercida por Rap1.

Demostramos que existe una vía de MAPK funcional en corticotrofos por distintos métodos:

- a) Utilizamos transfecciones transientes con un vector de expresión constitutivo para la proteína quimérica Gal4-Elk1 (la actividad transcripcional de Elk1 es incrementada por fosforilación directa de ERK1, 2) y un vector reportero que responde solo a este factor ya que posee elementos que son reconocidos solamente por el dominio de

unión al DNA de Gal4, de esta forma un aumento en la actividad transcripcional es un correlato de la actividad de ERK1, 2.

- b) Medimos la actividad de ERK2 *in vitro*, bajo tratamiento con CRH y cAMP
- c) Medimos la fosforilación de ERK1, 2 en la célula por tratamiento con CRH y cAMP por la técnica de Western-blot, como indicativo de su activación.

Mediante estos métodos demostramos que la actividad de MAPK es incrementada en la célula por tratamiento con CRH y cAMP y mediante el uso de inhibidores y estimuladores moleculares y farmacológicos, como ya mencionamos, demostramos que involucra la activación de Rap1- B-Raf- MEK1, 2- ERK1, 2.

Esta es la primer evidencia de que la vía de MAPK existe en corticotrofos y es estimulada por tratamiento con CRH y cAMP. Aunque la existencia de una vía de MAPK funcional fue descrita para la regulación de varias células hipofisarias como lactotrofos, somatotrofos y gonadotrofos como ya se explicó en la introducción, no se había descrito previamente en células corticotrofas.

Sin embargo ya se había asociado una activación de MAPK en células CHO, mediante la transfección transiente de un vector de expresión para CRH-R1 α y CRH-R2 β y tratamiento con urocortina (que interacciona con este receptor como lo hace CRH). En estas células la activación de la vía de MAPK es completamente distinta a como ocurre en corticotrofos, ya que involucra a la proteína Gq, un aumento en los niveles de IP3 y activación de la PKC, contrariamente el tratamiento con CRH de estas células es incapaz de activar la vía de MAPK (Grammatopoulos *et al.* 2000). Esta diferencia de respuesta respecto a los corticotrofos no es sorprendente ya que la activación o inhibición de la vía de MAPK es estrictamente dependiente del tipo celular estudiado por la presencia o ausencia de componentes específicos en la cascada, como ya se discutió en la introducción.

En este trabajo de tesis demostramos además que esta vía de señalización por MAPK puede ser regulada diferencialmente por CRH y cAMP. En forma similar a los caminos que regulan la inducción de Nur77 y Nurr1, también existen vías

dependientes del calcio para la estimulación de las MAPK por CRH y vías independientes del calcio, que se evidencian por niveles mayores de cAMP. Esta activación por MAPK está involucrada en la regulación de la actividad transcripcional de Nur77 y no la inducción de Nur77 o Nur71.

La activación de Rap1 dependiente o independiente de PKA fue descrita en diversos modelos celulares (Grewal *et al.* 2000b, Rooij *et al.* 1998, Tsygankova *et al.* 2001). Nosotros observamos que en células AtT20 la activación de Rap1 por cAMP es dependiente de PKA. La expresión de B-Raf es esencial para la activación de la vía de MAPK por Rap1 (Grewal *et al.* 2000b, Qiu *et al.* 2000, Vossler *et al.* 1997b). Mostramos además que B-Raf se expresa constitutivamente en células corticotrofas y cuando este es sobreexpresado mediante transfecciones transientes con un vector de expresión se incrementa la estimulación de la vía de MAPK por CRH. En algunos tipos celulares cAMP estimula la fosforilación de Rap por PKA y la inhibición de la activación de Raf-1 por Ras (Cook & McCormick. 1993, Wu *et al.* 1993). La presencia de B-Raf otorga una vía extra de activación del camino de MAPK. La expresión de B-Raf es tejido específica y se estableció una correlación entre la presencia o ausencia de B-Raf y el efecto estimulador o inhibitorio del cAMP sobre la vía de MAPK (Qiu *et al.* 2000) (Figura 9). Por ejemplo en neuronas, que expresan B-Raf, el tratamiento con cAMP estimula la vía de MAPK, sin embargo en astrocitos que no expresan B-Raf, el tratamiento con cAMP inhibe la estimulación de la vía de MAPK (Dugan *et al.* 1999). Al forzar la expresión de B-Raf en células de una línea de astrocitoma, el tratamiento con cAMP estimula la vía de MAPK en forma dependiente de la activación de Rap1 (Dugan *et al.* 1999). Usando la forma mutante constitutiva de Rap1 (RapG12V) demostramos que en células AtT20 el camino que une la activación de Rap1 con la activación de ERK y el aumento en la actividad transcripcional de Elk1 existe y puede ser atribuido a la presencia de B-Raf, como fue previamente descrito en células PC12 (Vossler *et al.* 1997a).

Demostramos que RapG12V puede estimular la actividad transcripcional basal de Elk1 y la actividad de ERK pero no estimula la actividad basal de los factores Nur sobre el sitio NurRE. Este resultado es consistente con el hecho de que las MAPK, a diferencia de la vía del calcio y PKA, no aumenta los

niveles del mRNA de Nur77 y Nurr1 y en ausencia de estos factores no puede observarse regulación por las MAPK. Coherentemente la sobreexpresión de una mutante constitutivamente activa para MEK (MEK-EE) estimula la actividad transcripcional de Nur77, cuando es sobreexpresado con un vector de expresión, sobre el sitio NurRE aún en ausencia de tratamiento.

Nosotros mostramos que en células corticotrofas AtT20 B-Raf se expresa y mediante el uso de inhibidores farmacológicos (PD98059, UO126), bioquímicos (quinasas y ensayos de fosforilación de Nur77) y moleculares (vectores de expresión de formas activas constitutivamente o dominantes negativos) que existe una vía de MAPK funcional en corticotrofos que involucra (Rap1-B-Raf-MEK1,2 -ERK1, 2).

Los estudios con NIF muestran que río abajo en la cascada de PKA por estimulación con CRH y cAMP involucra no solo caminos dependientes del calcio sino también calcio independientes, los cuales pueden ser particularmente importantes para la regulación de la actividad Nur independiente del calcio.

Ejemplos de regulación de la cascada de MAPK que dependen del calcio son varios. En células PC12, la activación de MAPK por el factor de crecimiento neuronal (NGF) estimula la actividad MAPK, y esta estimulación es inhibida por un inhibidor de calmodulina, este efecto es debido a un bloqueo de la actividad de la quinasa de Raf-1 y B-Raf (Egea *et al.* 2000). Se ha descrito también la fosforilación de CREB dependiente e independiente del calcio en células PC12; en este caso también la fosforilación dependiente del calcio requiere de la actividad del camino Rap1-B-Raf-MEK-ERK (Grewal *et al.* 2000a). Parecería entonces que caminos comunes de regulación dependientes e independientes del calcio existen en células corticotrofas y neuronales.

Las MAPK regulan la transactivación de Nur77 pero no su inducción. La actividad basal y estimulada de la proteína quimérica Gal4-Nur77 son inhibidas cuando se tratan las células con el inhibidor de MEK (PD98059). Contrariamente, el tratamiento con este inhibidor no afecta la inducción del mRNA de Nur77 y Nurr1 por CRH o cAMP.

El aumento en la actividad transcripcional de Nur77 por tratamiento con CRH y cAMP correlaciona con la capacidad de Nur77 de ser fosforilado *in vitro* por ERK2. En la secuencia aminoacídica de Nur77 existen 2 sitios consenso de fosforilación localizados en las posiciones 108 y 325 que pueden ser blanco de esta fosforilación. Pero estudios adicionales son necesarios para identificar los sitios blancos de ERK2 con precisión. La actividad de MAPK basal puede depender de factores autocrinos o paracrinos presentes en el medio de cultivo. En concordancia con este nivel de actividad basal, la sobreexpresión de Nur77 sin estímulos externos es capaz de incrementar la transcripción sobre los sitios NurRE y NBRE (Philips *et al.* 1997a), esto indica que la proteína sobreexpresada es al menos en parte activa transcripcionalmente. Además la actividad basal de MAPK es probablemente necesaria para la actividad transcripcional de Nur77, ya que el tratamiento con el inhibidor de MEK reduce drásticamente la transactivación de Gal4-Nur77.

En células fibroblásticas NIH3T3, la activación de CREB es dependiente de la actividad basal de MAPK. En estas células, aunque el camino de MAPK que involucra Raf-MEK-ERK no es activado por el tratamiento con forskolina, la inhibición de este camino por dominantes negativos de Raf o por el inhibidor de MEK (PD98059) puede inhibir la transcripción por CREB sin afectar la fosforilación en la serina 133, la cual es necesaria para interactuar con el coactivador CBP y activar la transcripción (Seternes *et al.* 1999).

En conclusión, demostramos que CRH y cAMP gatillan una serie de señales dependientes e independientes del calcio, incluyendo al camino de las MAPK (Figura 43). Estas distintas vías de señales se combinan para regular la expresión y actividad de Nur77 y Nurr1 resultando en un control unificado de la expresión de POMC y por ende producción de ACTH.

Como fue recientemente descrito, cAMP actúa por diferentes caminos, incluyendo el camino Rap-Raf-MEK-ERK en algunos tipos celulares y estados de diferenciación (Richards. 2001). Incluso es posible que en algunas células la fosforilación de CREB mediada por PKA y la fosforilación de otras proteínas quinasas como PDK1, PKB (o akt) y MAPK puedan ser necesarias para la activación completa de la transcripción (Richards. 2001).

En esta parte de la tesis demostramos que las células corticotrofas AtT20 constituyen una célula endocrina importante en la cual este camino de señalización es relevante para el control de la expresión de POMC por los factores Nur.

2. Relevancia y dependencia de la actividad de Nur en la inducción de POMC por IL-1.

Ya mencionamos anteriormente la importancia y relevancia de los factores Nur en la regulación del promotor de POMC por CRH.

Recientemente se identificaron los elementos respondedores en el promotor de POMC a las citoquinas pertenecientes a la familia de gp130 (LIF e IL-11) (Philips *et al.* 1997a, Ray *et al.* 1996), e involucran la activación de los factores de transcripción STAT (Ray *et al.* 1996). Si embargo los factores de transcripción involucrados en la inducción del mRNA de POMC por IL-1 no habían sido descriptos.

En esta parte de la tesis demostramos que la inducción del mRNA de POMC por IL-1 involucra la inducción y actividad de Nur77 y no Nur1. Es mas, demostramos que este efecto es específico de IL-1 ya que las otras citoquinas pertenecientes a la familia de gp130, como IL-6, IL-11 y LIF, aunque incrementan los niveles de mRNA de POMC y estimulan la actividad del promotor de POMC (Arzt *et al.* 1999, Auernhammer & Melmed. 1999, Ray & Melmed. 1997, Ray *et al.* 1996), no lo hacen a través de los factores Nur.

La estimulación sobre el sitio NurRE por IL-1 es dependiente de la actividad de la protein quinasa p38. Además demostramos que Nur77 es esencial para la función de IL-1 en células corticotrofas, ya que:

- a) El promotor de POMC con el sitio NurRE mutado no responde a la estimulación por IL-1
- b) Desarrollamos una línea celular que sobreexpresa una mutante dominante negativa de Nur77, esta forma carece el dominio de transactivación, interactúa con los sitios NBRE y NurRE y no activa la

transcripción (Philips *et al.* 1997a, Woronicz *et al.* 1994). Esta línea es insensible a la estimulación de IL-1, ya que:

- IL-1 no estimula al sitio NurRE
- IL-1 no induce al mRNA de POMC.
- IL-1 no estimula la secreción de ACTH por IL-1.

La ausencia de efectos a el tratamiento con IL-1 en la línea que sobreexpresa la dominante negativa de Nur77, no es debida a un efecto de interrupción de la cascada de señalización por el receptor de IL-1 sino que es específica sobre la actividad Nur, ya que la respuesta estimuladora de IL-1 sobre elementos respondedores a NFkB (factor de transcripción involucrado en la inducción de promotores de citoquinas en células inmunes por tratamiento con IL-1) no se ve alterada.

IL-1 es capaz de incrementar la transcripción sobre el sitio NurRE, pero no sobre el sitio NBRE. Esta diferencia de acción puede ser debida a la diferente estequiometría requerida por los sitios NurRE y NBRE ya que el sitio NurRE requiere la interacción de homo o heterodímeros de Nur77, Nurr1 o NOR1 y NBRE interacciona solo con una proteína como monómero (Murphy *et al.* 1995, Wilson *et al.* 1991, Wilson *et al.* 1992). Otra explicación posible es la diferencia de respuesta que posee cada sitio. CRH produce una estimulación de 20 veces sobre NurRE-LUC pero solo de dos veces sobre el sitio NBRE-LUC (Philips *et al.* 1997a), esta diferencia en sensibilidad a CRH correlaciona con el rol preponderante del sitio NurRE para la regulación de POMC, ya que la delección o mutación de este sitio anula la inducción por CRH (Philips *et al.* 1997a). Contrariamente a CRH que induce el mRNA de Nur77 y Nurr1, IL-1 induce solo el mRNA de Nur77. NOR1 puede interaccionar con el sitio NurRE pero no es tan efectivo como Nur77 en estimular la transcripción (Fernandez *et al.* 2000, Maira *et al.* 1999). Entonces la unión de homodímeros de Nur77 debe ser la responsable de la activación sobre el sitio NurRE por IL-1, aunque podría existir unión de heterodímeros entre Nur77 y NOR1.

Como ya mencionamos en la introducción IL-1 gatilla diferentes caminos de señalización, siendo el receptor tipo I el responsable de la transducción de la señal mediante la interacción con proteínas accesorias que poseen actividad tirosina quinasa (Baud *et al.* 1999, Dinarello. 1994). La interacción con estas proteínas dispara una serie de cascadas de señales que termina con la activación de JNK, p38 y PKC, entre otros (Baud *et al.* 1999, Dinarello. 1994, Gwosdow *et al.* 1994). Investigamos el rol que ejerce cada uno de estos caminos de protein quinasas en los efectos estimulatorios de IL-1 sobre la actividad transcripcional e inducción de Nur77. Observamos que el bloqueo de p38 reduce drásticamente la inducción y la actividad transcripcional de Nur77, sin embargo la inhibición de PKC produce una inhibición de menor magnitud tanto en el mRNA de Nur77 como en la actividad transcripcional.

Diferentes patrones de fosforilación de Nur77 fueron descritos por diferentes estímulos (Katagiri *et al.* 1997). Nur77 es fosforilada en su estado basal (Fahrner *et al.* 1990) y como ya se mencionó anteriormente la modulación de su actividad es ejercida por fosforilación. Varios sitios de Nur77 pueden ser blanco de fosforilación de la protein quinasa p38. El tratamiento con IL-1 de células AtT20 produce la fosforilación de diferentes proteínas, entre ellas una con el mismo peso molecular de Nur77 (Fagarasan *et al.* 1990). Sin embargo aún no se ha determinado si Nur77 es realmente fosforilada dentro de la célula por tratamiento con IL-1, ni si es un blanco de fosforilación directo por p38.

Dado que IL-1 estimula la transcripción mediada por NFkB, y la activación de este factor está involucrada en la mayoría de los efectos transcripcionales estimulados por IL-1 en diferentes modelos celulares, investigamos el posible rol de este factor en la inducción del mRNA de Nur77 y la actividad Nur por tratamiento con IL-1. Contrariamente a lo esperado, la transfección transiente con una mutante superrepresora de IKB (se une a NFkB y lo mantiene en su forma inactiva en el citoplasma), que no puede fosforilarse y liberar a NFkB para que active la transcripción en sus genes blanco, en vez de inhibir la actividad de Nur77, potencia la estimulación por IL-1 produciendo un incremento en la activación del promotor de POMC y sobre los elementos NurRE. En concordancia, el tratamiento con sulfazalasina (un inhibidor de la

activación de NFkB) produce un efecto similar. Esto evidencia que IL-1 está produciendo dos efectos contrapuestos, uno estimulatorio mediante la inducción del mRNA de Nur77 y uno inhibitorio mediante la activación de NFkB.

Si bien la presencia o función de NFkB en células corticotrofas no ha sido caracterizada previamente, nosotros observamos mediante transfecciones transientes con un vector reportero que contiene elementos KB (de respuesta a NFkB) acoplados al gen de LUC, que existen elevados niveles basales de actividad en células AtT20 (no mostrado), si se compara con otros factores de transcripción como AP1. Es posible entonces que posea una función regulatoria en el corticotrofo.

Una hipótesis que explicará estos resultados sería que los elevados niveles basales de actividad de NFkB estén probablemente afectando la respuesta celular en su conjunto mediante el secuestro de coactivadores específicos. El tratamiento con la mutante superrepresora de IKB, podría liberar estos coactivadores de la transcripción y producir una estimulación de la actividad transcripcional en una forma mas general. Aunque el mecanismo específico de acción no está claro, esta inhibición, ejercida por la activación de NFkB por IL-1 puede explicar el efecto de menor magnitud que posee IL-1 sobre la actividad Nur si se compara con la activación ejercida por CRH, dado que ambos estimulan al mRNA de Nur77 en proporciones similares.

Esta tesis describe por primera vez los mecanismos moleculares involucrados en la inducción del mRNA de POMC y la secreción de ACTH estimulada por IL-1, demostrando una dependencia estricta en la inducción y actividad de Nur77 en células corticotrofas.

3. Efectos moduladores de IL-1 sobre la estimulación por CRH y la inhibición por glucocorticoides de POMC y ACTH

Demostramos que no solo IL-1 ejerce su efecto sobre la secreción de ACTH e inducción de POMC sino que también sensibilizan a la hipófisis a la acción estimuladora de CRH e inhibidora de los glucocorticoides.

Como ya mencionamos en la introducción efectos modulatorios entre CRH e IL-1 se han descrito a nivel del corticotrofo sobre la secreción de ACTH y β -endorfina. CRH e IL-1 producen un incremento mayor en la secreción de β -endorfina y ACTH con respecto al tratamiento con CRH sola (Fagarasan *et al.* 1989, Payne *et al.* 1994). CRH e IL-1 sinergizan en la inducción de POMC en la línea AtT20 (Katahira *et al.* 1998). IL-1 modula los receptores a CRH en la hipófisis (Parsadaniantz *et al.* 1997) y el tratamiento con CRH afecta la sensibilidad a IL-1 en la hipófisis *in vivo* (Payne *et al.* 1994) e *in vitro* (Webster *et al.* 1991). Nosotros demostramos que IL-1 y CRH sinergizan para aumentar la transcripción sobre el sitio NurRE, este efecto provee la base molecular para el sinergismo que se observa entre IL-1 y CRH en la secreción de ACTH y en la inducción del mRNA de POMC.

El mecanismo de inhibición por glucocorticoides que es afectado por el pretratamiento con IL-1 es sobre la secreción de ACTH estimulada por CRH y no por una disminución en los niveles de expresión del mensajero de POMC. La mayor inhibición ejercida por los glucocorticoides no es debida a un aumento en las características de unión de GR a los glucocorticoides ni por una variación en el número de receptores. En este trabajo de tesis no observamos variación alguna en los parámetros de unión de GR a su ligando por el método de Scatchard, siendo la afinidad por el ligando y el número de receptores exactamente los mismos. Previamente demostramos que el pretratamiento con IL-1 aumenta la actividad transcripcional de GR sobre elementos GRE en la línea celular AtT20 (Costas *et al.* 1996). Este efecto podría ser el responsable de la mayor sensibilidad a la acción inhibitoria de los glucocorticoides por tratamiento con IL-1.

Este aumento en la sensibilidad a la acción inhibitoria de los glucocorticoides por tratamiento con IL-1 puede tener un correlato fisiológico en la inhibición que ejercen los glucocorticoides sobre el sistema HPA una vez activado, por retroalimentación negativa. Cuando la activación del eje HPA se da como consecuencia de una reacción inflamatoria e IL-1 es el mediador involucrado en esta activación, un aumento en la sensibilidad a la retroalimentación negativa por glucocorticoides contribuiría a esta inhibición.

Como ya mencionamos en la introducción, existen distintos mecanismos de inhibición de la acción corticotrofa por glucocorticoides: la inhibición tardía que involucra la inhibición de los niveles del mRNA de POMC y la inhibición intermedia que involucra un efecto inhibitorio a nivel de la secreción de ACTH. Demostramos en esta parte de la tesis que el efecto sensibilizador a la acción de los glucocorticoides se da a nivel de la inhibición de la secreción de ACTH y no a nivel de la inducción del mRNA de POMC. Estos resultados se observan en tiempos breves de secreción como a las 3 hs y a 2h.

El efecto de inhibición intermedia por glucocorticoides depende de la síntesis proteica y para observar la sensibilización por IL-1 fue necesario pretratar a las células por 18 hs, esta cinética de sensibilización sugiere que estaría involucrado un efecto transcripcional por IL-1.

Otros mecanismos de regulación de la actividad de GR por caminos de transducción de señales fue demostrada; por ejemplo el tratamiento con IL-2 o IL-4 aumenta la cantidad de GR fosforilado, produce una disminución en la unión de GR a su ligando y una menor actividad represora de GR, esta regulación es ejercida por la proteína quinasa p38 (Irusen *et al.* 2002).

Por otro lado Vanadato, que inhibe la activación de GR por mantenerlo unido a las proteínas heat shock, si es agregado luego de la estimulación de GR por glucocorticoides, potencia la actividad transcripcional sobre sitios GRE en presencia del ligando, este efecto es dependiente de la actividad tirosina quinasa y probablemente de la activación de las vías de MAPK (Li Calzi *et al.* 2002). IL-2 afecta negativamente la actividad transcripcional de GR sobre sitios GRE, y probablemente esta inhibición es consecuencia de la interacción entre STAT5 y GR (Biola *et al.* 2001).

Los adenomas corticotrofos poseen elevados niveles de secreción de ACTH, los cuales son insensibles a la acción inhibitoria por glucocorticoides (Newell-Price *et al.* 1998). En esta tesis demostramos que la acción sensibilizadora de IL-1 sobre la inhibición por glucocorticoides se evidencia tanto en células AtT20 como en cultivos primarios de adenomas corticotrofos humanos.

El aumento en la sensibilidad de glucocorticoides en la hipófisis, y por ende una disminución en la secreción de ACTH y glucocorticoides plasmáticos a raíz de los ya elevados niveles de glucocorticoides en pacientes que sufren la enfermedad de Cushing, es de alta relevancia para el tratamiento de la enfermedad. En este sentido el tratamiento con IL-1 y con combinaciones de agentes farmacológicos podría contribuir a una mejor calidad de vida de estos pacientes.

VI) CONCLUSIONES

De este trabajo de tesis se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

1. Mecanismos Moleculares involucrados en la inducción y activación de los factores Nur por CRH y cAMP

La estimulación en la entrada de calcio por canales tipo L es esencial para la inducción de los mRNAs de Nur77 y Nurr1 y la estimulación de la actividad Nur por CRH.

Niveles elevados del calcio intracelular son suficientes para la inducción de los mRNAs de Nur77 y Nurr1 y la estimulación de la actividad Nur.

El camino calcio dependiente involucra la actividad de CAMKII

Existe también la inducción de los mRNAs de Nur77 y Nurr1 y la estimulación de la actividad Nur independiente de esta entrada de calcio, que se hace evidente ante niveles mayores de cAMP.

Existe una vía de MAPK funcional en corticotrofos que se estimula por CRH y cAMP en forma calcio-dependiente y calcio-independiente.

Esta vía de MAPK involucra a los componentes Rap1, B-Raf, MEK1/2 y ERK1/2.

La actividad de las MAPK estimula la actividad Nur, no por inducción de los mRNAs sino por aumento en la fosforilación y actividad transcripcional de Nur77.

Esta regulación de la actividad Nur correlaciona con la regulación del gen de POMC.

2. Relevancia y dependencia de la actividad de Nur en la inducción de POMC por IL-1

IL-1 y no las citoquinas pertenecientes a la familia de gp130 estimulan la actividad Nur, sobre el sitio NurRE y no sobre el sitio NurRE en el promotor de POMC.

Este aumento en la actividad Nur correlaciona con la inducción del mRNA de Nur77 y no de Nurr1. Este aumento en los niveles de mRNA de Nur77 es un evento a nivel del promotor de Nur77.

El aumento en el mRNA y la actividad de Nur77 depende de la protein quinasa p38.

Una línea que sobreexpresa una mutante dominante negativa de Nur77 es insensible a la estimulación por IL-1 de la secreción de ACTH, la actividad Nur y la inducción de POMC, no así de la activación de NFkB por IL-1, confirmando la dependencia de Nur en la regulación corticotrofa por IL-1.

El factor de transcripción NFkB ejerce un efecto negativo en la estimulación de la actividad Nur y la inducción de POMC por IL-1.

3. Efectos modulatorios de IL-1 sobre la estimulación por CRH y la inhibición por glucocorticoides de POMC y ACTH

El tratamiento con IL-1 potencia la estimulación por CRH de la secreción de ACTH y la actividad Nur.

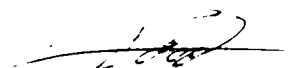
El tratamiento con IL-1 aumenta la sensibilidad a la inhibición por glucocorticoides de la secreción de ACTH, tanto en la línea celular AtT20 como en cultivos primarios de adenomas corticotrofos humanos.

Este efecto no es un correlato de la inhibición del mRNA de POMC por glucocorticoides sino un efecto a nivel de la secreción ya que el mRNA de POMC no se ve alterado por pretratamiento con IL-1 y el efecto se evidencia en tiempos cortos.

Este aumento en la sensibilidad no es consecuencia de una diferencia en la afinidad de GR por los glucocorticoides ni una diferencia en el número de GR.



Dr. EDUARDO ARZT
PROFESOR TITULAR
F.C.E.N. - Univ. de Bs. As



VII) REFERENCIAS

- Addison T 1855 On the constitutional and local effects of the suprarenal capsules *London: Ed. Samuel Highley.*
- Affolter HU and Reisine T 1985 Corticotropin releasing factor increases proopiomelanocortin messenger RNA in mouse anterior pituitary tumor cells *J Biol Chem* **260** 15477-15481
- Akita S, Malkin J and Melmed S 1996 Disrupted murine leukemia inhibitory factor (LIF) gene attenuates adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion *Endocrinology* **137** 3140-3143
- Akita S, Webster J, Ren SG, Takino H, Said J, Zand O and Melmed S 1995 Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotrophic hormone synthesis and secretion *J Clin Invest* **95** 1288-1298
- Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ and Cowley S 1994 Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1 *EMBO J.* **13** 1610-1619
- Altschuler D and Lapetina EG 1993 Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b *J Biol Chem* **268** 7527-7531
- Andrews WV, Windle RJ, Kershaw YW, Wood SA, Lightman SL and Ingram CD 1998 Rapid responses to steroid hormones. 1st International meeting. Mannheim, Germany, September 18-20, 1998. Abstracts *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **106** A39-61
- Antaraki A, Ang KL and Antoni FA 1997 Involvement of calyculin A inhibitable protein phosphatases in the cyclic AMP signal transduction pathway of mouse corticotroph tumor (AtT20) cells *Brit. J. Pharmacol.* **121** 991-999
- Antoni FA, Fink G and Sheward WJ 1990 Corticotrophin-releasing peptides in rat hypophysial portal blood after paraventricular lesions: a marked reduction in the concentration of corticotrophin-releasing factor-41, but no change in vasopressin *J Endocrinol* **125** 175-183
- Aoki Y, Iwasaki Y, Katahira M, Oiso Y and Saito H 1997 Regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. II: Effects of the pituitary

adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide
Endocrinology **138** 1930-1934

- Arvan P, Kuliawat R, Prabakaran D, Zavacki AM, Elahi D, Wang S and Pilkey D 1991 Protein discharge from immature secretory granules displays both regulated and constitutive characteristics *J Biol Chem* **266** 14171-14174

- Arzt E, Paez Pereda M, Perez Castro C, Pagotto U, Renner U and Stalla GK 1999 Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front. Neuroendocrinol.* **20** 71-95

- Arzt E, Stelzer G, Renner U, Lange M, Müller OA and Stalla GK 1992 Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J. Clin. Invest.* **90** 1944-1951

- Assil IQ, Qi LJ, Arai M, Shomali M and Abou-Samra AB 2001 Juxtamembrane region of the amino terminus of the corticotropin releasing factor receptor type 1 is important for ligand interaction *Biochemistry* **40** 1187-1195

- Attur MG, Dave MN, Leung MY, Cipolletta C, Meseck M, Woo SL and Amin AR 2002 Functional genomic analysis of type II IL-1beta decoy receptor: potential for gene therapy in human arthritis and inflammation *J Immunol* **168** 2001-2010

- Auernhammer CJ and Melmed S 1999 Interleukin-11 stimulates proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion in corticotroph cells: evidence for a redundant cytokine network in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis *Endocrinology* **140** 1559-1566

- Awartkruis FJ, Wolthuis RM, Nabben NM, Franke B and Bos JL 1998 Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signaling *EMBO J.* **17** 5905-5912

- Ban E, Milon G, Prudhomme N, Fillion G and Haour F 1991 Receptors for interleukin-1 (alpha and beta) in mouse brain: mapping and neuronal localization in hippocampus *Neuroscience* **43** 21-30

- Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y and Karin M 1999 Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes. Dev.* **13** 1297-1308

- Berg JM 1989 DNA binding specificity of steroid receptors *Cell* **57** 1065-1068

- Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F and Besedovsky H 1987 Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1 *Science* **238** 524-526
- Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC and Fein HG 1987 Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells *Science* **238** 519-521
- Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E and Dinarello CA 1986 Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones *Science* **233** 652-654
- Besedovsky H and Sorkin E 1977 Network of immune-neuroendocrine interactions *Clin Exp Immunol* **27** 1-12
- Besedovsky H, Sorkin E, Keller M and Muller J 1975 Changes in blood hormone levels during the immune response *Proc Soc Exp Biol Med* **150** 466-470
- Besedovsky HO, Del Rey A and Sorkin E 1979 Antigenic competition between horse and sheep red blood cells as a hormone-dependent phenomenon *Clin Exp Immunol* **37** 106-113
- Besedovsky HO, del Rey A and Sorkin E 1981 Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels *J Immunol* **126** 385-387
- Besedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E, Lotz W and Schwulera U 1985 Lymphoid cells produce an immunoregulatory glucocorticoid increasing factor (GIF) acting through the pituitary gland *Clin Exp Immunol* **59** 622-628
- Biola A, Lefebvre P, Perrin-Wolff M, Sturm M, Bertoglio J and Pallardy M 2001 Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1 *Mol Endocrinol* **15** 1062-1076
- Birnberg NC, Lissitzky JC, Hinman M and Herbert E 1983 Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion *Proc Natl Acad Sci U S A* **80** 6982-6986
- Blaeser F, Ho N, Prywes R and Chatila TA 2000 Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors *J. Biol. Chem.* **275** 197-209
- Bos JL 1998 All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral *Embo J* **17** 6776-6782

- Bos JL, Franke B, M'Rabet L, Reedquist K and Zwartkruis F 1997 In search of a function for the Ras-like GTPase Rap1 *FEBS Lett* **410** 59-62
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH and Yancopoulos GD 1991 ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF *Cell* **65** 663-675
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J and Cobb MH 1990 An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control *Science* **249** 64-67
- Bousquet C, Zatelli MC and Melmed S 2000 Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing *J Clin Invest* **106** 1417-1425
- Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL and Nadler LM 1997 Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1 *Science* **278** 124-128
- Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, Lundblad JR, Roberts JL and Loeffler JP 1995 Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1 *Mol. Endocrinol.* **9** 745-755
- Boutillier AL, Sassone-Corsi P and Loeffler JP 1991 The protooncogene c-fos is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells *Mol. Endocrinol.* **5** 1301-1310
- Bradford AP, Conrad KE, Wasylyk C, Wasylyk B and Gutierrez-Hartmann A 1995 Functional interaction of c-Ets-1 and GHF-1/Pit-1 mediates Ras activation of pituitary-specific gene expression: mapping of the essential c-Ets-1 domain *Mol Cell Biol* **15** 2849-2857
- Bristulf J, Simoncsits A and Bartfai T 1991 Characterization of a neuronal interleukin-1 receptor and the corresponding mRNA in the mouse anterior pituitary cell line AtT-20 *Neurosci Lett* **128** 173-176
- Burgess TL and Kelly RB 1987 Constitutive and regulated secretion of proteins *Annu Rev Cell Biol* **3** 243-293
- Callahan TA and Piekut DT 1997 Differential Fos expression induced by IL-1 β and IL-6 in rat hypothalamus and pituitary gland *J Neuroimmunol* **73** 207-211

- Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D and Winoto A 1995 A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection *Immunity* **3** 273-282
- Cambronerio JC, Rivas FJ, Borrell J and Guaza C 1992 Interleukin-1-beta induces pituitary adrenocorticotropin secretion: evidence for glucocorticoid modulation *Neuroendocrinology* **55** 648-654
- Castillo SO, Xiao Q, Lyu MS and A. KC 1997 Organization, sequence, chromosomal localization, and promoter identification of the mouse orphan nuclear receptor Nurr1 gene *Genomics* **41** 250-257
- Castro DS, Arvidsson M, Bondesson Bolin M and Perlmann T 1999 Activity of the Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2 *J Biol Chem* **274** 37483-37490
- Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ and Sawchenko PE 1993 A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry *J Neurosci* **13** 5126-5138
- Chang CP, Pearse RV, 2nd, O'Connell S and Rosenfeld MG 1993 Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain *Neuron* **11** 1187-1195
- Charron J and Drouin J 1986 Glucocorticoid inhibition of transcription from episomal proopiomelanocortin gene promoter *Proc Natl Acad Sci U S A* **83** 8903-8907
- Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, Cobb MH, Marshall MS and Brugge JS 2000 Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338 *Curr Biol* **10** 551-554
- Chen RH, Abate C and Blenis J 1993 Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen- activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** 10952-10956
- Chen RH, Juo PC, Curran T and Blenis J 1996 Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity *Oncogene* **12** 1493-1502
- Chomczynski P and Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction *Anal Biochem* **162** 156-159

- Clark TP and Kempainen RJ 1994 Glucocorticoids do not affect intracellular calcium transients in corticotrophs: Evidence supporting an effect distal to calcium influx *Neuroendocrinology* **60** 273-282
- Clegg CH, Abrahamsen MS, Degen JL, Morris DR and McKnight GS 1992 Cyclic AMP-dependent protein kinase controls basal gene activity and steroidogenesis in Y1 adrenal tumor cells *Biochemistry* **31** 3720-3726
- Cobb MH 1999 MAP kinase pathways *Prog Biophys Mol Biol* **71** 479-500
- Conn PM, Huckle WR, Andrews WV and McArdle CA 1987 The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary *Recent Prog Horm Res* **43** 29-68
- Cook SJ and McCormick F 1993 Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf *Science* **262** 1069-1072
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T and Gutkind JS 1995 The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway *Cell* **81** 1137-1146
- Costas M, Trapp T, Paez Pereda M, Sauer J, Rupprecht R, Nahmod VE, Reul JM, Holsboer F and Arzt E 1996 Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* **98** 1409-1416
- Crawford PA, Sadovsky Y, Woodson K, Lee SL and Milbrandt J 1995 Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice *Mol Cell Biol* **15** 4331-4336
- Crespo P, Xu N, Simonds WF and Gutkind JS 1994 Ras-dependent activation of MAPK pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits *Nature* **369** 418-420
- Crews C, Alessandrini A and Erikson R 1992 The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product *Science* **258** 478-480
- Daaka Y, Luttrell LM and Lefkowitz RJ 1997 Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A *Nature* **390** 88-91
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L and Levin N 1987 Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B *Recent Prog Horm Res* **43** 113-173
- Davis IJ, Hazel TG, Chen RH, Blenis J and Lau LF 1993 Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77 *Mol Endocrinol* **7** 953-964

- Davis IJ and Lau LF 1994 Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands *Mol Cell Biol* **14** 3469-3483
- Davis RJ 1993 The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway *J Biol Chem* **268** 14553-14556
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A and Bos JL 1998 Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP *Nature* **396** 474-477
- De Souza EB 1987 Corticotropin-releasing factor receptors in the rat central nervous system: characterization and regional distribution *J Neurosci* **7** 88-100
- De Souza EB 1995 Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders *Psychoneuroendocrinology* **20** 789-819
- De Souza EB, Whitehouse PJ, Kuhar MJ, Price DL and Vale WW 1986 Reciprocal changes in corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity and CRF receptors in cerebral cortex of Alzheimer's disease *Nature* **319** 593-595
- del Rey A, Besedovsky H and Sorkin E 1984 Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice *J Immunol* **133** 572-575
- Dent P, Haser W, Hasted TAJ, Vincent LA, Roberts TM and Sturgill TW 1992 Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro *Science* **257** 1404-1407
- Dent P, Reardon DB, Morrison DK and Sturgill TW 1995 Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro *Mol Cell Biol* **15** 4125-4135
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M and Davis RJ 1994 JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain *Cell* **76** 1025-1037
- DeSouza E, Webster EL, Grigoriadis DE and Tracey DE 1989 Corticotropin-releasing factor (CRF) and interleukin-1 (IL-1) receptors in the brain-pituitary-immune axis. *Psychopharmacol. Bull.* **25** 299-305
- Diaz B, Barnard D, Filson A, MacDonald SG, King A and Marshall M 1997 Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event

for Ras-dependent activation and biological signaling *Mol. Cell Biol.* **17** 4509-4516

- Dinarello CA 1994 The interleukin-1 family: 10 years of discovery *Faseb J* **8** 1314-1325

- Drouin J, Maira M and Philips A 1998 Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription *J Steroid Biochem Mol Biol* **65** 59-63

- Dugan LL, Kim JS, Zhang Y, Bart RD, Sun Y, Holtzman DM and Gutmann DH 1999 Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf *J. Biol. Chem.* **274** 25842-25848

- Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ and Stone JC 1998 RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs *Science* **280** 1082-1086

- Egea J, Espinet C, Soler RM, Peiro S, Rocamora N and Comella J 2000 Nerve growth factor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is modulated by Ca⁺ and calmodulin *Mol. Cell Biol.* **20** 1931-1946

- English JD and Sweatt JD 1996 Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation *J Biol Chem* **271** 24329-24332

- Erlichman J, Litvin Y and Fleischer N 1984 Immunological and molecular characterization of cAMP-dependent protein kinases in AtT-20 cells *J. Biol. Chem.* **259** 10289-10295

- Fabian JR, Daar IO and Morrison DK 1993 Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase *Mol. Cell Biol.* **13** 7170-7179

- Fagarasan MO, Bishop JF, Rinaudo MS and Axelrod J 1990 Interleukin-1 induces early protein phosphorylation and requires only a short exposure for late induced secretion of β -endorphin in a mouse pituitary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87** 2555-2559

- Fagarasan MO, Eskay R and Axelrod J 1989 Interleukin 1 potentiates the secretion of beta-endorphin induced by secretagogues in a mouse pituitary cell line (AtT-20) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** 2070-2073

- Fahrner TJ, Carroll SL and Milbrandt J 1990 The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally *Mol Cell Biol* **10** 6454-6459
- Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H and Moran MF 1997 Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras *Mol Cell Biol* **17** 1396-1406
- Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME and Feig LA 1995 Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF *Nature* **376** 524-527
- Fernandez PM, Brunel F, Jimenez MA, Saez JM, Cereghini S and Zakin MM 2000 Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **141** 2392-2400
- Ferrara N, Winer J and Henzel WJ 1992 Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** 698-702
- Ferrell JJ 1996 Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs *Trends Biol. Sci.* **21** 460-466
- Ferrell JJ and Machleder EM 1998 The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes *Science* **280** 895-898
- Franke B, Akkerman JW and Bos JL 1997 Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets *Embo J* **16** 252-259
- Freed E, Symons M, MacDonald SG, McCormick F and Ruggieri R 1994 Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation *Science* **265** 1713-1716
- Frost JA, Steen H, Shapiro PS, Lewis R, Ahn J, Shaw PE and Cobb MH 1997 Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins *EMBO J.* **16** 6426-6438
- Gabellec MM, Griffais R, Fillion G and Haour F 1995 Expression of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment *Brain Res Mol Brain Res* **31** 122-130
- Gaillard RC, Turnill D, Sappino P and Muller AF 1990 Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors *Endocrinology* **127** 101-106

- Gatti S and Bartfai T 1993 Induction of tumor necrosis factor- α mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6 *Brain Res* **624** 291-294
- Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Katsanou ES and Hillhouse EW 2000 Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1 α and R2 β CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins *Mol Endocrinol* **14** 2076-2091
- Green VL, Atkin SL, Speirs V, Jeffreys RV, Landolt AM, Mathew B, Hipkin L and White MC 1996 Cytokine expression in human anterior pituitary adenomas *Clin Endocrinol (Oxf)* **45** 179-185
- Grewal SS, Fass DM, Yao H, Ellig CL, Goodman RH and Stork PJS 2000a Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway *J. Biol. Chem.* **275** 34433-34441
- Grewal SS, Horgan AM, York RD, Withers GS, Banker GA and Stork PJ 2000b Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase *J Biol Chem* **275** 3722-3728
- Gupta S, Campbell D, Derijard B and Davis RJ 1995 Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway *Science* **267** 389-393
- Gwosdow AR, O'Connell NA, Spencer JA, Kumar MS, Agarwal RK, Bode HH and Abou-Samra AB 1992 Interleukin-1-induced corticosterone release occurs by an adrenergic mechanism from rat adrenal gland *Am J Physiol* **263** E461-466
- Gwosdow AR, O'Connell NA and Abou-Samra AB 1994 Interleukin-1 increases protein kinase A activity by a cAMP-independent mechanism in AtT-20 cells. *Am. J. Physiol.* **266** E79-E84
- Hafner S, Adler HS, Mischak H, Janosch P, Heidecker G, Wolfman A, Pippig S, Lohse M, Ueffing M and Kolch W 1994 Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A *Mol Cell Biol* **14** 6696-6703
- Hagemann C and Rapp UR 1999 Isotype-specific functions of Raf kinases *Exp. Cell Res.* **253** 34-36

- Haisenleder DJ, Cox ME, Parsons SJ and Marshall JC 1998 Gonadotropin-releasing hormone pulses are required to maintain activation of mitogen-activated protein kinase: role in stimulation of gonadotrope gene expression *Endocrinology* **139** 3104-3111
- Hamilton M and Wolfman A 1998 Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo *Oncogene* **16** 1417-1428
- Hanahan D 1983 Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids *J Mol Biol* **166** 557-580
- Hanisch A, Dieterich KD, Dietzmann K, Ludecke K, Buchfelder M, Fahlbusch R and Lehnert H 2000 Expression of members of the interleukin-6 family of cytokines and their receptors in human pituitary and pituitary adenomas *J Clin Endocrinol Metab* **85** 4411-4414
- Harbuz MS, Stephanou A, Knight RA, Chover-Gonzalez AJ and Lightman SL 1992 Action of interleukin-2 and interleukin-4 on CRF mRNA in the hypothalamus and POMC mRNA in the anterior pituitary *Brain Behav Immun* **6** 214-222
- Hashimoto K, Nishioka T, Tojo C and Takao T 1995 Nitric oxide plays no role in ACTH release induced by interleukin-1 beta, corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin and phorbol myristate acetate in rat pituitary cell cultures *Endocr J* **42** 435-439
- Hazel TG, Misra R, Davis IJ, Greenberg ME and Lau LF 1991 Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment *Mol Cell Biol* **11** 3239-3246
- Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH and Polley HF 1949 The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxycorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis *Mayo Clinic Proc.* **24** 181-197
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A and Karin M 1993 Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain *Genes Dev* **7** 2135-2148
- Hirata Y, Kiuchi K, Chen HC, Milbrandt J and Guroff G 1993 The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B *J Biol Chem* **268** 24808-24812

- Hirata Y, Whalin M, Ginty DD, Xing J, Greenberg ME, Milbrandt J and Guroff G 1995 Induction of a nerve growth factor-sensitive kinase that phosphorylates the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B *J Neurochem* **65** 1780-1788
- Holsboer F, Stalla GK, von Bardeleben U, Hammann K, Muller H and Muller OA 1988 Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls *Life Sci* **42** 1-5
- Honkaniemi J, Kononen J, Kainu T, Pyykonen I and Pelto-Huikko M 1994 Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress *Brain Res Mol Brain Res* **25** 234-241
- Howard PW and Maurer RA 1994 Thyrotropin releasing hormone stimulates transient phosphorylation of the tissue-specific transcription factor, Pit-1 *J Biol Chem* **269** 28662-28669
- Hsieh KP and Martin TF 1992 Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11 *Mol Endocrinol* **6** 1673-1681
- Huang C-Y and Ferrell JJ 1996 Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** 10078-10083
- Hunter T 1995 protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling *Cell* **80** 225-236
- Hwung YP, Wang LH, Tsai SY and Tsai MJ 1988 Differential binding of the chicken ovalbumin upstream promoter (COUP) transcription factor to two different promoters *J Biol Chem* **263** 13470-13474
- Imura H 1985 ACTH and related peptides: molecular biology, biochemistry and regulation of secretion *Clin Endocr Metab* **14** 845-866
- Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF and Adcock IM 2002 p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma *J Allergy Clin Immunol* **109** 649-657
- Iwasaki Y, Aoki Y, Katahira M, Oiso Y and Saito H 1997 Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein *Biochem Biophys Res Commun* **235** 295-299

- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Jr., Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D and Brown PO 1999 The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum *Science* **283** 83-87
- Jacobson L and Sapolsky R 1991 The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic- pituitary-adrenocortical axis *Endocr Rev* **12** 118-134
- Jaffe HL 1924 The influence of the suprarenal gland on the thymus III. Stimulation of the growth of the thymus gland following double suprarenalectomy in young rats. *J. Exp. Med* **40** 753-760
- Jaiswal RK, Weissinger E, Kolch W and Landreth GE 1996 Nerve Growth factor-mediated activation of the mitogen activated protein (MAP) kinase cascade involves a signaling complex containing b-Raf and HSP90 *J. biol. Chem.* **271** 23626-23629
- Jingami H, Matsukura S, Numa S and Imura H 1985 Effects of adrenalectomy and dexamethasone administration on the level of prepro-corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamus and adrenocorticotropin/beta-lipotropin precursor mRNA in the pituitary in rats *Endocrinology* **117** 1314-1320
- Karanth S and McCann SM 1991 Anterior pituitary hormone control by interleukin 2 *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** 2961-2965
- Karin M and Chang L 2001 AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level *J Endocrinol* **169** 447-451
- Katagiri Y, Hirata Y, Milbrandt J and Guroff G 1997 Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor *J Biol Chem* **272** 31278-31284
- Katahira M, Iwasaki Y, Aoki Y, Oiso Y and Saito H 1998 Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells *Endocrinology* **139** 2414-2422
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE and Graybiel AM 1998 A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1 *Science* **282** 2275-2279

- Keane KM, Giegel DA, Lipinski WJ, Callahan MJ and Shivers BD 1995 Cloning, tissue expression and regulation of rat interleukin 1 beta converting enzyme *Cytokine* **7** 105-110
- Keller-Wood ME and Dallman MF 1984 Corticosteroid inhibition of ACTH secretion *Endocr Rev* **5** 1-24
- Kiang JG 1997 Corticotropin-releasing factor-like peptides increase cytosolic [Ca²⁺] in human epidermoid A-431 cells *Eur J Pharmacol* **329** 237-244
- Kievit P, Lauten JD and Maurer RA 2001 Analysis of the role of the mitogen-activated protein kinase in mediating cyclic-adenosine 3',5'-monophosphate effects on prolactin promoter activity *Mol Endocrinol* **15** 614-624
- Kimura A, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Ikegami H, Hayakawa J, Hisamoto K, Morishige K, Hinuma S, Kurachi H and Murata Y 2000 Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase *J Biol Chem* **275** 3667-3674
- Kishimoto T, Pearce RV, 2nd, Lin CR and Rosenfeld MG 1995 A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 1108-1112
- Klug A and Schwabe JW 1995 Protein motifs 5. Zinc fingers *Faseb J* **9** 597-604
- Koenig JI, Snow K, Clark BD, Toni R, Cannon JG, Shaw AR, Dinarello CA, Reichlin S, Lee SL and Lechan RM 1990 Intrinsic pituitary interleukin-1 beta is induced by bacterial lipopolysaccharide *Endocrinology* **126** 3053-3058
- Kolch W, Heldecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D and Rapp U 1993 Protein kinase Ca activates Raf-1 by direct phosphorylation *Nature* **364** 249-255
- Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M and Nishida E 1992 Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation *EMBO J* **11** 2903-2908
- Krishnan R, Ellinwood EH, Jr., Laszlo J, Hood L and Ritchie J 1987 Effect of gamma interferon on the hypothalamic-pituitary-adrenal system *Biol Psychiatry* **22** 1163-1166
- kyriakis JM, App H, Zhang X-F, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR and Avruch J 1992 Raf-1 activates MAP kinase-kinase *Nature* **358** 417-421

- Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A and Drouin J 2001 A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins *Cell* **104** 849-859
- Langer SJ, Bortner DM, Roussel MF, Sherr CJ and Ostrowski MC 1992 Mitogenic signaling by colony-stimulating factor 1 and ras is suppressed by the ets-2 DNA-binding domain and restored by myc overexpression *Mol Cell Biol* **12** 5355-5362
- Lee AK and Tse A 1997 Mechanism underlying corticotropin-releasing hormone (CRH) triggered cytosolic Ca rise in identified rat corticotrophs *J. Physiol.* **504** 367-378
- Leever SJ, Paterson HF and Marshall CJ 1994 Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane *Nature* **369** 411-414
- Lewis TS, Shapiro PS and Ahn NG 1998 Signal transduction through MAP kinase cascades *Adv Cancer Res* **74** 49-139
- Li Calzi S, Periyasamy S, Li da P and Sanchez ER 2002 Vanadate increases glucocorticoid receptor-mediated gene expression: a novel mechanism for potentiation of a steroid receptor *J Steroid Biochem Mol Biol* **80** 35-47
- Litvin Y, PasMantier R, Fleischer N and Erlichman J 1984 Hormonal activation of the cAMP-dependent protein kinases in AtT20 cells *J. Biol. Chem.* **259** 10296-10302
- Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M and Low MJ 1992 Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice *Mol Cell Biol* **12** 3978-3990
- Liu B, Mortrud M and Low MJ 1995 DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice *Biochem J* **312** (Pt 3) 827-832
- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB and Oltersdorf T 1995 Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin- releasing factor receptor subtype from rat brain *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 836-840
- Luini A, Lewis D, Guild S, Corda D and Axelrod J 1985 Hormone secretagogues increase cytosolic calcium by increasing cAMP in corticotropin-secreting cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82** 8034-8038

- Lyson K and McCann SM 1991 The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro *Neuroendocrinology* **54** 262-266
- M'Rabet L, Coffe P, Zwartkruis F, Franke B, Segal AW, Koenderman L and Bos JL 1998 Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils *Blood* **92** 2133-2140
- Maira M, Martens C, Philips A and Drouin J 1999 Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation *Mol Cell Biol* **19** 7549-7557
- Mangelsdorf DJ and Evans RM 1995 The RXR heterodimers and orphan receptors *Cell* **83** 841-850
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and et al. 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade *Cell* **83** 835-839
- Mansour SJ, Resing KA, Candia JM, Hermann AS, Gloor JW, Herskind KR, Wartmann M, Davis RJ and Ahn J 1994 Mitogen activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis *J. Biochem.* **116** 304-314
- Marquette C, Van Dam AM, Ban E, Laniece P, Crumeyrolle-Arias M, Fillion G, Berkenbosch F and Haour F 1995 Rat interleukin-1 beta binding sites in rat hypothalamus and pituitary gland *Neuroendocrinology* **62** 362-369
- Marshall CJ 1995 Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation *Cell* **80** 179-85
- Maruyama K, Tsukada T, Bando S, Sasaki K, Ohkura N and Yamaguchi K 1995 Expression of NOR-1 and its closely related members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily in human neuroblastoma cell lines *Cancer Lett* **96** 117-122
- Maruyama K, Tsukada T, Bando S, Sasaki K, Ohkura N and Yamaguchi K 1997 Retinoic acids differentially regulate NOR-1 and its closely related orphan nuclear receptor genes in breast cancer cell line MCF-7 *Biochem Biophys Res Commun* **231** 417-420
- Matsuuchi L and Kelly RB 1991 Constitutive and basal secretion from the endocrine cell line, AtT-20 *J Cell Biol* **112** 843-852

- McKay LI and Cidlowski JA 1998 Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism *Mol Endocrinol* **12** 45-56
- McKean DJ, Bell M, Huntoon C, Rastogi S, Norstrand MV, Podzorski R, Nilson A and Paya C 1995 IL-1 receptor and TCR signals synergize to activate NF- κ B mediated gene transcription. *Int. Immunol.* **7** 9-20
- McLeod SJ, Ingham RJ, Bos JL, Kurosaki T and Gold MR 1998 Activation of the Rap1 GTPase by the B cell antigen receptor *J Biol Chem* **273** 29218-29223
- Melik Parsadaniantz S, Levin N, Lenoir V, Roberts JL and Kerdelhue B 1994 Human interleukin 1 beta: corticotropin releasing factor and ACTH release and gene expression in the male rat: in vivo and in vitro studies *J Neurosci Res* **37** 675-682
- Milenkovic L, Rettori V, Snyder GD, Beutler B and McCann SM 1989 Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action in vitro *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** 2418-2422
- Mischak H, Seitz T, Janosch P, Eulitz M, Steen H, Schellerer M, Philipp A and Kolch W 1996 Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621 *Mol Cell Biol* **16** 5409-5418
- Mitchell R, Sim PJ, Leslie T, Johnson MS and Thomson FJ 1994 Activation of MAP kinase associated with the priming effect of LHRH *J Endocrinol* **140** R15-18
- Moore HP, Gumbiner B and Kelly RB 1983 Chloroquine diverts ACTH from a regulated to a constitutive secretory pathway in AtT-20 cells *Nature* **302** 434-436
- Morrison DK and Cutler RE 1997 The complexity of Raf-1 regulation *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 174-179
- Mu YM, Takayanagi R, Imasaki K, Ohe K, Ikuyama S, Yanase T and Nawata 1998 Low level of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in adenomas manifesting Cushing's disease with resistance to a high dose dexamethasone suppression test *Clin Endocrinol* **49** 301-306
- Muller MB, Landgraf R, Preil J, Sillaber I, Kresse AE, Keck ME, Zimmermann S, Holsboer F and Wurst W 2000 Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing

hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids *Endocrinology* **141** 4262-4269

- Mulvaney JM and Roberson MS 2000 Divergent signaling pathways requiring discrete calcium signals mediate concurrent activation of two mitogen-activated protein kinases by gonadotropin-releasing hormone *J Biol Chem* **275** 14182-14189

- Murphy EP, Dobson ADW, Keller CH and Connely OM 1995 Differential regulation of transcription by the Nurr1/Nur77 subfamily of nuclear transcription factors. *Gene Express.* **5** 169-179

- Nagamoto-Combs K, Piech KM, Best JA, Sun B and Tank AW 1997 Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation *J Biol Chem* **272** 6051-6058

- Naito Y, Fukata J, Tominaga T, Masui Y, Hirai Y, Murakami N, Tamai S, Mori K and Imura H 1989 Adrenocorticotrophic hormone-releasing activities of interleukins in a homologous in vivo system *Biochem Biophys Res Commun* **164** 1262-1267

- Naitoh Y, Fukata J, Tominaga T, Nakai Y, Tamai S, Mori K and Imura H 1988 Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats *Biochem Biophys Res Commun* **155** 1459-1463

- Nakai A, Kartha S, Sakurai A, Toback FG and DeGroot LJ 1990 A human early response gene homologous to murine nur77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily *Mol Endocrinol* **4** 1438-1443

- Neta R, Perlstein R, Vogel SN, Ledney GD and Abrams J 1992 Role of interleukin 6 (IL-6) in protection from lethal irradiation and in endocrine responses to IL-1 and tumor necrosis factor *J Exp Med* **175** 689-694

- Nett MA, Cerretti DP, Berson DR, Seavitt J, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Black RA and Chaplin DD 1992 Molecular cloning of the murine IL-1 beta converting enzyme cDNA *J Immunol* **149** 3254-3259

- Newell-Price J, Trainer P, Besser M and Grossman A 1998. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states *Endocr Rev* **19** 647-672

- Nguyen TT, Scimeca JC, Filloux C, Peraldi P, Carpentier JL and Van Obberghen E 1993 Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor *J Biol Chem* **268** 9803-9810
- Ogata T, Nakamura Y and Schubert P 1996 Potentiated cAMP rise in metabotropically stimulated rat cultured astrocytes by a Ca²⁺-related A1/A2 adenosine receptor cooperation *Eur J Neurosci* **8** 1124-1131
- Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T and Yamaguchi K 1999 An isoform of Nurr1 as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1444** 69-79
- Okabe T, Takayanagi R, Adachi M, Imasaki K and Nawata H 1998 Nur77, a member of the steroid receptor superfamily, antagonizes negative feedback of ACTH synthesis and secretion by glucocorticoid in pituitary corticotrope cells *J Endocrinol* **156** 169-175
- Okada T, Hu CD, Jin TG, Kariya K, Yamawaki-Kataoka Y and Kataoka T 1999 The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases *Mol. Cell Biol.* **19** 6057-6064
- Parnet P, Brunke DL, Goujon E, Mainard JD, Biragyn A, Arkins S, Dantzer R and Kelley KW 1993 Molecular identification of two types of interleukin-1 receptors in the murine pituitary gland *J Neuroendocrinol* **5** 213-219
- Parsadaniantz SM, Batsché E, Gegout-Pottie P, Terlain B, Gillet P, Netter P and Kerdelhué B 1997 Effects of continuous infusion of Interleukin-1 β on corticotropin-releasing hormone (CRH), CRH receptors, proopiomelanocortin gene expression and secretion of corticotropin, β -endorphin and corticosterone. *Neuroendocrinology* **65** 53-63
- Parsadaniantz SM, Gaillet S, Malaval F, Lenoir V, Batsche E, Barbanel G, Gardier A, Terlain B, Jacquot C, Szafarczyk A and et al. 1995 Lesions of the afferent catecholaminergic pathways inhibit the temporal activation of the CRH and POMC gene expression and ACTH release induced by human interleukin-1 β in the male rat *Neuroendocrinology* **62** 586-595
- Pawson T and Scott JD 1997 Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins *Science* **278** 2075-2080

- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her J-H, Shananowitz J, Hunt DF, Weber MJ and Sturgill TW 1991 Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen activated protein kinase (MAP kinase) *EMBO J.* **10** 885-892
- Payne LC, Weigent DA and Blalock JE 1994 Induction of pituitary sensitivity to interleukin-1: a new function for corticotropin-releasing hormone *Biochem Biophys Res Commun* **198** 480-484
- Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B-E, Karandikar M, Berman K and Cobb MH 2001 Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions *Endocr. Rev.* **22** 153-183
- Pekarsky Y, Hallas C, Palamarchuk A, Koval A, Bullrich F, Hirata Y, Bichi R, Letofsky J and Croce CM 2001 Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77 *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** 3690-3694
- Paez Pereda M, Lohrer P, Kovalovsky D, Perez Castro C, Goldberg V, Losa M, Chervin A, Berner S, Molina H, Stalla GK, Renner U and Arzt E 2000 Interleukin-6 is inhibited by glucocorticoids and stimulates ACTH secretion and POMC expression in human corticotroph pituitary adenomas *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108** 202-207
- Perlmann T and Jansson L 1995 A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1 *Genes Dev* **9** 769-782
- Perlstein RS, Mougey EH, Jackson WE and Neta R 1991 Interleukin-1 and interleukin-6 act synergistically to stimulate the release of adrenocorticotrophic hormone in vivo. *Lymphokine Cytokine Res.* **10** 141-146
- Peterson SN, Trabalzini L, Brtva TR, Fischer T, Altschuler DL, Martelli P, Lapetina EG, Der CJ and White GC 1996 Identification of a novel RalGDS-related protein as a candidate effector for Ras and Rap1 *J. Biol. Chem.* **271** 29903-29908
- Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P and Drouin J 1997a Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell Biol.* **17** 5946-5951
- Philips A, Maira M, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P and Drouin J 1997b Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription *Mol Cell Biol* **17** 5952-5959

- Phillips M and Tashjian AH, Jr. 1982 Characterization of an early inhibitory effect of glucocorticoids on stimulated adrenocorticotropin and endorphin release from a clonal strain of mouse pituitary cells *Endocrinology* **110** 892-900
- Plotsky PM, Bruhn TO and Vale W 1985 Hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion in response to insulin-induced hypoglycemia *Endocrinology* **117** 323-329
- Plotsky PM and Sawchenko PE 1987 Hypophysial-portal plasma levels, median eminence content, and immunohistochemical staining of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin after pharmacological adrenalectomy *Endocrinology* **120** 1361-1369
- Price MA, Cruzalegui FH and Treisman R 1996 The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light *Embo J* **15** 6552-6563
- Price MA, Rogers AE and Treisman R 1995 Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET) *Embo J* **14** 2589-2601
- Prowse CN, Hagopian JC, Cobb MH, Ahn NG and Lew J 2000 Catalytic reaction pathway for the mitogen-activated protein kinase ERK2 *Biochemistry* **39** 6258-6266
- Qi LJ, Leung AT, Xiong Y, Marx KA and Abou-Samra AB 1997 Extracellular cysteines of the corticotropin-releasing factor receptor are critical for ligand interaction *Biochemistry* **36** 12442-12448
- Qian NX, Winitz S and Johnson GL 1993 Epitope-tagged Gq alpha subunits: expression of GTPase-deficient alpha subunits persistently stimulates phosphatidylinositol-specific phospholipase C but not mitogen-activated protein kinase activity regulated by the M1 muscarinic acetylcholine receptor *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** 4077-4081
- Qiu W, Zhuang S, von Lintig FC, Boss GR and Pilz RB 2000 Cell type-specific regulation of B-raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins *J. Biol. Chem.* **275** 31921-31929
- Ray D and Melmed S 1997 Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr. Rev.* **18** 206-228

- Ray DW, Ren SG and Melmed S 1996 Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway *J Clin Invest* **97** 1852-1859
- Regenhard P, Goethe R and Phi-van L 2001 Involvement of PKA, PKC, and Ca²⁺ in LPS-activated expression of the chicken lysozyme gene *J Leukoc Biol* **69** 651-658
- Richards JS 2001 New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells *Mol. Endocrinol.* **15** 209-218
- Rivier C and Vale W 1983 Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo *Endocrinology* **113** 939-942
- Rivier CL and Plotsky PM 1986 Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adeno-hypophysial hormone secretion *Annu Rev Physiol* **48** 475-494
- Roberts JL, Budarf ML, Baxter JD and Herbert E 1979 Selective reduction of proadrenocorticotropin/endorphin proteins and messenger ribonucleic acid activity in mouse pituitary tumor cells by glucocorticoids *Biochemistry* **18** 4907-4915
- Robinson MJ, Cheng M, khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan K, Stein B, Goldsmith E and Cobb MH 1996a Contribution of the MAP kinase backbone and phosphorylation lip to MEK specificity *J. Biol. Chem.* **271** 29734-29739
- Robinson MJ, Harkins PC, Zhang J, Baer R, Haycock JW, Cobb MH and Goldsmith EJ 1996b Mutation of position 52 in ERK2 creates a nonproductive binding mode for ATP *Biochemistry* **35** 5641-5646
- Roh MS, Drazenovich KA, Barbose JJ, Dinarello CA and Cobb CF 1987 Direct stimulation of the adrenal cortex by interleukin-1 *Surgery* **102** 140-146
- Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, Cool RH, Nijman SMB, Wittinghofer A and Bos JL 1998 Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP *Nature* **396** 474-477
- Rossant CJ, Pinnock RD, Hughes J, Hall MD and McNulty S 1999 Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2alpha receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'- monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase *Endocrinology* **140** 1525-1536

- Rossomando AJ, Dent P, Sturgill TW and marshak DR 1994 Mitogen activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation *Mol. Cell Biol.* **14** 1594-1602
- Rowan BG, Weigel NL and O'Malley BW 2000 Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen- activated protein kinase pathway *J Biol Chem* **275** 4475-4483
- Rubinstein M, Mortrud M, Liu B and Low MJ 1993 Rat and mouse proopiomelanocortin gene sequences target tissue-specific expression to the pituitary gland but not to the hypothalamus of transgenic mice *Neuroendocrinology* **58** 373-380
- Sandi C and Guaza C 1995 Evidence for a role of nitric oxide in the corticotropin-releasing factor release induced by interleukin-1 beta *Eur J Pharmacol* **274** 17-23
- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P and Vale W 1987 Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin- releasing factor *Science* **238** 522-524
- Saucedo-Cardenas O and Conneely OM 1996 Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system *J Mol Neurosci* **7** 51-63
- Sawchenko PE, Brown ER, Chan RK, Ericsson A, Li HY, Roland BL and Kovacs KJ 1996 The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress *Prog Brain Res* **107** 201-222
- Sawchenko PE, Swanson LW and Vale WW 1984 Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** 1883-1887
- Schecterson LC and Mcknight GS 1991 Role of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in hormone-stimulated β -endorphin secretion in AtT20 cells *Mol. Endocrinol.* **5** 170-178
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA and Baldwin AS, Jr. 1995 Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors *Mol Cell Biol* **15** 943-953

- Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ and Parker PJ 1998 Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase C isoforms *Mol. Cell Biol.* **18** 790-798
- Schulte TW, Blagosklonny MV, Ingui C and Neckers L 1995 Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association *J. Biol. Chem.* **270** 24585-24588
- Scully KM and Rosenfeld MG 2002 Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis *Science* **295** 2231-2235
- Seidel MG, Klinger M, Freissmuth M and Iler C 1999 Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21 (ras)-dependent pathway *J. Biol. Chem.* **274** 25833-25841
- Selye H 1936 A syndrome produced by diverse noxious agents *Nature* **138** 32
- Seternes OM, Johansen B and Moens U 1999 A dominant role for the Raf-MEK pathway in forskolin, 12-O-tetradecanoyl-phorbol acetate, and platelet-derived growth factor-induced CREB (cAMP-responsive element-binding protein) activation, uncoupled from serine 133 phosphorylation in NIH 3T3 cells *Mol. Endocrinol.* **13** 1071-1083
- Sheng C-F and Guan K 1994 Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues *EMBO J.* **13** 1123-1131
- Smith LR, Brown SL and Blalock JE 1989 Interleukin-2 induction of ACTH secretion: presence of an interleukin-2 receptor alpha-chain-like molecule on pituitary cells *J Neuroimmunol* **21** 249-254
- Spangelo BL, Isakson PC and MacLeod RM 1990a Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide *Endocrinology* **127** 403-409
- Spangelo BL, Judd AM, MacLeod RM, Goodman DW and Isakson PC 1990b Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamic cells *Endocrinology* **127** 1779-1785
- Stancato LF, Silverstein AM, Owens-Grillo JK, Chow YH, Jove R and Pratt WB 1997 The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase *J. Biol. Chem.* **272** 4013-4020

- Stefana B, Ray DW and Melmed S 1996 Leukemia inhibitory factor induces differentiation of pituitary corticotroph function: an immuno-neuroendocrine phenotypic switch *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** 12502-12506
- Stojilkovic SS, Reinhart J and Catt KJ 1994 Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways *Endocr Rev* **15** 462-499
- Strahl T, Gille H and Shaw PE 1996 Selective response of ternary complex factor Sap1a to different mitogen- activated protein kinase subgroups *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** 11563-11568
- Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H and Shizume K 1983 Effects of bilateral adrenalectomy on immunoreactive corticotropin- releasing factor in the rat median eminence and intermediate-posterior pituitary *Endocrinology* **113** 1182-1184
- Suda T, Tozawa F, Ushiyama T, Sumitomo T, Yamada M and Demura H 1990 Interleukin-1 stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in rat hypothalamus *Endocrinology* **126** 1223-1228
- Suda T, Tozawa F, Yamada M, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, Nakagami Y, Demura H and Shizume K 1988 Effects of corticotropin-releasing hormone and dexamethasone on proopiomelanocortin messenger RNA level in human corticotroph adenoma cells in vitro *J Clin Invest* **82** 110-114
- Sundar SK, Becker KJ, Cierpial MA, Carpenter MD, Rankin LA, Fleener SL, Ritchie JC, Simson PE and Weiss JM 1989 Intracerebroventricular infusion of interleukin 1 rapidly decreases peripheral cellular immune responses *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** 6398-6402
- Sundaresan S, Colin IM, Pestell RG and Jameson JL 1996 Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin- releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C *Endocrinology* **137** 304-311
- Takano K, Yasufuku-Takano J and Fujita T 1998 Rapid responses to steroid hormones. 1st International meeting. Mannheim, Germany, September 18-20, 1998. Abstracts *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **106** A39-61
- Takao T, Culp SG and De Souza EB 1993 Reciprocal modulation of interleukin-1 beta (IL-1 beta) and IL-1 receptors by lipopolysaccharide (endotoxin) treatment in the mouse brain-endocrine-immune axis *Endocrinology* **132** 1497-1504

- Takao T, Dieterich KD, Tracey DE and De Souza EB 1994 Cyclic AMP-dependent modulation of interleukin-1 receptors in the mouse AtT-20 pituitary tumor cell line *Brain Res* **656** 177-181
- Takao T, Hashimoto K and De Souza EB 1995a Interleukin-1 receptors in the brain-endocrine-immune axis. Modulation by stress and infection *Ann N Y Acad Sci* **771** 372-385
- Takao T, Tojo C, Nishioka T, Hashimoto K and De Souza EB 1995b Corticotropin-releasing factor treatment upregulates interleukin-1 receptors in the mouse pituitary: reversal by dexamethasone *Brain Res* **688** 219-222
- Takao T, Tojo C, Nishioka T, Makino S, Hashimoto K and De Souza EB 1996 Stress-induced upregulation of pituitary interleukin-1 receptors is mediated by corticotropin releasing factor *Life Sci* **59** PL165-168
- Tatsuno I, Somogyvari-Vigh A, Mizuno K, Gottschall PE, Hidaka H and Arimura A 1991 Neuropeptide regulation of interleukin-6 production from the pituitary: stimulation by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and calcitonin gene-related peptide *Endocrinology* **129** 1797-1804
- Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ and Mahadevan LC 1999 The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase *Embo J* **18** 4779-4793
- Tilders FJ, Schmidt ED and de Goeij DC 1993 Phenotypic plasticity of CRF neurons during stress *Ann N Y Acad Sci* **697** 39-52
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F and Wurst W 1998 Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1 [10ee comments] *Nat Genet* **19** 162-166
- Todd VL, Atkin SL, Speirs V and White MC 1995 PCR expression of cytokines in anterior pituitary adenomas. *J. Endocrinol.* **144** P285
- Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Usui T, Murakami N, Fukushima M, Nakai Y, Hirai Y and Imura H 1991 Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins *Endocrinology* **128** 526-531
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, 3rd, Zentella A, Albert JD and et al. 1986 Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin *Science* **234** 470-474

- Tsagarakis S, Gillies G, Rees LH, Besser M and Grossman A 1989 Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotrophin releasing factor from rat hypothalamus *Neuroendocrinology* **49** 98-101
- Tsygankova OM, Saavedra A, Rebhun JF, Quilliam LA and Meinkoth JL 2001 Coordinated regulation of Rap1 and thyroid differentiation by cyclic AMP and protein kinase A *Mol. Cell Biol.* **21** 1921-1929
- Turnbull AV and Rivier C 1997 Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides *Proc Soc Exp Biol Med* **215** 1-10
- Turnbull AV and Rivier CL 1999 Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action *Physiol Rev* **79** 1-71
- Vale W, Rivier C, Yang L, Minick S and Guillemin R 1978 Effects of purified hypothalamic corticotropin-releasing factor and other substances on secretion of adrenocorticotropin and β -endorphin-like immunoreactivities in vitro *Endocrinology* **103** 1910-1978
- Vale W, Spiess J, Rivier C and Rivier J 1981 Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin *Science* **213** 1394-1397
- Vale W, Vaughan J, Smith M, Yamamoto G, Rivier J and Rivier C 1983 Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells *Endocrinology* **113** 1121-1131
- Vankelecom H, Carmeliet P, Heremans H, Van Damme J, Dijkmans R, Billiau A and Deneef C 1990 Interferon-gamma inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures *Endocrinology* **126** 2919-2926
- Von Dreden G, Loeffler JP, Grimm C and Holtt V 1988 Influence of calcium ions on proopiomelanocortin mRNA levels in anterior clonal pituitary cells *Neuroendocrinology* **47** 32-37
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS and Stork PJ 1997a cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf and Rap1-dependent pathway *Cell* **89** 73-82

- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS and Stork PJ 1997b cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway *Cell* **89** 73-82
- Watanobe H, Sasaki S and Takebe K 1995 Role of prostaglandins E1, E2 and F2 alpha in the brain in interleukin 1 beta-induced adrenocorticotropin secretion in the rat *Cytokine* **7** 710-712
- Watanobe H and Suda T 2000 A significant role of leukemia inhibitory factor in the brain and periphery in endotoxin stimulation of adrenocorticotropin secretion in the rat *Brain Res* **865** 97-101
- Webster EL, Tracey DE and De Souza EB 1991 Upregulation of interleukin-1 receptors in mouse AtT-20 pituitary tumor cells following treatment with corticotropin-releasing factor *Endocrinology* **129** 2796-2798
- Webster EL, Tracey DE, Jutila MA, Wolfe SA, Jr. and De Souza EB 1990 Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: identification of receptor-bearing cells as resident macrophages *Endocrinology* **127** 440-452
- Wehling M 1997 Specific, nongenomic actions of steroid hormones *Annu Rev Physiol* **59** 365-393
- Whitcomb RW, Linehan WM, Wahl LM and Knazek RA 1988 Monocytes stimulate cortisol production by cultured human adrenocortical cells *J Clin Endocrinol Metab* **66** 33-38
- Whitehurst CE, Owaki H, Bruder JT, Rapp UR and Geppert TD 1995 The MEK kinase activity of the catalytic domain of Raf-1 is regulated independently of Ras binding in T cells *J. Biol. Chem.* **270** 5594-5599
- Whitfeld PL, Seeburg PH and Shine J 1982 The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence, and interspersions with repetitive DNA *DNA* **1** 133-143
- Whitmarsh AJ and Davis RJ 2000 A central control for cell growth *Nature* **403** 255-256
- Williams GT and Lau LF 1993 Activation of the inducible orphan receptor gene *nur77* by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses *Mol Cell Biol* **13** 6124-6136
- Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M and Milbrandt J 1991 Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252** 1296-1300

- Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J and Parker KL 1993 The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase *Mol Cell Biol* **13** 861-868
- Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA and Milbrandt J 1992 Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* **256** 107-110
- Winter JS, Gow KW, Perry YS and Greenberg AH 1990 A stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins *Endocrinology* **127** 1904-1909
- Woloski BM, Smith EM, Meyer WJ, 3rd, Fuller GM and Blalock JE 1985 Corticotropin-releasing activity of monokines *Science* **230** 1035-1037
- Woods MD, Shipston MJ, Mullens EL and Antoni FA 1992 Pituitary corticotrope tumor (AtT20) cells as a model system for the study of early inhibition by glucocorticoids *Endocrinology* **131** 2873-2880
- Woronicz JD, Calnan B, Ngo V and Winoto A 1994 Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T- cell hybridomas *Nature* **367** 277-281
- Woronicz JD, Lina A, Calnan BJ, Szychowski S, Cheng L and Winoto A 1995 Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **15** 6364-6376
- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ and Sturgill TW 1993 Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate *Science* **262** 1065-1069
- Wu Q, Li Y, Liu R, Agadir A, Lee MO, Liu Y and Zhang X 1997 Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization *Embo J* **16** 1656-1669
- Xiong Y, Xie LY and Abou-Samra AB 1995 Signaling properties of mouse and human corticotropin-releasing factor (CRF) receptors: decreased coupling efficiency of human type II CRF receptor *Endocrinology* **136** 1828-1834
- Yaekura K, Kakei M and Yada T 1996 cAMP-signaling pathway acts in selective synergism with glucose or tolbutamide to increase cytosolic Ca²⁺ in rat pancreatic beta-cells *Diabetes* **45** 295-301

- Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Yamamoto H, Igawa H and Saito H 2001 IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TNF receptor-associated factor-6 in nasal fibroblast lines *J Immunol* **167** 283-288
- Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J and Karin M 1990 Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein- protein interaction *Cell* **62** 1205-215
- Youn HD, Sun L, Prywes R and Liu JO 1999 Apoptosis of T cells mediated by Ca-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* **286** 790-793
- Young WS, 3rd, Mezey E and Siegel RE 1986 Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats *Neurosci Lett* **70** 198-203
- Zakarian S, Eleazar MS and Silvers WK 1989 Regulation of pro-opiomelanocortin biosynthesis and processing by transplantation immunity *Nature* **339** 553-556
- Zheng C-F and Guan K 1993 Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2 *J. Biol. Chem.* **268** 11435-11439
- Zwartkruis FJ, Wolthuis RM, Nabben NM, Franke B and Bos JL 1998 Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling *Embo J* **17** 5905-5912